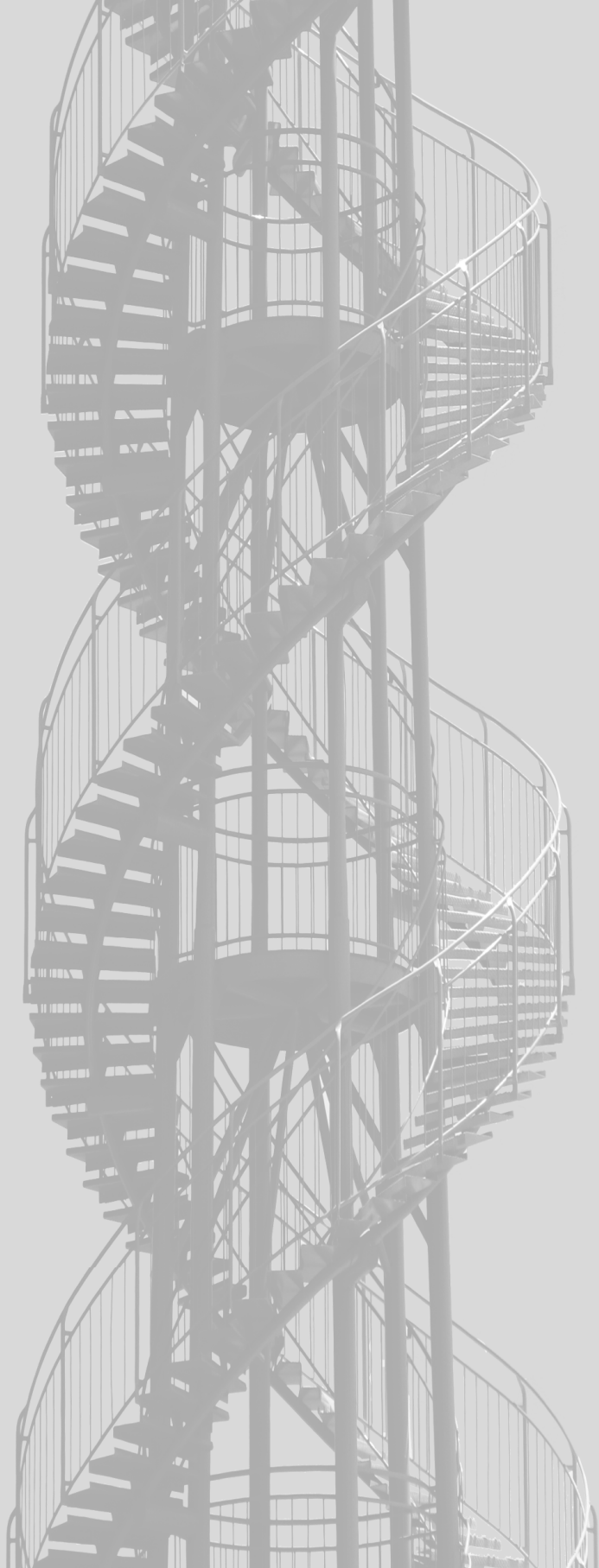


Samenvatting



Samenvatting

Verschillende acute en chronische longaandoeningen met variabele stadia van fibrose zijn beschreven en worden over het algemeen aangeduid als diffuse of interstitiële longaandoeningen (interstitial lung disease, ILD). De oorzaak van het ontstaan van ILD is veelal nog onbekend. Bij de meeste aandoeningen worden een genetische basis en omgevingsfactoren genoemd als mogelijke risicofactoren. Afgelopen jaren zijn er verschillende studies verricht die een associatie aantonen tussen genetische polymorfismen of de aanwezigheid van bepaalde variant allelen, en het voorkomen en/of de progressie van ILD van onbekende oorsprong. Daarnaast gaat de zoektocht naar met name meer specifieke 'markers' nog steeds door.

Het doel van de studies die in dit proefschrift worden beschreven, was om de klinische en prognostische waarde van genetische testen te evalueren. Als studiepopulatie werd een groep patiënten met door geneesmiddelen veroorzaakte ILD (drug-induced interstitial lung disease, DI-ILD), een groep patiënten met door orale antistolling veroorzaakte diffuse alveolaire bloedingen (diffuse alveolar hemorrhage, DAH) en een groep sarcoïdosepatiënten gebruikt, bekend bij het ild care team van het Maastrichts Universitair Medisch Centrum.

De analyses in de studies beschreven in dit proefschrift werden uitgevoerd op volbloedmonsters van patiënten met door geneesmiddelen veroorzaakte ILD, idiopathische longfibrose (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) en sarcoïdosepatiënten. Sarcoïdose is een chronische inflammatoire multisysteemziekte, waarvan de oorzaak nog niet bekend is. Het verloop en de prognose van deze grillige aandoening kan erg variëren. Van de groep patiënten die een episode van diffuse alveolaire bloedingen doorgemaakt hadden werden de analyses op volbloedmonsters en cellen die in bronchoalveolaire lavage (BAL) vloeistof aanwezig waren gedaan. Van gezonde vrijwilligers (healthy volunteers, HV) werden volbloedmonsters en wangslimvliesuitstrijkjes (buccal swab, BS) gebruikt voor de analyses.

Het belang van het genotyperen van cytochroom P450 (CYP) enzymen (zoals CYP2D6, CYP2C9 en CYP2C19) en/of vitamine K epoxide reductase complex1 (VKORC1) werd in de bovengenoemde populaties onderzocht. Daarnaast werd in sarcoïdose patiënten tumor necrose factor alfa -308 (*TNF- α* G-308A), butyrophiline-like 2 (*BTNL2* G16071A) en humaan leukocytenantigeen (human leukocyte antigen, HLA) DRB1 en DQB1 getypeerd.

In **hoofdstuk 1** wordt als inleiding een overzicht gegeven van de verschillende presentatievormen van interstitiële longaandoeningen. Speciale aandacht gaat uit naar door geneesmiddelen veroorzaakte ILD, diffuse alveolaire bloedingen

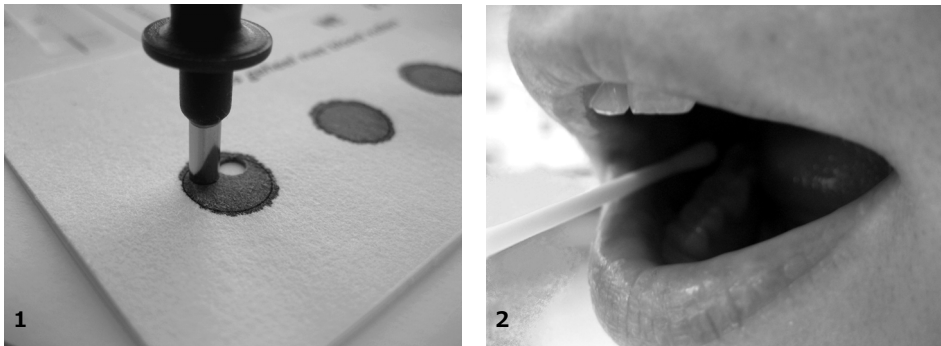
en sarcoïdose. Verder wordt het begrip polymorfisme en de manieren waarop deze kunnen worden bepaald verklaard. De in dit proefschrift gebruikte detectiemethode, de fluorescentie resonantie energie overdracht (fluorescence resonance energy transfer, FRET) wordt wat meer in detail besproken.

In **hoofdstuk 2** wordt de mogelijke rol van cytochroom P450 (CYP) enzymen in de pathogenese van interstitiële longaandoeningen, en in het bijzonder in door geneesmiddelen veroorzaakteILD beschreven. De CYP enzymfamilie speelt een belangrijke rol in de metabolisatie van allerlei ingenomen of geïnhaleerde xenobiotische stoffen. Polymorfismen in deze CYP genen kunnen de metabole activiteit van de hieruit volgende enzymen beïnvloeden, en deze veranderde activiteit kan vervolgens leiden tot plaatselijke (toxische) reacties en weefselschade. Geneesmiddeltoxiciteit kan het gevolg zijn van geen of heel lage enzymactiviteit, in het bijzonder wanneer er geen andere metabole route beschikbaar is. Om toxische bijwerkingen te verhinderen wordt in het geval van een verlaagde enzymactiviteit een reductie van de voorgeschreven dosering of het gebruik van een alternatief geneesmiddel dat gemetaboliseerd wordt via een ander, niet aangetast (CYP) enzym, geadviseerd. Dit is vooral van belang wanneer er sprake is van meervoudig geneesmiddelengebruik. Daarom zou kennis over het CYP profiel van een patiënt voordat er een (bepaald) geneesmiddel wordt voorgeschreven van groot belang kunnen zijn en een manier om door geneesmiddelen veroorzaakteILD en andere door geneesmiddelen geïnduceerde gevolgen te voorkomen. Verder kan het ook de ernstige bijwerkingen door ingeademde of ingenomen xenobiotische stoffen verklaren.

Hoofdstuk 3 beschrijft een eenvoudige DNA isolatiemethode die gebruikt kan worden om monsters te bewerken alvorens polymorfismen te bepalen. Hoewel er diverse commerciële DNA isolatie kits beschikbaar zijn om genomisch DNA uit volbloedmonsters te isoleren, vergen deze procedures behoorlijk wat tijd en zijn over het algemeen ook behoorlijk kostbaar. Een alternatieve techniek zou de op een filterpapier gespotte bloeddruppel (dried blood spot, DBS) monsterafname (zie Figuur A1) en een daaropvolgende simpele isolatiemethode zijn. De DNA isolatie wordt daarmee ook sneller, goedkoper en logistiek eenvoudiger.

Deze gedroogde bloeddruppel DNA isolatiemethode bleek een goed alternatief voor commercieel verkrijgbare DNA isolatiekits en een zeer praktische methode om onderscheid te kunnen maken tussen verschillende genotypen. Dezelfde methode kan ook gebruikt worden om DNA uit wangslimvliesuitstrijkjes (zie Figuur A2) te isoleren en geeft, naast goede DNA opbrengsten, totaal overeenkomende genotyperings resultaten vergeleken met monsters die met behulp van commerciële DNA isolatiekits geïsoleerd werden. Dit is een

praktische uitbreiding van de toepasbaarheid van deze snelle en eenvoudige DNA isolatiemethode. Zeker in combinatie met de niet-invasieve en patiëntvriendelijke wangslimvliesuitstrijkjes monsterafname, bleek dit een goed alternatief ten opzichte van invasieve monsterafname methoden.



Figuur A (1) monstername van een gedroogde bloeddruppel, (2) monstername van wangslimvlies met behulp van een wattenstokje.

Door geneesmiddelen geïnduceerde longtoxiciteit vormt een nog steeds groeiend probleem. Het precieze ontstaansmechanisme van deze toxiciteit is veelal nog onbekend. Allerlei verschillende geneesmiddelen worden gemetaboliseerd door cytochroom P450 (CYP) enzymen.

In **hoofdstuk 4** wordt het onderzoek beschreven met de vraag of alle variatie in *CYP* polymorfe genen bijdraagt aan de tot nu toe onverklaarde toxiciteit en verschillen in het reageren op geneesmiddelen. Hiervoor werd een retrospectieve case-control studie uitgevoerd. De cases waren patiënten met door geneesmiddelen veroorzaakte interstitiële longaandoeningen. Daarnaast werden er twee controle groepen gebruikt: een groep gezonde vrijwilligers en een groep patiënten met idiopathische longfibrose. Het aantal mensen met één of meer variant *CYP* genen was duidelijk hoger in de door geneesmiddelen veroorzaakte ILD groep vergeleken met de gezonde vrijwilligers evenals van de bestudeerde longfibrosepatiënten. Bovendien werd er een significante associatie tussen het ontwikkelen van door geneesmiddelen veroorzaakte ILD en het bezitten van één of meer variant *CYP* genen gevonden. Door geneesmiddelen veroorzaakte ILD bleken geassocieerd met de aanwezigheid van tenminste één variant *CYP* allel. Deze studie ondersteunt het nut van het voorschrijven van geneesmiddelen na genotypering, de zogenaamde geïndividualiseerde geneeskunde, om zo efficiëntie, verdraagzaamheid en veiligheid van de voorgeschreven geneesmiddelen te verhogen.

De klinische relevantie van genotypering voor het initiëren van medicamenteuze behandeling met name in geval van gebruik van meerdere geneesmiddelen tegelijkertijd wordt geïllustreerd aan de hand van het patiëntenvoorbeeld beschreven in **hoofdstuk 5**. Het beter begrijpen van het mechanisme van geneesmiddelmetabolisme en eventuele interacties kan bijdragen tot het voorkomen of verminderen van bijwerkingen. De patiënte werd behandeld met onder andere venlafaxine i.v.m. een depressie en metoprolol i.v.m. hartritmestoornissen. Ondanks deze behandeling ging ze klinisch gezien achteruit i.p.v. vooruit. Bij opname in het ziekenhuis rees de verdenking op een overgevoeligheidsreactie (ADR) die toegeschreven zou kunnen worden aan het gebruik van venlafaxine en/of metoprolol. Er werden toxische waarden van venlafaxine gemeten en de actieve metabooliet (*O*-desmethylvenlafaxine) was niet aantoonbaar. Na genotypering werd duidelijk dat patiënte een slechte metaboliseerder voor CYP2D6 ten gevolge van een polymorfisme in dit cytochroom P450 (*CYP*) gen bleek te zijn. Dit betekent dat de metabole activiteit van het corresponderende enzym negatief beïnvloed werd, waardoor serumconcentraties van de door het aangedane enzym te metaboliseren geneesmiddelen (venlafaxine en metoprolol) veranderden. Venlafaxine kon hierdoor niet worden omgezet naar de bijbehorende actieve metabooliet (*O*-desmethylvenlafaxine) en die was daarom niet aantoonbaar. Het gevolg was dat het doel waarvoor de venlafaxine werd voorgeschreven in het geheel niet werd bereikt en patiënte niet instaat was op de beoogde wijze te reageren op de voorgeschreven medicatie. De venlafaxine werd gestopt, een alternatieve therapie werd gestart en klinische toestand van de patiënte verbeterde aanzienlijk. Naast therapeutische geneesmiddelmonitoring, bleek het genotyperen van enkele belangrijke CYP enzymen van additionele waarde in het vinden van de verklaring waarom de patiënt ernstige bijwerkingen ontwikkelde. Daarnaast verschaft de genotypering inzicht in het waarom de patiënte geen therapeutisch effect bereikte van met name venlafaxine. Dit voorbeeld benadrukt het belang van zowel klinische als genetische risicostratificatie voor het starten van een behandeling. Dit kan uitermate behulpzaam zijn bij het nemen van het nemen van beslissingen betreffende welk geneesmiddel voorgeschreven kan worden, en tevens om een patiëntgerichte dosering vast te stellen.

In **hoofdstuk 6** wordt een studie bij patiënten met diffuse alveolaire bloedingen (DAH), een bloedingcomplicatie die kan optreden ten gevolge van onder andere orale antistollingstherapie, beschreven. De hypothese was dat bij patiënten die worden behandeld met coumarines deze complicatie geassocieerd zou kunnen worden met een polymorfisme in het vitamine K epoxide reductase complex1 (*VKORC1*) gen en de aanwezigheid van variant allelen in het cytochroom P450 gen *CYP2C9*, en in het geval van acenocoumarol gebruik ook

met *CYP2C19* varianten. Retrospectief werden patiënten die coumarines gebruikten en tenminste één episode met diffuse alveolaire bloedingen hadden doorgemaakt over een periode van zeven jaar verzameld. Van de 173 bevestigde gevallen van patiënten met diffuse alveolaire bloedingen gebruikten 75 patiënten orale antistolling waarvan uiteindelijk 63 (84%) patiënten konden worden geïncludeerd aangezien er DNA monsters beschikbaar waren. Van deze monsters werden *CYP2C9*, *CYP2C19* en *VKORC1* single nucleotide polymorphismen (SNPs) gegenotypeerd. Bij 62 van de 63 bestudeerde patiënten was er of een *VKORC1*, of een *CYP2C9* variant allel, of beiden aanwezig. Hieruit werd geconcludeerd dat het zinvol is om voorafgaand aan de behandeling met orale antistolling te genotyperen om met deze informatie zoveel mogelijk het risico op ernstige bijwerkingen, waaronder diffuse alveolaire bloedingen, te beperken. Om een veiligere en meer persoonlijke antistollingstherapie te garanderen wordt deze werkwijze reeds aanbevolen door de Amerikaanse federale Food and Drug Administration (FDA).

De studie beschreven in **hoofdstuk 7** werd uitgevoerd om te evalueren of er een verband bestaat tussen de aanwezigheid van tumor necrose factor alfa (*TNF- α*) polymorfismen en de prognose dan wel het verloop van sarcoïdose. In een retrospectieve case-control studie werd van 625 sarcoïdose patiënten *TNF- α* G-308A, *TNF- α* G-238A en *lymphotoxin- α* (*LTA*) gegenotypeerd. Deze patiënten werden onderverdeeld in een groep van 298 patiënten met persisterende sarcoïdose en 327 patiënten met niet-persisterende sarcoïdose. Niet-persisterende sarcoïdose werd gedefinieerd als patiënten die verbeterden naar of stabiel bleven met röntgenstadium 0 of I. Hierbij werd gebruik gemaakt van röntgenfoto's en longfunctietestsuitslagen na een periode van tenminste twee jaar na diagnosestelling. Het *TNF- α* -308A variant allel werd in 25.5% van de patiënten met persisterende sarcoïdose aangetroffen, vergeleken met 44.0% voorkomen in patiënten met de niet-persisterende vorm. De gevonden data tonen dat, mede door de sterke associatie tussen *TNF- α* G-308A en HLA-DRB1*03, de aanwezigheid van een *TNF- α* -308A variant allel geassocieerd kan worden met een gunstige prognose en dat een betrekkelijk eenvoudige bepaling van de *TNF- α* G-308A SNP bruikbaar is om het verloop van longsarcoïdose te voorspellen.

In **hoofdstuk 8** wordt een studie beschreven die de associatie tussen butyrophiline-like 2 (*BTNL2*) G16071A en de progressie van longsarcoïdose onderzoekt en de associatie met de prevalentie van de ziekte in 632 sarcoïdose patiënten bevestigd. Verder werd de samenhang tussen *BTNL2* G16071A en specifieke HLA-DRB1 en HLA-DQB1 types onderzocht. Bij patiënten met persisterende sarcoïdose werd het *BTNL2* 16071A variant allel significant meer aangetroffen (92.4%) dan in patiënten met niet-persisterende sarcoïdose

(86.6%). Uit de resultaten van deze studie blijkt dat het bezitten van een *BTNL2* 16071A variant allel het risico op progressie van longsarcoïdose bijna verdubbeld. Dit verhoogde risico kan het gevolg zijn van de sterke link tussen *BTNL2* G16071A en DRB1*15, waarvan de associatie tussen aanwezigheid en progressie naar een ernstigere en meer persistente vorm van longsarcoïdose bevestigd werd. Het werd verder duidelijk dat HLA-DRB1 typeren voldoende is, door het niet verkrijgen van extra informatie bij HLA-DQB1 typering. Of men uiteindelijk kiest voor een *BTNL2* G16071A SNP bepaling of HLA-DRB1 typeren ligt meer aan de beschikbaarheid en/of uitvoerbaarheid van deze testen.

De belangrijkste bevindingen beschreven in dit proefschrift worden besproken in **hoofdstuk 9**, evenals de hieruit voortkomende mogelijkheden voor toekomstig onderzoek. Ondanks het continue voortschrijdende inzicht aangaande het metabolisme van geneesmiddelen blijven er nog veel vragen open. Door continuering van het onderzoek naar de relatie tussen kliniek en genetische eigenschappen kunnen mogelijk in de toekomst een aantal antwoorden ingevuld worden. De genetische basis van sarcoïdose en de invloed van het genotype op het fenotype, ofwel de klinische presentatie, en het beloop is nog steeds onvoldoende opgehelderd. Het vergaren van verder inzicht in deze aspecten van de pathogenese van sarcoïdose zal een interessant en uitdagend thema vormen voor verder onderzoek. Met name onderzoek naar mogelijke onderscheidende factoren tussen zogenaamde responders en non-responders op therapeutische interventies zal heel klinisch relevant en uiteindelijk kostenbesparend kunnen zijn. Op die manier kan dan in de toekomst een duidelijke beperking worden aangebracht in het voorschrijven van (dure) geneesmiddelen.