

Het monitoren van de werking van immuunsuppressieve medicatie in orgaan transplantatie patiënten

H.H. van ROSSUM¹ en J. van PELT²

Bij orgaan transplantatie patiënten is een goede onderdrukking van de immunologische reactie tegen het ontvangen, lichaamsvreemde orgaan van cruciaal belang. Om deze natuurlijke afstotingsreactie te onderdrukken wordt immuunsuppressieve therapie gebruikt. Als deze niet gegeven wordt, of niet toerikend is, stoot het lichaam het ontvangen orgaan af.

Er zijn verschillende medicamenten die gebruikt worden als immuunsuppressieve therapie bij orgaantransplantatie. Kort na transplantatie vormt een zogenaamde calcineurine (CN) remmer in het algemeen de basis van de immuunsuppressieve therapie. Er zijn twee calcineurine remmers in gebruik in de transplantatie geneeskunde: tacrolimus (TRL, FK506) en ciclosporine (CsA). Deze calcineurine remmers zorgen voor een goede onderdrukking van de afstotingreactie, maar kunnen ernstige bijwerkingen geven, waaronder nier-toxiciteit, hypertensie en diabetes. Een ander probleem van TRL en CsA therapie is dat er grote verschillen tussen personen bestaan in de farmacokinetiek. Dit maakt dat het moeilijk is om van te voren te voorspellen wat de blootstelling zal zijn. Om de blootstelling aan CsA of TRL te controleren wordt zogenaamd TDM (therapeutic drug monitoring) toegepast. De laboratorium bepalingen voor TDM worden in Nederland meestal door de ziekenhuisapotheken verricht. In verschillende andere landen zoals de Verenigde Staten vallen deze bepalingen wel onder verantwoordelijkheid van de klinisch chemische laboratoria. Dit maakt dat dit vakgebied vaak beschreven staat in de klinisch chemische vakliteratuur, maar voor veel klinische chemici in Nederland toch redelijk onbekend is. Bij TDM worden er een of meer medicijn concentraties voor en/of na inname bepaald. Op basis hiervan kan vervolgens een dosis advies worden gegeven zodat de blootstelling na dosis aanpassing zeer waarschijnlijk weer binnen vooraf gestelde grenzen valt. Ondanks dat calcineurine onderdrukkende therapie op deze manier gecontroleerd wordt, komen er nog steeds afstotingsreacties voor en vormt de medicijn toxiciteit naast over-immuunsuppressie een groot klinisch probleem.

Verbeteringsmogelijkheden voor ciclosporine en tacrolimus therapie

De belangrijkste manier van het verder optimaliseren van de ciclosporine en tacrolimus therapie is waarschijnlijk het beter kunnen monitoren van de therapie. De therapie kan dan per individu beter worden ingesteld, waardoor er over de gehele groep minder afstotingsreacties en bijwerkingen optreden. Er zijn verschillende strategieën die allen ditzelfde doel nastreven. Zo is er ruimte om de huidige manier van monitoren van CsA therapie verder te optimaliseren. Aangezien het gebruikelijk is om slechts op één tijdstip voor of na inname de CsA of TRL concentratie te meten is er een 'grote' onnauwkeurigheid tussen de ingeschatte en werkelijk blootstelling. Door gebruik te maken van protocollen waarbij op verschillende vastgestelde tijdstippen (0, 2 en 3 uur) de CsA concentratie gemeten wordt, kan er een nauwkeurigere inschatting gemaakt worden van de werkelijke blootstelling wat resulteert in een beter op maat gemaakt dosis advies (1-3).

Ook farmacogenetische informatie kan gebruikt worden voor het optimaliseren van ciclosporine en tacrolimus therapie. Zo zijn er enkele polymorfismen van metabole eiwitten bekend die zijn geassocieerd met een afwijkende farmacokinetiek van tacrolimus (4, 5). Enkele polymorfismen van het cytochroom P450 oxygenase systeem bevorderen de klaring van tacrolimus zoals aangetoond voor CYP3A5 (4). Ook kunnen polymorfismen van transporterende eiwitten zoals het para-glycoproteïne zorgen voor een afwijkende distributie van deze immuun suppressieve medicatie en daarmee resulteren in een afwijkende werking, metabolisatie en klaring. Door van te voren te screenen op aanwezigheid van deze polymorfismen, kan er in theorie een betere op maat gemaakte start dosis tacrolimus of ciclosporine gegeven worden.

Als derde mogelijkheid kan er gekeken worden naar het farmacologische en/of immunologische effect van tacrolimus en ciclosporine.

Ciclosporine en tacrolimus farmacologie

De farmacologische en immunologische werking van de immuunsuppressieve ciclosporine en tacrolimus is gebaseerd op de remming van het enzym calcineurine. Dit is een calcium afhankelijk fosfatase dat onder andere tot expressie komt in lymfocyttaire cellen. Antigen herkenning door de T-cel receptor, in aanwezigheid van een co-stimulerend signaal, zorgt voor activatie van de T-lymfocyt. Dit resulteert in een stijging van

Klinisch chemisch en hematologisch laboratorium, Bronovo ziekenhuis, Den Haag¹ en Lab KCHI, MCA, Alkmaar²

E-mail: hh.vrossum@bronovo.nl

de calcium concentratie in het cytoplasma waardoor het calcineurine enzym actief wordt. Een van de belangrijkste substraten van calcineurine in de T-cel zijn de NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) transcriptie factoren die na defosforylering naar de celkern migreren. NFATs zijn belangrijk voor de transcriptie en translatie van verschillende cytokines zoals interleukine-2 (IL-2), interferon- γ (IFN γ) en tumor necrosis factor α (TNF α) en oppervlakte eiwitten van de T-lymfocyt, zoals de IL2 Receptor, Fas en OX40. Deze eiwitten reguleren vervolgens gezamenlijk de immunologische reactie van de T-lymfocyt en andere immunologische cellen tegen het betreffende antigeen bevattende weefsel.

Het bijzondere van de calcineurine remmers is dat ze zelfstandig niet in staat zijn om calcineurine fosfatase activiteit te remmen. Voor remming van de calcineurine activiteit is binding aan een intracellulair eiwit, een immunofiline, noodzakelijk. Het complex van tacrolimus met het FKBP12-eiwit en van ciclosporine met cyclofiline, blokkeert substraat/NFAT binding aan het katalytische centrum van calcineurine. Dit maakt dat in een toestand van antigeen herkenning door de T-cel er een blokkade plaatsvindt van de signaaltransductie op het nivo van calcineurine/NFAT waardoor de immunologische respons wordt geblokkeerd.

Farmacodynamisch monitoren van ciclosporine en tacrolimus therapie

Er zijn verschillende strategieën mogelijk om naar de effecten van ciclosporine en tacrolimus te kijken. Als eerste kan de calcineurine activiteit gebruikt worden als parameter. Hiervoor zijn verschillende methoden beschreven waarbij de defosforylering van een gefosforyleerd polypeptide substraat wordt gekwantificeerd in aanwezigheid van een calcium overmaat. Naast de calcineurine activiteit is het ook mogelijk om naar andere parameters zoals mRNA expressie of eiwit synthese van calcineurine afhankelijke verbindingen te kijken. Voor deze laatste strategieën is echter een *in vitro* activatie van de T-lymfocyt noodzakelijk. Een ander verschil is, dat de expressie van deze parameters ook door andere immuunsuppressiva worden beïnvloed waardoor ze niet specifiek zijn voor ciclosporine en tacrolimus (7, 8).

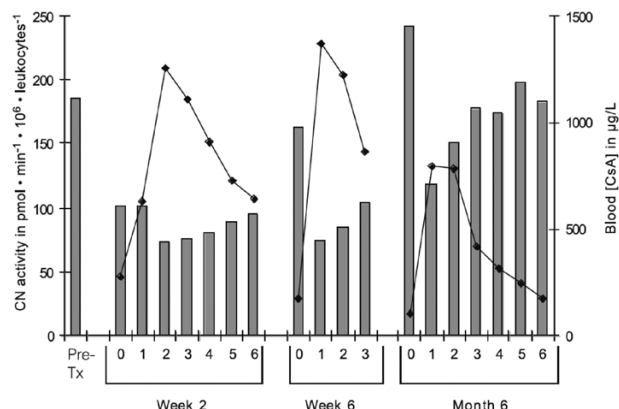
Wij hebben gekozen om gebruik te maken van een calcineurine activiteit bepaling die gebaseerd is op een spectrofotometrische detectie van vrijgekomen fosfaat. Daarnaast is er gekozen om in de leukocyten fractie van perifere bloed de calcineurine activiteit te bepalen (9). Deze methode is vervolgens gebruikt om in 98 niertransplantatie patiënten, gedurende de eerste 6 maanden na nier implantatie, de calcineurine activiteit parallel aan de ciclosporine-concentratie te bepalen. Hier werd een duidelijke inverse relatie tussen de ciclosporine concentratie en de calcineurine activiteit gevonden, zie figuur 1.

Helaas werd er geen relatie gevonden tussen de gemeten calcineurine activiteit en gekozen klinische eindpunten zoals orgaanresectie. Daarbij overschaduwde de grote intra-individuele variatie in het niveau van de calcineurine remming de inter-individuele variatie.

Een van de variabelen die mogelijk een rol speelt is dat de calcineurine concentratie in de leukocyten fractie is gemeten en niet in de belangrijkste doelcellen van ciclosporine en tacrolimus; de T-lymfocyt. Zo kan de samenstelling van de perifere leukocyten fractie van niertransplantatie patiënten behoorlijk verschillen (10). Aangezien in het perifere bloed de T-lymfocyten slechts een kleine fractie van het totaal aan leukocyten zijn, hoeft de calcineurine activiteit en remming daarvan die gemeten is in de leukocyten fractie als geheel niet noodzakelijk te corresponderen met de calcineurine activiteit in T-lymfocyten. Vandaar dat calcineurine activiteit in T-lymfocyt in theorie een betere maat zou moeten zijn van de relevante calcineurine activiteit voor de immuunsuppressieve werking van ciclosporine en tacrolimus. Om hierop te anticiperen is er een T-lymfocyt specifieke calcineurine activiteits bepaling opgezet. Voor de isolatie van de T-lymfocyten fractie uit het perifere bloed wordt gebruik gemaakt van paramagnetische beads die zijn gelabeld met anti-CD3. De fractie die op deze manier geïsoleerd wordt uit het perifere bloed bestaat voor meer dan 95% uit T-lymfocyten. Verdere verwerking middels de beschreven calcineurine activiteitsbepaling laat adequate analytische eigenschappen zien; lineair in relevant meetgebied en een variatiecoëfficiënt van 7%. In de toekomst zou het zeer relevant zijn om de waarde van deze test voor het monitoren van tacrolimus en ciclosporine therapie te onderzoeken.

Conclusie

De orgaantransplantatiegeneeskunde heeft de laatste paar decennia een ontwikkeling doorgemaakt die ervoor zorgt dat orgaantransplantatie nu de eerste keus behandeling is bij eindfalen van verschillende organen zoals, nier, lever, pancreas, hart en long. De ontwikkeling van adequate immuunsuppressieve therapie is hierin cruciaal geweest. Deze therapie blijft dus onderhevig aan bijwerkingen inherent aan immuunsuppressie en medicijn toxiciteit. Daarnaast treden er nog regelmatig afstotingsreacties op die een belangrijk risico vormen voor donor orgaanschade en kan resulteren in volledige afstoting van het donororgaan.



Figuur 1. Calcineurine activiteit in leukocyten en ciclosporine concentratie (CsA) gemeten op verschillende momenten voor (Pre-Tx) en na (week 2, week 6, month 6) orgaanimplantatie en gemeten op verschillende tijdstippen voor (0) en na (1,2,3,4,5,6) ciclosporine inname (11). ■ CN activity; —◆ [CsA].

Biochemische markers die deze processen adequaat en specifiek kunnen volgen zouden zeer waardevol voor de kliniek zijn, zodat op tijd therapeutische aanpassingen gemaakt kunnen worden. Het blijft lastig om specifiek de immunologische reactie tegen het lichaamsvreemde orgaan en de onderdrukking hiervan door de gegeven immuunsuppressiva te monitoren. Er zijn recentelijk veel inzichten verkregen in de mogelijkheden, eigenschappen en tekortkomingen van de verschillende strategieën. Het is nu noodzaak deze te gebruiken voor het ontwikkelen van een nieuwe generatie testen die wel in staat zijn om relevante informatie over de immunologische status van de transplantatiepatient te genereren.

Referenties

1. Cremers SC, Scholten EM, Schoemaker RC, Lentjes EG, Vermeij P, Paul LC, et al. A compartmental pharmacokinetic model of cyclosporin and its predictive performance after Bayesian estimation in kidney and simultaneous pancreas-kidney transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 1201-1208.
2. Scholten EM, Cremers SCLM, Schoemaker RC, Rowshani AT, van Kan EJ, den Hartigh J, et al. AUC-guided dosing of tacrolimus prevents progressive systemic overexposure in renal transplant recipients. *Kidney Int*. 2005; 67: 2440-2447.
3. van Rossum HH, Press RR, den Hartigh J, de Fijter JW. Point: A call for advanced pharmacokinetic and pharmacodynamic monitoring to guide calcineurin inhibitor dosing in renal transplant recipients. *Clin Chem*. 2010; 56: 732-735.
4. Press RR, Ploeger BA, den Hartigh J, van der Straaten T, van Pelt J, Danhof M, de Fijter JW, Guchelaar HJ. Explaining variability in tacrolimus pharmacokinetics to optimize early exposure in adult kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit*. 2009; 31: 187-197.
5. Press RR, Ploeger BA, den Hartigh J, van der Straaten T, van Pelt H, Danhof M, de Fijter JW, Guchelaar HJ. Explaining variability in ciclosporin exposure in adult kidney transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010; 66: 579-590.
6. Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*. 2000; 80: 1483-1521.
7. van Rossum HH, Romijn FP, Smit NP, de Fijter JW, van Pelt J. Everolimus and sirolimus antagonize tacrolimus based calcineurin inhibition via competition for FK-binding protein 12. *Biochem Pharmacol*. 2009; 77: 1206-1212.
8. van Rossum HH, de Fijter JW, van Pelt J. Pharmacodynamic monitoring of calcineurin inhibition therapy: principles, performance, and perspectives. *Ther Drug Monit*. 2010; 32: 3-10.
9. Sellar KJ, van Rossum HH, Romijn FP, Smit NP, de Fijter JW, van Pelt J. Spectrophotometric assay for calcineurin activity in leukocytes isolated from human blood. *Anal Biochem*. 2006; 358: 104-110.
10. van Rossum HH, Romijn FP, Sellar KJ, Smit NP, van de Boog PJ, de Fijter JW, van Pelt J. Variation in leukocyte subset concentrations affects calcineurin activity measurement: implications for pharmacodynamic monitoring strategies. *Clin Chem*. 2008; 54: 517-524.
11. van Rossum HH, Romijn FP, Sellar KJ, Smit NP, van de Boog PJ, de Fijter JW, van Pelt J. Monitoring of calcineurin activity under controlled systemic cyclosporine exposure after renal transplantation. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk*. 2007; 32: 272-273.