

Samenvatting

In 2006 wachtten in Nederland 1054 patiënten op een donornier, terwijl in hetzelfde jaar slechts 360 niertransplantaties werden uitgevoerd. Niet alleen de levensverwachting maar ook de kwaliteit van leven verbetert enorm nadat de patiënt een donornier heeft ontvangen. Echter 10 jaar na transplantatie functioneert nog maar ongeveer de helft van alle donornieren. Het verlies van getransplanteerde nieren wordt veroorzaakt door niet goed functionerende getransplanteerde nieren en nog vaker door het overlijden van de patiënt ondanks een goed functioneerde nier. Het overlijden van deze patiënten wordt vaak veroorzaakt door hart- en vaatziekten.

Alle patiënten die een donororgaan ontvangen moeten hun hele leven behandeld worden met immunosuppressiva, die allemaal sterk variërende farmacokinetische karakteristieken en een smalle therapeutische index hebben. De immunosuppressieve onderhoudstherapie bestond van 1980 tot 1995 uit cyclosporine (Neoral[®]) met corticosteroiden en azathiopurine (Immunan[®]). In 1995 kwamen enkele nieuwe immunosuppressiva beschikbaar: tacrolimus (Prograf[®]) een geneesmiddel dat gebruikt kan worden als een hoeksteen voor de farmacotherapie, mycofenolaat mofetil (Cellcept[®]) en sirolimus (Rapamune[®]), welke gebruikt kunnen worden als aanvullende immunosuppressieve geneesmiddelen. Wanneer in plaats van cyclosporine tacrolimus wordt gegeven komen er minder vaak acute afstotingen voor. Dit is het geval voor zowel corticosteroid-gevoelige als corticosteroid-ongevoelige acute afstotingen. Doordat acute afstoting en zeker corticosteroid-ongevoelige acute afstoting geassocieerd wordt met een hoger risico op chronische transplantaat-disfunctie, was het te verwachten dat het gebruik van tacrolimus zou leiden tot een betere transplantatie overleving dan met cyclosporine gebruik. Ondertussen zijn er sterke aanwijzingen dat deze verwachtingen zijn gerechtvaardigd. Verder leidt het gebruik van tacrolimus, in plaats van cyclosporine tot een verbetering van diverse lipoproteïnen (HDL, LDL) en lipiden (triglyceriden) in het bloed en tot een lagere bloeddruk. Deze factoren zijn ook geassocieerd met chronische transplantaat disfunctie en daardoor met mortaliteit als resultaat van hart- en vaatziekten na transplantatie. Bij tacrolimus gebruik is ook vastgesteld dat de incidentie van diabetes mellitus na transplantatie vaker voorkomt dan bij cyclosporine gebruik. Dit zou uiteindelijk de eerder beschreven voordelen ten aanzien van een vergrote overleving van de getransplanteerde nier en de verhoogde overleving van de patiënt teniet doen.

Nadat in HOOFDSTUK 1 het overzicht en het doel van dit proefschrift is beschreven, geeft HOOFDSTUK 2 een compleet overzicht van het tacrolimus metabolisme (absorptie, distributie, metabolisatie en eliminatie). De sterk variërende farmacokinetische karakteristieken van tacrolimus in combinatie met een smalle therapeutische index benadrukt de noodzaak tot het nauwkeurig volgen van de tacrolimus bloed concentraties. Vervolgens beschrijft HOOFDSTUK 2 verschillende methoden die tegenwoordig gebruikt worden om de tacrolimus blootstelling te meten, farmacokinetische parameters, dalspiegels (C_0), verkorte oppervlakte onder de tijd tacrolimus concentratie curve (AUC_{0-12}) of complete 12 uren AUC_{0-12} en de apparatuur

welke gebruikt worden (IMx II of LC-MS/MS) om de tacrolimus spiegels te meten. Verder zijn de genetische en niet genetische factoren die een rol zouden kunnen spelen samengevat en tenslotte is er een discussie over de klinische consequenties en de impact van subtherapeutische of toxische tacrolimus bloedspiegels voor de patiënt.

Voordat de real-time polymerase kettingreactie (PCR) kan worden uitgevoerd, die gebruikmaakt van fluorescentie probes, is DNA isolatie uit ethyleen diamine tetra azijnzuur (EDTA) volbloed monsters vereist. Alhoewel verschillende commerciële DNA isolatie kits beschikbaar zijn om DNA te extraheren uit volbloed monsters, is er weinig informatie beschikbaar ten aanzien van de extractie efficiënties en de kwaliteit van het geïsoleerde DNA. HOOFDSTUK 3 vergelijkt drie commercieel beschikbare DNA isolatie kits, QIAamp blood mini kit (Qiagen, Leusden, Nederland), Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Duitsland) en Puregene (Biozyme, Landgraaf, Nederland) ten aanzien van hun capaciteit om DNA te isoleren uit volbloed monsters en de verkregen DNA kwaliteit.

In de begin jaren 90, introduceerde de real-time PCR technologie een nieuwe dimensie binnen de PCR technologie, omdat amplificatie en detectie mogelijk werd in één enkel PCR cupje, plaat of capillair. De gedefinieerde drempel cyclus (C_t) waarde kan gebruikt worden om de DNA kwantiteit, welke aanwezig is in het PCR cupje te bepalen, terwijl een verschil tussen het wild type en variant allel DNA in de probe aanhechting kan worden gebruikt voor genotypering met real-time PCR technologie. Door zijn analysesnelheid, verminderd risico op contaminatie, geringe arbeidstijd en een PCR en detectiemethode in één, heeft real-time PCR een enorme interesse gewekt onder de moleculair biologen. Een toepassing die algemeen wordt gebruikt in de real-time PCR is de "fluorescence resonance energy transfer" (FRET) methodologie. Een kenmerk van deze real-time PCR FRET technologie is dat twee individuele fluorescentie probes complementair zijn aan het PCR product dichtbij de polymorfe positie. Een ander karakteristiek van de FRET technologie zijn de smeltcurves. Na de laatste cyclus, wordt het PCR product nadat het is afgekoeld tot een bepaalde temperatuur nogmaals gedenatureerd. Het dubbelstrengs PCR product wordt verwarmd met een snelheid van 0.1 tot 0.2°C/seconde tot de gewenste temperatuur. Gedurende deze opwarmingsprocedure wordt het fluorescentie-sigitaal continue gemeten. Als het nucleotide dat gepositioneerd is op de polymorfe positie in de sensor probe complementair is aan het nucleotide gepositioneerd in de polymorfe positie in het vermenigvuldigde DNA, is er een relatief sterke binding tussen deze nucleotiden. Het fluorescentiesigitaal zal alleen bij een hoge temperatuur afnemen in sterkte. Dit in tegenstelling tot een niet complementair nucleotide in het PCR product dat een minder stabiele binding tot gevolg heeft en uiteindelijk zal resulteren in een afname in het fluorescentiesigitaal bij een lagere temperatuur. Door het berekenen van de negatieve afgeleide van de afname in dit fluorescentiesigitaal, wordt een smeltpiek voor het wild type en de variant allel monsters verkregen.

Door de samenstelling van de DNA sequentie, bijv. een lang A/T rijk gebied, is het noodzakelijk om een sensor probe te ontwerpen, de probe die de polymorfe positie omvat en die lang genoeg is om een voldoende hoge smelttemperatuur te krijgen. Als

resultaat van de vergrote lengte van zo'n sensor probe wordt de invloed van het niet complementaire nucleotide significant minder in vergelijking met een kortere sensor probe. HOOFDSTUK 4 toont aan dat het inbouwen van een "locked nucleic acid" (LNA) het genotyperen van de PXR A11156C polymorfisme significant verbeterde. Vooral heterozygoten zijn duidelijker te onderscheiden door het verschijnen van twee smeltpieken, terwijl de probes zonder een LNA bij een smeltcurve analyse niet in staat zijn om deze smeltpieken te scheiden. Daarom concluderen we dat een LNA binnen een sensor probe het discriminerend vermogen van een FRET assay kan verbeteren.

In HOOFDSTUK 5 zijn snelle en consistente assays voor organische anion transporterende polypeptide 1B1 (OATP1B1) polymorfismen door middel van snelle PCR FRET assays op de LightCycler ontwikkeld. Een LNA op de polymorfe locatie binnen de sensor probe was noodzakelijk om de twee allelen van het OATP1B1 T521C polymorfisme te onderscheiden. Om de betrouwbaarheid van beide real-time PCR FRET assays te bevestigen, werden deze nieuwe methoden gevalideerd door 120 monsters te genotyperen met een PCR "restriction fragment length polymorphism" (RFLP) assay en een allel-specifieke PCR. De resultaten van de real-time PCR FRET assays komen volledig overeen met de conventionele PCR methoden wat aangeeft dat de real-time PCR FRET assays geschikt zijn voor een klinische omgeving.

In de meeste transplantatie centra wordt het monitoren van de tacrolimus bloed concentraties uitgevoerd met C_0 concentraties na de ochtend tacrolimus inname, ondanks dat er bewijs beschikbaar is dat de bruikbaarheid van deze ochtend tacrolimus C_0 spiegels niet optimaal is. Dit wetende, hebben verschillende studies een "limited sampling strategy (LSS)" ontwikkeld met stapsgewijze multiple regression analysis of Bayesian fitting om de AUC_{0-12} zo nauwkeurig mogelijk te voorspellen. Dit omdat de AUC_{0-12} gezien wordt als de gouden standaard voor het meten van de totale tacrolimus concentratie. Veel van deze studies die een LSS ontwikkelde voor tacrolimus gebruikten geen onafhankelijke transplantatie patiënten populatie om de LSS te valideren. In HOOFDSTUK 6 worden verschillende LSS die recentelijk zijn gepubliceerd geëvalueerd met een onafhankelijke goed gekarakteriseerde stabiele niertransplantatie patiënten populatie. De prestaties van 24 LSS in 37 niertransplantatie patiënten met een bekende AUC_{0-12} is geëvalueerd en de resultaten worden tevens vergeleken met de voorspelbaarheid van de dalspiegels (C_0 en C_{12}). Het criterium was een absolute voorspelbaarheidsfout (APE%) die minder dan 15% verschilt van de complete AUC_{0-12} . Dertien van de 18 (72%) LSS zijn gebaseerd op regressie analyse en in staat om tenminste 90% van de 37 individuele AUC_{0-12} binnen een APE% van 15% te voorspellen. Voorspellingen gebaseerd op C_0 en C_{12} en Bayesian fitting zijn lager dan 90%: respectievelijk, 62% en 67%. In tegenstelling tot een recente publicatie hebben we in onze resultaten geen duidelijke verschillen waargenomen in de voorspellende capaciteiten, wanneer een LSS was ontwikkeld door een studie op basis van 12 uren farmacokinetische profielen, die opgenomen zijn van hart of long transplantatie patiënten bij validatie in onze niertransplantatie patiënten groep. Daarom zijn LSS met C_0 , C_2 en/of C_4 naar onze mening een beter alternatief voor de C_0 concentratie. De verschillende LSS beschikbaar in de huidige literatuur voor het monitoren van tacrolimus zouden adequate voorspel-

lingen kunnen genereren alhoewel een voorzichtige evaluatie voor de betrouwbaarheid van deze LSS verplicht is.

Tacrolimus wordt voornamelijk gemetaboliseerd door cytochroom P450 (CYP450) 3A iso-enzymen in 13-O-desmethyltacrolimus, die een verwaarloosbare immunosuppressieve activiteit heeft. In de HOOFDSTUK 7 en 8 tonen we in een Chinese en Caucasische niertransplantatie patiënten populatie aan, dat het CYP3A5 A6986G polymorfisme het meest relevante polymorfisme is in de CYP450 3A iso-enzym familie, met een significante impact op zowel de tacrolimus blootstelling als de dagelijkse tacrolimus dosering. In HOOFDSTUK 7 wordt de associatie tussen CYP3A en ABCB1 polymorfismen en de AUC_{0-12} , berekend met een tweetijds punt strategie, geëvalueerd. De CYP3A en ABCB1 genotypes zijn bepaald met real-time PCR FRET assays in 103 Chinese niertransplantatie patiënten en vervolgens gerelateerd aan de dosis genormaliseerde (dn) AUC_{0-12} . Een significant allel-afhankelijk effect (Kruskal-Wallis; $P < 0.001$) is waargenomen tussen het CYP3A5*3 polymorfisme en de $dnAUC_{0-12}$. Multiple regression analyse toonde aan dat het CYP3A5*3 polymorfisme de meest significante onafhankelijke variabele is en 35% van de variabiliteit in de dosering verklaarde in relatie tot het tacrolimus gebruik. Ten aanzien de ABCB1 G2677T/A en C3435T polymorfismen is er een trend waargenomen tussen de verschillende genotypen en de $dnAUC_{0-12}$.

HOOFDSTUK 8 beschrijft twee verschillende niertransplantatie patiënten groepen welke worden gebruikt om te onderzoeken wat de invloed is van CYP3A en ABCB1 polymorfisme op de dagelijkse tacrolimus dosering en verschillende farmacokinetische parameters. In totaal zijn 63 Kaukasische niertransplantatie patiënten verdeeld in 26 vroege en 37 late posttransplantatie patiënten gegenotypeerd voor CYP3A en ABCB1 polymorfismen. De farmacokinetische parameters van tacrolimus worden bepaald voor alle niertransplantatie patiënten en gecorreleerd aan hun corresponderende genotypes. Een significant verschil in allel frequenties wordt waargenomen voor CYP3A4*1B ($P = 0.028$) en CYP3A5*1 ($P = 0.022$) allelen tussen de vroege en late posttransplantatie patiënten groep. Significant hogere dnC_0 , $dnAUC_{0-12}$ en dnC_{max} werden waargenomen voor dragers van het CYP3A5*3 variant allel in beide niertransplantatie patiënten groepen. Behalve voor de dagelijkse tacrolimus dosering ($P = 0.025$) werd geen significant verschil waargenomen voor dragers van de CYP3A4*1B variant allel. Zowel de individuele ABCB1 polymorfismen als de ABCB1 haplotypen zijn geassocieerd met iedere farmacokinetische parameter.

Vervolgens is in HOOFDSTUK 9 de allel frequentie van het CYP3A7*1C variant allel onderzocht en tevens de invloed van CYP3A7*1C op de verschillende farmacokinetische parameters van tacrolimus. Een allel frequentie van respectievelijk 2.8% en 0.0% werd gevonden na het genotyperen van 70 Kaukasische en 103 Chinese niertransplantatie patiënten voor het CYP3A7*1C variant allel met een real-time PCR FRET assay. Heterozygote dragers van het CYP3A7*1C allel vertoonden geen significant lagere dnC_0 spiegels, $dnAUC_{0-12}$ of dnC_{max} voor tacrolimus in vergelijking met de dragers van het CYP3A7*1 allel.

In HOOFDSTUK 10 vertoonde de variant allelen van de UGT2B7 polymorfismen G-79A, T-66C en C816T met een allel frequentie van respectievelijk, 0.0%, 5.8% en 29.6% geen significante verschillen met zowel de $dnAUC_{0-12}$ als de dagelijkse tacrolimus dosering vergeleken met dragers van wild type UGT2B7 allelen wanneer de patiënten worden gecategoriseerd op basis van hun CYP3A5 A6986G, ABCB1 G2677T/A en ABCB1 C3435T genotype. Ondanks het feit dat tacrolimus wordt gegluconideerd door UGT2B7 vertonen de drie relevante polymorfismen in het UGT2B7 gen geen invloed op de tacrolimus blootstelling in de Chinese niertransplantatie patiënten groep.

Hoewel polymorfismen in genen die indirect betrokken zijn bij het tacrolimus metabolisme ook een belangrijke rol schijnen te spelen. De pregnane X receptor (PXR) speelt een belangrijke rol in de expressie regulatie van CYP450 iso-enzymen, 5'-uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) enzymen en de geneesmiddeltransporter ABCB1, welke direct zijn betrokken in het tacrolimus metabolisme. In HOOFDSTUK 11 wordt de invloed van vier individuele PXR polymorfismen en PXR haplotypen onderzocht op de tacrolimus blootstelling in een Chinese niertransplantatie patiënt populatie. Individuen die drager zijn van een variant allel voor de PXR polymorfismen A7635G, C8055T, A11156C en T11193C, worden geassocieerd met een hogere expressie van CYP3A4 of ABCB1 in vergelijking met individuen die drager zijn van de wild type variant (Mann-Whitney; respectievelijk, $P = 0.038$, $P = 0.088$, $P = 0.038$ en $P = 0.038$). De resultaten in HOOFDSTUK 11 suggereren dat de vier PXR polymorfismen geassocieerd zijn met een sterke trend naar een lagere $dnAUC_{0-12}$ van tacrolimus, wat de rol bevestigt van PXR bij de CYP3A en ABCB1 expressie en daardoor ook op het tacrolimus metabolisme. Vervolgens wordt in HOOFDSTUK 12 de invloed van zowel de dagelijkse corticosteroid dosering en deze vier PXR polymorfismen op de verschillende farmacokinetische tacrolimus parameters in een vroege en een late Kaukasische posttransplantatie patiënten groep beschreven. Alhoewel niet genetische factoren zoals geslacht, leeftijd, hematocriet en tijd na transplantatie ook een belangrijke rol schijnen te spelen in de variabiliteit van de tacrolimus blootstelling tussen niertransplantatie patiënten. Tot nu toe wordt het therapeutisch monitoren van tacrolimus nog steeds uitgevoerd door het meten C_0 concentraties, hoewel recentelijk verschillende studies aangeven dat de LSS die bestaan uit twee of drie tijdstippen waarop monster worden afgenomen binnen vier uur na de ochtend tacrolimus inname, een significant betere afspiegeling geeft van de complete AUC_{0-12} . Om de variabiliteit in de tacrolimus blootstelling van de transplantatie patiënten te verlagen is het ook aan te bevelen om te kijken naar mogelijke geneesmiddelinteracties met tacrolimus en mogelijke interacties met andere CYP450 inducers en remmers, zoals St. Janskruid of grapefruitsap.

Samengevat, het onderzoek dat wordt gepresenteerd in dit proefschrift omvat de vergelijking van verschillende commercieel verkrijgbare DNA isolatie kits ten aanzien van hun isolatie capaciteiten, diverse real-time PCR FRET assays voor verschillende polymorfismen werden ontworpen in ons laboratorium, geoptimaliseerd en gevalideerd en verder is in niertransplantatie patiënten van een verschillende etnische oorsprong (Kaukasisch en Chinees) de invloed van verschillende genetische (CYP3A, ABCB1,

UGT2B7 en PXR polymorfismen) en niet genetische factoren (geslacht, leeftijd, hematocriet en tijd na transplantatie) onderzocht op de tacrolimus spiegels met verschillende methodologieën om de diverse farmacokinetische parameters voor tacrolimus te bepalen (verkorte AUC_{0-12} en complete AUC_{0-12}).