

Farmacogenetica verklaart variabiliteit in busulfanklaring bij volwassen patiënten

M.H. ten Brink *, J. Zwaveling, J.A.M. Wessels, J. den Hartigh, T. van der Straaten en H-J. Guchelaar

Afdeling Klinische Farmacie en Toxicologie, Leids Universitair Medisch Centrum.

* Correspondentie: M.H.ten_Brink@lumc.nl.

KERNPUNTEN

- Busulfan wordt toegepast in conditioneringschema's voorafgaand aan stamceltransplantaties.
- Er is een grote interindividuele variabiliteit in busulfanklaring.
- In dit onderzoek is gezocht naar een farmacogenetische verklaring van deze variabiliteit.
- Met de *drug metabolizing enzymes and transporters array* zijn 1936 genetische variaties geanalyseerd in 225 genen die betrokken zijn bij geneesmiddelmetabolisme en -transport.
- Variaties in 7 genetische markers konden 64% van de variabiliteit in busulfanklaring verklaren.

Inleiding

Busulfan is een alkylarend cytostaticum dat wordt toegepast als onderdeel van conditioneringschema's bij stamceltransplantaties. Een te hoge busulfanblootstelling is geassocieerd met toxiciteit zoals veno-occlusieve leverziekte [1], een te lage blootstelling geeft meer kans op rejectie van het transplantaat [2]. Tevens kent busulfan een grote interindividuele variabiliteit in blootstelling, wat noodzaakt tot individualisering van de therapie met behulp van *therapeutic drug monitoring*.

Uit eerder onderzoek is gebleken dat een deel van de variabiliteit in de busulfanblootstelling is te verklaren door polymorfismen in genen die coderen voor glutathion-S-transferases [3-5]. Deze enzymen zijn verantwoordelijk voor de conjugatie van busulfan aan glutathion, een belangrijke stap in het metabolisme van busulfan. Zo is het effect op busulfanklaring aangetoond van een polymorfisme (-69C/T) in *GSTA1* (het gen dat codeert voor glutathion-S-transferase A1), maar dit polymorfisme verklaart slechts 14% van de variabiliteit [6]. Een mogelijke verklaring hiervoor zou zijn dat nog andere, thans onbekende metabole routes een rol spelen bij busulfanmetabolisme.

Het *drug metabolizing enzyme and transporter genotyping platform* (DMET) geeft de mogelijkheid om met behulp van een microarray-techniek een patiënt te genotypen voor 1936 variaties in 225 genen die zijn betrokken bij geneesmiddelmetabolisme en -distributie [7]. In dit onderzoek is nagegaan of de grote variabiliteit in de klaring van busulfan bij volwassenen is te verklaren door variabiliteit in genen die coderen voor metabole enzymen en geneesmiddeltransporters.

ABSTRACT

Pharmacogenetics explains variability in busulfan clearance in adult patients

OBJECTIVE

To investigate the effect of genetic polymorphisms in drug metabolizing enzymes and transporters on the variability in busulfan clearance in adult patients. Busulfan is an alkylating agent used in high doses in conditioning schemes prior to stem cell transplantation. Interpatient variability in busulfan pharmacokinetics is considered high. Furthermore, busulfan exposure is related to outcome: high exposure is associated with a higher incidence of toxicity, whereas low exposure leads to higher rates of graft failure and rejection.

METHODS

62 adult patients receiving busulfan were included in the study. Blood samples were taken for busulfan concentration measurements. DNA was collected and patients were genotyped using the Drug Metabolizing Enzymes and Transporters genotyping array. This array contains 1936 genetic variants in 225 genes involved in drug metabolism and transport. Associations with busulfan clearance and polymorphisms were tested by linear regression analysis. Candidate markers from the initial univariate analysis with $P < 0.05$ (SNPs or haplotypes) and SNPs with a frequency $> 10\%$ were analyzed in the multivariate linear regression analysis.

RESULTS

86 SNPs present in 52 different genes were significantly associated with busulfan clearance ($P < 0.05$). The 29 most informative haplotypes and 15 SNPs were further analyzed. This resulted in a final model including 7 genetic markers (in 6 genes) explaining 64% of the variability in busulfan clearance. 3 genes were involved in drug metabolism (*GSTA5*, *CYP2C19* and *CYP3A1*) and 3 genes were involved in drug transport (*ABCB4*, *SLC22A4* and *SLC7A8*).

CONCLUSION

7 genetic markers involved in drug metabolism and transport explain 64% of the variability in busulfan clearance.

ten Brink MH, Zwaveling J, Wessels JAM, den Hartigh J, van der Straaten T, Guchelaar HJ. Pharmacogenetica verklaart variabiliteit in busulfanklaring bij volwassen patiënten. PW Wetenschappelijk Platform. 2012;6:a1233.

Methoden

Geïnccludeerd werden volwassen patiënten (18-70 jaar) die busulfan kregen als onderdeel van een conditioneringschema voorafgaand aan stamceltransplantatie en van wie bloedmonsters beschikbaar

TABEL 1

Het effect (beta) van de zeven markers, resulterend uit de multivariate analyse, op de variabiliteit in busulfanklaring

Gen	Haplotype/SNP	Frequentie	Univariaat		Multivariaat	
			R ² (%)	P	beta	beta
GSTA5	CG	0,54	24,7	>0,001	0,038	0,016
SLC22A4	46011C>T	0,43	13,5	0,004	-0,026	-0,021
ABCB4	GAT	0,58	11,8	0,006	-0,024	-0,025
SLC7A8	-1065T>G	0,40	14,7	0,002	0,027	0,013
CYP39A1	TC	0,27	21,3	>0,001	-0,036	-0,018
CYP2C19	-806C/T	0,23	6,6	0,046	0,023	0,023
CYP39A1	GC	0,80	15,0	0,002	0,034	0,018

Weergegeven zijn de statistische gegevens afkomstig uit de univariate en multivariate analyse.

Drie haplotypen in *GSTA5*, *ABCB4*, *CYP39A1* en drie SNP's in *SLC4A*, *SLC8A8* en *CYP2C19* zijn geassocieerd met busulfanklaring.

SNP: *single nucleotide polymorphism*.

waren voor spiegelbepaling en genotypering van busulfan. Busulfan werd gedurende 2 of 4 dagen gegeven (0,8 mg/kg, viermaal daags). Busulfan werd intraveneus toegediend gedurende 2 uur en bloedmonsters werden 2,5 en 4 uur na start van het eerste busulfaninfuus afgenomen.

Met behulp van een ééncompartimentmodel (MW\Pharm) werd de busulfanklaring van busulfan voor de individuele patiënt berekend [6, 8].

DNA werd geïsoleerd uit volbloed en DNA-monsters werden genotyped met behulp van DMET plus array (Affymetrix UK, Verenigd Koninkrijk) volgens het voorschrift van de fabrikant [9, 10]. Genotypes werden berekend met DMET-console software, waarbij gebruik werd gemaakt van het algoritme *dynamic genotype boundaries*. Alleen patiënten bij wie 90% van de *single nucleotide polymorphisms* (SNP's) konden worden bepaald (*call rate* > 90%) werden in de verdere associatieanalyse betrokken. X-chromosomale SNP's op de DMET-array zijn uit de analyse verwijderd (45 stuks). Wanneer meerdere SNP's in één gen geassocieerd waren met klaring, werden deze polymorfismen getest op onderlinge samenhang, ofwel *linkage disequilibrium*. Bij *linkage disequilibrium* tussen SNP's in één gen werd een 'haploblok' (met verschillende haplotypen) gevormd. Zulke haploblokken werden alleen gevormd als er meer dan 95% zekerheid was over de samenhang van SNP's in een haplotype.

De associaties tussen afzonderlijke SNP's en busulfanklaring en tussen het aantal kopieën van een haplotype en busulfanklaring werden getest met lineaire regressieanalyse, in een additief model (1 vrijheidsgraad). Deze analyses werden uitgevoerd in respectievelijk gPLINK [11] en PASW statistics, versie 17.0.01 (SPSS, Chicago, Verenigde Staten). Het effect van het aantal kopieën van een gen (*copy number variants*) op de klaring werd getoetst met Student's t-test in PASW statistics.

Ten slotte werden alle SNP's of haplotypen met een P-waarde < 0,05 en een minimale frequentie van 10% geanalyseerd in een multivariate analyse.

Resultaten

Van de 65 patiënten die aanvankelijk zijn geïnccludeerd, zijn 3 patiënten alsnog geëxcludeerd vanwege een *call rate* < 90%. Van de overgebleven 62 patiënten waren 34 man, de gemiddelde leeftijd was 53 jaar en de gemiddelde busulfanklaring was $0,19 \pm 0,05 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Van de 1936 geanalyseerde SNP's hadden 849 SNP's een minimale allelfrequentie > 0,1%; deze werden geanalyseerd in de initiële analyse in relatie tot de busulfanklaring. Dit resulteerde in 86 SNP's in 52 genen die significant geassocieerd waren met busulfanklaring ($P < 0,05$), waaronder twee SNP's in *GSTA1*, namelijk rs4715332 en rs4715333. Geen van de *copy number variants* was geassocieerd met busulfanklaring. Van 45 SNP's lagen er telkens twee of meer SNP's binnen hetzelfde gen; hiermee werden 15 haploblokken gevormd, het totaal aantal verschillende haplotypen was 29.

29 haplotypen en 14 SNP's ($P < 0,05$, frequentie > 10%) zijn geanalyseerd in de multivariate analyse. Dit resulteerde in een model met zeven haplotypen of SNP's (ofwel genetische markers) die samen 64% van de variabiliteit in busulfanklaring verklaarden ($P < 0,001$). Deze zeven markers zijn aanwezig in zes genen. Drie van deze genen zijn betrokken bij geneesmiddelmetabolisme: glutathion-S-transferase A5 en twee cytochroom-P450-genen (*CYP2C19* en *CYP39A1*); drie genen zijn betrokken bij geneesmiddeltransport: *ABCB4*, *SLC22A4* en *SLC7A8*. Tabel 1 geeft een overzicht van deze zeven markers en hun effect op busulfanklaring en de potentiële rol van de markers staat in tabel 2.

Beschouwing

Dit is het eerste onderzoek waarbij een exploratieve farmacogenetische methode gebruikt is om de variabiliteit in busulfanklaring te verklaren. De hypothese in dit onderzoek is dat er naast *GSTA1* andere, nog onbekende metabole routes en geneesmiddeltransporters zijn die een rol spelen bij busulfanmetabolisme en dat variaties in de genen die voor deze eiwitten coderen, grotendeels de variabiliteit in klaring kunnen verklaren.

TABEL 2

Overzicht van de functie van de genen en hun mogelijke rol bij busulfanmetabolisme

Gen	Functie	Mogelijk effect op busulfan
<i>GSTA5</i>	Onderdeel van de familie glutathion-S-transferase alfa	Geen functioneel enzym detecteerbaar in humaan weefsel
<i>SLC22A4</i>	Influxtransporter	Onbekend
<i>ABCB4</i>	ATP-binding cassette, subfamilie B (MDR/TAP); dit gen codeert voor een transporter van de P-glycoproteïnefamilie en is mogelijk betrokken bij transport van fosfolipiden	<i>ABCB4</i> transporteert glutathionconjugaten de cel uit; transporteert mogelijk het busulfan-glutathion-conjugaat
<i>SLC7A8</i>	Kationaminozuurtransporter	Het SNP ligt in een haploblok in de promotor van het gen; er is geen informatie over het effect van het SNP op de expressie van het gen
<i>CYP39A1</i> (haploblok 1 en 2)	Onderdeel van het cytochroom-P450-systeem; dit enzym is betrokken bij de conversie van cholesterol naar galzuren	Onbekend
<i>CYP2C19</i>	Onderdeel van het cytochroom-P450-systeem; dit enzym is betrokken bij het metabolisme van verschillende geneesmiddelen, waaronder omeprazol en anti-epileptica	Het SNP codeert voor het *17 allel en daarmee het fenotype <i>ultrarapid metabolizer</i> ; het busulfan-glutathion-conjugaat wordt geoxideerd in de lever, wat mogelijk wordt gefaciliteerd door <i>CYP2C19</i>

SNP: *single nucleotide polymorphism*.

Uit dit onderzoek is gebleken dat zeven markers in zes genen die betrokken zijn bij geneesmiddelentransport en -metabolisme, 64% van de variabiliteit in busulfanklaring verklaren. In geen van de eerdere farmacogenetische studies met busulfan bij volwassenen kon de variabiliteit in de klaring in dergelijk hoge mate worden verklaard. In deze studies werd het effect van polymorfismen in genen die coderen voor glutathion-S-transferases op busulfanmetabolisme aangetoond. Onder andere in ons centrum is aangetoond dat een polymorfisme (-69C/T) in *GSTA1* is geassocieerd met busulfanklaring, maar dit polymorfisme verklaarde slechts 14% van de variabiliteit [6].

In de huidige studie hebben we gekozen voor een exploratieve methode waarbij 225 genen werden geanalyseerd die betrokken zijn bij geneesmiddelenmetabolisme of -transport. Een voordeel van deze methode boven de kandidaatgen-methode, is dat geen metabole routes of geneesmiddelcarriers bij voorbaat worden geëxcludeerd; het onderzoek wordt dus niet beperkt door de farmacologische inzichten betreffende het betrokken geneesmiddel. Een mogelijk nadeel van deze methode is dat de rol van sommige gevonden genetische markers in het algemeen, en in het bijzonder in relatie tot de busulfanklaring, onduidelijk is, zoals blijkt uit tabel 2. Hoe deze enzymen en transporters een rol spelen bij de farmacokinetiek van busulfan, zal in mechanistisch onderzoek moeten worden uitgezocht.

In de literatuur kon slechts in beperkte mate het effect worden aangetroffen van de gevonden SNP's of haplotypes op de genfunctie of -expressie. Daardoor kan over de rol van de marker in het busulfanmetabolisme uitsluitend gespeculeerd worden.

Een van de door ons gevonden markers is gelegen in het gen *GSTA5*. De rol van dit gen in geneesmiddelenmetabolisme is onduidelijk. Singh e.a. [12] beschrijven de afwezigheid van *GSTA5*-enzym in humaan weefsel. In onze patiëntenpopulatie vertonen *GSTA5* en *GSTA1* *full linkage disequilibrium*. Dit betekent dat wanneer een

patiënt een variatie in *GSTA5* heeft, het allel in *GSTA1* ook afwijkend is. Hierdoor is eigenlijk ook *GSTA1* aanwezig in ons model en daarmee is het een goede positieve controle. Tevens valt hierdoor de aanwezigheid van het niet functionele *GSTA5*-gen in het model te verklaren.

Een mogelijke tekortkoming van deze studie is dat een groot aantal SNP's is geanalyseerd in een relatief kleine patiëntengroep zonder te corrigeren voor *multiple testing*, wat kan resulteren in vals-positieve bevindingen. In deze studie is echter gekozen voor een exploratieve opzet en de resultaten die zijn gevonden in deze studie, zullen bevestigd moeten worden in een onafhankelijk cohort.

De bevindingen in dit onderzoek zijn klinisch van belang aangezien de busulfanblootstelling gerelateerd is aan de uitkomst na stamceltransplantatie en kan leiden tot meer toxiciteit dan wel groter risico op afstoting van het transplantaat. Met behulp van het model dat voortkomt uit dit onderzoek, kan de busulfanklaring en daarmee de blootstelling beter worden voorspeld. Zo kan in de toekomst mogelijk de busulfandosering worden geïndividualiseerd op basis van het genetisch profiel van de patiënt. Concluderend: deze studie laat zien dat 64% van de variabiliteit in busulfanklaring bij volwassenen patiënten verklaard wordt door zeven genetische markers.

Gebaseerd op het registratieonderzoek van M.H. ten Brink.

LITERATUUR

- Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB, et al. Pharmacokinetics of busulfan: correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989;25(1):55-61.
- Slattery JT, Clift RA, Buckner CD, et al. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: the influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation. *Blood.* 1997 apr 15;89(8):3055-60.

- 3 Kusama M, Kubota T, Matsukura Y, et al. Influence of glutathione S-transferase A1 polymorphism on the pharmacokinetics of busulfan. *Clin Chim Acta*. 2006 jun;368(1-2):93-8.
- 4 Srivastava A, Poonkuzhali B, Shaji RV, et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism: a risk factor for hepatic venoocclusive disease in bone marrow transplantation. *Blood*. 2004 sep 1;104(5):1574-7.
- 5 Abbasi N, Vadnais B, Knutson JA, et al. Pharmacogenetics of intravenous and oral busulfan in hematopoietic cell transplant recipients. *J Clin Pharmacol*. 2011 okt;51(10):1429-38.
- 6 ten Brink MH, Wessels JA, den Hartigh J, et al. Effect of genetic polymorphisms in genes encoding GST isoenzymes on BU pharmacokinetics in adult patients undergoing hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2012 feb;47(2):190-5.
- 7 Sissung TM, English BC, Venzon D, Figg WD, Deeken JF. Clinical pharmacology and pharmacogenetics in a genomics era: the DMET platform. *Pharmacogenomics*. 2010 jan;11(1):89-103.
- 8 Cremers S, Schoemaker R, Bredius R, et al. Pharmacokinetics of intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation. *Br J Clin Pharmacol*. 2002 apr;53(4):386-9.
- 9 Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood*. 2008 apr 15;111(8):4106-12.
- 10 Dumauval C, Miao X, Daly TM, et al. Comprehensive assessment of metabolic enzyme and transporter genes using the Affymetrix Targeted Genotyping System. *Pharmacogenomics*. 2007 mrt;8(3):293-305.
- 11 Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 2007 sep;81(3):559-75.
- 12 Singh SP, Zimniak L, Zimniak P. The human hGSTA5 gene encodes an enzymatically active protein. *Biochim Biophys Acta*. 2010 jan;1800(1):16-22.

Staken van inhalatiecorticosteroïden en kennis van hun werking

Ada Stuurman-Bieze

Menckeberg en collega's onderzochten bij nieuwe gebruikers van inhalatiecorticosteroïden die het gebruik niet voortzetten, of zij voldoende kennis hadden van de werking van deze geneesmiddelen en of zij uitleg hadden gekregen hoe ze de inhalator moesten gebruiken.

In 15 apotheken kregen 677 personen een eerste uitgifte van een inhalatiecorticosteroïde. De 287 personen (42%) die het gebruik niet continueerden, werden gebeld door de apotheker om met behulp van een gestructureerde vragenlijst de medicatiekennis te onderzoeken. Uiteindelijk deden 230 gebruikers mee aan het onderzoek. Van hen gaf 79% foute antwoorden. Met name wist bijna de helft niet de ontstekingsremmende werking te benoemen. De meerderheid van de patiënten had instructie gehad hoe te inhaleren: 53% van de huisarts en 35% van een apotheekmedewerker.

Daarnaast werd de voorschrijvende huisartsen gevraagd naar de indicatie en naar de ernst van de luchtwegaandoening van bovengenoemde patiënten. Van de 40 huisartsen wilden 21 meedoen met het onderzoek, die de helft (115) van het aantal geïnterviewde patiënten behandelden. Van deze patiënten had bijna 60% astma en driekwart kende de ontstekingsremmende werking niet. De huisartsen waren van oordeel dat slechts 28 van hun 115 patiënten

de inhalatiecorticosteroïden niet hoefden te continueren en dat 12 patiënten zelfs ernstige klachten hadden.

Er was geen correlatie tussen het kennisniveau van de patiënten en de klachten die zij rapporteerden, het gebruik van luchtwegverwijders, de diagnose astma (gesteld door de arts) of de zorgverlener die de instructie had gegeven.

Omdat patiënten die inhalatiecorticosteroïden wel continueerden, niet werden betrokken in het onderzoek, konden de auteurs niet concluderen dat gebrek aan geneesmiddelkennis de reden was dat patiënten de medicatie staakten. Maar de auteurs trekken wel de conclusie dat zorgverleners bij het starten van inhalatiemedicatie de nadruk leggen op de vaardigheden om te inhaleren en minder op de werking van het geneesmiddel. Bij inhalatiecorticosteroïden zou meer informatie moeten worden gegeven over de werking en de duur van de behandeling.

Menckeberg TT, Hugtenburg JG, Lammers JW, Raaijmakers JA, Bouvy ML. Knowledge of actions of inhaled corticosteroids in patients who did not persist drug treatment early. *Int J Clin Pharm*. 2012 apr;34(2):277-81.

Stuurman-Bieze A. Staken van inhalatiecorticosteroïden en kennis van hun werking. *PW Wetenschappelijk Platform*. 2012;6:e1218