

Het effect van bèta-agonisten en corticosteroiden op de cytokineproductie bij COPD-patiënten

Robert ten Broeke, Vera H.M. Deneer, Peter D. Vernooij, Jules M.M. van den Bosch, Gert Folkerts en Mathieu M. Tjoeng

Abstract

The effect of beta-agonists and corticosteroids on cytokine production in COPD patients

Objective

In this study we investigated whether treatment with beta-agonists and corticosteroids affects the release of cytokines by human macrophages from patients with COPD. Furthermore, we investigated whether cytokines can be used as biomarkers for COPD.

Design

In this experimental/observational study we included three groups of subjects: non-smoking healthy volunteers (n = 17), smoking healthy volunteers (n = 9) and smoking patients with COPD (n = 6).

Methods

About 30 ml of blood was withdrawn from subjects. We measured the amount of the cytokines IL-8, TNF α and IFN γ in serum. Thereafter, monocytes were isolated and exposed to cigarette smoke. The amount of cytokines was measured in the presence of the beta-agonist salbutamol and/or the corticosteroid betamethasone.

Results

IL-8 in serum could not be detected in any subject. In smoking subjects without COPD, TNF α and IFN γ levels were significantly increased compared to non-smoking subjects. In patients with COPD these cytokines could not be observed. Treatment with betamethasone decreased IL-8 production in stimulated monocytes. The combination salbutamol + betamethasone further decreased IL-8 production. Stimulation with cigarette smoke increased TNF α production in non-smoking and smoking volunteers. Treatment with salbutamol + betamethasone resulted in the highest reduction in TNF α production. In patients with COPD TNF α could not be detected.

Conclusions

TNF α and IFN γ levels, but not IL-8 levels, in serum can probably be used as biomarkers in smokers to predict the development of COPD in these patients. Treatment with betamethasone decreased cytokine production in smokers and patients with COPD. Whether the combination salbutamol + betamethasone has any further beneficial effect has to be determined in future experiments.

PW Wetenschappelijk Platform. 2007;1(2):30-33

Kernpunten

- Roken is de belangrijkste oorzaak voor het ontwikkelen van de ontstekingsziekte COPD.
- Voor het stellen van de diagnose COPD is het belangrijk een biomarker te hebben.
- Inhalatiecorticosteroiden dienen bij de behandeling van COPD in een vroeg stadium te worden toegepast.
- De toegevoegde waarde van de combinatietherapie met bèta-agonisten en corticosteroiden bij COPD dient verder onderzocht te worden.

COPD is de verzamelnaam voor chronische bronchitis en longemfyseem. Bij COPD is er een beperking van de luchtstroom die gewoonlijk progressief van aard is en gepaard gaat met een abnormale reactie van de longen op schadelijke deeltjes of gassen. Roken is verreweg de belangrijkste risicofactor [1]. Tegenwoordig wordt COPD gezien als ontstekingsziekte waarbij alveolaire macrofagen en neutrofielen dé effectorcellen zijn. Deze

cellen produceren diverse cytokinen die het ontstekingsproces initiëren, in stand houden en uitbreiden. De belangrijkste cytokinen zijn interleukine 8 (IL-8), tumornecrosefactor alfa (TNF α) en interferon gamma (IFN γ). IL-8 wordt gezien als belangrijkste cytokine bij COPD vanwege de aantrekking van neutrofielen naar de luchtwegen. TNF α is een pro-inflammatoire cytokine, geproduceerd door voornamelijk macrofagen. IFN γ wordt geproduceerd door T-cellen en stimuleert de productie van IL-8 door de diverse ontstekingscellen [2].

De medicamenteuze behandeling van COPD is symptomatisch en bestaat uit het toedienen van bronchodilatoren (β 2-sympathicomimetica en/of parasymphatholytica) en ontstekingsremmers (corticosteroiden oraal of per inhalatie). De precieze plaats van inhalatiecorticosteroiden bij COPD is nog onduidelijk. Recent onderzoek laat zien dat er mogelijk een synergistisch effect bestaat tussen bèta-agonisten en corticosteroiden [3]. Verder wordt bij rokers een verminderd effect van corticosteroiden gezien [4]. In dit (in-vitro-)onderzoek wordt onderzocht of bèta-agonisten en/of corticosteroiden een effect hebben op de cytokineproductie bij COPD-patiënten en of dit effect wordt beïnvloed door sigarettenrook. Daarnaast wordt onderzocht of bepaalde cytokinen in het bloed gebruikt kunnen worden als biomarker voor COPD.

Methoden

Het betreft een experimenteel/observationeel onderzoek. De deelnemers zijn onderverdeeld in drie groepen:

- gezonde proefpersonen (niet-rokend);
- rokers zonder COPD;
- rokers met COPD.

[In de studieopzet is uitgegaan van dertig personen per groep op basis van veronderstelde IL-8-serumwaarden (power 0,93), die uiteindelijk niet meetbaar zijn.]

De gezonde proefpersonen (n = 17) en de rokers zonder COPD (n = 9) zijn gerekruteerd middels een advertentie. De rokers zonder COPD zijn gezonde rokende proefpersonen die geen COPD of andere onderliggende aandoeningen hebben. De rokers met COPD (n = 6) zijn gerekruteerd uit een bestand van patiënten die met luchtwegklachten door de huisarts naar het ziekenhuis zijn doorverwezen voor een longfunctietest.

De diagnose COPD werd gesteld door de longarts op basis van de symptomen (hoesten, kortademigheid, sputumproductie) en de uitslag van de longfunctietest (forced expiratory volume in 1 seconde/forced vital capacity < 0,7 na toediening van een bronchodilatans) (GOLD-criteria). Geen van de proefpersonen gebruikte bèta-agonisten en/of corticosteroïden (oraal of per inhalatie). Bij alle deelnemende personen werd 30 ml bloed afgenomen. In het serum is de hoeveelheid van de cytokinen IL-8, TNF α en IFN γ bepaald middels ELISA. Vervolgens zijn uit het bloed monocytten geïsoleerd die, in vitro, zijn blootgesteld aan sigarettenrook. De (gestandaardiseerde hoeveelheid) sigarettenrook werd verkregen door gebruik te maken van een rookmachine, waarbij door middel van een vacuüm-pomp de rook van sigaretten wordt opgevangen en direct door het medium wordt geleid [5, 6]. De experimenten zijn uitgevoerd in de aan- of afwezigheid van een bèta-agonist (salbutamol 1 nmol/l) en/of een corticosteroïde (betamethason 100 mmol/l), waarna de hoeveelheid van de cytokinen IL-8, TNF α en IFN γ werd bepaald. De gegevens met een niet-normale verdeling (in-vitro-experimenten) zijn geanalyseerd met behulp van SPSS middels een Kruskal-Wallis ANOVA gebaseerd op rangnummers. De gegevens met een normale verdeling (serumwaarden) zijn geanalyseerd met behulp van SPSS middels een eenweg-ANOVA-analyse (LSD post hoc). Een p-waarde < 0,05 wordt als statistisch significant beschouwd.

Het onderzoek is goedgekeurd door de Verenigde Commissies Mensgebonden Onderzoek te Nieuwegein.

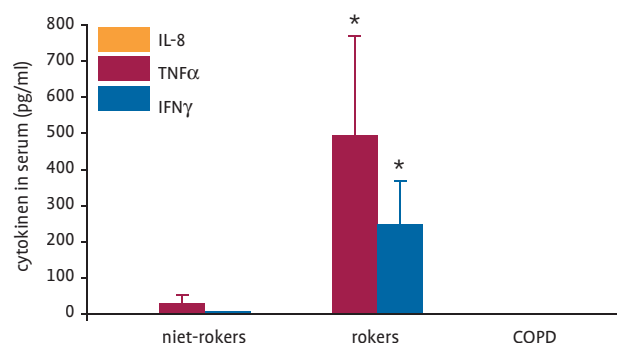
Resultaten

In het serum van geen van de proefpersonen was IL-8 aanwezig. Bij de rokende proefpersonen zonder COPD zijn de gemiddelde TNF α - en de IFN γ -waarden significant verhoogd ten opzichte van gezonde proefpersonen (p < 0,05, figuur 1). Bij enkele rokende proefpersonen zonder COPD (n = 4) zijn deze cytokinen echter niet meetbaar. TNF α en IFN γ zijn niet meetbaar in het serum van de proefpersonen met COPD.

In geïsoleerde monocytten waren geen cytokinen meetbaar na stimulatie met controlevloeistof (fysiologisch zout, gegevens niet getoond). Toediening van sigarettenrook aan monocytten leidt tot IL-8-productie in vitro (figuur 2 links, tabel 1). De monocytten van rokers en personen met COPD produceren minder IL-8 na stimulatie met sigarettenrook (p = 0,10). Salbutamol heeft geen effect op de IL-8-

Figuur 1

Concentraties van IL-8, TNF α en IFN γ in serum van niet-rokers (n = 17), rokers zonder COPD (n = 9) en proefpersonen met COPD (n = 6). De concentraties zijn weergegeven als gemiddelde \pm SEM (pg/ml). * p < 0,05



Tabel 1

Mediane productie (pg/ml) van IL-8 (boven) en TNF α (onder) in vitro na stimulatie met sigarettenrook van uit bloed geïsoleerde monocytten van niet-rokers, rokers en proefpersonen met COPD

	Niet-rokers	Rokers	COPD
IL-8			
• controle	23387	15120	7877
• salbutamol	23036	16624	11440
• betamethason	2304	2820	5220
• salbutamol + betamethason	1339	2485	2660
TNFα			
• controle	15,6	7,3	0 Δ
• salbutamol	11,6	6,8	0 Δ
• betamethason	10,3	5,5	0
• salbutamol + betamethason	8,6	3,9	0

Δ p < 0,05

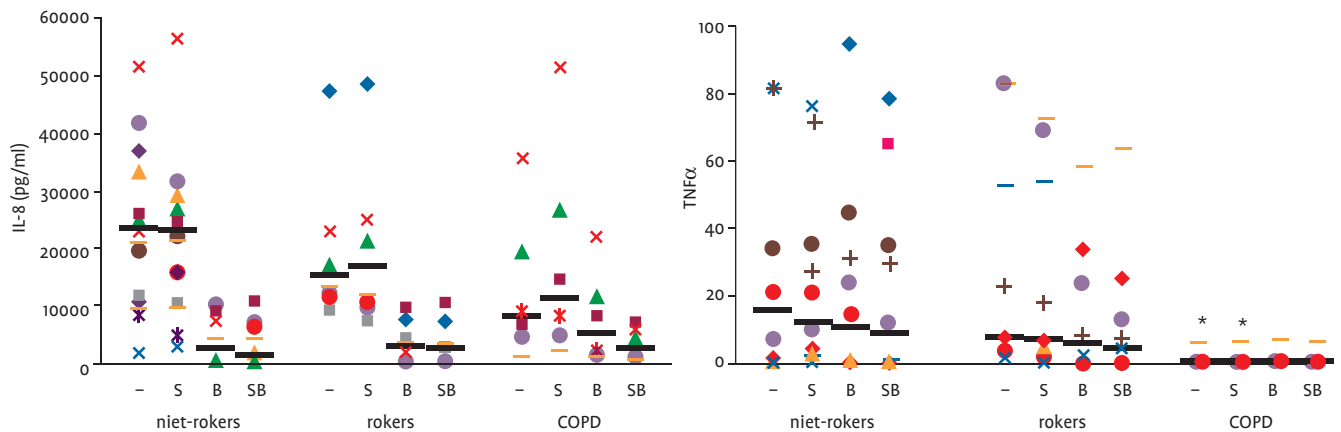
productie en lijkt een lichte verhoging te geven bij rokers en mensen met COPD. Betamethason verlaagt de IL-8-productie bij gezonde vrijwilligers en rokers met meer dan 80 %, terwijl bij mensen met COPD een remming van 34 % wordt gezien (p = 0,52). De combinatie salbutamol + betamethason geeft in alle groepen een verdere (lichte) verlaging van de IL-8-productie, met het grootste effect bij de personen met COPD (50 %, p = 0,49).

De TNF α -productie was verhoogd na stimulatie met sigarettenrook bij gezonde vrijwilligers en rokers (figuur 2 rechts, tabel 1). De combinatie salbutamol + betamethason geeft de meeste verlaging in TNF α -productie. Bij enkele gezonde vrijwilligers (n = 6) en enkele rokers (n = 3) is geen TNF α meetbaar na stimulatie met sigarettenrook. Bij de personen met COPD was geen TNF α -productie meetbaar na stimulatie met sigarettenrook, maar alleen na stimulatie met

Figuur 2

Productie van IL-8 en TNF α in vitro na stimulatie met sigarettenrook van uit bloed geïsoleerde monocytten van niet-rokers (n = 17), rokers zonder COPD (n = 9) en proefpersonen met COPD (n = 6). De experimenten zijn uitgevoerd in aanwezigheid van placebo (-), salbutamol 1 nmol/l (S), betamethason (100 μ mol/l) en de combinatie salbutamol + betamethason (1 nmol/l + 100 μ mol/l) (SB). De concentraties zijn per individu weergegeven als metingen met de mediaan (—).

* p < 0,0



controlevloei stof en salbutamol is het verschil significant ($p = 0,01$ in beide gevallen).

IFN γ was niet detecteerbaar na stimulatie met sigarettenrook in alle proefpersonen.

Conclusie

In deze studie is ten eerste gekeken of serumwaarden van de belangrijkste cytokinen bij COPD verschillen tussen gezonde vrijwilligers, rokers en mensen met COPD. IL-8 was niet meetbaar in het serum van alle proefpersonen. Eerdere studies tonen echter aan dat IL-8-waarden verhoogd zijn in sputum van mensen met COPD [7] en dat de longfunctie (licht) verbetert bij personen met COPD die behandeld worden met een antilichaam tegen IL-8 [8]. Mogelijk is de hoeveelheid in serum te laag om die te kunnen detecteren.

TNF α - en IFN γ -waarden in serum zijn verhoogd bij rokers met normale longfunctie, terwijl deze cytokinen niet meer aantoonbaar zijn bij rokende mensen met COPD. Eerder is aangetoond dat waarden van deze cytokinen in het sputum van rokers normaal zijn (TNF α) dan wel iets verhoogd (IFN γ), terwijl bij personen met COPD beide verhoogd zijn [9, 10]. Dit zou erop kunnen duiden dat in de pre-fase (roken) de ontsteking zich voornamelijk afspeelt op serumniveau en uiteindelijk bij het optreden van COPD zich ook verplaatst naar de luchtwegen. Opmerkelijk is dat in deze studie bij enkele rokende proefpersonen TNF α en IFN γ niet meetbaar zijn in het serum. Mogelijk is dat een voorspellende factor voor het al dan niet ontwikkelen van COPD bij rokers. Daarnaast zou een genpolymorfisme voor de grote interindividuele variabiliteit in cytokineproductie kunnen zorgen. In vervolgstudies zou onderzocht moeten worden of de verschillen in concentraties cytokinen samenhangen met de hoeveelheid en de activiteit van de ontstekingscellen in serum en de luchtwegen.

Een aantal jaren geleden werden corticosteroïden bij COPD alleen gebruikt bij exacerbaties (oraal, intraveneus) of indien tevens sprake

was van een astmatische component. Recente klinische studies laten echter zien dat (inhalatie)corticosteroïden veel eerder ingezet dienen te worden bij COPD [11, 12]. In deze studies werd een verbetering van de longfunctie en van de kwaliteit van leven gevonden bij de patiënten die (tevens) behandeld werden met corticosteroïden. Roken beïnvloedt echter de reactie van ontstekingscellen op corticosteroïden waardoor deze minder effectief zijn, zoals onlangs in vitro is aangetoond bij mensen met milde astma [4]. Alhoewel niet significant, zien we in de huidige studie echter de trend dat corticosteroïden in vitro de cytokineproductie na stimulatie met sigarettenrook remmen bij gezonde rokers en mensen met COPD. Diverse studies, zowel in vitro als in vivo, tonen aan dat er een synergistisch effect bestaat tussen corticosteroïden en bèta-agonisten [3]. Bij combinatietherapie treedt, ten opzichte van behandeling met de afzonderlijke middelen, een verdere verbetering op van de longfunctie en de kwaliteit van leven. In de huidige in-vitro studie wordt geen significant verschil gevonden in de remming van de cytokineproductie (IL-8) bij personen met COPD indien naast de corticosteroïde ook een bèta-agonist wordt gebruikt. Zeer binnenkort verschijnen de eerste resultaten van een klinische studie waarin het effect van gecombineerd gebruik van bèta-agonisten en corticosteroïden op niet alleen de longfunctie en de kwaliteit van leven, maar ook op de mortaliteit is onderzocht (Torch-studie) [13]. Geconcludeerd kan worden dat er geen significant verschil gevonden wordt in IL-8-productie na stimulatie met sigarettenrook in aanwezigheid van corticosteroïden en de combinatie van zowel een bèta-agonist als een corticosteroïde bij rokers en COPD-patiënten. Er dienen echter meer proefpersonen geïncubeerd te worden om daarover harde uitspraken te kunnen doen. Vervolgstudies zullen verder moeten uitwijzen of deze studieopzet gebruikt kan worden om te voorspellen of een patiënt met COPD baat heeft bij therapie met corticosteroïden al dan niet in combinatie met een bèta-agonist.

Dr. R. ten Broeke: ziekenhuisapotheker io (thans werkzaam als ziekenhuisapotheker in het Catharina Ziekenhuis Eindhoven); dr. V.H.M. Deneer: ziekenhuisapotheker/klinisch farmacoloog; drs. M.M. Tjoeng: ziekenhuisapotheker. Klinische Farmacie, St. Antonius Ziekenhuis Nieuwegein. P.D. Vernooij: student; dr. G. Folkerts: hoogleraar; Departement Farmaceutische Wetenschappen, Universiteit Utrecht.
Prof. dr. J.M.M. van den Bosch, longarts, St. Antonius Ziekenhuis Nieuwegein.
De auteurs willen graag de volgende personen bedanken: dr. P. Zanen, longfysioloog, Universitair Medisch Centrum Utrecht, voor de statistische analyse; drs. J. van der Zeijden, longarts, Mesos Medisch Centrum Utrecht, voor de inclusie van proefpersonen; Y.H. van der Hoorn, student Farmaceutische Wetenschappen, Universiteit Utrecht, voor de uitvoering van de pilotexperimenten ter voorbereiding van dit onderzoek.
Correspondentie: dr. R. ten Broeke, rtenbroeke@yahoo.com.

LITERATUUR

- 1 Pauwels RA, Buist AS, Ma P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): executive summary. *Respir Care*. 2001;46:798-825.
- 2 De Boer WI. Cytokines and therapy in COPD: a promising combination? *Chest*. 2002;121:2095-185.
- 3 Profita M, Gagliardo R, Di Giorgi R, et al. Biochemical interaction between effects of beclomethasone dipropionate and salbutamol or formoterol in sputum cells from mild to moderate asthmatics. *Allergy*. 2005;60:323-9.
- 4 Tomlinson JE, McMahon AD, Chaudhuri R, et al. Efficacy of low and high dose inhaled corticosteroid in smokers versus non-smokers with mild asthma. *Thorax*. 2005;60:282-7.

- 5 Karimi K, Sarir H, Mortaz E, et al. Toll-like receptor-4 mediates cigarette smoke-induced cytokine production by human macrophages. *Respir Res*. 2006;7:66.
- 6 Sarir H, Karimi K, Smit JJ, et al. Cigarette smoke-induced cytokine production by human monocyte-derived macrophages: inhibition by glucocorticosteroids and b-agonists. XIII EAACI Congress; 12-16 June 2004; Amsterdam. Abstract 358. www.congex.com/eaaci2004 > programme navigator. Geraadpleegd 27 februari 2007.
- 7 Keatings VM, Collins PD, Scott DM, et al. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153:530-4.
- 8 Mahler DA, Huang S, Tabrizi M, et al. Efficacy and safety of a monoclonal antibody recognizing interleukin-8 in COPD: a pilot study. *Chest*. 2004;126:926-34.
- 9 Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2001;suppl 34:50s-9s.
- 10 Saetta M, Di Stefano A, Turato G, et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:822-6.
- 11 Sin DD, Wu L, Anderson JA, et al. Inhaled corticosteroids and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2005;60:992-7.
- 12 Calverley P, Pauwels R, Vestbo J, et al. TRIal of Inhaled STeroids ANd long-acting beta2 agonists study group. Combined salmeterol and fluticasone in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2003;361:449-56.
- 13 Vestbo J. TORCH Study Group. The TORCH (towards a revolution in COPD health) survival study protocol. *Eur Respir J*. 2004;24:206-10.

NEDERLANDS FARMACEUTISCH ONDERZOEK IN DE INTERNATIONALE LITERATUUR

Patiëntvriendelijke bloedspotanalyse voor tacrolimus

Toine Egberts

Transplantatiepatiënten moeten meestal levenslang immuno-suppressiva zoals tacrolimus gebruiken. Gezien de relatie tussen concentratie en effect, de inter- en intra-individueel variabele kinetiek en de interactiegevoeligheid, is therapeutisch drug monitoring ter controle en begeleiding van de farmacotherapie standaard bij deze patiënten. Een reguliere bloedafname is voor de patiënt nogal onpraktisch en belastend, vooral omdat die kan interfereren met de dagelijkse activiteiten. Bloedafname door de patiënt zelf in de thuissituatie zou daarom een patiëntvriendelijke vooruitgang zijn.

Naar analogie van een methode die bij epilepsiepatiënten steeds meer in zwang raakt, ontwikkelden Hoogtanders e.a. voor patiënten die tacrolimus gebruiken de bloedspotmethode. Bij deze methode laat de patiënt zelf een druppel bloed, verkregen via een eenvoudige vingerprik, op een speciaal monsterpapiertje vallen. Na drogen wordt de bloedspot via de post opgestuurd naar het farmaceutisch laboratorium van het ziekenhuis. Op een gestandaardiseerde manier wordt het bloed geëxtraheerd uit het monster-

papier en vervolgens analytisch met LC-MS-MS kwantitatief bepaald. De auteurs beschrijven de opzet en de validiteit van deze werkwijze. De inter- en intra-assayvariabiliteit is goed (< 15 %) voor zowel de precisie als de nauwkeurigheid. Bij 24 patiënten is de concentratie in het monster dat is verkregen via de bloedspotmethode vergeleken met de concentratie in een regulier monster (venapunctie). Tussen beide methoden zijn geen klinisch relevante verschillen gevonden. De auteurs concluderen dat de bloedspotmethode patiëntvriendelijk is en veelbelovend voor controle en begeleiding van transplantatiepatiënten die tacrolimus gebruiken.

Hoogtanders K, van der Heijden J, Christiaans M, van de Plas A, van Hooff J, Stolk L. Dried blood spot measurement of tacrolimus is promising for patient monitoring. *Transplantation*. 2007;83(2):237-8.