

---

# PULMO *Script*

Officieel orgaan van de NVALT

Jaargang 22, nummer 2, juni 2011

---



*In dit nummer:*

- ERS Amsterdam: voorproefje
- Bronkhorst Colloquium
- Longartsenweek

# Polymorphisms in interstitial lung diseases: Friend or foe?

*Samenvatting proefschrift dr. P.A.H.M. Wijnen*

Klinisch chemisch laboratorium, ild care team, Maastricht Universitair Medisch Centrum (MUMC+), Maastricht

Promotiedatum: 18 maart 2011

#### Promotores:

- Prof. dr. M. Drent (longarts),
- Prof. dr. M. van Dieijen-Visser (klinisch chemicus)

#### Co-promotor:

- Dr. O. Bekers (klinisch chemicus)

Petal Wijnen werkt momenteel als onderzoeksanaliste op het KCL van het MUMC+

Vershillende acute en chronische longaandoeningen met variabele stadia van fibrose zijn beschreven en worden over het algemeen aangeduid als diffuse of interstitiële longaandoeningen (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 vooral 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, een groep patiënten met door orale antistolling veroorzaakte diffuse alveolaire bloedingen en een groep sarcoidosepatiënten gebruikt, bekend bij het ild care team van het MUMC+.

#### De rol van cytochroom P450 enzymen

Cytochroom P450 (CYP) enzymen spelen mogelijk een rol in de pathogenese van interstitiële longaandoeningen, en in het bijzonder in door geneesmiddelen veroorzaakte ILD. 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 (zie Figuur 1).



Figuur 1. Patiënten met dezelfde diagnose en met dezelfde behandeling, maar met verschillende reacties op de geneesmiddelen: geen bijwerkingen (blauw), geen reactie op de therapie (rood) en patiënten met (ernstige) bijwerkingen (geel).

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

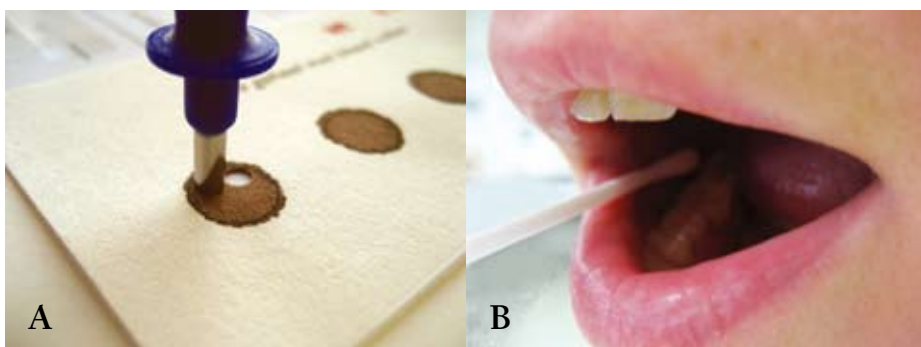
geneesmiddel dat gemetaboliseerd wordt via een ander, niet aangetast CYP enzym, geadviseerd. Dit is vooral van belang wanneer er sprake is van meervoudig geneesmiddelengebruik. Daarom zou kennis over het CYP profiel van een patiënt voordat er een (bepaald) geneesmiddel wordt voorgeschreven van groot belang kunnen zijn en een manier om door geneesmiddelen veroorzaakte ILD en andere door geneesmiddelen geïnduceerde gevolgen te voorkomen. Verder kan het ook de ernstige bijwerkingen door ingeademde of ingenomen xenobiotische stoffen verklaren.

#### DNA isoleren

Voor het uitvoeren van de testen om polymorfismen op te sporen is DNA van de betrokkene nodig. Er wordt een eenvoudige DNA isolatiemethode beschreven die gebruikt kan worden om monsters te bewerken alvorens deze en andere 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 filtreerpapier gespote bloeddruppel monsterafname (zie Figuur 2A) of een wangslijmvliesuitstrijkje (zie Figuur 2B) en een daaropvolgende simpele isolatiemethode zijn. De DNA isolatie wordt daarmee ook sneller, goedkoper en logistiek eenvoudiger.

Deze simpele DNA isolatiemethode bleek een goed alternatief voor commercieel verkrijgbare DNA isolatiekits en een zeer praktische methode om onderscheid te kunnen maken tussen verschillende genotypen en geeft bovendien een voldoende hoge DNA opbrengst. Zeker in combinatie met de niet-invasieve en patiëntvriendelijke wangslijmvliesuitstrijkjes monsterafname, bleek dit een goed alternatief ten opzichte van invasieve monsterafname methoden.



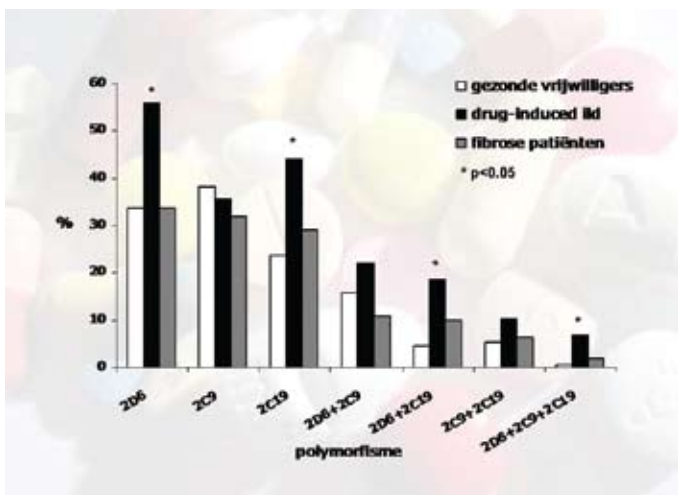
Figuur 2. Monstername van (A) een gedroogde bloeddruppel en (B) wangslimvlies met behulp van een wattenstokje.

**De invloed van geneesmiddelen: door geneesmiddelen veroorzaakte interstitiële longaandoening**

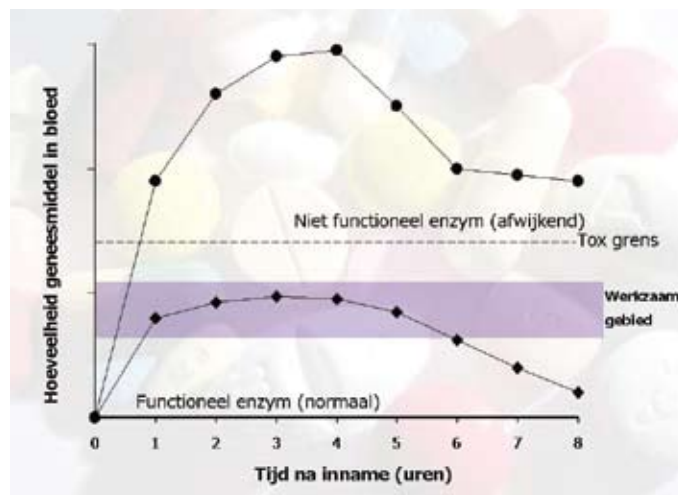
Door geneesmiddelen geïnduceerde longtoxiciteit (drug-induced ILD) vormt een nog steeds groeiend probleem. Het precieze ontstaansmechanisme van deze toxiciteit is veelal nog onbekend. Allerlei verschillende geneesmiddelen worden gemetaboliseerd door cytochroom P450 (CYP) enzymen. De vraag of alle variatie in CYP polymorfe genen bijdragen aan de tot nu toe onverklaarde toxiciteit en verschillen in het reageren op geneesmiddelen werd onderzocht. 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. 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 (zie Figuur 3). 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 voornamelijk bij gebruik van meerdere geneesmiddelen tegelijkertijd wordt verder geïllustreerd aan de hand van een patiëntenvoorbeeld. 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. hartritme stoornissen. 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 metaboliet (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 (zie Figuur 4). Venlafaxine kon hierdoor niet worden omgezet naar de bijbehorende actieve metaboliet en die was daarom niet aantoonbaar. Het gevolg was dat het doel waarvoor de venlafaxine



Figuur 3. Percentages voorkomen polymorfismen in de verschillende patiënten populaties.



Figuur 4. Illustratie van bloedconcentraties tijdens geneesmiddelverwerking bij de aanwezigheid van een normaal en afwijkend enzym.

werd voorgeschreven in het geheel niet werd bereikt en patiënte niet in staat 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 en verschaftte inzicht in het waarom de patiënte geen therapeutisch effect bereikte. Dit voorbeeld benadrukt het belang van zowel klinische als genetische risicofratificatie voor het starten van een behandeling.

#### De invloed van geneesmiddelen: door orale antistolling veroorzaakte diffuse longbloedingen

Deze studie onderzocht het zich voordoen van diffuse alveolaire bloedingen (DAH), een bloedingcomplicatie die kan optreden ten gevolge van onder andere orale antistollingstherapie. 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*. Retrospectief werden patiënten die coumarines gebruikten en tenminste één episode met diffuse alveolaire bloedingen hadden doorgemaakt over een periode van zeven jaar verzameld. Drieënzestig patiënten konden worden geïncludeerd en werden genotypeerd. 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 DAH, te beperken. Om een veiligere en meer persoonlijke antistollingstherapie te garanderen wordt deze werkwijze al aanbevolen door de Amerikaanse federale Food and Drug Administration (FDA).

#### Sarcoïdose

In een populatie van sarcoïdose patiënten werden een aantal studies uitgevoerd om te evalueren of er een verband bestaat tussen de aanwezigheid van tumor necrose factor alfa (*TNF-*) polymorfismen en de prog-

nose dan wel het verloop van sarcoïdose. In een retrospectieve case-control studie werden 625 sarcoïdosepatiënten genotypeerd. 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-* -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-* G-308A en HLA-DRB1\*03, de aanwezigheid van een *TNF-* -308A variant allel geassocieerd kan worden met een gunstige prognose en dat een betrekkelijk eenvoudige bepaling van de *TNF-* G-308A SNP bruikbaar is om het verloop van long-sarcoïdose te voorspellen.

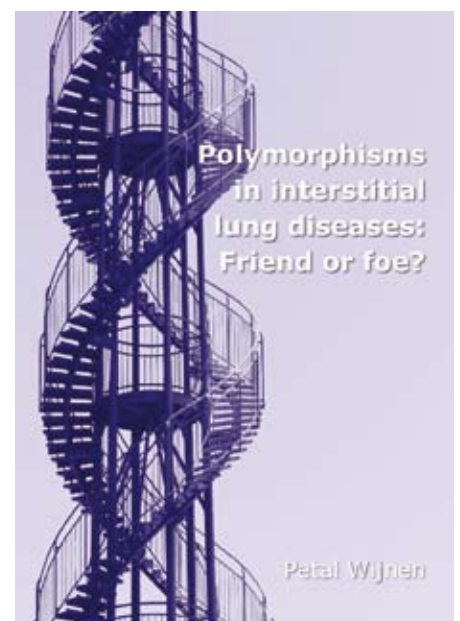
Een andere studie die werd uitgevoerd in een populatie van 632 sarcoïdosepatiënten. Deze studie onderzocht de associatie tussen butyrophiline-like 2 (*BTNL2*) G16071A en de progressie van longsarcoïdose en bevestigde de associatie met de prevalentie van de ziekte. Verder werd de samenhang tussen *BTNL2* 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.

#### Beschouwing

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. Naast Flikken Maastricht hebben we nu ook een Maastrichtse variant van crime scene

investigation. In deze CSI (*CYP*, *BTNL2*, *TNF-* en *VKORC1* in Sarcoïdose en andere Interstitiële longaandoeningen) Maastricht draait het allemaal om DNA variaties.

Ondanks vele onderzoeken is 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. Verder zouden er met behulp van de aanwezige informatie beslissingen over agressief of conservatief behandelen genomen kunnen worden. Dit alles om uiteindelijk tot een 'medicijnverstrekking op maat' te komen, waarbij bijwerkingen zoveel mogelijk beperkt kunnen worden.



#### Publicaties uit dit proefschrift

Wijnen PA, Op den Buijsch RA, Cheung SC, van der Heijden J, Hoogtanders K, Stolk LM, van Diejen-Visser MP, Neef C, Drent M, Bekers O. Genotyping with a dried blood spot method: A useful technique for applica-

tion in pharmacogenetics. *Clin Chim Acta*. 2008;388:189-91.

Wijnen PA, Drent M, Nelemans PJ, Kuijpers PM, Koek GH, Neef C, Haenen GR, Bekers O. Role of cytochrome P450 polymorphisms in the development of pulmonary drug toxicity: A case-control study in the Netherlands. *Drug Saf*. 2008;31:1125-34.

Wijnen PA, Drent M, van Diejen-Visser MP, Bekers O. Pharmacogenetic testing after a simple DNA isolation method on buccal swab samples. *Pharmacogenomics*. 2009;10:983-7.

Wijnen PA, Limantoro I, Drent M, Bekers O, Kuijpers PM, Koek GH. Depressive effect of

an antidepressant: therapeutic failure of venlafaxine in a case lacking CYP2D6 activity. *Ann Clin Biochem*. 2009;46:527-30.

Wijnen PA, Linszen CE, Haenen GR, Bekers O, Drent M. Variant VKORC1 and CYP2C9 Alleles in Patients with Diffuse Alveolar Hemorrhage Caused by Oral Anticoagulants. *Mol Diagn Ther*. 2010;14:23-30.

Wijnen PA, Nelemans PJ, Verschakelen JA, Bekers O, Voorter CE, Drent M. The role of tumor necrosis factor alpha G-308A poly-

morphisms in the course of pulmonary sarcoidosis. *Tissue Antigens*. 2010;75:262-8.

Wijnen PA, Bekers O, Drent M. Relationship between drug-induced interstitial lung diseases and CYP polymorphisms. *Curr Opin Pul Med*. 2010;16:496-502.

Wijnen PA, Voorter CE, Nelemans PJ, Verschakelen JA, Bekers O, Drent M. Butyrophilin-like 2 in pulmonary sarcoidosis: a factor for susceptibility and progression? *Hum Immunol*. 2011;72:342-347.

*Pdfs van het proefschrift en de afzonderlijke hoofdstukken zijn terug te vinden op [www.ildcare.eu](http://www.ildcare.eu) onder de link 'research'.*



Het secretariaat van de NVALT is  
gesloten van 15 t/m 21 augustus.

Wij wensen u allen  
een fijne zomervakantie.