

Associatie tussen clozapinegebruik en FL3-fluorescentie: een mogelijke biomarker voor therapie(on)trouw?

Jan Willem Douma ^{a*}, Ingeborg Wilting ^{ab}, Maarten ten Berg ^c, Hanneke den Breeijen ^{ab}, Albert Huisman ^c, Toine Egberts ^{ab} en Wouter van Solinge ^{bc}

^a Afdeling Klinische Farmacie, Universitair Medisch Centrum Utrecht.

^b Afdeling Farmaco-epidemiologie en Klinische Farmacologie, Departement Farmaceutische Wetenschappen, Universiteit Utrecht.

^c Laboratorium Klinische Chemie en Hematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht.

* Correspondentie: jwdouma@tjongerschans.nl.

KERNPUNTEN

- Therapie(on)trouw is een probleem bij patiënten met schizofrenie die clozapine gebruiken.
- Inname van meer dan 50 mg clozapine per dag verhoogt de FL3-fluorescentie van neutrofiële granulocyten. Deze FL3-fluorescentie neemt langzaam af na het stoppen van clozapine.
- FL3-fluorescentie van neutrofiële granulocyten is mogelijk een maat voor therapie(on)trouw.

Inleiding

Clozapine is vanwege zijn effectiviteit bij therapieresistente schizofrenie een waardevol antipsychoticum [1-3]. Het bijwerkingenprofiel, met onder andere potentieel fatale agranulocytose (incidentie 0,7%), maakt clozapine ongeschikt als eerstekeuzemiddel. Tijdens behandeling met clozapine is frequente bloedafname noodzakelijk vanwege bloedbeeldmonitoring en vanwege *therapeutic drug monitoring* [bepaling van dosering en controle op therapie(on)trouw] [4-6]. Therapie-ontrouw is een belangrijke complicerende factor bij behandeling van schizofrenie. Een clozapineserumspiegel geeft, gezien de korte halfwaardetijd, alleen informatie over inname tot hoogstens twee dagen voor de bloedafname.

Hoffmann en Lillholm rapporteerden in een abstract als toevalsbevinding een associatie tussen clozapinegebruik en verhoogde FL3-fluorescentie van neutrofiële granulocyten [7]. FL3-fluorescentie is een van de parameters die gemeten worden door sommige geautomatiseerde hematocytometers als een bloedbeeld wordt aangevraagd. De FL3-fluorescentie wordt onder andere gebruikt om de integriteit van leukocyten te meten. De behandeling met clozapine zou in belangrijke mate verbeterd kunnen worden met een betere marker voor therapie(on)trouw. FL3-fluorescentie zou hiervoor interessant kunnen zijn.

Dit onderzoek richt zich op het bestaan van een associatie tussen clozapinegebruik en de mate van FL3-fluorescentie van neutrofiële granulocyten.

ABSTRACT

The association between clozapine use and FL3 fluorescence of neutrophil granulocytes

OBJECTIVE

To investigate the association between FL3 fluorescence of neutrophil granulocytes and clozapine use.

DESIGN

Retrospective cohort study within the UPOD database.

METHODS

The study cohort comprised all patients of 18 years and older hospitalized at the UMC Utrecht between 2007 and 2010 with a blood cell count, excluding intensive care patients and patients without any registered medication use. The association between clozapine use and FL3 fluorescence of neutrophil granulocytes was determined by calculating the sensitivity and specificity for different cut-off values for the FL3 fluorescence. For 26 individual patients (10 starters with clozapine, 10 current users and 6 patients discontinuing clozapine) the FL3 fluorescence was followed in time.

RESULTS

38,141 patients were included, of whom 124 (0.33%) were treated with clozapine. Clozapine users had a higher mean FL3 fluorescence (91, sd 12) than non-users (70, sd 4; $P < 0.01$). At a cut-off value of 80 (mean + 3 sd), the specificity was 0.99 and the sensitivity was 0.75. All clozapine users with low FL3 fluorescence had a dosage < 50 mg or were labelled as non-compliant. FL3 fluorescence reached a maximum after four weeks of clozapine use. After discontinuation of clozapine the FL3 fluorescence faded within four weeks to the original level.

CONCLUSION

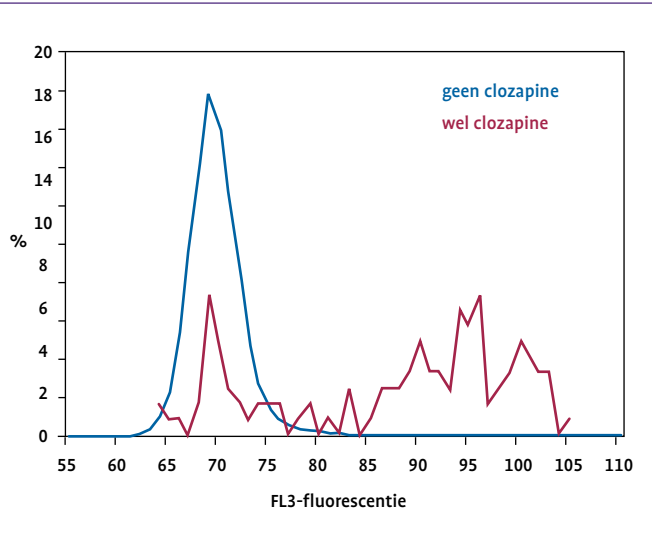
Clozapine use in the normal dosage for schizophrenia enhances the FL3 fluorescence of neutrophil granulocytes. The possible use of this finding for monitoring compliance should be investigated further.

Douma JW, Wilting I, ten Berg M, den Breeijen H, Huisman A, Egberts T, van Solinge W. Associatie tussen clozapinegebruik en FL3-fluorescentie: een mogelijke biomarker voor therapie(on)trouw? PW Wetenschappelijk Platform. 2012;6:a1210.

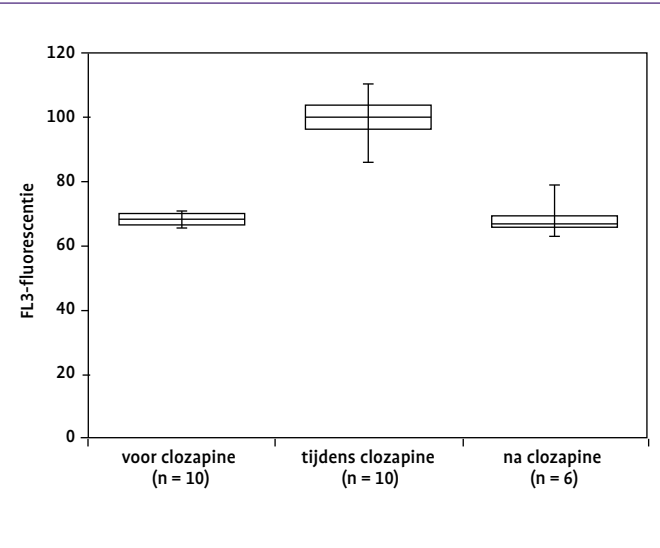
Methoden

Voor dit retrospectieve cohortonderzoek kwamen in aanmerking alle klinische patiënten van het UMC Utrecht van 18 jaar of ouder voor wie ten minste één hematologische bepaling beschikbaar was in de periode 2007-2010. Patiënten die waren opgenomen op de afdeling Intensive Care, patiënten zonder medicatievoorschriften

FIGUUR 1
FL3-fluorescentie bij patiënten die al dan niet clozapine gebruiken



FIGUUR 2
FL3-fluorescentie voor, tijdens en na clozapinegebruik



en patiënten met monsters waarvan de integriteit was aangetast [*white cell viability fraction (WVF) < 0,95*] werden uitgesloten van deelname.

Voor dit onderzoek zijn gegevens gebruikt uit de Utrecht Patient Oriented Database (UPOD). UPOD bevat van alle patiënten die worden behandeld bij het UMC Utrecht, gegevens over geneesmiddelengebruik, laboratoriumuitslagen, ontslagdiagnoses en specialistische verrichtingen [8]. Daarnaast bevat UPOD een specifieke database met hematologiegegevens van geautomatiseerde bloedcellenanalyses die uitgevoerd zijn met de Abbott Cell-Dyn Hematology Analyser [9]. Indien de arts een hematologische bepaling aanvraagt, bepaalt dit apparaat alle hematologische parameters, waaronder de FL3-fluorescentie. Deze wordt niet gerapporteerd aan de aanvrager. UPOD voldoet aan de huidige wet- en regelgeving met betrekking tot het gebruik van patiëntgegevens voor wetenschappelijk onderzoek. Gegevens werden verzameld over leeftijd, geslacht, medicatiegebruik (geneesmiddelen gegroepeerd op ATC-codering niveau 3, waarbij clozapine apart werd geselecteerd), clozapinespiegel, aantal leukocyten, aantal neutrofiele granulocyten en klinische afdeling op moment van FL3-bepaling. Medicatiegebruik werd gedefinieerd als het hebben van een actieve medicatieopdracht binnen drie dagen voor bepaling van de FL3-fluorescentie.

Allereerst werd geanalyseerd of er interindividueel een relatie bestaat tussen clozapinegebruik en de mate van FL3-fluorescentie van neutrofiele granulocyten, door willekeurig een FL3-fluorescentie per patiënt te selecteren. Het verschil in FL3-fluorescentie tussen clozapinegebruikers en niet-clozapinegebruikers werd getoetst met een chi-kwadraattoets. Sensitiviteit en specificiteit werden bepaald voor verschillende FL3-afkapwaarden (gemiddelde + 0,5 sd, + 1 sd, + 2 sd, + 3 sd en + 4 sd) en verwerkt tot een *receiver operating characteristic curve* (ROC-curve).

Voor de intra-individuele relatie werd het beloop van de FL3-fluo-

rescentie onderzocht bij 3 × 10 individuele clozapinegebruikers van wie alle clozapine-medicatieopdrachten en alle FL3-fluorescentiewaarden (zowel klinisch als poliklinisch) uit UPOD werden verkregen. Van 10 patiënten die met clozapine gestart waren, 10 patiënten die clozapine minimaal twee maanden gebruikten en 10 patiënten die gestopt waren met clozapine, werd de FL3-fluorescentie gevolgd in de tijd. De verandering in FL3-fluorescentie werd getoetst met een gepaarde t-test.

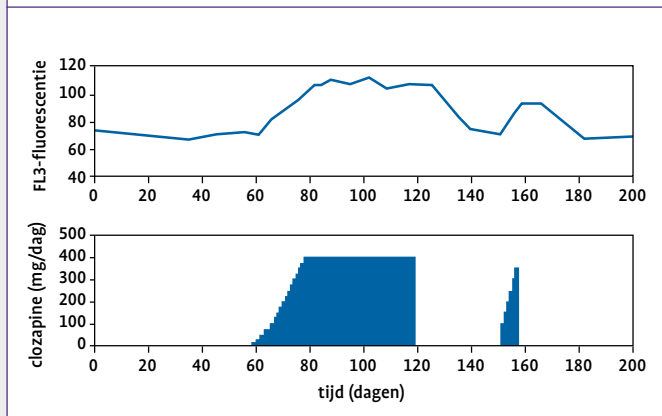
Resultaten

38.141 klinische patiënten (gemiddelde leeftijd 54 jaar, sd 19; 47% man) werden geïncludeerd. 124 patiënten (0,33%) werden behandeld met clozapine op het moment van de FL3-fluorescentiebepaling (gemiddelde leeftijd 44 jaar, sd 18; 65% man). Clozapinegebruikers hadden gemiddeld een hogere FL3-fluorescentie (91, sd 12) dan niet-clozapinegebruikers (70, sd 4; $P < 0,01$) (figuur 1). Uit de ROC-analyse blijkt dat bij een FL3-fluorescentie groter dan 80 (meer dan het gemiddelde + 3 sd) de sensitiviteit van een verhoogde FL3-fluorescentie voor clozapinegebruik 0,75 was. De specificiteit van een verhoogde FL3-fluorescentie was 0,99. Er waren 33 patiënten (25%) met een clozapinevoorschrift zonder een verhoogde FL3-fluorescentie. Van hen verkeerden 20 in de eerste twee weken van het opbouwschema en 11 gebruikten maximaal 50 mg/dag (andere indicatie dan schizofrenie). Bij de overige 2 patiënten was er twijfel over de therapietrouw. Een van hen had een clozapinespiegel van 0,22 mg/L (referentiewaarden 0,35-0,60 mg/L). Clozapinegebruikers met een verhoogde FL3-fluorescentie gebruikten altijd meer dan 50 mg/dag. Binnen de groep niet-clozapinegebruikers met een verhoogde FL3-fluorescentie (totaal 371 patiënten) werd geen duidelijke relatie gevonden met overige medicatie, leeftijd, afdeling of overige hematologische laboratoriumbepalingen.

De gemiddelde FL3-fluorescentie van starters nam toe van 68,3 (sd

FIGUUR 3

FL3-fluorescentie (lijn) en dosering clozapine (kolommen) bij één patiënt



1,6) voor de start van clozapine tot 99,5 (sd 3,6) na een maand gebruik ($P < 0,01$) (figuur 2). Hierna steeg de FL3-fluorescentie niet verder. De stijging was onafhankelijk van de uiteindelijke clozapinedosering (spreiding 200-450 mg/dag) of clozapinespiegel (spreiding 0,09-0,57 mg/L). De FL3-fluorescentie van de groep gebruikers was vergelijkbaar: 99,6 (sd 4,4). In totaal waren 6 patiënten gestopt met clozapine. Na staken daalde de gemiddelde FL3-fluorescentie significant ($P < 0,01$) van 94,0 (sd 4,4) naar 67,3 (sd 3,9). Figuur 3 toont clozapinedosering en FL3-fluorescentie bij een patiënt die twee keer stopte met clozapine in verband met neutropenie. Terwijl de FL3-fluorescentie binnen een week na starten met clozapine begint te stijgen, is na stoppen bij deze patiënt de FL3-fluorescentie pas na vier weken terug op de uitgangswaarde.

Beschouwing

De resultaten van dit onderzoek bevestigen de eerdere toevalsbevinding [7] dat er een relatie bestaat tussen clozapinegebruik (van > 50 mg/dag) en een verhoogde FL3-fluorescentie van neutrofiële granulocyten. Deze stijging heeft na vier weken een maximum dat onafhankelijk is van clozapinedosering of clozapinespiegel. FL3-fluorescentie kan daardoor dus serumspiegelbepaling niet volledig vervangen.

Er waren slechts 2 patiënten die in het ziekenhuis gecontroleerd stopten met clozapine. Stoppen gebeurt niet klinisch, behalve in de opbouwperiode of vanwege bewezen agranulocytose. In ons ziekenhuis worden patiënten na instellen meestal terugverwezen naar GGZ-instellingen. Stoppers komen daarom meestal pas na lange tijd weer klinisch in beeld, waardoor het beloop van de FL3-fluorescentie na stoppen onvoldoende onderzocht kon worden. De FL3-fluorescentie bereikt na vier weken clozapinegebruik een maximum, terwijl er meestal al na twee weken een therapeutische dosering is bereikt.

Het is onduidelijk hoe clozapine de FL3-fluorescentie verhoogt. Dat verhoging van FL3-fluorescentie langer aanhoudt dan er clozapine in serum te meten is, zou kunnen betekenen dat clozapine de ontwikkeling van leukocyten in het beenmerg beïnvloedt.

Neutrofiële granulocyten rijpen tien dagen in het beenmerg en circuleren slechts een paar dagen in het bloed [10]. De FL3-fluorescentie begint relatief snel na de start van clozapine te stijgen, dus mogelijk is er ook een direct effect op de neutrofiële granulocyten. Sommige therapie-ontrouwe patiënten nemen vlak voor een clozapinespiegelbepaling eenmalig de clozapine in zodat het, enkel afgaande op de spiegel, lijkt alsof ze therapietrouw zijn. Het is onduidelijk wat de FL3-fluorescentie doet bij een patiënt die zijn clozapine onregelmatig inneemt. Dit zal waarschijnlijk mede afhangen van de mate van therapie(on)trouw. Na staken neemt de FL3-fluorescentie weer geleidelijk af. De twee patiënten bij wie er grote twijfels waren over de algehele therapietrouw, hadden een lage FL3-fluorescentie. Als patiënten slechts eenmalig clozapine innemen, zal de FL3-fluorescentie waarschijnlijk niet verhoogd zijn.

Het is onduidelijk waarom 1% van de niet-clozapinegebruikers een hoge FL3-fluorescentie heeft. FL3-fluorescentiemeting is gebaseerd op de hoeveelheid fluorescerende stof (propidiumjodide) die in leukocyten gebonden wordt maar de celwand van intacte leukocyten niet penetreert. Het geeft een maat voor de permeabiliteit van de cel: niet-intacte cellen hebben een hogere FL3-fluorescentie. Mogelijke oorzaken van celschade zijn infecties en cytostatica-gebruik. Er was bij de niet-clozapinegebruikers met verhoogde FL3-fluorescentie geen relatie met een verhoogde spiegel C-reactief proteïne of met afdelingen waar cytostatica worden toegevoerd. Overige medicatiegroepen (waaronder antibiotica) en overige hematologische bepalingen hadden hiermee ook geen duidelijke relatie. Verhoging van de voor inclusie minimaal vereiste WVF naar 0,98 zorgde ervoor dat van de patiënten met verhoogde FL3-fluorescentie die geen clozapine gebruikten, 30% afviel, maar het merendeel werd hiermee nog steeds niet verklaard. Er waren geen clozapinegebruikers met een WVF $< 0,98$.

Verder onderzoek is nodig om meer duidelijkheid te krijgen over het verloop van de FL3-fluorescentie na stoppen met clozapine en bij onregelmatig gebruik van clozapine. Ook moet onderzocht worden waarom de FL3-fluorescentie verhoogd is bij patiënten die geen clozapine gebruiken.

Dit onderzoek laat zien dat het verband tussen langdurig clozapinegebruik in een dosering > 50 mg/dag en een verhoogde FL3-fluorescentie van neutrofiële granulocyten mogelijk een biomarker is voor therapie(on)trouw. Dit verband moet verder onderzocht worden op bruikbaarheid in de praktijk.

Gebaseerd op het registratieonderzoek van J.W. Douma.

LITERATUUR

- 1 Chakos M, Lieberman J, Hoffman E, et al. Effectiveness of second-generation antipsychotics in patients with treatment-resistant schizophrenia: a review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Psychiatry*. 2001;158(4):518-26.
- 2 Meltzer HY, Alphs L, Green AI, et al. Clozapine treatment for suicidality in schizophrenia: International Suicide Prevention Trial (InterSePT). *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60(1):82-91.
- 3 Reid WH, Mason M, Hogan T. Suicide prevention effects associated with clozapine therapy in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Psychiatr Serv*. 1998;49(8):1029-33.
- 4 Richtlijn voor het gebruik van clozapine. Clozapine PlusWerkgroep; 2010. www.clozapinepluswerkgroep.nl/pdf/SKMBT_C4511011109560.pdf. Geraadpleegd 2011 juli 12.

- 5 Potkin SG, Bera R, Gulasekaram B, et al. Plasma clozapine concentrations predict clinical response in treatment-resistant schizophrenia. *J Clin Psychiatry*. 1994;55 Suppl B:133-6.
- 6 Cramer JA, Rosenheck R. Compliance with medication regimens for mental and physical disorders. *Psychiatr Serv*. 1998;49(2):196-201.
- 7 Hoffmann J, Lillholm A. Neutrophil fluorescence in patients using clozapine [abstract]. *Ned Tijdschr Klin Chem*. 2000;25(2):108.
- 8 ten Berg MJ, Huisman A, van den Bemt PM, et al. Linking laboratory and medication data: new opportunities for pharmacoepidemiological research. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(1):13-9.
- 9 Müller R, Mellors I, Johannessen B, et al. European multi-center evaluation of the Abbott Cell-Dyn sapphire hematology analyzer. *Lab Hematol*. 2006;12(1):15-31.
- 10 Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, et al. In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010;116(4):625-7.

Onjuiste bewaring van inhalatiecapsules kan leiden tot inademen van brokstukjes

Ada Stuurman-Bieze

Bij het inhaleren van geneesmiddelen uit capsules die in de bijbehorende inhalator door één of meer naaldjes zijn geperforeerd, worden soms brokstukjes mee ingeademd. Deze brokjes gelatine zijn niet schadelijk, maar leiden bij patiënten tot klachten en een verminderd vertrouwen in het geneesmiddel.

De vraagstelling van het onderzoek van Renswouw c.s. was of bewaarcondities invloed hebben op de kwaliteit van de inhalatiecapsules. Hoge luchtvochtigheid kan aanleiding geven tot plakkerige, zachte capsules en lage luchtvochtigheid tot de vorming van scheurtjes in de capsulewand. Daarom staat in de bijsluiters dat een capsule pas direct voor gebruik uit de oorspronkelijke verpakking mag worden gehaald.

Alle 13 (toen) in Nederland beschikbare inhalatiecapsules werden buiten de verpakking bewaard bij 20°C onder normale omstandigheden (luchtvochtigheid 60%) en onder droge condities (luchtvochtigheid 25%). Al na één dag bewaring bij lage luchtvochtigheid waren in de meeste capsules scheurtjes zichtbaar en braken splinters af bij het doorboren van de capsule. Na tien dagen traden zulke problemen op in alle capsules – alleen tiotropiumcapsules waren na 31 dagen nog steeds geheel intact. Bij bewaring onder normale omstandigheden (maar buiten de verpakking) traden vanaf een bewaartermijn van drie dagen problemen op, maar lang niet bij alle capsules. Geen van de capsules werd plakkerig of zacht.

Om te zien hoe goed patiënten op de hoogte waren van de bewaarcondities werden aan telkens 50 patiënten uit 12 openbare apotheken vragenlijsten gestuurd; de respons was 40%. Slechts 32% bewaarde de inhalatiecapsules op de aanbevolen manier, 59% echter in vochtige ruimtes als badkamer en keuken of op zeer droge plaatsen als boven de verwarming of op de vensterbank en/of niet in de gesloten originele verpakking; 10% deed na gebruik de volgende capsule alvast in de inhalator! Slechts 3% gaf aan dat zij in de apotheek mondelinge uitleg hadden gekregen hoe de capsules bewaard moesten worden.

De auteurs concludeerden dat er een relatie kon bestaan tussen de bewaarcondities en het inhaleren van capsulebrokstukjes. Het verdient dus aanbeveling om aan de ene kant capsules te ontwikkelen die minder kwetsbaar zijn en om anderzijds patiënten beter te instrueren hoe medicijnen bewaard dienen te worden.

Renswouw DC, Laarhoven AC, Haren MJ, Bouvy ML, Weda M. Storage instructions for inhalation capsules: consequences of incorrect storage and adherence in daily practice. *J Pharm Pract*. 2010;23(6):548-52.

Stuurman-Bieze A. Onjuiste bewaring van inhalatiecapsules kan leiden tot inademen van brokstukjes. PW Wetenschappelijk Platform. 2012;6:e1202.