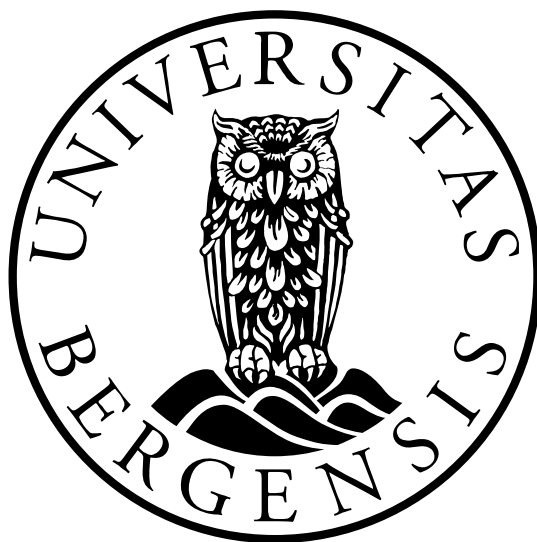


Masteroppgave i farmakologi for graden Master of Pharmacy

TAKROLIMUS

–Farmakokinetikk i tidlig fase etter levertransplantasjon

Ragnhild Gislefoss



Seksjon for farmakologi og endokrinologi
Avdeling for medisinsk biokjemi
Rikshospitalet

Senter for Farmasi
UNIVERSITETET I BERGEN
Vår 2009

Forord

Masteroppgaven ble utført på Rikshospitalet, avdeling for medisinsk biokjemi (MBK) og veiledet av professor Stein Bergan, leder av seksjon for analytisk farmakologi og endokrinologi (SAFE). I løpet av dette året på SAFE har jeg lært mye. Oppgaven har vært spennende og gitt meg nye utfordringer.

En stor takk til Stein som har vært en inspirerende veileder med alltid godt humør og positiv energi. Du har utrolig mye kunnskap som jeg har fått glede av. Takk for hjelp med kurver, tabeller etc. og lesing av oppgaven til alle døgnets tider. Du har en entusiasme som "sprudler" over på oss andre.

Arbeidet på labben har jeg til tider delt med stipendiat Ingjerd. Takk for opplæring i starten og hjelp underveis til det meste. Jeg setter pris på at du alltid var imøtekommende når jeg stakk hodet inn døren. Takk for et supert samarbeid.

LC-MS/MS var en relativ ny metodikk for meg da jeg begynte på oppgaven. Forsker Nils Tore har vært en dyktig veileder for analysearbeidet. Takk for positiv innstilling da jeg maste som verst!

Takk til stipendiat Sara for din interesse og diskusjoner på faglig og ikke minst "ufaglige" områder.

Takk til alle tre for en trivelig tid og for sjampis-driking på østkanten☺

Jeg har satt pris på det!

Det har vært kjekt å være en del av SAFE! Bioingeniørene har bidratt til et hyggelig miljø og påfyll av karbohydrater (det vil bli savnet!). Vi har hatt flotte turer både til fjells og på ski, og hyggelig sammenkomster. Takk for en trivelig tid.

En STOR takk må rettes til mamma, oppgaven hadde ikke blitt ferdig uten deg. Takk for at du var villig til å lære om levertransplantasjon, CYPer og andre farmakokinetiske saker. Husk at ingen lærdom er bortkastet☺

Deretter vil jeg takke pappa for kjøring både tidlig og sent for en til tider sliten student.

Tilslutt vil jeg takke Thomas for oppmuntring, selv da du ikke skjønnte hva frustrasjonen gjaldt. Du har vært flink til å støtte meg underveis, men også trekke meg ut av min lille "masterboble" innimellom.

Ragnhild Gislefoss, Oslo 18.05.2009

"It takes a minute to learn, but a lifetime to master".

Innholdsfortegnelse

FORORD	3
SAMMENDRAG	7
FORKORTELSER	8
1. INNLEDNING	11
1.1 TRANSPLANTASJON	11
1.2 IMMUNOLOGISK REAKSJON	14
1.3 IMMUNSUPPRESSIV BEHANDLING	16
1.4 FARMAKOLOGI: TAKROLIMUS	18
1.4.1 Farmakokinetiske egenskaper	18
1.4.1.1 Cytokrom P450 isoenzym	20
1.4.1.1.1 CYP3A polymorfismer	20
1.4.1.2 P-glykoprotein (MDR1; ABCB1)	22
1.4.1.2.1 MDR1 polymorfismer	23
1.4.1.3 Link mellom CYP3A4, CYP3A5, P-glykoprotein	24
1.4.2 Farmakodynamiske egenskaper	24
1.4.2.1 Bivirkninger	26
1.4.3 Interaksjoner	27
1.4.3.1 Grapefruktjuice	28
1.4.3.2 Andre viktige interaksjoner av klinisk betydning	28
1.5 FARMAKOLOGISK MONITORERING	29
2. FORMÅL	33
3. MATERIALE OG METODER	34
3.1 INKLUDERING AV PASIENTER	34
3.2 IMMUNSUPPRESSIVT REGIME	34
3.3 FARMAKOKINETISK STUDIEPROTOKOLL	35
3.4 METODER	35
3.4.1 LC-MS/MS	35
3.4.2 Konsentrasjonsbestemmelse av takrolimus	37
3.4.3 Beregninger	38
4. RESULTATER	40
5. DISKUSJON	51
6. KONKLUSJON	58
REFERANSELISTE	59
APPENDIKS A: UTDRAG FRA IMMUNSUPPRESJONSPROTOKOLLER VED LEVERTX	71
APPENDIKS B: REAGENSER OG UTSTYR	72
APPENDIKS C: BETINGELSER FOR ANALYSEN	73
APPENDIKS D: PRESISJON OG NØYAKTIGHET	74
APPENDIKS E: FARMAKOKINETISKE PROFILER	75

Sammendrag

Takrolimus er del av standard immunsuppresjon og vedlikeholdsdoseringsregimet etter levertransplantasjon. Det har et smalt terapeutisk vindu, og monitorers derfor etter bunnkonsentrasjonsmålinger. Intra- og interindividuelle variasjoner i takrolimus farmakokinetikk fører til uforutsigbare behandlingsresultater. Spesielt i den tidlige fasen etter transplantasjon er det viktig at man raskt oppnår optimal legemiddelkonsentrasjon hos pasienter. Det er i denne perioden risikoen for akutt rejeksjon er høyest. Genetiske forskjeller (polymorfismer) blant legemiddelmetaboliserende enzymer og transportmekanismer kan muligens spille en rolle i variabiliteten i farmakokinetikken. Målet med oppgaven var å studere takrolimus farmakokinetikk i den tidlige fasen (1-30 dager) etter levertransplantasjon. Det ble tatt blodprøver av pasientene (n=11) før transplantasjon og på inntil 4 enkeltdager etter operasjon. Det ble benyttet en LC-MS/MS metode i analysen av takrolimuskonsentrasjoner. Fullstendige farmakokinetiske (PK) profiler ($AUC_{0-12\text{timer}}$) ble plottet og sammenlignet.

Resultatene viste at det forelå stor variasjon i PK-profilene blant pasientene, og dose- og vektjusterte (C_0 , C_{max} , AUC) resultater endret lite på dette bildet. Det er vanskelig å si hva som er grunnen til de store variasjonene. Variabelt legemiddelopptak i den tidlige fasen og genetiske forskjeller kan være noen av årsakene.

Resultatene viste også at C_0 -konsentrasjonen ikke var den mest optimale parameter for dosejustering i studiegruppen.

Forkortelser

A	– adenin
ABCB1	– ATP-bindende kassett B1
APC	–antigenpresenterende celler
ATG	– antitymocyttglobulin
ATP	– adenosin trifosfat
AUC	– arealet under konsentrasjonstids-kurven
BW	– body weight
C	– cytosin
C ₀	– bunnkonsentrasjon, konsentrasjon rett før ny dose
CD	– cluster of differentiation
CD28	– cluster of differentiation 28
CD4+	– cluster of differentiation 4 positive celler
CD40L	– cluster of differentiation 40 ligand
CD8+	– cluster of differentiation 8 positive celler
CD80	– cluster of differentiation 80
CD86	– cluster of differentiation 86
cDNA	– copy deoksyribonukleinsyre
Cl	– clearance
C _{max}	– maksimum plasmakonsentrasjon
CNA	– kalsineurin A
CNB	– kalsineurin B
CNI	–kalsineurin hemmere
CVK	– sentralt venekateter
C _x	– konsentrasjon i blod etter ett gitt tidspunkt x etter inntatt dose
CYP450	– Cytokrom P450
DNA	– deoksyribonukleinsyre
EDTA	– etylendiamintetraeddiksyre
ESI	– elektronspray
F	– biotilgjengelighet
FKBP	– FK506 bindende proteiner
G	– guanin
GM-CSF	– granulocyttmakrofagkolonistimulerende faktor

HLA	– human leucocyte antigen
HPLC	– high performance liquid chromatography
IFN γ	– interferon γ
IL	– interleukin
IL-2R	– interleukin 2 reseptor
K _{el}	– eliminasjonskonstant
LC-MS/MS	– liquid chromatography- tandem mass spectrometry
M	– makrofager
m/z	– masse/ladning forhold
MARS	– molecular adsorbents recirculating system
MDR1	– multidrugresistens 1
MHC	– major histocompatibility complex
mRNA	– messenger ribonukleinsyre
MS	– massespektrometri
mTOR	– mammalian target of rapamycin
NFAT	– nuclear factor of activated T cells
NF- κ B	– nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
p.o	– peroralt
PBC	– primær biliær cirrhose
Pgp	– P-glykoprotein
PK	– farmakokinetikk
PMN	– polymorfonukleære leukocytter
PSC	– primær skleroserende cholangitt
RSD	– relativt standardavvik
SNP	– singel nucleotide polymorphism
T	– tymin
T _{1/2}	– halveringstid
TCR	– T-celle reseptor
TDM	– Therapeutic Drug Monitoring (farmakologisk monitorering)
TNF α	– tumornekrosefaktor α
tx	– transplantasjon

1. Innledning

Leveren er kroppens største organ og essensiell for livet. Navnet synes å hense på verbet ”å leve” [1].

I antikken ble leveren omtalt som ”magefølelse”, og dens funksjon var å holde begjæret borte fra intellektet og bidra til drømmer og profetiske visjoner. Intellektet sendte ut bitter væske i leveren som førte til at den krøllet seg sammen, stengte sine porer, spredte smerte og kvalme, og dermed døyvet begjæret [2].

I det gamle Babylon ble en oppskåret lever fra et ofret dyr brukt til spådom og forvarsel. De hadde ingen anelse om leverens fantastiske metabolske funksjon. På 1800-tallet fant Claude Bernard ut hvilken livsviktig funksjon leveren, hadde som et virkelig laboratorium, for selve livet [1].

I dag har man kunnskap om leverens mange oppgaver. Noen av funksjonene er dannelse av galle, metabolisme av karbohydrater, proteiner, fett og hormoner, lagring av vitaminer og jern, dannelse av koagulasjonsfaktorer, filtrering og lagring av blod. I tillegg fungerer den som et detoksifiseringssystem, og kan bryte ned og fjerne fremmede kjemikalier, deriblant legemidler [3]. Leversvikt vil påvirke disse funksjonene og blant annet føre til manglende fettabsorpsjon, blødningstendenser, ikterus, økt aktivitet av mange hormoner og forlenget virkning av mange medikamenter [4].

Konsekvensene for en pasient med sviktende leverfunksjon er svært alvorlige, og pasienten må som oftest behandles med transplantasjon.

1.1 Transplantasjon

Transplantasjon defineres vanligvis som kirurgisk overføring av celler eller vev fra et individ til et annet. Når man flytter celler eller vev innenfor et individ, for eksempel hud, kalles det autotransplantasjon. Andre typer inkluderer isotransplantasjon (mellom eneggede tvillinger), allotransplantasjon (mellom genetisk forskjellige individer av samme art) og xenotransplantasjon (mellom forskjellige arter) [5,6]. Det blir utført flest allotransplantasjoner.

I 1954 ble den første vellykkede transplantasjon fra et individ til et annet gjennomført av Murray, Merrill, Harrison og medarbeidere ved Peter Bent Brigham Hospital i Boston. Dette

var en nyretransplantasjon mellom to genetisk identiske tvillinger. Bare to år etter, ble det for første gang gjennomført en transplantasjon i Norden. Efskind og medarbeidere ved Rikshospitalet i Oslo utførte en allogen nyretransplantasjon der donornyren i tillegg var ABO-uforlikelig [7].

Den første levertransplantasjonen ble utført i Denver i USA av Thomas Starzl i 1963. Det første forsøket mislyktes, men i juli 1967 gjennomførte han en vellykket levertransplantasjon [8]. Første forsøk på levertransplantasjon i Norge ble utført på Ullevål sykehus av Snorre Aune og medarbeidere i 1971. Dette var mislykket [7]. I fortsettelsen var det Audun Flatmark ved Rikshospitalet som var drivkraften for etablering av levertransplantasjon som prosedyre, og det er i dag en livreddende behandling til pasienter med irreversibel leversvikt [9]. Den første levertransplantasjon med levende donor ble gjennomført i Brasil av Silvano Raia i 1987. Metoden ble utviklet på grunn av organmangel. Transplantasjonen var vellykket, men pasienten døde senere av andre årsaker [10].

I 2008 ble det ved Rikshospitalet transplantert 469 organer til 425 pasienter, der 79 var transplantasjon av lever. Tilsvarende antall i 2007 var 443 organer til 401 pasienter, og av disse var 72 levertransplantasjoner [11].

Det finnes få behandlingsoalternativer i sluttfasen ved organsvikt. I de fleste tilfeller er transplantasjon det beste alternativet, spesielt for vitale organer som nyre, lever, hjerte og lunger [12].

For pasienter med fulminant (fullt utviklet) leversvikt, kan leverdialyse være en midlertidig behandling i påvente av et nytt organ [13]. Leverdialyse også kalt MARS (molecular adsorbents recirculating system) er et detoksifiseringssystem av blod. Behandlingen innebærer en kunstig form for leverstøtte, som potensielt sett har mulighet til å fjerne betydelige mengder albuminbundne toksiner og vannløselige substanser. Toksinene inkluderer fettsyrer, gallsalter, bilirubin, aromatiske aminosyrer og nitrogenoksid. [14]. Leverdialyse erstatter ikke syntesefunksjonene til leveren, og kan derfor ikke benyttes som helbredende eller langvarig behandling.

Ved utgangen av 2008 stod 7 pasienter på venteliste for levertransplantasjon. Tilsvarende tall for 2007 var 12 [11]. Den hyppigste årsaken til levertransplantasjon i Norge er primær skleroserende cholangitt (PSC). Andre sykdommer er akutt leversvikt og maligniteter [15].

Ettårsoverlevelsen (pasient) etter en levertransplantasjon ligger på cirka 85 %, mens det for graftet ligger på cirka 80 %. Femårsoverlevelse (pasient) for de fleste transplantasjonsprogrammer ligger på rundt 50-70 % [12].

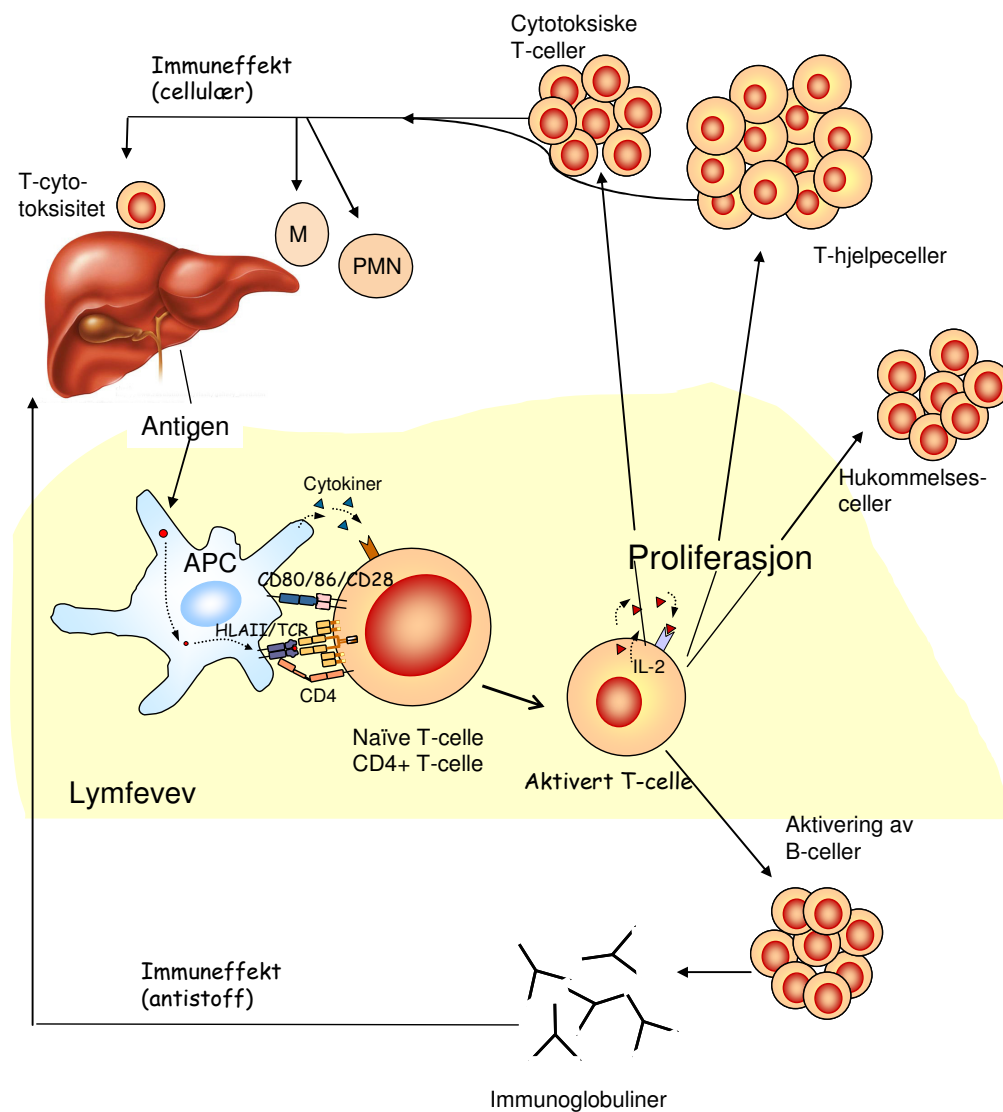
Det tilstrebes ABO-identitet mellom donor og resipient for å redusere risikoen for reaksjonsperioder. Nå dette ikke er mulig, benyttes ABO-forlikelig lever. Dette betyr at en mottaker som har blodtype A kan motta en blodtype O lever [16]. I de senere år er det også utviklet behandlingsprotokoller for behandling av resipienter som får transplantert organ (nyre) fra ABO-uforlikelig levende giver, slik at muligheten for å finne levende giver er blitt større. I tillegg til ABO-identitet ønsker man så stor vevsforlikelighet som mulig mellom giver og mottaker [5]. Noen antigener, alloantigener, kan utløse en kraftig immunreaksjon ved transplantasjon. Dette er major histocompatibility complex (MHC) molekyler og blir hos mennesket kalt human leucocyte antigen (HLA). HLA-molekylene deles inn i to klasser, klasse I og II, som strukturmessig sett er forskjellige. Det finnes tre serier av klasse I HLA-molekyler, A, B og C. Tilsvarende gjelder for klasse II, DP, DQ og DR. Genene som koder for molekylene utviser stor polymorfisme. Det betyr at enkeltindivider med stor sannsynlighet uttrykker et sett med HLA-gener som er forskjellig fra andre individer.

Uttrykket av klasse I og II molekyler er forskjellig på ulike celler. Klasse I molekyler uttrykkes på alle celler med unntak av erytrocytter. Klasse II har mer begrenset distribusjon, og er uttrykt i store mengder på dentrittiske celler og i mindre grad på B-celler. Celletyper med konstitutiv ekspresjon av klasse II-molekyler kalles profesjonelle antigenpresenterende celler (profesjonelle APC).

I den immunologiske synapsen (ved interaksjon mellom APC og T-celle) finnes blant annet adhesjonsmolekyler, kostimulatoriske molekyler og koreseptorer. Det finnes to forskjellige koreseptorer, CD4 og CD8 (CD: "cluster of differentiation"). T-celler deles inn i to grupper, de som uttrykker CD4 og de som uttrykker CD8. CD4+ T-celler har reseptorer som er assosiert med peptid som presenteres av klasse II HLA, mens CD8+ T celler har reseptorer som er assosiert med peptid på klasse I. Peptidfragmenter, som presenteres på HLA klasse I-molekyler, kommer som oftest fra proteiner som lages av cellen og finnes i cytosol eller i cellekjernen. For klasse II molekyler kommer også de fleste peptidene fra proteiner som cellen lager selv. Disse finner man hovedsakelig i den sekretoriske delen av cellen (endoplasmatisk retikulum, golgiapparatet, endosomer, lysosomer) og i cellemembranen. I tillegg presenteres det en del peptider som har sin opprinnelse fra proteiner i den ekstracellulære væsken [6].

Den største risikofaktor for avstøtning av transplantert organ sees ved betydelig uforlikelighet mellom HLA-molekyler [17]. Dette gjelder spesielt ved transplantasjon av nyre, benmarg og hjerte [5]. Ved levertransplantasjon spiller derimot HLA-forlikelighet en mindre rolle, og foreløpig er det ikke funnet grunnlag for å ta hensyn til dette [16].

1.2 Immunologisk reaksjon



Figur 1. Immunrespons. Figuren er modifisert fra Bergan et al [18].
(Forkortelser; M: makrofas; PMN: polymorfonukleære leukocytter).

Etter en organtransplantasjon initieres en allogen immunreaksjon (figur 1). Resipientens T-celler aktiveres ved at fremmed antigen (for eksempel uforlikelig HLA) fra transplantatet

presenteres. Disse blir først tatt opp av antigenpresenterende celler (APC), bearbeidet og deretter presentert til T-celler. Denne aktiveringen av T-cellen krever to signal, henholdsvis signal 1: stimulering av T-cellerreseptoren (MHC-peptidkomplekset bindes), og signal 2: kostimulatorisk signal (hovedsakelig mediert ved at CD28 på T-cellen bindes av CD80/CD86 på den antigenpresenterende cellen). Signalene konvergeres og formidles til cellekjernen gjennom en kaskade av enzymatiske reaksjoner. Dette fører blant annet til aktivering av genet for interleukin-2 (IL-2), produksjon av IL-2 og uttrykk av IL-2 reseptoren (IL-2R) på T-cellens overflate. IL-2 bindes til sin reseptor som aktiverer en ny kaskade. Signalene regulerer cellesyklus og DNA- og proteinsyntese. Som et resultat av dette aktiveres T-celleproliferasjon. Immuneffekten til de aktiverede T-cellene medieres ved utvikling av cytotoxiske celler som destruerer transplantatet. Frigjøring av en rekke cytokiner bidrar til ytterligere vevsskadelig inflammasjon i transplantatet. Aktiverede T-celler stimulerer B-celler til antistoffproduksjon med spesifisitet for fremmede antigener. Dette kan også føre til skade på graftet [18].

En T-celle kan gjenkjenne et (allo)antigen via ulike mekanismer. Ved direkte antigengjenkjennelse vil T-celler gjenkjenne determinanter på intakt donor MHC-molekyler som er uttrykt på overflaten av transplanterte celler [19]. I den indirekte mekanismen blir donor MHC molekyler bearbeidet og presentert som peptider av vertens egne MHC-molekyler [17].

Det antas at APC, som er til stede i donorvev på transplantasjonstidspunktet, gir opphav til den kraftige direkte anti-donor alloresponsen i tidlig fase. Etter hvert som de antigenpresenterende cellene dør og fjernes, avtar responsen. Den indirekte alloresponsen inntreffer senere, og varer livet ut for graftet. Transplantatutledete antigen skilles ut kontinuerlig og tas opp og bearbeides av resipientens egne APC [20].

Tre kategorier avstøtningsepisoder kan forekomme. Det er vanlig å klassifisere dem etter tiden det tar før de utvikles.

- Hyperakutt avstøttingsreaksjon.

Reaksjonen utvikles fra minutter til timer etter transplantasjon. I slike tilfeller har mottaker som oftest preformert antistoff rettet mot donors klasse I-HLA antigener. I tillegg kan naturlig forekommende antistoffer i ABO-systemet føre til hyperakutt forkastelse dersom transplantatet uttrykker de korresponderende antigener [6]. For å hindre denne type avstøttingsreaksjon matches mottakers blodtype med donors.

- Akutt avstøtningsreaksjon.
I fravær av immunsuppresjon vil en reaksjon inntreffe de første ukene etter enhver allogen organtransplantasjon [18], vanligvis mellom dag 5 og 90 [20]. Selv med immunsuppresjon kan pasientene oppleve avstøtningsepisoder (20-50 % hos levertransplanterte innen de første 12 måneder [12]). Dette reverseres som oftest med intensivert reaksjonsbehandling [18].
- Kronisk avstøtningsreaksjon.
Kronisk avstøtningsreaksjon oppstår vanligvis først måneder til år etter transplantasjon [6], og kan skje selv etter en vellykket organtransplantasjon med tilsynelatende effektiv og tolerabel immunsuppressiv behandling [18]. Pasienten har som regel gjennomgått flere episoder med akutte forkastelsesreaksjoner, som reverseres med immunsuppressiv behandling. Disse reaksjonene fører til varig skade som akkumuleres [6]. Kronisk avstøtningsreaksjon av levertransplantat er ganske sjeldent hos dagens resipienter. Insidensen ligger på mellom 3-5 % [16].

Det blir hevdet at den direkte antigengjenkjennelsesmekanismen kan være ansvarlig for den kraftige immunresponsen i akutt reaksjon, mens den indirekte veien kan være mest dominerende ved kronisk reaksjon [17].

1.3 Immunsuppressiv behandling

Immunsuppressiv behandling har som mål å beskytte det transplanterte organet fra vertens immunresponser [21].

Før immunsuppressive legemidler ble tatt i bruk, resulterte organtransplantasjon mellom genetisk ulike individer i rask reaksjon. Vellykkede transplantasjoner ble bare gjennomført mellom identiske tvillinger. Økt forståelse av immunologien bak reaksjon og utviklingen av immunsuppressive medikamenter har revolusjonert organtransplantasjon de siste 40 årene [22].

Tidlig på 1950-tallet ble det første forsøket på å undertrykke reaksjonsprosessen gjennomført. Dette innebar subletal totalkroppsbestråling kombinert med kortison. De fleste forsøkene førte til reaksjon, og dette ga motivasjon for å lete etter mer effektive metoder og medikamenter for å hindre avstøtning.

Azatioprin, et prodrug av 6-mercaptopurin, dannet utgangspunktet for den kliniske behandlingen av transplanterte. Studier med azatioprin på dyr resulterte i langtidsoverlevelse, men kun hos noen få. Dette ga bekymring da de første kliniske forsøkene ble innledet i 1962. Pasientene ble behandlet med azatioprin kombinert med et kortikosteroid, og man observerte en ettårs overlevelse av graftet på 40-50 %. Dette var en enorm forbedring fra de tidligere dyreforsøkene [23].

På 1980-tallet ble Ciklosporin, en kalsineurinhemmer (CNI), isolert fra jordprøver fra Hardangervidda. Dette immunsuppressivet har siden vært et viktig medikament ved organtransplantasjon.

En ny kalsineurinhemmer, takrolimus, ble introdusert noen år senere. Denne forbindelsen ble først isolert i Japan. Selv om takrolimus er kjemisk sett ulik ciklosporin, har stoffene flere farmakologiske fellestrekk og lignende virkningsmekanisme [18]. Takrolimus har vist seg å være mer potent enn ciklosporin, og for å oppnå samme virkning trengs det derfor en betydelig større dose ciklosporin enn takrolimus. Studier som sammenligner legemidlene har vist en reduksjon av akutt reaksjon med takrolimus, men samtidig en signifikant høyere insidens av legemiddeltoksisitet [24,25].

Sirolimus og everolimus er strukturelt beslektet med takrolimus, men har ulik virkningsmekanisme (hemming av mammalian target of rapamycin (mTOR)) [18,21].

På 1990-tallet ble mykofenolat introdusert som immunsuppressiv. Mykofenolat klassifiseres som en purinantagonist, og har lignende effekter som azatioprin. Ved sin virkningsmekanisme via hemming av inosin monofosfat dehydrogenase (IMPDH), som er sentral i nysyntese av purinnukleotider, får mykofenolat en relativ spesifisitet for lymfocytter [18]. I dag har mykofenolat mer eller mindre erstattet bruken av azatioprin ved organtransplantasjon, og inngår som standardbehandling etter levertransplantasjon [26].

Videre er det utviklet antistoff rettet mot T-celler, og antistoff rettet mot interleukin-2-reseptoren. I tillegg benyttes også kortikosteroider ved transplantasjon. Bruk av steroider kan gi betydelige bivirkninger hos pasienten, og man tilstreber derfor å redusere doseringen [18].

Selv om man i dag har en imponerende rekke tilgjengelige terapeutiske valg, kan hvert av legemidlene, enten alene eller kumulativt, forårsake alvorlige bivirkninger [21]. Ved å utnytte synergisk effekt av legemiddelkombinasjoner oppnår man ofte et akseptabelt resultat. Studier av levertransplanterte som behandles med duobehandling (steroider og kalsineurinhemmere) har vist at cirka 20 % av pasientene utvikler nyresvikt over tid. Reduksjon av nyrekomplikasjoner kan oppnås ved trippelbehandling med steroider, lavdose

kalsineurinhemmer og mykofenolat. Denne type behandling benyttes ved standard vedlikeholdsbehandling av voksne etter levertransplantasjon. Protokoll på Rikshospitalet inkluderer en trippelbehandling bestående av steroider (Prednisolon (p.o)), takrolimus (Prograf) og mykofenolat (CellCept) [26]. Se appendiks A.

Når man søker etter nye mer spesifikke behandlingsprotokoller, er det viktig å merke seg at infeksjonsrisikoen øker med immunsuppresjonens intensitet. Immunsuppressiv behandling er en balansegang mellom risiko for infeksjon og bivirkninger, og avstøtning av transplantatet [18].

1.4 Farmakologi: Takrolimus

1.4.1 Farmakokinetiske egenskaper

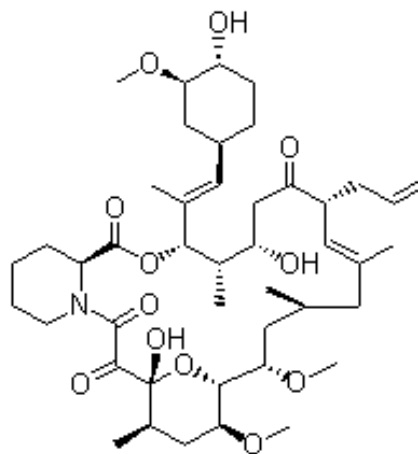
Takrolimus (tidligere kjent som FK506) er den aktive forbindelsen i Prograf®.

Strukturformel er presentert i figur 2.

Takrolimus er et fermenteringsprodukt fra soppen *Streptomyces tsukubaensis* og er klassifisert som et immunsuppressivt legemiddel av makrolid type [18,21,28]. Takrolimus benyttes som profylakse mot rejeksjon ved allogen lever-, nyre-, og hjertetransplantasjon [28]. Legemiddelet har også vist seg å være effektivt i behandlingen av andre organtransplantasjoner, inkludert lunge, pankreas og tynntarm, og ved beinmargstransplantasjon [29].

ABSORPSJON

Takrolimus kan absorberes gjennom hele mage-tarm-kanalen, men opptaket skjer hovedsakelig i duodenum og jejunum hos mennesker [28,30]. Ved oral administrasjon vil absorpsjonen være ufullstendig og variabel. Dette medfører lav biotilgjengelighet (F), i



Figur 2. Takrolimus (C₄₄H₆₉NO₁₂) [27].

gjennomsnitt 20-25 % [28], men store variasjoner har vært rapportert, fra 5-93 % [29]. Absorpsjonshastigheten av takrolimus er relativt rask hos de fleste individer, og maksimumskonsentrasjonen (C_{max}) inntreffer vanligvis etter 1-3 timer [28]. Andre individer kan ha en kontinuerlig absorpsjon over en forlenget periode, og dette gir en relativt flat profil [28,31]. Absorpsjonshastigheten og opptaket av takrolimus er størst ved faste. Effekten av et måltid reduserer begge faktorene, mest etter et fettrikt måltid og mindre etter et karbohydratrikt måltid. Det er generelt anbefalt at kapslene tas på tom mage eller minst 1 time før eller 2-3 timer etter et måltid [28,30]. Takrolimus har dårlig vannløselighet [29] og er utsatt for utstrakt presystemisk metabolisme via gastrointestinale enzymer og tilbakeføring til lumen via en effluks-mekanisme [29,32-34]. Dette kan redusere medikamentets biotilgjengelighet, særlig hos pasienter som har endringer i mage- og tarmmotiliteten etter transplantasjon [29].

DISTRIBUSJON

Takrolimus bindes i stor grad til erythrocytter i sirkulasjonen [28,29]. Dette resulterer i en distribusjonsfordeling mellom fullblods- og plasmakonsentrasjoner på cirka 20:1. I plasma bindes takrolimus til plasmaproteiner (>98,8 %), hovedsakelig albumin og α 1-surt glykoprotein [29]. Distribusjonsvolumet ved likevekt basert på plasma- og fullblodskonsentrasjoner er henholdsvis 1300 liter og 47, 6 liter [28].

METABOLISME

Takrolimus blir metabolisert i utstrakt grad, og kun spor av uendret legemiddel kan detekteres i urin og fæses (0,5 %). Det er hovedsakelig enzymer i lever og tarmvegg som står for nedbrytningen [29,35]. Dannelse av opptil 15 metabolitter har vært rapportert [29,36], og hovedmetabolitten synes å være 13-O-demetyltakrolimus, som er 1/10 så aktiv som takrolimus [36-38].

ELIMINASJON

Takrolimus er karakterisert som et lav-clearance legemiddel [28,35]. Dette betyr at clearance styres av hepatocellulær aktivitet og ubundet fraksjon i plasma. Høy-clearance legemidler derimot styres hovedsakelig av perfusjon, og er mindre sensitiv for endringer i proteinbinding eller cellulær eliminasjonsaktivitet. [39]. Gjennomsnittlig total kropps-clearance hos friske individer er 2,25 L/time estimert fra fullblodskonsentrasjon. Hos voksne pasienter ligger verdiene på henholdsvis 4,1; 6,7 og 3,9 L/time etter lever-, nyre- og hjertetransplantasjon.

Halveringstiden ($t_{1/2}$) til takrolimus er variabel. Gjennomsnittlig halveringstid i fullblod hos friske individer og levertransplanterte (voksne) er henholdsvis cirka 43 timer og cirka 12 timer [28]. Lang halveringstid fører til likevektskonsentrasjon først etter flere dager med administrering [35].

Forhøyete clearanceverdier hos transplanterte kan sees ved lave hematokritverdier, lave proteinnivåer som fører til økt ubundet fraksjon av takrolimus, eller ved kortikosteroidindusert økt metabolisme [28]. Kald ischemitid og reperfusjon av en transplantert lever kan påvirke clearance av takrolimus [29].

1.4.1.1 Cytokrom P450 isoenzym

De fleste av enzymene som er ansvarlig for metabolisme av legemidler tilhører superfamilien cytokrom P450 (CYP) enzymene. Hos mennesket består denne superfamilien av mer enn 50 isoenzym [40], og er delt inn i 18 forskjellige familier [41], betegnet CYP 1, 2 og 3 og videre. Disse er igjen delt inn i subfamilier, A til E og tall er brukt for å referere til de individuelle enzym (genprodukt) [39].

Takrolimus metaboliseres hovedsakelig via CYP3A isoenzymene i lever og tarmvegg [29]. CYP3A familien består av minst 4 isoformer, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 og CYP3A43 [42]. CYP3A4 og CYP3A5 er hovedenzymene som er ansvarlig for legemiddelmetabolisme i voksne individer [43]. CYP3A5 har 84 % strukturell likhet med CYP3A4 [44], og finnes hovedsakelig i tynntarm og mage [43]. Hos voksne individer utgjør CYP3A4 cirka 30 % av total mengde CYP i leveren [43,45,46] og mer enn 70 % i tynntarm [43,45].

Wacher et al [45] har vist til at CYP3A4-uttrykket i lever og tarm er svært variabelt. Det har vært rapportert 10-100 ganger variasjoner i leveruttrykk, og opptil 30 ganger forskjell i tynntarmuttrykk.

1.4.1.1.1 CYP3A polymorfismer

Det er identifisert nesten 40 singelnukleotid polymorfismer (SNPs) i CYP3A4 genet [47]. Den SNP som er mest studert er CYP3A4*1B (-392A>G overgang) som er lokalisert i 5'-regulatoriske region [43,48,49]. Ball et al [48] fant at mutasjonsfrekvensen lå på cirka 55 % for afroamerikanere, cirka 9 % hos latinamerikanere og bare på rundt 4 % for hvite

amerikanere. Hos amerikanere av japansk eller kinesisk opprinnelse ble ikke mutasjonen funnet.

Det er uklart om CYP3A4*1B SNP påvirker metabolismen av CYP3A4 substrater [50]. Ball et al [48] viste i sin in vivo studie at det ikke forekom endring i metabolismen av kjente CYP3A4 substrater når CYP3A4*1B SNP var til stede. Hesselink et al [40] gjennomførte en studie på 174 nyretransplanterte resipienter (64 pasienter mottok takrolimus). Det ble observert en trend mot et lavere dose-justert bunnkonsentrasjonsnivå (C_0) hos pasienter som var heterozygote eller homozygote for CYP3A4*1B allelet sammenlignet med pasienter som hadde CYP3A4*1/*1 genotype. Disse funnene er i samsvar med antagelsen om at bærere av CYP3A4*1B allelet vil uttrykke høyere CYP3A4 aktivitet. Forskjellen i takrolimus dose-justert bunnkonsentrasjonsnivå var signifikant både etter tre og 12 måneder. Bærere av CYP3A4*1B allelet trengte en høyere dose takrolimus for å nå adekvate nivåer i fullblod sammenlignet med bærere av villtypen (CYP3A4*1/*1).

CYP3A5 enzymet har også betydning for takrolimus metabolisme. Villtypen er betegnet CYP3A5*1. Flere varianter er identifisert inkludert CYP3A*2, *4, *6, *7, *8, *9 og *10. Disse er lokalisert på forskjellige eksoner, men hovedsakelig på ekson 7 og 11 [51]. Det finnes i tillegg noen SNPs på introner som påvirker mRNA spleising og er en viktig årsak til funksjonelt defekte alleler, eksempler inkluderer CYP3A5*3 og CYP3A5*5 [43,51].

Blant de undersøkte etniske gruppene forekommer CYP3A5*3 allelet hyppigst. Dette indikerer at polymorfismen er en fortidsvariant, og har en tendens til å være delt mellom alle populasjoner [51]. Individuer som uttrykker CYP3A5*3 allelet har en sekvensvariabilitet i intron 3. Dette fører til alternativ spleising, som gir et forkortet mRNA og ekspresjon av et irregulært CYP3A5 protein. Analyse av humane lever CYP3A5 cDNA har vist at kun individer med én CYP3A5*1 allel produserer høye nivåer av full-lengde CYP3A5 mRNA og dermed uttrykker CYP3A5 protein [52].

Det er funnet en statistisk signifikant sammenheng i frekvensen av CYP3A5*3 allelvariant mellom forskjellige populasjoner. Rekkefølgen av estimerte populasjonfrekvenser for CYP3A5*3 allelet er som følger: Kaukasere (90-93 %) > øst-asiater (73 %) > latinamerikanere (65 %) > sør-asiater (60 %) > afroamerikanere (32 %). Dette indikerer at CYP3A5*1 er mer hyppig i populasjoner med afrikansk opprinnelse [51], og resulterer i en høyere ekspresjon og en bedre funksjon av CYP3A5.

Blant CYP3A5*3/*3 individer utgjør CYP3A5 ekspresjon bare 4,2 % av det totale CYP3A-mangfoldet i lever og 2,7 % av total CYP3A i jejunum. Blant individer med CYP3A5*1/*3

genotypen økes CYP3A5 ekspresjonen til 50 % av total CYP3A i lever og 61 % av CYP3A i jejunum [43].

CYP3A5*6 allelet er svært sjelden hos kaukasere og er fraværende hos asiater. Hos afroamerikanere finner man en allelfrekvens på 12 %. Dette indikerer at det er et nytt allel med afrikansk opprinnelse. Latinamerikanere har en estimert CYP3A5*6 allelfrekvens på cirka 4 %. CYP3A5*6 er en synonym mutasjon i ekson 7 som fører til endret mRNA leseramme og et forkortet protein [52].

Takrolimus er substrat for CYP3A5 og det har vært spekulert på om polymorfismen av CYP3A5 genet kan forklare de store interindividuelle variasjonene i de farmakokinetiske egenskapene til takrolimus. I forsøk på å forklare denne interindividuelle forskjellen, har CYP3A5*3 genotype blitt studert.

De fleste studier som ser på forholdet mellom CYP3A5 polymorfismen og takrolimus dosebehov, har funnet at pasienter med CYP3A5*3/*3 genotype trenger en lavere dose takrolimus for å oppnå optimal C_0 , sammenlignet med resipienter med minst ett CYP3A5*1 allel [40,53-61]. Studier ved levertransplantasjon har vist at takrolimus konsentrasjon/dose-forholdet var lavere i resipienter med CYP3A5*1/*1 og *1/*3 genotyper sammenlignet med CYP3A5*3/*3 genotype [62-64].

1.4.1.2 P-glykoprotein (MDR1; ABCB1)

P-glykoprotein (Pgp) er kodet av multidrugresistens 1 (MDR1) genet hos mennesker, og ble først karakterisert som en ATP-avhengig transportør av kassettfamilien (ABCB1), ansvarlig for effluks av kjemoterapeutika fra resistente cancerceller [65]. MDR1-genet er uttrykt i mange organer, for eksempel nyrer, lever, tarm, pankreas og lymfocytter og i celler i blod-hjerne-barrieren [65-67].

Pgp fungerer som en energi-avhengig membrantransportør som pumper en rekke endogene substanser og legemidler fra cytoplasma til utsiden av cellen [34,68]. Dette reduserer den intracellulære legemiddelkonsentrasjonen [34]. I tarmen er Pgp uttrykt i enterocytter, og fungerer som en beskyttende mekanisme ved å pumpe xenobiotika ut av cellene [69], og inn i galle og tarmlumen. I tillegg deltar den i blod-hjerne-barriere funksjonen [34].

Substrater for Pgp inkluderer en rekke forbindelser med forskjellige terapeutiske indikasjoner. Det er ingen klare strukturelle fellestrekk som definerer Pgp-substrater, men molekylene har en tendens til å være store, og amfipatiske eller hydrofobe og inneholder en eller flere aromatiske ringer [65,70].

I tarmen fungerer Pgp som en absorpsjonsbarriere mot en rekke oralt administrerte legemidler som er substrat for proteinet, inkludert takrolimus. Biotilgjengeligheten til takrolimus kan påvirkes av proteinets genetiske variasjon i ekspresjon [64,70]. Pgp proteinnivået har vist en signifikant interindividuell variabilitet [34].

1.4.1.2.1 MDR1 polymorfismer

MDR1 genot er lokalisert på kromosom 7 og består av 28 eksoner [70]. Det har vært identifisert mer enn 50 SNPs i dette genet [71]. Tre polymorfismer i genet har vist seg å være i koblingsulikevekt (engelsk: linkage disequilibrium) og deler en felles haplotype. De er lokalisert på ekson 12, 21 og 26 og er hyppig studert i relasjonen til takrolimus farmakokinetikk [67,72]. To av polymorfismene, C1236T og C3435T, på henholdsvis ekson 12 og 26 benevnes synonyme. Dette vil si at de ikke resulterer i en utskiftning av aminosyre. MDR1 G2677T/A (Ala893Ser/Thr) i ekson 21 er en ikke-synonym polymorfisme, og fører til aminosyreutskiftning [64,67].

C3435T polymorfismen i MDR1 genot er mest utbredt hos asiater (40-70 %) og kaukasere (50-60 %), men i mindre grad hos afrikanere (16-17 %) [50]. Hoffmeyer et al [73] observerte en signifikant korrelasjon mellom denne MDR1 polymorfismen og dens uttrykk og funksjon. Andre studier har ikke funnet denne sammenhengen, og det er derfor usikkert om denne SNP påvirker legemiddelmetabolismen [74].

De to andre polymorfismene, C1236T og G2677T er identifisert hos 62 % kaukasere og 13 % afroamerikanere og korrelerer med hyppigheten av C3435T SNP i liknende populasjoner. Tilstedeværelse av de tre polymorfismene hos et individ forårsaker 40 % reduksjon av metabolismen av et kjent Pgp substrat. Dette kan bety at det produseres en redusert mengde funksjonell Pgp [50].

Studier på nyretransplanterte har vist svak eller ingen sammenheng mellom MDR1 genotyper eller haplotyper og takrolimus farmakokinetikk [40,54-57,61,75-78].

Studier utført på levertransplanterte resipienter med levende donor, har vist at kjente genetiske variasjoner av MDR1-genot ikke har effekt på intestinalt MDR1-nivå eller takrolimus konsentrasjon/dose-forholdet [64,74,79]. Derimot er intestinale mRNA-nivåer av MDR1 en nyttig molekylær markør for bestemmelse av den individuelle orale dosen av takrolimus etter transplantasjon [64,79,80].

1.4.1.3 Link mellom CYP3A4, CYP3A5, P-glykoprotein

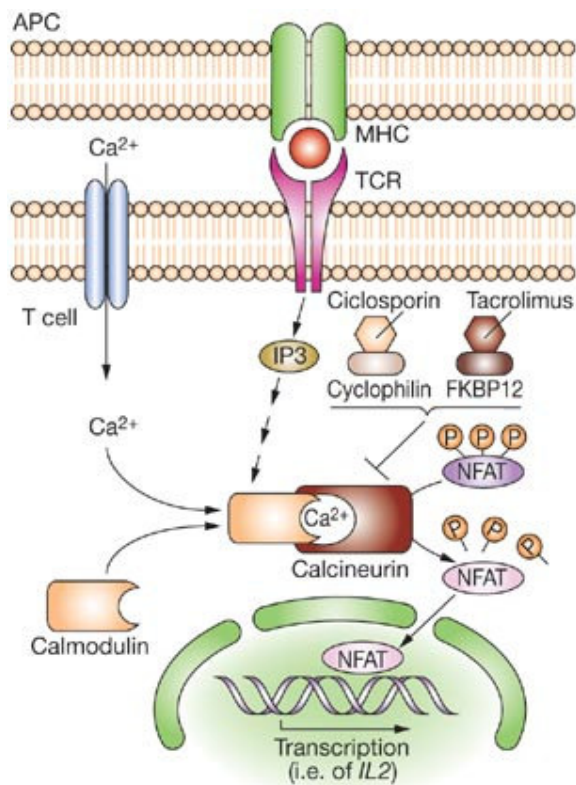
Den nære cellulær lokalisering av CYP3A og Pgp i enterocytter, i tillegg til sammenfallende substratspesifisitet, indikerer proteinenes viktige rolle ved oral tilførsel av legemiddel [34]. Både Pgp og CYP3A er til stede i høye nivåer i tynntarmen, hovedstedet for absorpsjon av oralt administrerte legemidler. Proteiner kan virke synergisk og danne en barriere for legemiddelets biotilgjengelighet [34,65]. Pgp sitter transmembrant, mens CYP3A er lokalisert på innsiden av cellen i endoplasmatisk retikulum. Dette indikerer at Pgp kan kontrollere eksponeringen av substrater til CYP3A enzymene, og dermed styre metabolismen. Legemiddelmolekylene kan vandre mellom tarmlumen og enterocytterne via passiv absorpsjon og utpumping av Pgp. Dette fører til at CYP3A enzymene kan få repeterende tilgang på legemiddelet, i konsentrasjoner under metningspunktet, som kan gi redusert absorpsjon [34].

Flere studier har vist sammenhengen mellom Pgp og CYP3A. Goto et al [74] observerte at C3435T polymorfismen i MDR1 genet påvirket det intestinale ekspresjonsnivået av CYP3A4 mRNA. Det ble vist til at ekspresjonsnivået av intestinal CYP3A4 mRNA var 8 ganger lavere i individer med genotype 3435T/T enn i individer med 3435C/C genotype, mens nivået var 4 ganger lavere i individer med 3435C/T heterozygoter sammenlignet med 3435C/C genotype. Farmakokinetikken til takrolimus kan bli påvirket av en kombinert effekt av genetiske polymorfismer i CYP3A4 og CYP3A5 [40]. I studien utført av Hesselink et al [40] var 80 % av pasientene som var homozygote for CYP3A5*3, også homozygote for CYP3A4*1. Takrolimus metaboliseres av både CYP3A4 og CYP3A5, og dette kan skjule de kliniske effektene av de genetiske polymorfismene av hvert enzym [40].

MDR1 genet er lokalisert oppstrøms for CYP3A4 og CYP3A5 på den komplementære tråden. Sammenhengen mellom reguleringen av disse tre genene og koblingsulikevekten er fortsatt ukjent, og kan muligens være det manglende leddet i forståelsen av metabolismen til takrolimus [59].

1.4.2 Farmakodynamiske egenskaper

Under påvirkning av takrolimus vil hemming av signaloverføringen til T-cellens kjerne begrense immunresponsen under en begynnende transplantatavstøtning. Se figur 3. Hemmingen av T-cellen er uspesifikk, slik at alle aktiverte T-celler påvirkes. Behandlingen med takrolimus forårsaker derfor reduserte cellulære immunresponser mot patogene agens, med assosiert infeksjonsfare [6].



Figur 3. Virkningsmekanisme til Takrolimus (figuren er hentet fra Fantini et al [81]).

Aktiverte T-cellers nukleær faktor (NFAT; nuclear factor of activated T cells) har to komponenter, en T-celle spesifikk cytoplasmatisk subenhet (NFATc) og en nukleær subenhet (NFATn). Stimulering av T-celler resulterer i økt intracellulær kalsium (Ca^{2+}), og dette sammen med kalmodulin aktiverer kalsineurin [82,83]. Kalsineurin, en serin-threonin fosfatase, består av en katalytisk (kalsineurin A (CNA)) og en regulatorisk (kalsineurin B (CNB)) subenhet. Binding av Ca^{2+} /kalmodulin komplekset frigjør et autohemmende domene fra CNA, og resulterer i aktivering av fosfatase [82]. Det aktiverte enzymet defosforylerer NFATc og transkripsjonsfaktoren blir translokert inn i nukleus. I cellekjernen vil den danne et kompleks med NFATn, og dette komplekset vil assosieres med promotor for forskjellige cytokiner inkludert IL-2. NFAT er bare til stede i aktiverte lymfocytter [82,83].

Takrolimus virker hovedsakelig ved å endre genekspressjon i målcellen. Det er spesielt IL-2 genekspressjon i CD4^+ T-hjelpeceller som hemmes av legemidlet. Takrolimus virker på signaltransduksjonen involvert i T-celle aktivering. Når takrolimus kommer inn i cellen

bindes det til spesifikke cellulære proteiner av immunfilinklassen, FK506-bindende proteiner (FKBP). Det er observert minst fire medlemmer: FKBP 12, 13, 25 og 59 [83].

Takrolimus danner et kompleks med FKBP12, binder seg til kalsineurin og hemmer enzymet. Inaktivering av kalsineurin forårsaket av takrolimus i T-celler, resulterer også i hemming av andre transkripsjonsfaktorer som er involvert i cytokin transkripsjon. Dette undertrykker produksjon av flere cytokiner, inkludert IL-3, IL-4, IL-5, IFN γ , TNF α , GM-CSF og CD40L. Takrolimus påvirker også transkripsjonsfaktoren NF- κ B og dette kan forklare hemmingen av syntesen av IL-2 og IL-4 reseptorer i aktiverte T- og B-celler [82].

Når T-cellen aktiveres, produserer den flere cytokiner, den prolifererer og differensierer til en T-celle med effektorfunksjon. T-cellen kan stimulere seg selv, via en autokrin sløyfe, ved produksjon av både IL-2 (vekstfaktor) og IL-2 reseptorer. På den måten oppnår CD4+ T-celler, som reagerer på antigen, stimulering til egen vekst. Naboceller med IL-2 reseptorer kan også stimuleres (parakrin stimulering). IL-2 produksjon i CD4+ T-celler er spesielt viktig for veksten til CD8+ T-celler siden disse ikke produserer IL-2 i særlig grad. Antigenstimulerte T-celler, som ikke påvirkes av IL-2, vil ofte dø eller bli anerge [6].

1.4.2.1 Bivirkninger

Det kan være vanskelig å bestemme bivirkningsprofilen til immunsuppressiv legemidler på grunn av underliggende sykdom og samtidig bruk av andre legemidler [28]. Bivirkningene er som regel mer hyppige de første månedene og reduseres over tid, i samsvar med dosereduksjon [24]. Ved peroral administrering sees ofte en lavere insidens av bivirkninger enn ved intravenøs bruk. Det er generelt anbefalt at takrolimusdosen startes peroralt [28].

I studier som sammenligner takrolimus- og ciklosporinregime ble det observert flere bivirkninger ved takrolimusbehandling. Dette inkluderer nefrotoksisitet, neurotoksisitet, svekket glukosemetabolisme, hypertensjon og gastrointestinale forstyrrelser [24,25].

Nefrotoksisitet kan føre til begrenset bruk av takrolimus, og halvparten av de som behandles med takrolimus opplever bivirkningen. Pasientene i denne sykdomsgruppen bruker ofte andre nefrotoksiske medikamenter. De kan ha pågående nyresykdommer, slik at reduksjon i nyrefunksjonen ikke alltid kan direkte tilskrives toksiske effekter fra takrolimus [29].

Utviklingen av diabetes mellitus etter transplantasjon betraktes som en alvorlig komplikasjon ved immunsuppressiv behandling. Dette er assosiert med morbiditet, reduksjon i pasientens livskvalitet og mortalitet [84]. Flere risikofaktorer er assosiert med utviklingen av diabetes, inkludert rase, høye konsentrasjoner av takrolimus og høye doser av kortikosteroider [29].

Takrolimus er klassifisert som et makrolid som er hyppig assosiert med gastrointestinale forstyrrelser. Det er ikke uvanlig at pasienter opplever diaré, kvalme og oppkast [24].

Alle immunsuppressive medikamenter øker risikoen for infeksjoner (inkludert virus, bakterier, sopp, protozoer) og maligniteter. Det er rapportert både benigne og maligne neoplasmer, inkludert Epstein Barr virus-assosiert lymfoproliferativ sykdom og hudmaligniteter [28].

1.4.3 Interaksjoner

Peroralt inntak av et medikament sammen med andre legemidler, naturpreparater eller næringsmidler kan gi mulighet for interaksjon som kan endre legemiddelets biotilgjengelighet, effektivitet eller toksisitet. Både tarmvegg og lever kan påvirke den orale biotilgjengeligheten via mekanismer som involverer transport og presystemisk metabolisme av legemidler [85].

Administrasjon av et legemiddel kan endre virkningen til et annet legemiddel via to generelle mekanismer:

- Via en farmakodynamisk interaksjon (modifisere den farmakologiske effekten til andre legemidler uten å endre deres konsentrasjon i vevsvæsken).
- Via en farmakokinetisk interaksjon (endring av konsentrasjonen til andre legemidler som når virkningsstedet).

Slike interaksjoner kan få klinisk betydning hvis legemidlets terapeutiske vindu er smalt.

Alle de fire hovedprosessene som bestemmer den farmakokinetiske profil – absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon – kan påvirkes av medikamenter. Legemidler kan både hemme og indusere de legemiddelmetaboliserende enzymene [86].

CYP3A mediert metabolisme av takrolimus er ansvarlig for >90 % av den metabolske eliminering. Hemming av metabolismen av takrolimus kan resultere i økt eksponering av takrolimus og økt insidens av toksiske effekter, slik som nefrotoksisitet og neurotoksisitet. Induksjon av CYP3A fører til en reduksjon av den orale biotilgjengeligheten og raskere eliminering av takrolimus. Dette resulterer i manglende effekt og høyere doser av takrolimus.

Selv om de farmakokinetiske legemiddelinteraksjonene kan sees på som uønskete, kan de også gi terapeutiske fordeler, som for eksempel ved å øke oral biotilgjengelighet [87].

1.4.3.1 Grapefruktjuice

En av de klinisk viktigste medikament-næringsmiddelinteraksjonene er grapefruktjuice-hemming av CYP3A4 isoenzymer. Grapefruktjuice fører til økt biotilgjengelighet av legemidlet ved å redusere den presystemiske metabolisme, og forårsaker rask og irreversibel hemming av CYP-systemet. Dette kan skyldes at grapefruktjuice akselerer degradering av disse enzymene og reduserer mRNA-translasjon. Transkripsjonsprosessen av mRNA fra DNA er ikke påvirket [88]. Det hevdes at grapefruktjuice kan redusere CYP3A4 nivået i cellen med 47 % innen fire timer etter inntak [89]. Dette resulterer i økt biotilgjengelighet som kan vedvare i opptil 24 timer [90]. Gjenopprettelse av CYP3A4 aktivitet trenger de novo syntese eller erstatning av enterocytter. Dette fører til forlenget virkning av grapefruktjuice. Denne effekten viser en høy variabilitet blant individer og er avhengig av medfødte forskjeller i CYP3A4 proteinekspressjon. Det er vist at de fleste legemidler som er involvert i interaksjonen med grapefruktjuice ikke påvirkes når de administreres intravenøst.

Rapporterte effekter av grapefruktjuice på P-glykoprotein er motstridende. Aktivering in vivo vil bety en bedre effluks av legemidlet tilbake til tarmlumen, og deretter redusert oral biotilgjengelighet [88].

1.4.3.2 Andre viktige interaksjoner av klinisk betydning

STEROIDER

Kortikosteroider er en del av trippelbehandlingen etter levertransplantasjon [26].

Kortikosteroider er kjent for å være både substrat, hemmer og induktor av CYP3A enzymene [87]. Forskere har observert at gradvis reduksjon av steroider, som er vanlig hos de fleste pasienter etter transplantasjon, kan være ansvarlig for gradvis redusert oral clearance av takrolimus [91].

Anglicheau et al [92] observert i sin studie på nyretransplanterte at høye steroiddoser medførte høyere takrolimusdoser for å oppnå optimale bunnkonsentrasjonsverdier hos pasienter. Dette var sannsynligvis en interaksjonsmekanisme via induksjon av CYP3A og/eller Pgp. Interaksjonen var til stede selv ved lave steroid doser.

MYKOFENOLAT

Siden takrolimus også er et substrat til CYP3A og Pgp, er legemidlet en potensiell hemmer av transport og metabolisme av andre legemidler [87].

Zucker et al [93] observerte i sin studie en signifikant høyere mykofenolsyre bunnkonsentrasjon hos pasienter som ble behandlet med takrolimus og mykofenolat mofetil sammenlignet med en kontrollgruppe som ble behandlet med ciklosporin og mykofenolat mofetil. I senere tid har man derimot sett at det er heller ciklosporin som reduserer mykofenolsyrenivået [94].

CIKLOSPORIN

Det er ikke anbefalt å administrere ciklosporin og takrolimus samtidig. Legemidlene har lignende virkningsmekanismer (hemmer kalsineurin), og det er derfor ikke noe poeng å kombinere medikamentene. Samtidig bruk gir forlenget halveringstiden av ciklosporin, og kan føre til synergiske nefrotoksiske effekter [28]. Ved overgang fra det ene legemidlet til det andre er rutinen nå at man seponerer tvert og fortsetter med det nye.

1.5 Farmakologisk monitorering

Tidlig på 1960-tallet ble det utviklet analytiske teknikker som gjorde det mulig å måle de lave legemiddelkonsentrasjonene som sees i biologisk væske ved legemiddelbehandling. Dette gjorde det mulig å kontrollere legemiddelbehandlingen ved å bestemme konsentrasjonene i kroppen i stedet for å bruke dosen alene [95].

Farmakologisk monitorering (engelsk: Therapeutic Drug Monitoring: TDM) er en metode som benyttes for å optimalisere og individualisere legemiddelbehandlingen, i dette tilfellet immunsuppressiv terapi hos transplanterte pasienter. Målet er å individualisere legemiddeldosen for å oppnå et bedre resultat. Dette kan gjøres ved å kartlegge legemiddeleksponering definert som arealet under konsentrasjonstids-kurven (AUC). Ved gjentatte målinger av legemiddelkonsentrasjoner i biologisk væske kan man justere dosen i samsvar med utvikling av det kliniske forløpet. Flere farmakokinetiske parametere (for eksempel C_2 , forkortet AUC) har vært brukt for å estimere AUC_{0-12} , men det er bunnkonsentrasjonen som fortsatt er den mest brukte parameter, tiltross for at denne for noen immunsuppressive legemidler ikke alltid reflekterer den totale eksponeringen [96].

Man kan individualisere behandlingen via farmakokinetisk eller farmakodynamisk monitorering [18]. Tradisjonell farmakokinetisk monitorering hos pasienter må oppfylle flere kriterier:

1. Det bør være en god sammenheng mellom legemiddelkonsentrasjon og effekt.

2. Det bør være betydelig interindividuell farmakokinetisk variabilitet, og derfor ikke en klar sammenheng mellom inntatt dose og legemiddelkonsentrasjon/respons.
3. Legemiddelet bør ha et smalt terapeutisk vindu. Det betyr at det er liten forskjell mellom legemiddelkonsentrasjoner som gir terapeutisk effekt og konsentrasjoner som gir toksiske effekter.
4. Den farmakologiske responsen av legemidlet bør være vanskelig å fastsette eller å skille fra uheldige hendelser [95,97].

Farmakodynamisk monitorering involverer måling av biologisk effekt av et legemiddel på dens målpunkt i kroppen. For takrolimus vil et slikt målpunkt være hemming av kalsineurinaktivitet [18,98]. Denne metoden måler markører for immunsuppressiv legemiddelvirksomhet, og kan benyttes i utvikling av nye legemidler. Spesielt tilpassede legemidler vil kunne optimalisere behandlingen for hver enkelt pasient.

Farmakodynamisk monitorering av immunsuppressive medikamenter er ikke utbredt i klinikken. Dette skyldes delvis at de fleste farmakodynamiske metoder er tidkrevende, kostbare, og i noen tilfeller først gir resultater etter flere dager med inkubering. Manglende interesse for denne monitoreringsformen gir lite data som kan vise et bedret resultat ved å basere dosejusteringene på farmakodynamikk i stedet for farmakokinetikk [98].

Takrolimus er et legemiddel med et smalt terapeutisk vindu. Det er derfor nødvendig å individualisere medikamentet slik at man kan redusere toksisiteten samtidig som man optimaliserer behandlingen [96]. Bruk av TDM hos transplanterte pasienter er helt essensielt, særlig de tre første månedene da avstøtningsrisikoen er høyest og farmakokinetikken til takrolimus kan fluktuere i stor grad [99]. Farmakologisk monitorering kan også gi en viss kontroll med pasientens compliance [18]. Både over- og underdosering av takrolimus påvirker levetiden til den transplanterte. Ved overdosering risikerer pasienten alvorlige bivirkninger, mens ved underdosering er det stor risiko for avstøtning av graftet. Det er ekstremt viktig å oppnå målkonsentrasjon så tidlig som mulig etter transplantasjon for å redusere risikoen for graftreksjon [100].

Genetiske variasjoner mellom individer påvirker både de farmakokinetiske og farmakodynamiske egenskaper til takrolimus og gir variabel respons [96].

Kartlegging av det humane genom har åpnet muligheten for individualisert behandling basert på legemiddelmetabolisme. Farmakogenetisk typing kan føre til en betydelig forbedring i individualisert immunsuppressiv behandling [30].

I klinikken benyttes bunnkonsentrasjonsverdien (C_0) av takrolimus for å individuelt justere dosene til transplantasjonspasientene. Flere studier har rapportert at C_0 ikke er den beste markøren for å vurdere den systemiske eksponeringen av takrolimus i stabile levertransplanterte [101-104]. Andre studier som er gjort i tidlig fase etter levertransplantasjon har også vist at C_0 -verdien ikke korrelerer godt nok med total eksponering [105,106]. I motsetning fant Braun et al [107] nær korrelasjon mellom bunnkonsentrasjonsnivået av takrolimus og systemisk eksponering ved tre tidspunkt (rett etter første dose, under den andre uken og 3 måneder posttransplant).

TDM kan være nyttig i langsiktig behandling ved å redusere grafttap og bedre overlevelsen for pasienten [108]. Teoretisk ser man for seg perfekt kontroll på rejeksjon og akutte bivirkninger. Det vil være ønskelig å komme ned på den minste effektive dosen for å redusere langtidseffekter, spesielt malignitet. En studie utført av Jain et al [109] fulgte levertransplanterte resipienter (voksne) som ble behandlet med takrolimus over 90 måneder (1989/90 til 1997). 7 års pasientoverlevelse og graftoverlevelse var henholdsvis 67,8 % og 63,6 %. Infeksjoner, spesielt i det første året etter transplantasjon, var den hyppigste dødsårsaken, fulgt av tilbakefall av grunnsykdom, de novo maligniteter og kardiovaskulære hendelser. Grafttap relatert til akutt eller kronisk rejeksjon var sjelden. Hovedårsaken til sent grafttap og/eller død var i de fleste tilfeller relatert til tilbakevendende sykdom eller manglende pasientetterlevelse. Nefrotoksisitet var den vanligste komplikasjonen av takrolimusbehandling, men resultater fra studien viste at cirka 8 år etter levertransplantasjon hadde mindre enn 4 % av pasientene terminal nyresykdom med behov for dialyse eller nyretransplantasjon [109].

I en langtidsoppfølgingsstudie over 15 år ble det inkludert 1000 levertransplanterte resipienter (voksne og barn) fra 1989/92 med oppfølging til 2004. Målet med studien var å undersøke påvirkningen av takrolimus hos resipientene. Totalt sett lå 15 års pasientoverlevelse og graftoverlevelse på henholdsvis 51,4 % og 46,1 %. Hovedparten av sene dødsfall var på grunn av aldersrelaterte komplikasjoner, tilbakefall av opprinnelig sykdom og de novo cancer [110].

I dag ønsker man forsøksvis å redusere kalsineurinhemmere (CNI) og andre immunsuppressive medikamenter. CNI-sparende strategier inkluderer å unngå, redusere eller å trekke tilbake medikamentet. Det er fortsatt begrenset kunnskap om CNI-sparende regimer virker preventive eller forverrer de novo patologiske tilstander [111].

2. Formål

Formålet med oppgaven er å beskrive i detalj takrolimus farmakokinetikk i tidlig fase, det vil si de første 3-4 uker, etter levertransplantasjon. I denne fasen har man høyest risiko for å utvikle akutt reaksjon. På grunn av store intra- og interindividuelle variasjoner i respons på takrolimus må behandlingen monitoreres nøye.

Det kan ta tid før man oppnår optimal dosering for den enkelte pasient, noe som kan medføre både over- og underimmunsuppresjon, og risiko for toksiske effekter eller reaksjon. Begge disse tilfeller kan gi pasienten alvorlige komplikasjoner og det er derfor ønskelig å komme raskt til optimale dosering.

Det har vært diskutert om C_0 -verdien er den beste doseringsparameteren i behandling med takrolimus. I den tidlige fasen er kanskje ikke C_0 -verdien representativ for eksponeringen av takrolimus.

Opgaven er en del av en større pågående studie (MONOMIX: monitoring of mycophenolate by IMPDH in liver tx).

3. Materiale og metoder

3.1 Inkludering av pasienter

Oppgaven er en del av en deskriptiv, åpen, ikke-randomisert studie uten intervensjon.

Det er planlagt å inkludere totalt 15 pasienter i studien. Denne mastergradsoppgaven omfatter de første 11 pasientene som ble inkludert. Pasientene ble inkludert av transplantasjonskirurg, som også innhentet skriftlig, informert samtykke. Samtykket ble innhentet som oftest etter transplantasjon. Innkomstprøver, som ble tatt før transplantasjon, ble destruert hvis pasienten ikke samtykket. I henhold til protokollen ble ikke pasienter under 18 år inkludert, heller ikke pasienter som startet på andre legemiddelkombinasjoner enn mykofenolat, takrolimus, steroider og IL-2R-antistoff, eller som deltok i andre studier som intervenerte med terapien. En generell klinisk vurdering foretatt av behandlende lege avgjorde tilslutt om pasienten kunne inkluderes. Pasientene ble også gjort oppmerksom på at de til en hver tid kunne trekke seg fra studien uten konsekvenser. Studien ble godkjent av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk.

3.2 Immunsuppressivt regime

Standard immunsuppressivt regime er tidligere omtalt i oppgaven (se appendiks A). Bare pasienter som ble behandlet etter denne protokollen, ble inkludert i studien. Rejeksjonsbehandling med steroider (Solu-Medrol), monoklonale antistoff (Orthoclone, OKT-3) og Antitymocyttglobulin (ATG) [16] ble benyttet dersom den kliniske tilstanden til pasienten tilsa det. Doseringen av legemidlene er høyest i den tidlige fasen. Mykofenolat doseres med 1 g to ganger daglig det første året etter transplantasjon, med videre reduksjon av dosen til 1 g daglig. Startdosen til takrolimus er 0,05 mg/kg to ganger daglig, med videre individuell farmakologisk monitorering til man oppnår optimal fullblodskonsentrasjon (5-15 µg/L i de første 30 dager posttransplant). Steroider gis under operasjon i høye doser, og deretter gis prednisolon peroralt, 40 mg to ganger daglig, med intensiv nedtrapping de påfølgende dagene. I fravær av rejeksjon reduseres døgndosen av legemidlene gradvis slik at lavest mulig vedlikeholdsdose oppnås. Ved ukomplisert forløp ender steroidene opp med en

vedlikeholdsdose på 5 mg daglig etter ca 1 år og fullblodkonsentrasjon av takrolimus på 3-8 µg/L.

3.3 Farmakokinetisk studieprotokoll

Innkostprøver av alle aktuelle pasienter ble tatt før transplantasjon. Deretter ble det tatt blodprøver av de inkluderte pasientene på inntil 4 utvalgte dager innen en måned etter transplantasjon. De utvalgte dagene lå i følgende intervallene: Observasjonsdag 1: 1-5 dager posttransplant, Observasjonsdag 2: 5-10 dager, Observasjonsdag 3: 10-17 dager, Observasjonsdag 4: ≥18 dager etter transplantasjon. Blod ble tappet på EDTA Vacutainerglass, for å hindre koagulasjon av blodet. Første blodprøve ble tatt en time før morgendosen ble tatt (C₋₁). Neste prøve ble tatt ved C₀ (rett før dosen tas), og videre ved tidspunktene 0.5 (C_{0.5}), 1 (C₁), 1.5 (C_{1.5}), 2 (C₂), 2.5 (C_{2.5}), 3 (C₃), 4 (C₄), 5 (C₅), 6 (C₆), 8 (C₈), 10 (C₁₀) og 12 (C₁₂) timer etter inntatt dose.

På hvert tidspunkt ble det tatt flere blodprøver til øvrige delprosjekt i samme protokoll. Alle prøver ble tatt fra sentralt venekateter (CVK). Prøveglass A (tappet på alle tidspunkt) ble splittet til fire nye glass. Til takrolimusanalysen ble cirka 1 ml fullblod pipettert av til et nytt glass og fryst ned ved cirka -25°C.

3.4 Metoder

3.4.1 LC-MS/MS

LC-MS/MS (liquid chromatography- tandem mass spectrometry) ble brukt som analysemetode for takrolimus.

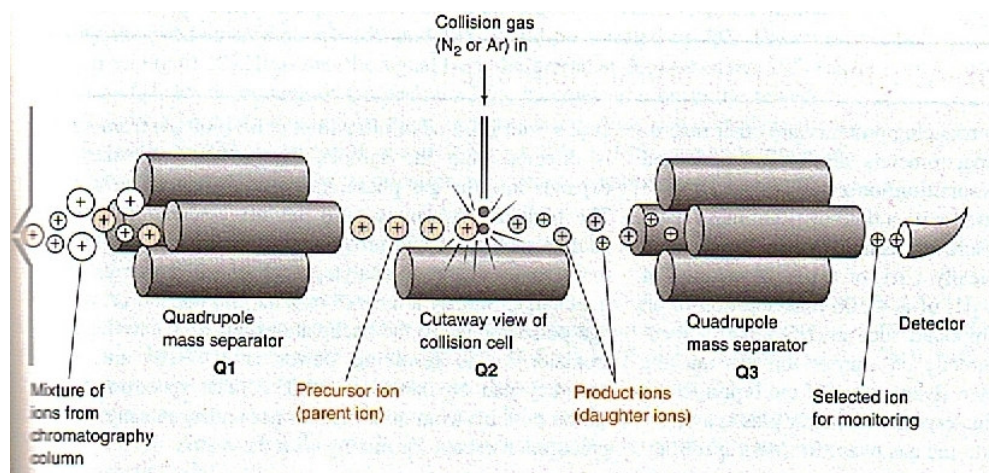
High- performance liquid chromatography (HPLC) er en kromatografisk teknikk som benytter små stasjonærfasepartikler og trykk for å pumpe løsemiddel gjennom en kolonne. Det finnes to hovedtyper eluering. Isokratisk eluering utføres med et enkelt løsemiddel (eller konstant blanding av løsemidler). Gradienteluering utføres med to løsemidler. Det må benyttes løsemidler med HPLC-kvalitet for å unngå å degradere kostbare kolonner med urenheter, og for å redusere detektor bakgrunnssignaler fra forurensing [112].

Massespektrometri (MS) er en teknikk der organiske forbindelser bombarderes med elektroner i vakuum [113], som resulterer i at molekyler ioniseres til ioner (molekylioner)

[112]. Ioniseringen og påfølgende fragmentering skjer i en ionekilde inne i massespektrometeret. Ionene akselereres ut av ionekilden og inn i en analysator som bestemmer molekylionet og molekylfragmentenes masse. Ionene separeres etter forholdet mellom masse (m) og ladning (z) i et magnetisk eller elektrostatisk felt. Ionene registreres ved hjelp av en detektor, som bestemmer mengde ioner som dannes og massen til ionene [113].

Kvadrupolen er den vanligste masseseparatoren som benyttes i dag. Instrumentet består av fire parallelle staver der det anvendes både en konstant spenning og en høyfrekvens vekslende spenning. Det elektriske feltet bøyer av ioner i komplekse baner når de vandrer fra ioniseringskammeret til detektoren. Bare de ionene (resonans ioner) som har et spesielt m/z forhold når detektoren og registreres. Andre ioner (non-resonans ioner) blir bøyd av og kolliderer med stavene og tapes før de når detektoren. Ved å variere spenningen kan ioner med forskjellige masse nå detektoren [112].

Det ble benyttet et trippel kvadrupol massespektrometer i analysemetoden. Se figur 4.



Figur 4. Trippel kvadrupol massespektrometer. Figuren er hentet fra Harris [112].

En blanding av ioner ledes inn i kvadrupol 1 (Q1). På bakgrunn av valgte innstillingene på instrumentet vil kun det ønskede precursor-ion slippe inn i kollisjonscellen Q2. Her blir ionene fragmentert av kollisjonsgass (Nitrogen eller Argon) og danner produkt-ioner. Alle fragment-ioner slipper videre inn i Q3. Kun spesifikke ioner når detektoren. Denne teknikken er svært selektiv for analytten man ønsker å måle.

Kromatografi koblet med massespektrometri. Massespektrometri er ofte brukt som detektor i kromatografi. Spektrometri er en sensitiv metode og kan benyttes ved lave

konsentrasjoner av analytter. Den gir både kvalitativ og kvantitativ informasjon om forbindelser, og kan skille substanser med samme retensjonstid fra hverandre. Spektrometeret kan også være svært selektivt for analytten man er interessert i, og denne selektiviteten letter behovet for prøvebearbeidelse [112].

I denne analysen ble det brukt elektropray (ESI). Når denne type injeksjonsteknikk benyttes, vil væskestrømmen fra HPLC-kolonnen forstøves ved hjelp av en tørkegass (nitrogen), og det dannes en aerosol. Analyttmolekylene beholder sin ladning og føres videre i masseanalysatoren på grunn elektrisk spenning [113].

Det ble benyttet en intern-standard-metode for å lage standardkurver. Intern standard tilsettes i kjent konsentrasjon i prøver før prøveopparbeidelsen starter. Det forutsettes at intern standard har molekylvekt tilnærmet lik analytten. Ved at intern standard oppfører seg som analytten man skal bestemme, vil man kunne korrigere for systematiske og tilfeldige feil som skjer under analysen. Ascomycin (molekylvekt 792,02 g/mol) ble brukt som intern standard for analyse av takrolimus (molekylvekt 804,02 g/mol).

Det lages standardløsninger i det konsentrasjonsområdet som skal bestemmes og intern standard tilsettes. Standardkurve lages basert på målinger av topparealene for analytten og intern standard.

Konsentrasjon av analytt i prøveløsningen bestemmes ved å tilsette den samme konsentrasjon av intern standard som ble brukt i standardløsningene. Standardkurven benyttes til å bestemme konsentrasjonen av analytten [113].

3.4.2 Konsentrasjonsbestemmelse av takrolimus

Før analysen ble prøver, standarder, kvalitetskontroller og ekstern kontroll tint. Prøvene ble deretter homogenisert ved vortex-miks og 50 µl av analytten ble pipetert. Det ble tilsatt 200 µl 0,1 M sinkulfat ($ZnSO_4$) og blandet med vortex-miks i 5 sekunder. Blandingen ble sentrifugert ved 3500 rpm i 30 sekunder. 500 µl intern standard (ascomycin 2 µg/L i acetonitril) ble tilsatt og blandet med vortex-mikser i 20 sekunder. Dette førte til proteinfelling. Rørene ble sentrifugert ved 13 400 g i 2 minutter, og 300 µl supernatant ble overført til insert/vial, og deretter målt ved LC-MS/MS.

Oversikt over betingelser for analysen og sammensetning av mobil fase er vedlagt. Se appendiks C.

3.4.3 Beregninger

Presisjon er definert som spredning i analyseresultater og rapporteres vanligvis som prosent relativt standardavvik for et statistisk signifikant antall prøver. Relativt standardavvik, RSD, beregnes på følgende måte:

$$\text{RSD} = s/m * 100 \%,$$

hvor s er standardavviket og m er middelverdien. God presisjon synliggjøres av lavt relativt standardavvik.

Nøyaktighet er avvik i prosent fra sann verdi. Analysemetodens nøyaktighet skal forsikre at det ikke er systematiske feil ved metoden.

Tabell D1 (i Appendiks D) viser beregnet presisjon og nøyaktighet for kontroller.

Kvalitetskontroller ble kjørt både før og etter analysen av prøvene. Beregningene viser at presisjon og nøyaktighet er god for analysen.

Det ble også benyttet en ekstern kontroll som kvalitetssikring. Ekstern kontroll ble kjørt før analysen av prøvene. Nøyaktigheten ligger innenfor 10 %.

Bunnkonsentrasjon og C_{\max} ble avlest fra kurvene.

Halveringstid ble beregnet ut i fra eliminasjonskonstanten (k_{el}) via av standard formel

$$(t_{1/2} = \ln 2/k_{el}).$$

K_{el} er estimert ut i fra de siste 6 målingene i doseintervallet ved regresjonsanalyse

(ln konsentrasjon mot tid).

Clearanceverdien er uttrykt som et forhold: Clearance/biotilgjengelighet (CL/F). Den er beregnet ut i fra standard formel ($F * \text{Dose} = \text{Cl} * \text{AUC}$).

Korrelasjon er beregnet som produktmomentrelasjonskoeffisienten Pearsons R i excel. R er deretter kvadrert.

Farmakokinetiske profiler (figur 7-10) i resultatdelen er basert på ideelle målinger. For å lage slike kurver må alle målingene vært tatt på samme tid, noe som ikke er mulig i praksis.

Derfor ble disse dataene interpolert til ideell tid, og den ”ideelle” målingen ble beregnet. På den måten kan man sammenligne målinger fra pasientene.

AUC ble beregnet som det arealet den enkelte dosen har bidratt med. Først ble total AUC i intervallet beregnet etter trapesmetoden. Deretter beregnes halens areal, det vil si arealet fra doseintervallets slutt til tiden uendelig (C_{12}/k_{el}). Fra det summerte arealet fra disse to beregninger, trekkes arealet som følger av bunnkonsentrasjonen ved doseintervallets start (C_0/k_{el}). Når arealet den gitte enkeltdose har bidratt med beregnes på denne måten blir beregningen uavhengig av om likevekt er oppnådd [114].

Kliniske data og øvrige laboratoriedata er ekstrahert fra en lokal ad hoc database som er opprettet for hovedprosjektet (Monomix). Dette er data hentet fra journal og laboratoriedatasystem. Presis informasjon om måltider, tidspunkt for doseinntak og annet er registrert ved egen observasjon i de aktuelle doseintervallene.

4. Resultater

Demografisk data for pasientene er vist i tabell 1. Verdiene angir median og (minimum – maksimum) hvis ikke annet er angitt.

Tabell 1. Demografisk data.

Antall (M/K)	11 (7/4)
Alder	55 (19 – 70)
Vekt	73,9 (54,5 – 111,6)
Indikasjon	
PSC	5
PBC	1
Budd-Chiari syndrom*	1
Alkoholisk cirrose	1
Hepatocellulært karsinom	1
Kongenitt hepatisk fibrose	1
Hepatitt C*	1

*2 pasienter ble retransplantert

Planen var å følge opp pasientene på 4 enkeltdager etter transplantasjon. Dette ble gjennomført for 6 pasienter. For pasient 1 manglet to dager (observasjonsdag 3 og 4) og for pasient 5, 8, 10 og 11 manglet én dag, henholdsvis observasjonsdag 1 for pasient 5 og observasjonsdag 4 for de resterende. Det var varierende årsaker til at pasientene ikke fullførte 4 dager: hjemsendelse før dag 18, tap av CVK og midlertidig reservasjon fra pasient 5.

Det foreligger kun data fra 11 pasienter. Dette er et lite antall statistisk og det er derfor vanskelig å oppnå en dokumentert normalfordeling. Det vil derfor være riktig å se på medianverdier ved sammenligning av observasjonsdagene og pasientene.

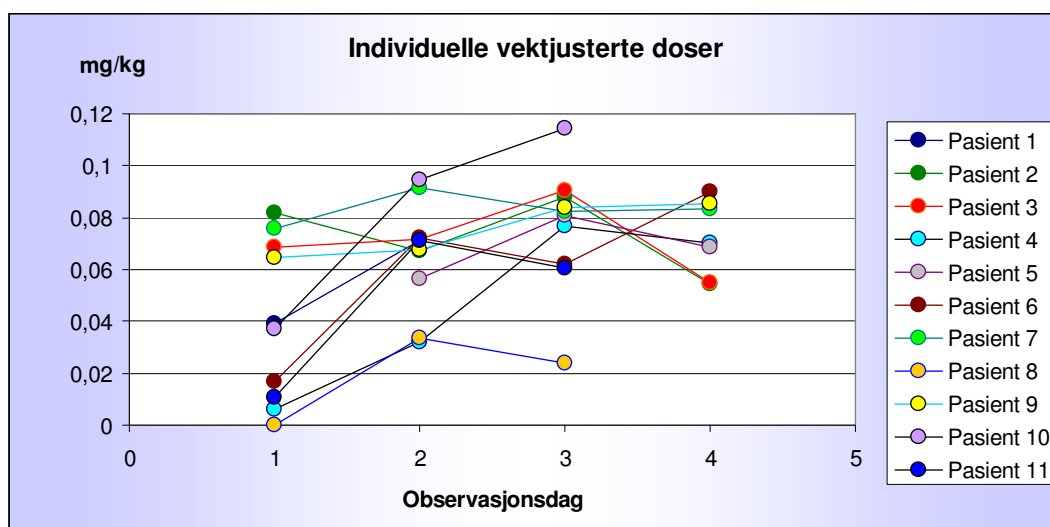
Initial dosering etter transplantasjon var 0,05 mg/kg x 2 i henhold til standard behandlingsprotokoll, med videre justering etter C₀-målinger. Tabell 2 viser median dosebehov for takrolimus med spredningsmål fra de forskjellige dagene. Tallene er basert på morgendosen (enkeltdosering).

Tabell 2. Vektjustert dose Takrolimus (mg/kg).

	Observasjons- dag 1 (3-5)*	Observasjons- dag 2 (7-10)*	Observasjons- dag 3 (13-16)*	Observasjons- dag 4 (18-23)*
Antall pasienter	10	11	10	7
Median, dose	0,038	0,071	0,082	0,070
Spredning	0 – 0,082	0,032 – 0,095	0,024 – 0,114	0,054 – 0,090

*dager posttransplant

Dosebehovet av takrolimus i studieperioden lå i intervallet 0 – 0,11 mg/kg for enkeltmålinger. Doseringsforløpet av enkeltpasienter posttransplant viser store variasjoner. De vektjusterte dosene har en tendens til å flate ut mellom observasjonsdag 3 og 4. Se figur 5.



Figur 5. Individuelle vektjusterte doser (takrolimus) på observasjonsdager.

Pasientene ble monitorert ut i fra bunnkonsentrasjonsverdiene. Optimalt intervall i henhold til standard protokoll ligger mellom 5-15 µg/L de første 30 dagene etter transplantasjon.

Bunnkonsentrasjoner og dose- og vektjustert bunnkonsentrasjon for pasientene er presentert i tabell 3. Bunnkonsentrasjon er her C₀, dersom ikke annet er angitt (altså ikke nødvendigvis den laveste observerte konsentrasjon i doseintervall).

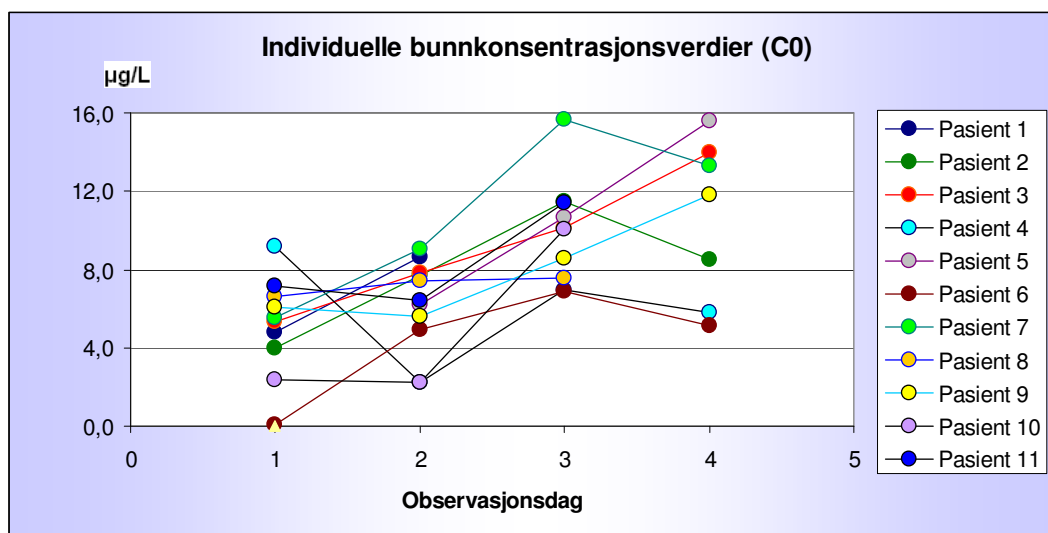
Tabell 3. Bunnkonsentrasjon av Takrolimus ($\mu\text{g/L}$) og dose- og vektjusterte verdier $[(C_0/(\text{Dose}/\text{BW}))]$ $[(\mu\text{g/L})/(\text{mg}/\text{kg})]$.

	Observasjonsdag 1 (3-5)*	Observasjonsdag 2 (7-10)*	Observasjonsdag 3 (13-16)*	Observasjonsdag 4 (18-23)*
Antall pasienter	10	11	10	7
Median, C_0	5,4	6,4	10,15	11,8
Spredning	0,1 – 9,2	2,2 – 9,1	6,9 – 15,7	5,2 – 15,6
Median, dose- og vektjustert C_0	77,1	99,2	133,2	118,5
Spredning, dose- og vektjustert	48,8 – 390,5	23,2 – 219,8	96,9 – 312,0	72,0 – 228,0

*dager posttransplant

Det foreligger en økning i median bunnkonsentrasjon fra observasjonsdag 1 til 4. For den dose- og vektjusterte bunnkonsentrasjonen ser man en økning fra observasjonsdag 1 til 3, og deretter en reduksjon på observasjonsdag 4.

Bunnkonsentrasjonsverdier indikerer store intra- og interindividuelle variasjoner. Se figur 6.



Figur 6. Individuelle bunnkonsentrasjoner (takrolimus) på observasjonsdager.

Eksposering av et medikament kan beskrives ved AUC. Tabell 4 angir median AUC og dose- og vektjusterte verdier med spredningsmål. Dette er AUC-bidraget fra den enkelte dose, som angitt i Metode.

Tabell 4. AUC ($\mu\text{g/L}\cdot\text{time}$) og dose- og vektjustert AUC [$\text{AUC}/(\text{Dose}/\text{BW})$] [$(\mu\text{g/L}\cdot\text{time})/(\text{mg}/\text{kg})$].

	Observasjonsdag 1 (3-5)*	Observasjonsdag 2 (7-10)*	Observasjonsdag 3 (13-16)*	Observasjonsdag 4 (18-23)*
Antall pasienter	10	11	10	7
Median, AUC	72	113	129	147
Spredning	16 – 133	30 – 182	54 – 213	81 – 210
Median, dose- og vektjustert, AUC	1417	1725	1808	2112
Spredning, dose- og vektjustert	439– 5544	716 – 4296	787 – 2581	1160 – 2519

*dager posttransplant

Median AUC øker til det dobbelte fra observasjonsdag 1 til 4. For dose- og vektjustert AUC er det halvannen ganger økning i samme periode.

C_{max} er høyeste målte konsentrasjon i løpet av et doseintervall. Tabell 5 viser C_{max} og dose- og vektjustert C_{max} -verdier.

Tabell 5. C_{max} ($\mu\text{g}/\text{L}$) og dose- og vektjustert C_{max} [$(\mu\text{g}/\text{L})/(\text{mg}/\text{kg})$]

	Observasjonsdag 1 (3-5)*	Observasjonsdag 2 (7-10)*	Observasjonsdag 3 (13-16)*	Observasjonsdag 4 (18-23)*
Antall pasienter	10	11	10	7
Median, C_{max}	9,0	17,7	17,4	24,5
Spredning	3,2– 16,8	4,6 – 30,7	10,1 – 42,8	10,7 – 37,1
Median, dose- og vektjustert, C_{max}	210	247	215	321
Spredning, dose- og vektjustert	110 – 1774	142 – 913	140 – 487	152 – 624

*dager posttransplant

Økning i C_{max} er nesten tre ganger, og for dose- og vektjustert halvannen gang fra observasjonsdag 1 til 4.

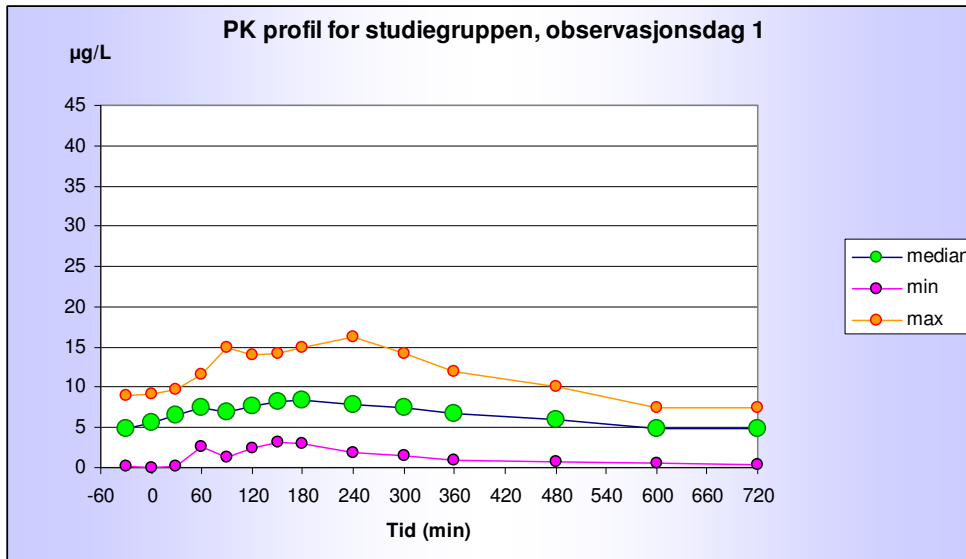
Halveringstid og clearanceverdier for medikamentet på de ulike observasjonsdagene er presentert i tabell 6. Tabellen viser at median halveringstid var relativt stabil, mens clearance sank utover i forløpet. Spredningen var relativt stor for begge parametrene.

Tabell 6. Beregnet halveringstid (time) og clearance (L/time) til takrolimus

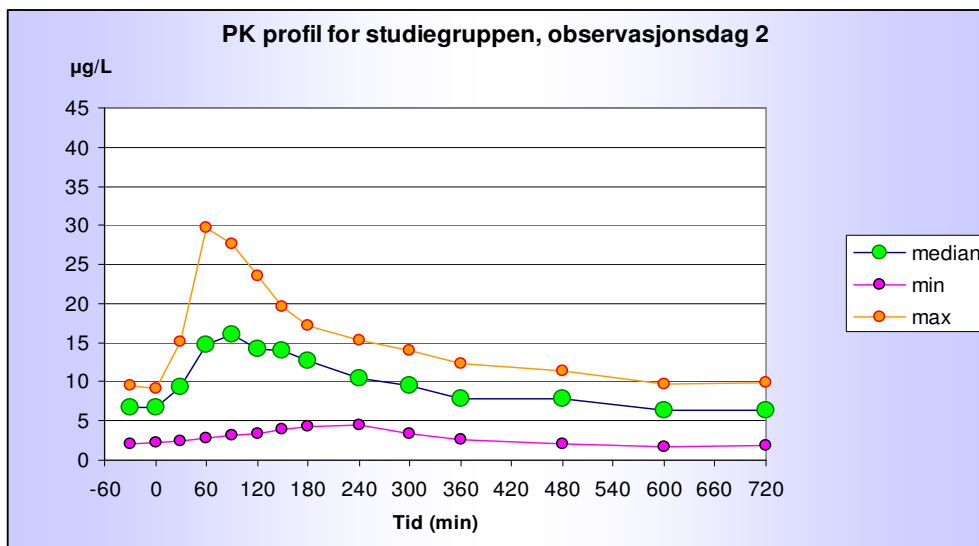
	Observasjons- dag 1 (3-5)*	Observasjons- dag 2 (7-10)*	Observasjons- dag 3 (13-16)*	Observasjons- dag 4 (18-23)*
Antall pasienter	10	11	10	7
Median, $t_{1/2}$	9,6	9,2	8,9	8,3
Spredning	3,7 – 33,6	6,7 – 15,2	6,7 – 17,6	6,0 – 21,1
Median, Cl/F	52,4	48,7	43,2	32,4
Spredning	0,0 – 185,2	24,2 – 103,2	28,2 – 99,0	25,2 – 61,6

*dager posttransplant

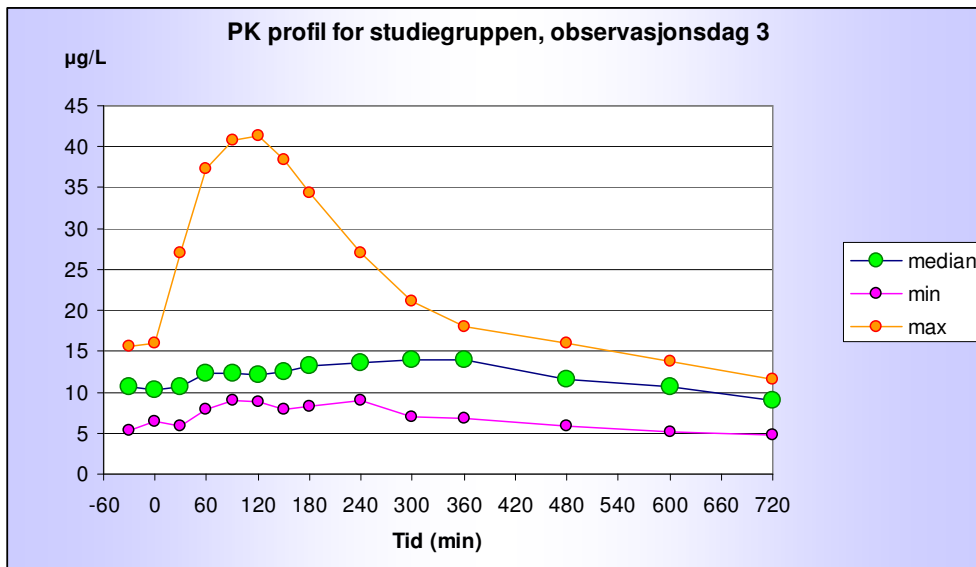
Det ble laget farmakokinetiske (PK) profiler på hver av de fire observasjonsdagene ut i fra medianverdier av takrolimuskonsentrasjoner i doseintervallene. Tallene er basert på ideelle målinger. Figurene viser også maksimums- og minimumskurven. Disse er basert på topp- og bunnkonsentrasjonen på hvert tidspunkt (altså ikke nødvendigvis fra samme pasient). Se figurer 7-10.



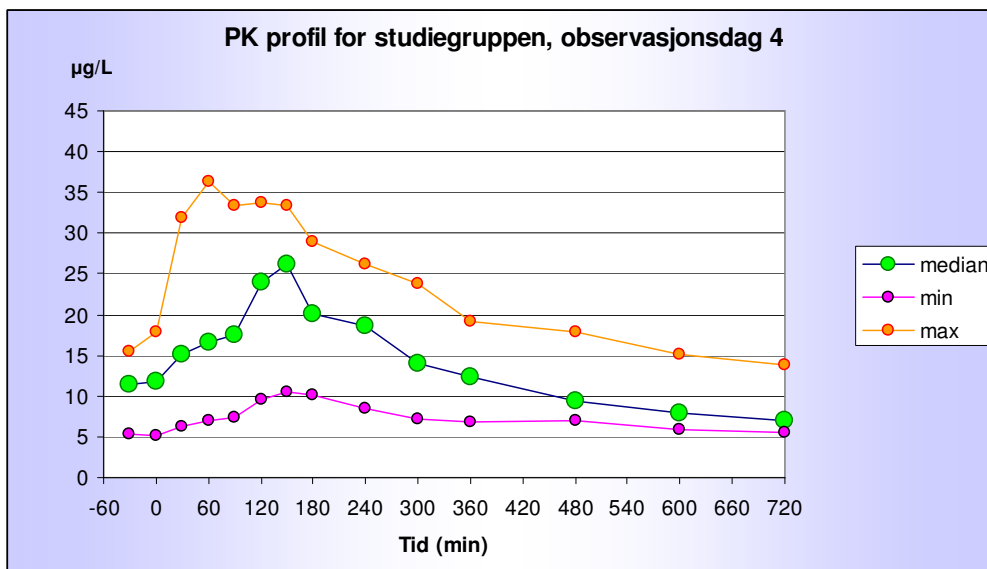
Figur 7. PK-profil (takrolimuskonsentrasjon) til studiegruppen, observasjonsdag 1 (dag 3-5 posttransplant); n=10.



Figur 8. PK-profil (takrolimuskonsentrasjon) til studiegruppen, observasjonsdag 2 (dag 7-10 posttransplant); n=11.



Figur 9. PK-profil (takrolimuskonsentrasjon) for studiegruppen, observasjonsdag 3 (dag 13-16 posttransplant); n=10.



Figur 10. PK-profil (takrolimuskonsentrasjon) for studiegruppen, observasjonsdag 4 (dag 18-23 posttransplant); n=7.

Mediankurven for observasjonsdag 1 viser en flat profil med tilsvarende form for maksimums- og minimumskurven. Observasjonsdag 2 har en topp mellom 60 og 120 minutter etter inntatt dose Denne er mer uttalt i maksimumskurven. Figur 9 viser en flat median profil for observasjonsdag 3. Denne følges av minimumsprofilen mens maksimumsprofilen har en

høy topp ved 120 minutter. Profilen for observasjonsdag dag 4 viser en median topp etter 120 minutter.

Det ble laget farmakokinetiske profiler for hver pasient basert på tiden etter dosen og konsentrasjonen av takrolimus i fullblod for hver av observasjonsdagene. I disse profilene benyttes de faktiske prøvetidspunktene og kurven er basert på de målte verdiene (ikke justert for tidspunkter). Figurene viser at det forligger både intra- og interindividuell variasjon.

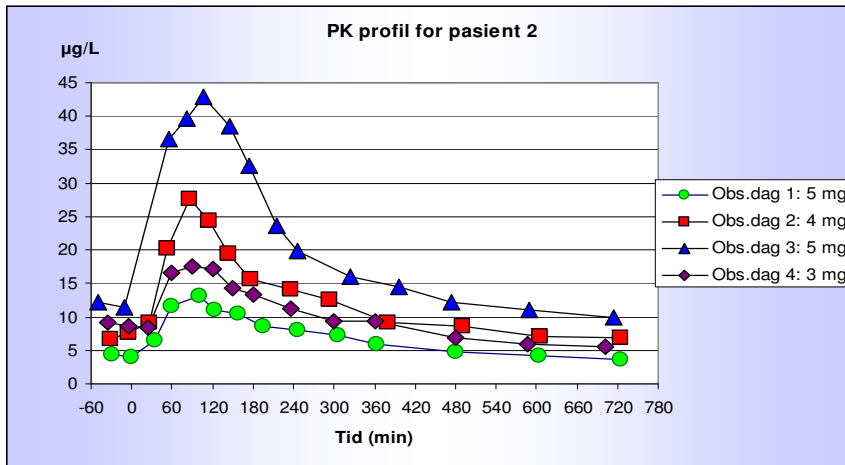
Farmakokinetiske profiler fra 3 pasienter (pasient 2, 3, 4) med målinger fra 4 observasjonsdager er presentert i figur 11-13. Disse er plukket ut for å vise hvor betydelig variasjonen er mellom pasientene. De resterende 8 profilene er presentert i appendiks E. Angitt dosering i figurene er morgendosering på den aktuelle observasjonsdagen. Se figur 11-13.

Pasient 2 ble valgt ut fordi kurvene viser en "klassisk" absorpsjons profil med C_{max} på omtrent samme tidspunkt på alle observasjonsdagene. Pasienten fikk en rejeksjonsepisode mellom observasjonsdag 1 og 2.

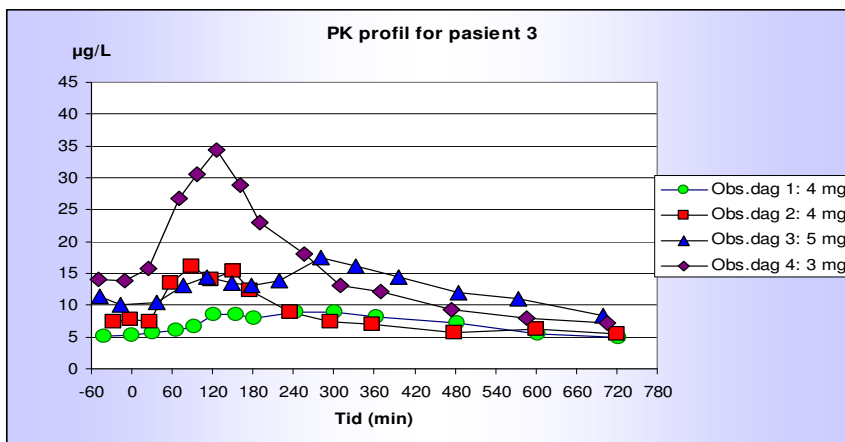
Pasient 3 har en PK-profil som har visse likhetstrekk med flere av de andre pasientprofilene. C_0 har økende verdier utover i forløpet og pasienten opplevde ikke rejeksjon i studieperioden.

Farmakokinetisk profil for pasient 4, presentert i figur 13 viser en flat farmakokinetisk form alle observasjonsdagene. Pasienten opplevde en rejeksjonsperiode mellom dag 2 og 3.

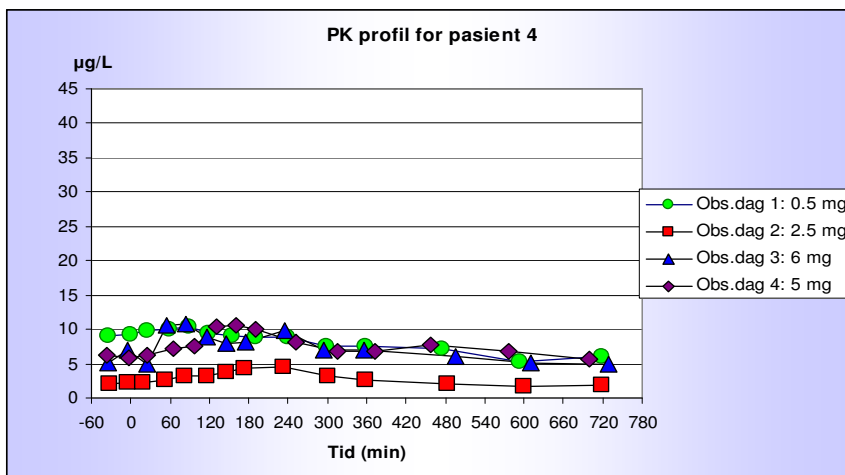
Tabell 7 viser ulike parameter for pasient 2, 3 og 4.



Figur 11. PK-profiler (takrolimuskonsentrasjon) for pasient 2, alle observasjonsdager.



Figur 12. PK-profiler (takrolimuskonsentrasjon) for pasient 3, alle observasjonsdager.



Figur 13. PK-profiler (takrolimuskonsentrasjon) for pasient 4, alle observasjonsdager.

Tabell 7. Oversikt over ulike parametre for pasient 2, 3 og 4 (D=dose).

Pasient	Observasjonsdag	1	2	3	4
2	D (mg)	5,0	4,0	5,0	3,0
	D/kg (mg/kg)	0,082	0,067	0,088	0,054
	D (N-1)(mg)	5,0	4,0	4,0	4,0
	D/kg (N-1)(mg/kg)	0,082	0,066	0,069	0,073
	C₀ (µg/L)	4,0	7,7	11,5	8,5
	C₀/(D/BW)[(µg/L)/(mg/kg)]	48,8	114,9	163,6	117,1
	AUC (µg/L*time)	75,8	133,0	171,6	82,8
	AUC/(D/BW)[(µg/L*time)/(mg/kg)]	924,2	1984,4	1963,3	1520,6
	C_{max} (µg/L)	13,2	27,6	42,8	17,5
	C_{max}/(D/BW)[(µg/L)/(mg/kg)]	160,7	412,4	487,2	321,0
3	D (mg)	4,0	4,0	5,0	3,0
	D/kg (mg/kg)	0,069	0,072	0,091	0,055
	D (N-1) (mg)	4,0	4,0	5,0	4,0
	D/kg (N-1) (mg/kg)	0,069	0,072	0,091	0,073
	C₀ (µg/L)	5,3	7,8	10,2	14,0
	C₀/(D/BW) [(µg/L)/(mg/kg)]	77,1	108,8	112,4	190,8
	AUC (µg/L*time)	81,6	56,0	131,1	118,7
	AUC/(D/BW)[(µg/L*time)/(mg/kg)]	1187,7	781,8	1444,5	2156,6
	C_{max} (µg/L)	9,0	16,1	17,4	34,4
	C_{max}/(D/BW)[(µg/L)/(mg/kg)]	131,0	224,9	191,5	624,2
4	D (mg)	0,5	2,5	6,0	5,0
	D/kg (mg/kg)	0,006	0,032	0,077	0,070
	D (N-1) (mg)	2,0	2,5	5,0	5,0
	D/kg (N-1) (mg/kg)	0,023	0,032	0,064	0,070
	C₀ (µg/L)	9,2	2,2	7,0	5,8
	C₀/(D/BW) [(µg/L)/(mg/kg)]	390,5	68,6	109,2	82,8
	AUC (µg/L*time)	32,6	30,3	60,6	81,2
	AUC/(D/BW)[(µg/L*time)/(mg/kg)]	5544,0	940,7	787,4	1159,8
	C_{max} (µg/L)	10,5	4,6	10,8	10,7
	C_{max}/(D/BW)[(µg/L)/(mg/kg)]	1774,4	142,0	140,0	152,2

Tabell 7 viser at de ulike parametrene varierer mellom pasientene. Dette er tre forskjellige tilfeller, og indikerer hvor store variasjoner som foreligger hos levertransplanterte pasienter i den tidlige fasen etter operasjon.

Flere pasienter opplevde en reaksjonsepisode (pasient 2, 4, 7 og 10). Disse kom 5-8 dager etter transplantasjon. Når reaksjonen oppdages, settes pasienten på høye doser metylprednisolon i cirka 6 dager etter episoden. Intensiteten og dosene varierte mellom pasientene. Pasient 4 fikk i tillegg behandling med ATG i 3 dager (ikke påfølgende).

Flere av pasienten fikk grapefruktjuice (pasient 1, 4, 5, 9 og 10) i et forsøk på å øke opptaket av takrolimus. Generelt gjelder dette pasienter som trenger store doser takrolimus for å komme opp i optimal konsentrasjon. Doseringene varierte fra 100 ml til 400 ml daglig.

Det ble beregnet korrelasjon mellom tidspunkt og total eksponering. Tabell 8 viser korrelasjonskoeffisienten (R^2) for hver av konsentrasjonsmålingene C_0 , C_2 , C_3 , C_4 , C_6 og C_{12} mot AUC. Korrelasjon er beregnet for alle pasienter på de forskjellige observasjonsdagene og viser stor variasjon.

Tabell 8. Korrelasjonskoeffisient (R^2) mellom konsentrasjon ved ulike tidspunkt og totaleksponering, AUC.

	Observasjons- dag 1 (3-5)*	Observasjons- dag 2 (7-10)*	Observasjons- dag 3 (13-16)*	Observasjons- dag 4 (18-23)*
Antall pasienter	10	11	10	7
C_0	0,11	0,51	0,81	0,06
C_2	0,06	0,59	0,55	0,39
C_3	0,46	0,59	0,55	0,39
C_4	0,60	0,81	0,78	0,76
C_6	0,69	0,80	0,88	0,57
C_{12}	0,48	0,80	0,87	0,43

*dager posttransplant

5. Diskusjon

Resultatene i studien viser at det kan være komplisert å behandle levertransplanterte med takrolimus i den tidlige fasen etter operasjon.

Tabell 1 viser demografiske data inkludert indikasjon for levertransplantasjon hos pasientene. Det forligger syv forskjellige indikasjoner som gir et bredt spekter av underliggende sykdom. Primær scleroserende cholangitt (PSC) har høyest frekvens i studien (n=5). Dette gjenspeiles også blant levertransplanterte i Norden [15].

For å kunne sammenligne pasientene i studien, ble parametrene dose- og vektjustert. Tabell 2 med vektjustert dose takrolimus viser stor variasjon mellom observasjonsdagene. Dette indikerte hvor vanskelig det var å dosere pasientene i denne perioden etter transplantasjon. Det vide spredningsmålet bekreftet de store interindividuelle variasjonene i takrolimus farmakokinetikk. Se figur 5 for visuell fremstilling. Median vektjustert dose var lavere på observasjonsdag 1 enn de resterende dagene. En av grunnene til dette kan være at man ønsker å initiere pasienten med den lavest mulige effektive dosen siden medikamentet har mange bivirkninger. Hos de fleste pasientene ble dosen økt fra observasjonsdag 1 til 2. Pasientkurvene viste en tendens til å flate ut etter observasjonsdag 3. Dette kan tyde på at pasienten ble behandlet med en mer optimal dose enn i starten, men også at for eksempel absorpsjonsforhold var mer stabilt. På observasjonsdag 4 lå median vektjustert dose på 0,070 mg/kg. Dette var relativt høyt i forhold til den initiale doseringen (0,05 mg/kg) og bekrefter at posttransplantasjonsperioden gir store utfordringer for optimalisering av farmakoterapi.

Som hjelp til å optimalisere doseringen måles bunnkonsentrasjonen av takrolimus i fullblod [28]. Bunnkonsentrasjonen skal optimalt ligge i området 5-15 µg/L de første 30 dagene etter transplantasjon [26]. Tabell 3 viser en økende C_0 -verdi fra observasjonsdag 1 og utover i forløpet. Når bunnkonsentrasjonen ble dose- og vektjustert, forelå det en økning fra observasjonsdag 1 til 3, med en påfølgende reduksjon til observasjonsdag 4. Grunner til dette kan være dosereduksjon hos de fleste pasientene på observasjonsdag 4 (i forhold til observasjonsdag 3), og vektreduksjon. Pasientene tapte i snitt 10 % av sin startvekt i løpet av studieperioden. Ved observasjonsdag 3 og 4 lå alle pasientenes bunnkonsentrasjonsmålinger innenfor det optimale intervallet. Det store spredningsmålet gjenspeiler variasjonen blant pasientenes dosebehov.

Vurdering av AUC for den enkelte pasient kan være både nyttig og interessant for klinikerne. Denne viser hvor mye legemiddel pasienten faktisk eksponeres for ut i fra en gitt dose. Fra et farmakokinetisk ståsted, vil ikke AUC-verdiene være sammenlignbare når kroppsvekt og

dosering er forskjellige, derfor justeres verdiene for dose og vekt. Dette fører til at man kan sammenligne pasienten på samme grunnlag.

Eksponeringen av legemidlet hos pasientene økte utover i studieperioden. Figur 7-10 viser PK-profiler for studiegruppen. Økningen i median AUC kan skyldes doseendring, mens for dose- og vektjustert AUC kan noe av forklaringen ligge i at pasientene gradvis har fått et bedre legemiddeloptak fra tarmen, slik at man får mer uttelling for dosen.

Median C_{\max} og dose- og vektjusterte verdier viser samme trend som AUC-verdiene. Dette kan forklares av doseendringer og bedret medikamentopptak. Det er kjent at tarmfunksjonen kan være dårlig etter operasjon og dermed påvirke absorpsjonen. Det er individuelt hvor lang tid det tar før opptaket i tarmen er normalt hos den enkelte pasient. I tillegg kan årsaken til de interindividuelle variasjonene være genetiske forskjeller mellom pasientene.

Leverprøver er viktige for å overvåke og evaluere graftfunksjonen. Siden det ikke finnes en markør som alene gir nok informasjon om leverfunksjon i den tidlige fasen, blir flere forskjellige markører analysert [16].

Studier har indikert at den transplanterte leveren begynner å påvirke metabolismen av takrolimus først rundt to uker etter transplantasjon [62,115]. Det er vanskelig å si om dette er tilfellet i vår studie. De fleste av pasienten var svært friske og oppegående kort tid etter transplantasjon.

Studiegruppen bestod av kun elleve pasienter. Dette er et lite antall, men mange målinger på hver pasient styrker studien. En svakhet med studien, var at den inkluderte de ”friskeste” blant de levertransplanterte. Doseintervalldagene kunne være hektiske for pasienten, spesielt i de første timene med hyppige blodprøvetakninger. De ”sykeste” pasientene ble ikke inkludert og noen trakk seg fra studien på grunn av dårlig form. Studien kan derfor ikke betraktes som representativ for hele pasientgruppen. Dette fører til skjevhet i utvalget (bias). Tiltross for dette viste resultatene store variasjoner både intra- og interindividuell. Fire pasienter opplevde reaksjonsepisoder, og noen pasienter fikk ordinert grapefruktjuice for å øke opptaket av legemiddelet. Dette tyder på at pasientmaterialet gir et relativt godt bilde over hva som skjer i den tidlige fasen hos levertransplanterte.

Det foreligger hyppige dosejusteringer hos de enkelte pasientene i den første tiden etter transplantasjon. Takrolimus er et legemiddel med lav clearance og ved dosejusteringer kan det ta flere dager før man ser den fulle endringen i blodkonsentrasjonen [28]. I denne første tiden har man ikke tid til at det skal innstille seg likevekt, da dette kan føre til at pasienten blir

underimmunsupprimert og får økt risiko for rejeksjon. Doseringen blir derfor ”titrert i fart”. Justering av dosen ut fra bunnkonsentrasjonen fra dag til dag kan være problematisk. Et økt opptak fra tarm fra en dag til en annen kan gi forhøyet eksponering og kan føre til overimmunsupprimering. Opprettholdes dette over lengre tid gir det økt risiko for alvorlige bivirkninger. For å unngå en plutselig høy eksponering kan pasienten forsøksvis settes på en lavere dose. Hos flere av pasientene i studien var dosen lavere på observasjonsdag 4 enn tidligere observasjonsdager.

Median halveringstid lå mellom 8 og 9 timer for alle observasjonsdagene. Litteraturen henviser til en gjennomsnittlig halveringstid på cirka 12 timer for stabile levertransplanterte, og er enda lengre for friske individer [28].

Siden vi ikke hadde data for intravenøs tilførsel, og derfor ikke kunne beregne relativ biotilgjengelighet, ble det beregnet clearance over biotilgjengelighet (Cl/F). Gjennomsnittlig biotilgjengelighet ligger på cirka 25 %. Benyttes denne verdien ($F=0,25$) blir median clearance forhøyet i forhold til stabile levertransplanterte og friske frivillige [28]. Tabell 6 viser stor spredning i Cl/F. Dette kan skyldes at biotilgjengeligheten varierte mellom pasientene. Hematokritverdiene til pasientene lå relativt lavt i forhold til normalverdiene, både rett etter transplantasjon og videre utover i forløpet. Siden takrolimus i hovedsak bindes til erytrocytter, vil lave verdier av hematokrit kunne føre til økt fri fraksjon som blir tilgjengelig for metabolisme og eliminering. Dette kan være en av årsakene til at halveringstiden var kortere hos disse pasientene (i tidlig fase) og at clearanceverdiene var forhøyet.

Halveringstiden beregnes ut i fra en estimert eliminasjonskonstant som er basert på de seks siste målingene i doseintervallet. Topper som inntreffer senere fører derfor til høye verdier som er med på å gi lengre halveringstider, og dette kan være en av årsakene til den store spredningen.

Farmakokinetiske profiler for enkeltpasientene illustrerer hvor vanskelig det er å dosere resipientene for å opprettholde en optimal effekt. I tillegg til doseendringer, er det flere andre faktorer som kan spille inn på eksponeringen av medikamentet: redusert vekt, rejeksjonsepisoder med høydose steroidbehandling, endringer i tarmmotilitet og funksjon, og hematokritverdier. I tillegg kan genetiske variasjoner i ekspresjon av transportører og legemiddelmetaboliserende enzym gi ulik biotilgjengelighet av medikamentet. Figur 11-13 og tabell 7 viser både intra- og interindividuelle variasjoner hos 3 utvalgte pasienter. Variasjon mellom observasjonsdagene hos den enkelte pasient kan til dels skyldes doseendring, men også bedret opptak utover i forløpet.

De store variasjonene mellom pasienter kan skyldes genetiske forskjeller i enzymene som metaboliserer legemidlet og transportører i enterocytter som pumper tilbake legemidlet til tarmlumen. Disse står også for transport av medikamentet inn i leverceller og fra levercellene til galle. Ulikt andre organtransplantasjoner vil resipienten ved en levertransplantasjon få erstattet sin gamle lever med en som genetisk sett er forskjellig. De fleste legemiddelmetaboliserende enzymer befinner seg i leveren, og bidraget fra donorleveren bør derfor kanskje tas med i beregningene når individuelle variasjoner av legemiddelfarmakokinetikken vurderes [62]. Wei-lin et al [115] studerte levertransplanterte resipienter den første måneden etter transplantasjon. Målet var å undersøke dosebehovet av takrolimus i forhold til MDR1 og CYP3A5 polymorfismer. Det ble observert lavere dosering av takrolimus blant resipienter med MDR1 3435T allelet sammenlignet med 3435CC genotype resipienter, ved alle målingene, i den første måneden etter transplantasjon. Det ble også funnet signifikant forskjell i dosebehovet av takrolimus mellom resipienter som ble transplantert med CYP3A5*1 allel genotype, og resipienter som mottok organer med CYP3A5*3/*3 genotype, både 2 uker og 1 måned etter transplantasjon. Gjennomsnittlig dose, som var nødvendig for å oppnå optimal konsentrasjon, var signifikant lavere i pasienter med en CYP3A5*1 allel. Donors MDR1 og resipientens CYP3A5 genotype påvirket ikke takrolimus' farmakokinetikk hos resipienten. Dette indikerer at virkninger av polymorfismer i CYP3A5 hovedsakelig kom fra donorleveren.

Det ble ikke utført genotyping i oppgaven. I prøveinnsamlingen ble det samlet inn fullblod før transplantasjon. Dette gir mulighet for å genotype i senere studier.

Det var fire pasienter (pasient 2, 4, 7, 10) som opplevde reaksjonsepisoder i løpet av studieperioden. Disse ble behandlet med høye doser steroider. Det kan virke som om steroidene har en tendens til å redusere eksponeringen av takrolimus [92]. Farmakokinetiske profiler for alle pasientene viser at det forekommer like store svingninger hos de som fikk reaksjon, og var under steroidbehandling, som for de som ikke fikk reaksjon i studieperioden. Det er derfor vanskelig ut fra dette materialet å konkludere om steroidpåvirkningen har betydning for de interindividuelle variasjonene i takrolimus farmakokinetikk. En indikator på reaksjon kan være bilirubinverdien. Fra kliniske data (ikke presentert) på pasientene ble det observert høyere bilirubinverdier hos de pasientene som opplevde reaksjonsepisoder.

I forsøk på å bedre oral biotilgjengelighet fikk flere av pasientene (pasient 1, 4, 5, 9, 10) grapefruktjuice (100-400 ml daglig). Fukatsu et al [116] rapporterte om betraktelig økning i takrolimus bunnkonsentrasjon (4.7 ng/mL til 37.2 ng/mL) etter samtidig inntak av grapefruktjuice hos en resipient (250 mL, 4 ganger i løpet av 3 dager). Effekten kom nesten en uke etter siste inntak, og ikke umiddelbart slik andre har indikert [88,89]. Det ble spekulert på om forsinkelsen i effekt kunne være et resultat av en gradvis redusert intestinal CYP3A-proteinkonsentrasjon [116].

To av pasientene i denne studien fikk grapefruktjuice etter en reaksjonsepisode (pasient 4 og 10). Kurver og tabelldata (ikke presentert) i denne studien ga ingen holdepunkter for å anta at grapefruktjuice hadde betydning for opptaket av takrolimus. Pasient 10 synes å ha nytte av grapefruktjuice men fikk både høyere doser takrolimus og var under reaksjonsbehandling med steroider på samme tid.

Retningslinjer for behandling med takrolimus anbefaler inntak uavhengig av mat (1 time før eller 2 til 3 timer etter inntatt måltid), på grunn av at mat kan redusere absorpsjonshastigheten og opptaket av takrolimus [28]. I praksis kan det være vanskelig å administrere legemidlet utenom måltid. Avdelingsprosedyrene tilstreber et medikamentinntak tilnærmet likt hver dag for å kontrollere for konfunderende faktorer (tidspunkt, måltid, andre medikamenter).

I klinikken i dag benyttes tradisjonell farmakokinetisk monitorering av pasientene som behandles med takrolimus. Doseringen styres etter C_0 -målinger og det har vært diskusjon om dette tidspunktet er det beste [101-107]. Korrelasjonsresultatene i oppgaven viser at C_0 -målingene har variabel korrelasjon med AUC_{0-12} . Dette fører til liten forutsigbarhet i behandlingsforløpet. I studien viste resultatene fra C_4 - og C_6 -målinger jevnt over bedre korrelasjon, og kan derfor virke som et nyttigere måletidspunkt for total eksponering. Hyppigere målinger, innenfor et doseintervall, kan muligens gi et bedre grunnlag for dosering av pasienten i den tidlige fasen etter transplantasjon.

Flere studier har sett på muligheter for å styre behandlingen via farmakodynamisk monitorering [99,117,118]. Måling av kalsineurinaktivitet alene eller kombinert med konsentrasjonsmåling kan være et alternativ for å få større kontroll over eksponeringen hos den enkelte pasient.

Leveren er et relativt privilegert organ med hensyn på transplantasjon. Det hevdes at den er utsatt for mindre aggressivt immunologisk angrep enn andre organer [119], og at pasienter

som mottar en ny lever trenger mindre immunsuppresjon enn andre organresipienter [120]. Under utvikling i fosterliv programmeres immunsystemet til å akseptere alt av sitt eget vev som selvprodukter. For transplantasjonsforskning de siste 40 årene, har målet vært å midlertidig manipulere det utviklede immunsystemet til en lignende tilstand som i fosterliv på transplantasjonstidspunkt, slik at det nye organet aksepteres. Dette betegnes som immunologisk toleranse og man har oppnådd dette i in vitro forsøk. Disse teknikker er imidlertid ikke passende for klinisk bruk ved organtransplantasjon [121]. Mazariegos et al [122] har vist at flere pasienter har oppnådd virksom toleranse etter avvenning av immunsuppressiv behandling. I 2000 rapporterte Calne [121] om en leverresipient som hadde levd 15 år uten immunsuppressiv behandling. Pasienten var noncompliant, og likte ikke bivirkningene av medikamentene. Det er svært uvanlig for organresipienter å stoppe medisineren uten å måtte betale for det i form av akutt eller kronisk rejeksjon [121]. Erfaringen fra transplantasjonsenheten viser at pasienter som selv seponerer immunsuppresjon får rejeksjon, selv når slik seponering foregår lang tid etter transplantasjon.

Nylig har det kliniske fokuset skiftet fra en primær vektlegging på å hindre akutt rejeksjon tidlig etter transplantasjon, til varig opprettholdelse av langtids graftoverlevelse og demping av bivirkningene som er assosiert med immunsuppressive regimer [123]. Selv om man har oppnådd utmerket korttids organoverlevelse og lav akutt rejeksjonsrate, har man ikke sett tilsvarende langtids forbedringer [124]. Blant legemidlene som brukes i dag, er det ofte CNI og kortikosteroidene som blir sett på som synderne i utvikling av klinisk relevante bivirkninger selv etter vellykket transplantasjon. For å redusere eller unngå bivirkningene, har man prøvd å unngå eller trekke tilbake CNI eller kortikosteroider, eller å redusere eksponeringen til medikamentene.

CNI-frie regimer har vært utviklet og fremmet med mål om å bedre graftfunksjonen og senere langtids organoverlevelse. Seponering av CNI eller kortikosteroider har ført til en relativt stor insidens av akutt rejeksjon, som fører til slitasje på graftfunksjonen. Resultater per dags dato har indikert varierende effekt og studier med langtidsoppfølging er ikke tilgjengelig [123].

De immunsuppressive legemidlene som er i bruk i dag induserer en sterk undertrykking av immunresponser, og fører til signifikante bivirkninger utenfor immunsystemet.

Man ønsker:

1. å skreddersy immunsuppresjonen i forhold til reaktiviteten den transplanterte resipienten har mot donor alloantigener, ved å vurdere pålitelige og validerte biomarkører
2. å designe nye terapeutiske verktøy for å regulere immunhendelser som ødelegger transplantatet [125].

En biomarkør defineres som et molekyl, ofte protein, som kan måles og vurderes som en indikator for normale biologiske eller patogene prosesser eller farmakologiske responser til en terapeutisk intervensjon [126]. Eksempler i transplantasjonsmedisin inkluderer: antistoff mot HLA, genetiske markører i perifert blod og donorspesifikk T-celle responser. [125].

Pasientens bekymringer i forbindelse med transplantasjon og i den postoperative perioden kan kanskje påvirke det videre forløpet. Goetzmann et al [127] viste til at 72 % av transplanterte pasienter (hjerte, lunge, lever og nyre) utviklet en følelse av ansvar for det mottatte organet og dens funksjon. I Norge benyttes utelukkende organ fra avdød donor til voksne resipienter. Pasienter som trenger levertransplantasjon er en voksende gruppe, og tilgang på organer varierer. Behovet for optimal behandling er derfor essensielt for å unngå tap av graft eller pasient.

6. Konklusjon

Studien viste at det er foreliggende store intra- og interindividuelle variasjoner i medikamentopptak og eksponering i studiegruppen i den tidlige fasen etter levertransplantasjon. Takrolimus er et legemiddel med et smalt terapeutisk vindu og det er derfor ekstremt viktig å oppnå raskt optimal konsentrasjon, slik at risikoen for over- eller underimmunsupprimering reduseres til et minimum. Konsekvensene av utilfredsstillende behandling kan være alvorlig for pasienten med både reaksjonsrisiko og toksiske bivirkninger.

Resultatene kan tyde på at dagens protokoll med bruk av C_0 -verdier som markør for dosejustering ikke er tilfredsstillende i den tidlige posttransplantasjonsperiode. Ut fra denne studien korrelerer både C_4 - og C_6 -målinger bedre med total eksponering, men eventuell bruk av slike parametre er også et spørsmål om hva som er gjennomførbart i praksis. Hyppigere målinger, innenfor et doseintervall, og eventuelt farmakodynamisk monitorering kan være alternativer for å gi et bedre grunnlag for dosering av pasienten i den tidlige fasen etter transplantasjon.

Polymorfismer i legemiddelmetaboliserende enzym og transportører kan også spille en rolle i de individuelle variasjonene som sees i studien. Bidraget fra donorleveren bør vurderes og genotyping kan gi en indikasjon på dosebehovet hos den enkelte pasient.

Ved levertransplantasjon benyttes en immunsuppressiv trippelbehandling. Når fullstendig data for de to andre medikamentene (steroider, mykofenolat) foreligger, vil man kunne avdekke om de observerte variasjonene i studien er biologiske eller medikamentspesifikke.

Referanseliste

Litteraturliste

1. Haubrich W.S. *Medical meanings: a glossary of word origins*, 2.edn. American College of Physicians, Philadelphia, 2003.
2. Hofmann, B. [Medical technology in the new millennium]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2000; 120: 94-98.
3. Guyton, A.C., Hall, J.E. *Textbook of Medical Physiology*, 11th.edn. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2006.
4. Sand, O., Sjaastad Ø.V, Haug, E., Toverud, K.C. *Menneskets fysiologi*, Gyldendal akademisk, Oslo, 2001.
5. Kåss, E., Marthilm, G. *Medisinsk ordbok*, 5.edn. Kunnskapsforlaget, Oslo, 1998.
6. Bogen, B., Munthe, L.A. *Immunologi*, 2.edn. Universitetsforlaget, Oslo, 2007.
7. Thorsby, E. [Transplantation medicine in Norway through 50 years]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2006; 126: 3305-3310.
8. Abbasoglu, O. Liver transplantation: yesterday, today and tomorrow. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3117-3122.
9. Soreide, O., Husberg, B., Bjoro, K., Schrupf, E. [Liver transplantation--development and experiences]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1999; 119: 3310-3314.
10. Raia, S., Nery, J.R., Mies, S. Liver transplantation from live donors. *Lancet* 1989; 2: 497.
11. Bakkan, P. A. Organdonasjon og transplantasjon Årsrapport 2008. <http://www.rikshospitalet.no/iKnowBase/Content/435763/Organdon-transpl-2008-pdf> (2008).
12. Anonymous. Guideline on clinical investigation of immunosuppressants for solid organ transplantation. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ewp/26314806enfin.pdf> (2008).
13. Tan, H.K. Molecular adsorbent recirculating system (MARS). *Ann Acad Med Singapore* 2004; 33: 329-335.

14. Boyle, M., Kurtovic, J., Bihari, D., Riordan, S., Steiner, C. Equipment review: the molecular adsorbents recirculating system (MARS). *Crit Care* 2004; 8: 280-286.
15. Anonymous. The Nordic Liver Transplant Registry Annual report 2007. <http://www.scandiarttransplant.org/NLTR2007.pdf> (2007).
16. Anonymous. Protokoll Levertransplantasjon. <http://www.rikshospitalet.no/iKnowBase/Content/413563/Leverprotokollen.pdf> (2006).
17. Sayegh, M.H., Turka, L.A. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998; 338: 1813-1821.
18. Bergan, S., Albrechtsen, D., Bentdal, O. [Immunosuppressive agents in organ transplantation]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1999; 119: 3615-3620.
19. Sayegh, M.H., Watschinger, B., Carpenter, C.B. Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides. *Transplantation* 1994; 57: 1295-1302.
20. Afzali, B., Lechler, R.I., Hernandez-Fuentes, M.P. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens* 2007; 69: 545-556.
21. Kahan, B.D. Individuality: the barrier to optimal immunosuppression. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 831-838.
22. Aw, M.M. Transplant immunology. *J Pediatr Surg* 2003; 38: 1275-1280.
23. Sayegh, M.H., Carpenter, C.B. Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. *N Engl J Med* 2004; 351: 2761-2766.
24. Anonymous. A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group. *N Engl J Med* 1994; 331: 1110-1115.
25. Anonymous. Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. European FK506 Multicentre Liver Study Group. *Lancet* 1994; 344: 423-428.
26. Anonymous. Immunosuppresjonsprotokoller ved Levertx. <http://www.anx.no/content/category/6/22/50/> (2007).

27. O'Neil, M.J. *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, 14th.edn. Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, NJ, USA, 2006.
28. Anonymous. Astellas Pharma a/s SPC Prograf.
http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch_80333.aspx?SearchID=915b4779-8d5a-4ea9-9586-2ff4fd60c6fb (2007).
29. Staatz, C.E., Tett, S.E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43: 623-653.
30. Post, D.J., Douglas, D.D., Mulligan, D.C. Immunosuppression in liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11: 1307-1314.
31. Gruber, S.A., Hewitt, J.M., Sorenson, A.L., Barber, D.L., Bowers, L., Rynders, G., Arrazola, L., Matas, A.J., Rosenberg, M.E., Canafax, D.M. Pharmacokinetics of FK506 after intravenous and oral administration in patients awaiting renal transplantation. *J Clin Pharmacol* 1994; 34: 859-864.
32. Tuteja, S., Alloway, R.R., Johnson, J.A., Gaber, A.O. The effect of gut metabolism on tacrolimus bioavailability in renal transplant recipients. *Transplantation* 2001; 71: 1303-1307.
33. Benet, L.Z. Impact of intraindividual variability of drugs on therapeutic outcomes: lessons from outside transplantation. *Transplant Proc* 1998; 30: 1650-1651.
34. Zhang, Y., Benet, L.Z. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40: 159-168.
35. Moller, A., Iwasaki, K., Kawamura, A., Teramura, Y., Shiraga, T., Hata, T., Schafer, A., Undre, N.A. The disposition of ¹⁴C-labeled tacrolimus after intravenous and oral administration in healthy human subjects. *Drug Metab Dispos* 1999; 27: 633-636.
36. Alak, A.M., Moy, S. Biological activity of tacrolimus (FK506) and its metabolites from whole blood of kidney transplant patients. *Transplant Proc* 1997; 29: 2487-2490.
37. Shiraga, T., Matsuda, H., Nagase, K., Iwasaki, K., Noda, K., Yamazaki, H., Shimada, T., Funae, Y. Metabolism of FK506, a potent immunosuppressive agent, by cytochrome P450 3A enzymes in rat, dog and human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 727-735.
38. Iwasaki, K., Shiraga, T., Nagase, K., Tozuka, Z., Noda, K., Sakuma, S., Fujitsu, T., Shimatani, K., Sato, A., Fujioka, M. Isolation, identification, and biological activities of

oxidative metabolites of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone. *Drug Metab Dispos* 1993; 21: 971-977.

39. Tozer, T.N., Rowland, M. *Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics The Quantitative Basis of Drug Therapy*, Lippincott Williams & Wilkins, US, 2006.
40. Hesselink, D.A., van Schaik, R.H., van, d.H., I, van der, W.M., Gregoor, P.J., Lindemans, J., Weimar, W., van, G.T. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74: 245-254.
41. Nelson, D. Cytochrome P450s in humans. <http://drnelson.utm.edu/p450lect.htm> (2007).
42. Gellner, K., Eiselt, R., Hustert, E., Arnold, H., Koch, I., Haberl, M., Deglmann, C.J., Burk, O., Buntfuss, D., Escher, S., Bishop, C., Koebe, H.G., Brinkmann, U., Klenk, H.P., Kleine, K., Meyer, U.A., Wojnowski, L. Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 111-121.
43. Anglicheau, D., Legendre, C., Beaune, P., Thervet, E. Cytochrome P450 3A polymorphisms and immunosuppressive drugs: an update. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 835-849.
44. Wrighton, S.A., Brian, W.R., Sari, M.A., Iwasaki, M., Guengerich, F.P., Raucy, J.L., Molowa, D.T., VandenBranden, M. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III_A5 (HLp3). *Mol Pharmacol* 1990; 38: 207-213.
45. Wacher, V.J., Silverman, J.A., Zhang, Y., Benet, L.Z. Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. *J Pharm Sci* 1998; 87: 1322-1330.
46. Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., Guengerich, F.P. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270: 414-423.
47. Anonymous. Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. <http://www.cypalleles.ki.se/> (2008).
48. Ball, S.E., Scatina, J., Kao, J., Ferron, G.M., Fruncillo, R., Mayer, P., Weinryb, I., Guida, M., Hopkins, P.J., Warner, N., Hall, J. Population distribution and effects on

- drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66: 288-294.
49. Rebeck, T.R., Jaffe, J.M., Walker, A.H., Wein, A.J., Malkowicz, S.B. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1225-1229.
 50. Utecht, K.N., Hiles, J.J., Kolesar, J. Effects of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of calcineurin inhibitors. *Am J Health Syst Pharm* 2006; 63: 2340-2348.
 51. Xie, H.G., Wood, A.J., Kim, R.B., Stein, C.M., Wilkinson, G.R. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics* 2004; 5: 243-272.
 52. Kuehl, P., Zhang, J., Lin, Y., Lamba, J., Assem, M., Schuetz, J., Watkins, P.B., Daly, A., Wrighton, S.A., Hall, S.D., Maurel, P., Relling, M., Brimer, C., Yasuda, K., Venkataramanan, R., Strom, S., Thummel, K., Boguski, M.S., Schuetz, E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; 27: 383-391.
 53. Macphee, I.A., Fredericks, S., Mohamed, M., Moreton, M., Carter, N.D., Johnston, A., Goldberg, L., Holt, D.W. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 2005; 79: 499-502.
 54. Zhang, X., Liu, Z.H., Zheng, J.M., Chen, Z.H., Tang, Z., Chen, J.S., Li, L.S. Influence of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus concentration in the early stage after renal transplantation. *Clin Transplant* 2005; 19: 638-643.
 55. Haufroid, V., Mourad, M., Van, K., V, Wawrzyniak, J., De, M.M., Eddour, D.C., Malaise, J., Lison, D., Squifflet, J.P., Wallemacq, P. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 147-154.
 56. Tada, H., Tsuchiya, N., Satoh, S., Kagaya, H., Li, Z., Sato, K., Miura, M., Suzuki, T., Kato, T., Habuchi, T. Impact of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37: 1730-1732.
 57. Tsuchiya, N., Satoh, S., Tada, H., Li, Z., Ohyama, C., Sato, K., Suzuki, T., Habuchi, T., Kato, T. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004; 78: 1182-1187.

58. Thervet, E., Anglicheau, D., King, B., Schlageter, M.H., Cassinat, B., Beaune, P., Legendre, C., Daly, A.K. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 76: 1233-1235.
59. Roy, J.N., Barama, A., Poirier, C., Vinet, B., Roger, M. Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16: 659-665.
60. Zhao, Y., Song, M., Guan, D., Bi, S., Meng, J., Li, Q., Wang, W. Genetic polymorphisms of CYP3A5 genes and concentration of the cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc* 2005; 37: 178-181.
61. Mourad, M., Wallemacq, P., De, M.M., Brandt, D., Van, K., V, Malaise, J., Chaib, E.D., Lison, D., Haufroid, V. The influence of genetic polymorphisms of cytochrome P450 3A5 and ABCB1 on starting dose- and weight-standardized tacrolimus trough concentrations after kidney transplantation in relation to renal function. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 1192-1198.
62. Yu, S., Wu, L., Jin, J., Yan, S., Jiang, G., Xie, H., Zheng, S. Influence of CYP3A5 gene polymorphisms of donor rather than recipient to tacrolimus individual dose requirement in liver transplantation. *Transplantation* 2006; 81: 46-51.
63. Uesugi, M., Masuda, S., Katsura, T., Oike, F., Takada, Y., Inui, K. Effect of intestinal CYP3A5 on postoperative tacrolimus trough levels in living-donor liver transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16: 119-127.
64. Goto, M., Masuda, S., Kiuchi, T., Ogura, Y., Oike, F., Okuda, M., Tanaka, K., Inui, K. CYP3A5*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 471-478.
65. Benet, L.Z., Izumi, T., Zhang, Y., Silverman, J.A., Wacher, V.J. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release* 1999; 62: 25-31.
66. Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D.J., Poplack, D.G., Gottesman, M.M., Pastan, I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 265-269.
67. Mourad, M., Wallemacq, P., De, M.M., Malaise, J., De, P.L., Eddour, D.C., Goffin, E., Lerut, J., Haufroid, V. Biotransformation enzymes and drug transporters pharmacogenetics in relation to immunosuppressive drugs: impact on pharmacokinetics and clinical outcome. *Transplantation* 2008; 85: S19-S24.

68. Saeki, T., Ueda, K., Tanigawara, Y., Hori, R., Komano, T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem* 1993; 268: 6077-6080.
69. Hall, S.D., Thummel, K.E., Watkins, P.B., Lown, K.S., Benet, L.Z., Paine, M.F., Mayo, R.R., Turgeon, D.K., Bailey, D.G., Fontana, R.J., Wrighton, S.A. Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction. *Drug Metab Dispos* 1999; 27: 161-166.
70. Fromm, M.F. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 1295-1310.
71. Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J.M., Kim, I.W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V., Gottesman, M.M. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007; 315: 525-528.
72. Op den Buijsch, R.A., Christiaans, M.H., Stolk, L.M., de Vries, J.E., Cheung, C.Y., Undre, N.A., van Hooff, J.P., van Dieijen-Visser, M.P., Bekers, O. Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and cytochrome (CYP) 3A polymorphisms. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; 21: 427-435.
73. Hoffmeyer, S., Burk, O., von, R.O., Arnold, H.P., Brockmoller, J., Johne, A., Cascorbi, I., Gerloff, T., Roots, I., Eichelbaum, M., Brinkmann, U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3473-3478.
74. Goto, M., Masuda, S., Saito, H., Uemoto, S., Kiuchi, T., Tanaka, K., Inui, K. C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 451-457.
75. Anglicheau, D., Verstuyft, C., Laurent-Puig, P., Becquemont, L., Schlageter, M.H., Cassinat, B., Beaune, P., Legendre, C., Thervet, E. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1889-1896.
76. Macphee, I.A., Fredericks, S., Tai, T., Syrris, P., Carter, N.D., Johnston, A., Goldberg, L., Holt, D.W. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation* 2002; 74: 1486-1489.
77. Haufroid, V., Wallemacq, P., VanKerckhove, V., Elens, L., De, M.M., Eddour, D.C., Malaise, J., Lison, D., Mourad, M. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms and tacrolimus

pharmacokinetics in renal transplant candidates: guidelines from an experimental study. *Am J Transplant* 2006; 6: 2706-2713.

78. Mai, I., Perloff, E.S., Bauer, S., Goldammer, M., Johne, A., Filler, G., Budde, K., Roots, I. MDR1 haplotypes derived from exons 21 and 26 do not affect the steady-state pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 58: 548-553.
79. Masuda, S., Goto, M., Okuda, M., Ogura, Y., Oike, F., Kiuchi, T., Tanaka, K., Inui, K. Initial dosage adjustment for oral administration of tacrolimus using the intestinal MDR1 level in living-donor liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37: 1728-1729.
80. Hashida, T., Masuda, S., Uemoto, S., Saito, H., Tanaka, K., Inui, K. Pharmacokinetic and prognostic significance of intestinal MDR1 expression in recipients of living-donor liver transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 308-316.
81. Fantini, M.C., Becker, C., Kiesslich, R., Neurath, M.F. Drug insight: novel small molecules and drugs for immunosuppression. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 633-644.
82. Lang, P., Baron, C. Molecular mechanisms of immunosuppressive chemical agents recently introduced in clinical transplantation protocols. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 2050-2054.
83. Thomson, A.W., Bonham, C.A., Zeevi, A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 584-591.
84. Henry, M.L. Cyclosporine and tacrolimus (FK506): a comparison of efficacy and safety profiles. *Clin Transplant* 1999; 13: 209-220.
85. Dresser, G.K., Bailey, D.G. The effects of fruit juices on drug disposition: a new model for drug interactions. *Eur J Clin Invest* 2003; 33 Suppl 2: 10-16.
86. Rang, H.P. *Pharmacology*, 5th.edn. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2003.
87. Christians, U., Jacobsen, W., Benet, L.Z., Lampen, A. Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41: 813-851.
88. Kiani, J., Imam, S.Z. Medicinal importance of grapefruit juice and its interaction with various drugs. *Nutr J* 2007; 6: 33.

89. Schmiedlin-Ren, P., Edwards, D.J., Fitzsimmons, M.E., He, K., Lown, K.S., Woster, P.M., Rahman, A., Thummel, K.E., Fisher, J.M., Hollenberg, P.F., Watkins, P.B. Mechanisms of enhanced oral availability of CYP3A4 substrates by grapefruit constituents. Decreased enterocyte CYP3A4 concentration and mechanism-based inactivation by furanocoumarins. *Drug Metab Dispos* 1997; 25: 1228-1233.
90. Lundahl, J., Regardh, C.G., Edgar, B., Johnsson, G. Relationship between time of intake of grapefruit juice and its effect on pharmacokinetics and pharmacodynamics of felodipine in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1995; 49: 61-67.
91. Undre, N.A., Schafer, A. Factors affecting the pharmacokinetics of tacrolimus in the first year after renal transplantation. European Tacrolimus Multicentre Renal Study Group. *Transplant Proc* 1998; 30: 1261-1263.
92. Anglicheau, D., Flamant, M., Schlageter, M.H., Martinez, F., Cassinat, B., Beaune, P., Legendre, C., Thervet, E. Pharmacokinetic interaction between corticosteroids and tacrolimus after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 2409-2414.
93. Zucker, K., Rosen, A., Tsaroucha, A., de, F.L., Roth, D., Ciancio, G., Esquenazi, V., Burke, G., Tzakis, A., Miller, J. Unexpected augmentation of mycophenolic acid pharmacokinetics in renal transplant patients receiving tacrolimus and mycophenolate mofetil in combination therapy, and analogous in vitro findings. *Transpl Immunol* 1997; 5: 225-232.
94. Gregoor, P.J., de Sevaux, R.G., Hene, R.J., Hesse, C.J., Hilbrands, L.B., Vos, P., van, G.T., Hoitsma, A.J., Weimar, W. Effect of cyclosporine on mycophenolic acid trough levels in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68: 1603-1606.
95. Johnston, A., Holt, D.W. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 47: 339-350.
96. Wavamunno, M.D., Chapman, J.R. Individualization of immunosuppression: concepts and rationale. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 604-608.
97. Lindholm, A., Sawe, J. Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 570-573.
98. Klupp, J., Holt, D.W., van, G.T. How pharmacokinetic and pharmacodynamic drug monitoring can improve outcome in solid organ transplant recipients. *Transpl Immunol* 2002; 9: 211-214.
99. Blanchet, B., Duvoux, C., Costentin, C.E., Barrault, C., Ghaleh, B., Salvat, A., Jouault, H., Astier, A., Tod, M., Hulin, A. Pharmacokinetic-pharmacodynamic assessment of

tacrolimus in liver-transplant recipients during the early post-transplantation period. *Ther Drug Monit* 2008; 30: 412-418.

100. Yu, S.F., Wu, L.H., Zheng, S.S. Genetic factors for individual administration of immunosuppressants in organ transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 337-344.
101. Langers, P., Press, R.R., den, H.J., Cremers, S.C., Baranski, A.G., Lamers, C.B., Hommes, D.W., van, H.B. Flexible limited sampling model for monitoring tacrolimus in stable patients having undergone liver transplantation with samples 4 to 6 hours after dosing is superior to trough concentration. *Ther Drug Monit* 2008; 30: 456-461.
102. Ku, Y.M., Min, D.I. An abbreviated area-under-the-curve monitoring for tacrolimus in patients with liver transplants. *Ther Drug Monit* 1998; 20: 219-223.
103. Dansirikul, C., Staatz, C.E., Duffull, S.B., Taylor, P.J., Lynch, S.V., Tett, S.E. Sampling times for monitoring tacrolimus in stable adult liver transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2004; 26: 593-599.
104. Mardigyan, V., Tchervenkov, J., Metrakos, P., Barkun, J., Deschenes, M., Cantarovich, M. Best single time points as surrogates to the tacrolimus and mycophenolic acid area under the curve in adult liver transplant patients beyond 12 months of transplantation. *Clin Ther* 2005; 27: 463-469.
105. Cantarovich, M., Fridell, J., Barkun, J., Metrakos, P., Besner, J.G., Deschenes, M., Alpert, E., Aalamian, Z., Tchervenkov, J.I. Optimal time points for the prediction of the area-under-the-curve in liver transplant patients receiving tacrolimus. *Transplant Proc* 1998; 30: 1460-1461.
106. Chi-Andanson, M., Charpiat, B., Jelliffe, R.W., Ducerf, C., Fourcade, N., Baulieux, J. Failure of traditional trough levels to predict tacrolimus concentrations. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 129-133.
107. Braun, F., Peters, B., Schutz, E., Lorf, T., Undre, N., Oellerich, M., Ringe, B. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus early after liver transplantation. *Transplant Proc* 2002; 34: 1538-1539.
108. Masuda, S., Inui, K. An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 184-198.
109. Jain, A.B., Kashyap, R., Rakela, J., Starzl, T.E., Fung, J.J. Primary adult liver transplantation under tacrolimus: more than 90 months actual follow-up survival and adverse events. *Liver Transpl Surg* 1999; 5: 144-150.

110. Jain, A., Marcos, A., Reyes, J., Mazariagos, G., Kashyap, R., Egtesad, B., Marsh, W., Fontas, P., de, V.M., Costa, G., Patel, K., Gadowski, M., Starzl, T., Fung, J. Tacrolimus for primary liver transplantation: 12 to 15 years actual follow-up with safety profile. *Transplant Proc* 2005; 37: 1207-1210.
111. Kiuchi, T. CNIs: immediate benefits but storing problems for the future? *Transplantation* 2008; 86: 1026-1027.
112. Harris, D.C. *Quantitative Chemical Analysis*, 6th.edn. Freeman, New York, 2003.
113. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E. *Legemiddelanalyse*, Fagbokforlaget, Bergen, 2004.
114. Ritschel W.A., Kearns G.L. *Handbook of Basic Pharmacokinetics*, 5th.edn. American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 1999.
115. Wei-lin, W., Jing, J., Shu-sen, Z., Li-hua, W., Ting-bo, L., Song-feng, Y., Sheng, Y. Tacrolimus dose requirement in relation to donor and recipient ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms in Chinese liver transplant patients. *Liver Transpl* 2006; 12: 775-780.
116. Fukatsu, S., Fukudo, M., Masuda, S., Yano, I., Katsura, T., Ogura, Y., Oike, F., Takada, Y., Inui, K. Delayed effect of grapefruit juice on pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in a living-donor liver transplant recipient. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006; 21: 122-125.
117. Fukudo, M., Yano, I., Masuda, S., Fukatsu, S., Katsura, T., Ogura, Y., Oike, F., Takada, Y., Tanaka, K., Inui, K. Pharmacodynamic analysis of tacrolimus and cyclosporine in living-donor liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 168-181.
118. Boleslawski, E., Conti, F., Sanquer, S., Podevin, P., Chouzenoux, S., Batteux, F., Houssin, D., Weill, B., Calmus, Y. Defective inhibition of peripheral CD8+ T cell IL-2 production by anti-calcineurin drugs during acute liver allograft rejection. *Transplantation* 2004; 77: 1815-1820.
119. Perry, I., Neuberger, J. Immunosuppression: towards a logical approach in liver transplantation. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 2-10.
120. Rosen, H.R. Transplantation immunology: what the clinician needs to know for immunotherapy. *Gastroenterology* 2008; 134: 1789-1801.

121. Calne, R.Y. Immunological tolerance--the liver effect. *Immunol Rev* 2000; 174: 280-282.
122. Mazariegos, G.V., Reyes, J., Marino, I., Flynn, B., Fung, J.J., Starzl, T.E. Risks and benefits of weaning immunosuppression in liver transplant recipients: long-term follow-up. *Transplant Proc* 1997; 29: 1174-1177.
123. Srinivas, T.R., Meier-Kriesche, H.U. Minimizing immunosuppression, an alternative approach to reducing side effects: objectives and interim result. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3 Suppl 2: S101-S116.
124. Meier-Kriesche, H.U., Schold, J.D., Srinivas, T.R., Kaplan, B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; 4: 378-383.
125. Goldman, M., Wood, K. European research on cell and organ transplantation: towards novel opportunities? *Transpl Int* 2007; 20: 1016-1019.
126. Anonymous. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95.
127. Goetzmann, L., Sarac, N., Ambuhl, P., Boehler, A., Irani, S., Muellhaupt, B., Noll, G., Schleuniger, M., Schwegler, K., Buddeberg, C., Klaghofer, R. Psychological response and quality of life after transplantation: a comparison between heart, lung, liver and kidney recipients. *Swiss Med Wkly* 2008; 138: 477-483.

Appendiks A: Utdrag fra Immunsuppresjonsprotokoller ved levertx.

Standard induksjons- og vedlikeholdsbehandling VOKSNE

LeverTx - voksne - standard					
Dag	Døgndose steroider Prednisolon p.o. Solu-Medrol i.v.	Dosering Takrolimus (Prograf)	Konsen- trasjon [Takro- limus]	Dosering Mykofenolat (CellCept)	Konsen- trasjon Mykofenolat [MPA]
Under opera- sjon	40 mg iv ved start 500 mg iv før reperf 40 mg postop				
1	80 mg	start 0,05 mg/kg x2 p.o. videre justering etter kons.	5-15 µg/L	1g x2	3-5 mg/L (tenta- tivt)
2	80 mg				
3	70 mg				
4	60 mg				
5	50 mg				
6	40 mg				
7	30 mg				
8-30	20 mg				
31-60	15 mg				
61-90	10 mg				
91-180	7,5 mg				
181-360	5 mg				
>360	→ 0 (nedtrapp) **				
	** ikke videre steroid-nedtrapping ved autoimmun-lidelse				

Appendiks B: Reagenser og Utstyr

Tabell A1. Reagenser og utstyrliste

Reagens	Produsent
Metansyre (CHOOH) (LC-MS kvalitet)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Acetonitril (HPLC-kvalitet)	Rathburn Chemicals Ltd, Walkerburn, Skottland
Sinksulfat (ZnSO ₄)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Ascomycin (C ₄₃ H ₆₉ NO ₁₂)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Vann (HPLC-kvalitet, 18 mΩ)	
Ammoniumacetat (CH ₃ COONH ₄) (LC-MS kvalitet)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO
Metanol (HPLC-kvalitet)	Rathburn Chemicals Ltd, Walkerburn, Skottland
Quality controls	Chromosystems, München, Tyskland
Multilevel Calibrator Set	Chromosystems, München, Tyskland
Ekstern internasjonal kontroll for takolimus	Analytical Service international, London, England
Utstyr	Produsent
BD Vacutainer™ EDTA K3E 15 %	BD Vacutainer Systems, Plymouth, England
Nunc CryoTube™ Vials 4,5 ml	Nagle Nunc International, Danmark
Micro tubes 1.5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Tyskland
250µl glass flat bottom inserts (5181-3377)	Agilent, US
Snap cap, PTFE/red silicone rubber (5182-0564)	Agilent, US
2 mL Wide Opening Snap Top Vials, clear, write-on (5182-0546)	Agilent, US
MassTrak C18 3 µm, 2.1 x 10 mm	Waters, Manchester, UK

Annet standard laboratorieutstyr.

Appendiks C: Betingelser for analysen

Tabell C1. LC-MS/MS innstillinger.

Metode	Flow (ml/min)	Trykk (bar)	Eluent
Oppstart	0,400	6-8	Isokratisk (mobilfase D)
Analyse	0,600	19-20	Gradient (step switch) (mobilfase A og B)

Run tid for hver prøve er 2.5 min.

Tabell C2. Gradient (step switch).

Minutter	Mobilfase A	Mobilfase B
0	50 %	50 %
0,40	0 %	100 %
1	50 %	50 %

Mobilfase A:

- Vann (HPLC- kvalitet, 18 mega-ohm)
- 2mM ammoniumacetat (LC-MS kvalitet)
- 0,1 % maursyre (LC-MS kvalitet).

Mobilfase B:

- Metanol (HPLC-kvalitet)
- 2mM ammoniumacetat (LC-MS kvalitet)
- 0,1 % maursyre (LC-MS kvalitet).

Mobilfase D:

- Metanol (HPLC- kvalitet)

Tabell C3. LC-MS/MS innstillinger.

Forbindelse	Molekylmasse (g/mol)	Innstilt (m/z) (g/mol)
Takrolimus	804,02	821,35>768,35
Ascomycin	792,01	809,35>756,35

Appendiks D: Presisjon og nøyaktighet

Tabell D1: Presisjon og nøyaktighet for kontroller

	Kontroll	Sann verdi ($\mu\text{g/L}$)	Presisjon (relativt standardavvik)(%)	Nøyaktighet (%)
Før analyse av prøver	QC_1	2,85	10,5	9,4
	QC_2	7,4	4,9	3,1
	QC_3	16,3	6,0	3,1
	QC_4	36,6	4,0	3,0
Etter analyse av prøver	QC_1	2,85	7,8	11,7
	QC_2	7,4	5,7	4,9
	QC_3	16,3	5,1	6,8
	QC_4	36,6	6,3	5,6

Appendiks E: Farmakokinetiske profiler

