

Symposium

Biotransformatie en polymorfisme: nieuwe ontwikkelingen in de klinische chemie

Farmacogenetica in historisch perspectief

F.A. de WOLFF

Sedert de jaren 60 is bekend dat sommige personen bepaalde geneesmiddelen sneller omzetten dan anderen. Uit deze waarneming is de farmacogenetica ontstaan, die de erfelijk bepaalde individuele verschillen in biotransformatie van xenobiotica beschrijft. Farmacogenetica behoort tot het aandachtsgebied therapeutische geneesmiddelenmonitoring en klinische toxicologie (TDM-CT), en poogt de verschillen in gevoeligheid voor de therapeutische en toxische effecten van lichaamsvreemde stoffen te verklaren. Heden ten dage wordt in de farmacogenetica de nadruk gelegd op genotypering: de in potentie aanwezige individuele metabole capaciteit voor een stof. In het verleden lag de nadruk echter op fenotypering: de resultante van de erfelijke bepaalde en door externe omstandigheden aangepaste metabole capaciteit.

In dit artikel wordt het belang van fenotypering toegelicht aan de hand van twee biotransformatieprocessen: een fase I- en een fase-II- reactie. Hypometabolisme van het anti-epilepticum fenytoïne wordt toegelicht aan de hand van een patiënt die een intoxicatie vertoonde bij een therapeutische dosis fenytoïne. Deze afwijking bleek autosomaal recessief te zijn. Aan de hand van de bepaling van de acetyleringssnelheid bij patiënten behandeld met het anti-flogisticum sulfasalazine wordt aangetoond dat kennis van het acetyleringsfenotype van belang is bij het voorkomen van toxiciteit veroorzaakt door de metaboliet sulfapyridine.

Therapeutische geneesmiddelenmonitoring en klinische toxicologie, in de Angelsaksische literatuur aangeduid met TDM-CT (Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology), is een aandachtsgebied van de klinische chemie dat zijn rol in de geneeskunde de afgelopen decennia duidelijk heeft bewezen. TDM-CT richt zich enerzijds op een optimalisering van de farmacotherapie op basis van concentratiebepalingen van geneesmiddelen en metabolieten daarvan in li-

chaamsvloeistoffen, en anderzijds op laboratoriumdiagnostiek en therapiebegeleiding van intoxicaties. Hoewel beide delen van TDM-CT onlosmakelijk met elkaar zijn verbonden, wordt in deze bijdrage ingegaan op een aspect van dit aandachtsgebied dat vooral tot TDM wordt gerekend: de farmacogenetica. Farmacogenetica verbindt verschillen in genstructuur met verschillen in metabolisme en farmacologisch effect van een geneesmiddel. Tevens poogt de farmacogenetica gevoeligheid voor de toxiciteit van stoffen, zoals carcinogenese, te verklaren op basis van individueel bepaalde verschillen in metabolisme. Farmacogenetica vormt aldus een verbinding tussen de farmacokinetiek, die zich bezighoudt met de effecten van het lichaam op een stof (absorptie, distributie, metabolisme en eliminatie: ADME) en de farmacodynamiek, die de effecten van een lichaamsvreemde stof op (pathologische) processen in het lichaam beschrijft. Een goed overzicht van de farmacogenetica dat speciaal is gericht op een klinisch-chemisch lezerspubliek verscheen eerder dit jaar in de Continuïng Educationreeks van de American Association for Clinical Chemistry (1). Het doel van deze inleidende bijdrage is, een overzicht te geven van algemene begrippen die van belang zijn voor een goed verstaan van ontwikkelingen in de farmacogenetica, en aan te geven hoe farmacogenetica werd bestudeerd voor de introductie van de moderne moleculair-biologische methoden: het historisch perspectief van de farmacogenetica.

Biotransformatie en polymorfisme

Biotransformatie is de term die wordt gebezigd voor het metabolisme van xenobiotica, ofwel lichaamsvreemde stoffen. In de biotransformatie worden twee typen processen onderscheiden: fase I- en fase II-reacties. Fase I-reacties zijn omzettingen waarbij het molecuul zelf een verandering ondergaat. Oxydatieve processen zijn de meest algemene fase I-reacties, maar ook reducties, bijvoorbeeld van een nitro- naar een aminogroep en dealkyleringen zijn fase I-processen. Doorgaans wordt een stof door zo'n omzetting minder lipofiel en dus gemakkelijker met de urine uit te scheiden, maar dat betekent niet altijd dat de stof daardoor minder toxisch wordt. Een stof kan door metabolisme juist toxischer worden: men spreekt dan van metabole activatie. Een voorbeeld daarvan is de omzetting van ethanol in het (toxischer) acetaldehyde onder invloed van alcoholdehydrogenase. Bij

Afdeling Klinische Chemie, -Farmacie en -Toxicologie: Laboratorium voor Toxicologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden en Humane Toxicologie, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam

Correspondentie: Laboratorium voor Toxicologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Postbus 9600, 2300 RC Leiden.
Ingekomen: 25.05.99

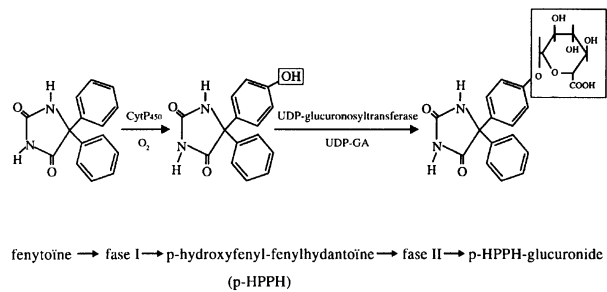
een fase II-reactie wordt een al dan niet in een fase I-proces veranderde stof enzymatisch gekoppeld aan een ander, doorgaans hydrofiel, lichaamseigen molecuul. Voorbeelden daarvan zijn glucuronidering, sulfatering en acetylering. Ook is conjugatie aan het tripeptide glutathion een fase II-reactie; daarbij worden echter na conjugatie de eindstandige aminozuren glutamine en glycine afgesplitst, waarna het overgebleven cysteine wordt geacetyleerd tot N-acetylcysteïne of mercaptuurzuur. Deze metabole route, eigenlijk een dubbeltrapsconjugatie, resulteert dus in de vorming van een mercaptuurzuurconjugaat van een xenobioticum.

Voor een aantal fase I- en fase II-processen is polymorfisme beschreven. Dit houdt in dat er binnen een populatie te onderscheiden groepen bestaan waarin de metabole snelheid duidelijk verschilt. Dit verschil is genetisch bepaald en wijkt daarin af van enzyminductie, waarbij een bepaalde enzymactiviteit toeneemt door een verhoogde genexpressie ten gevolge van het herhaald aanbieden van een substraat. Door enzyminductie verandert het genotype niet maar het fenotype wel. Men spreekt van een genotypisch polymorfisme als een mutatie van een gen in tenminste 1% van een populatie voorkomt; van fenotypisch polymorfisme wordt gesproken als er in 5 - 10% van de populatie een afwijkende enzymactiviteit wordt vastgesteld.

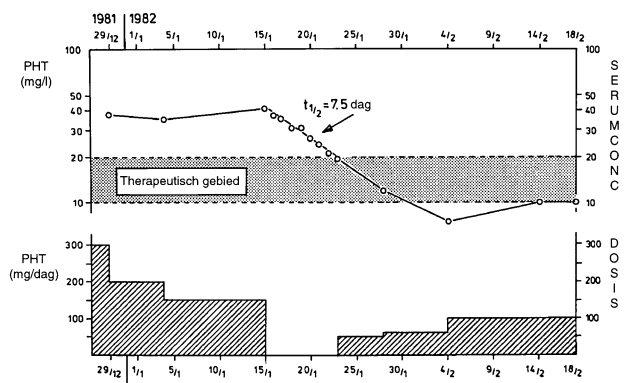
Met behulp van moderne moleculair-biologische methodieken is het mogelijk, de potentiële metabole capaciteit van een patiënt voor een bepaald geneesmiddel te schatten, ofwel te genotyperen; in de publicatie van Van den Bergh et al. zal hier op worden ingegaan. Vóór de introductie van deze moleculair-biologische technieken kon polymorfisme alleen door fenotypering worden bepaald. Dit geschiedt door toediening van een teststof aan de te onderzoeken persoon, waarna, doorgaans in urine, de verhouding wordt bepaald tussen de concentraties van de metaboliet en de onveranderde stof: de metabole ratio.

Men kan zich afvragen wat voor de klinische praktijk de voorkeur verdient: genotypering of fenotypering. Genotypering lijkt de voorkeur te verdienen, onder meer omdat geen teststof behoeft te worden toegediend. Fenotypering heeft echter het voordeel dat de actuele metabole capaciteit van een patiënt voor een middel kan worden vastgesteld, dus inclusief niet-genetisch bepaalde bijdragen als enzyminductie en leverpathologie.

Het is daarom van belang om de historie van de farmacogenetica - gebaseerd op fenotypering - te kennen, om de ervaring daarmee opgedaan niet te verliezen. Daarom worden hierna twee voorbeelden gegeven van farmacogenetisch patiëntenonderzoek, die zijn gebaseerd op fenotypering. Als voorbeeld van fase I-polymorfisme wordt een casus beschreven met een erfelijke vorm van hypometabolisme van het antiëpilepticum fenytoïne. Tenslotte wordt aan de hand van het antiflogisticum sulfasalazine een voorbeeld gegeven van fase II-polymorfisme, en toegelicht dat kennis van de individuele acetyleringscapaciteit van belang kan zijn voor de preventie van sulfonamide-toxiciteit.



Figuur 1. Biotransformatie van fenytoïne (PHT). In een fase I-reactie wordt dit anti-epilepticum door een cytochroom-P450 uit de 2C-subfamilie geoxydeerd tot p-hydroxyfenyl-fenylhydantoïne (p-HPPH), dat in een fase II-proces door UDP-glucuronosyltransferase wordt geconjugueerd tot het glucuronide.



Figuur 2. Relatie tussen de dosis en de serumconcentratie van fenytoïne (PHT) bij de heer F. in het verloop van de tijd. De zeer hoge serumconcentratie bij een gebruikelijke dosis en de lange halfwaardetijd van eliminatie na het staken van de therapie zijn indicatief voor een hypometabolisme.

Fenotypering van fenytoïne-hydroxylering

Fenytoïne (diphenylhydantoin) is een anti-epilepticum dat vooral wordt geoxydeerd tot de para-hydroxymetaboliet door een cytochroom-P450 subtype. Deze metaboliet wordt vervolgens door UDP-glucuronosyltransferase geglucuronideerd (figuur 1). Een probleem bij de toepassing van dit geneesmiddel is, dat de eerste stap verzadigbaar is in het therapeutische gebied. Dat betekent dat er geen lineaire relatie is tussen de dosis en de hoogte van de serumconcentratie ('bloedspiegel'): een kleine dosisverhoging kan leiden tot een sterke spiegelstijging met daarbij passende symptomen van toxiciteit. Daarnaast is het metabolisme induceerbaar door fenytoïne zelf en door andere inducerende stoffen, en kan de omzetting zijn geremd door andere geneesmiddelen. Om deze reden is het gebruikelijk de dosering van dit middel vast te stellen op geleide van de serumconcentratie, die idealiter ligt tussen 10 en 20 mg/l. Doorgaans wordt de therapie bij volwassenen begonnen met 300 mg/dag in 2 of 3 doses, en bijgesteld op basis van de bloedspiegel. Incidenteel komt men in de praktijk desondanks voor verrassingen te staan, zoals de volgende casus aangeeft.

De heer F., een 68-jarige gepensioneerde postbode, ontwikkelde twee maanden na een herseninfarct een focale epilepsie, waarvoor hij 300 mg fenytoïne per

Tabel 1. Testen ter karakterisering van de verminderde fenytoïne para-hydroxylering

Test	Patiënt	Normale gebied
Debrisoquine/4-hydroxy-debrisoquine in urine	0,8	0 - 8 (snelle metaboliseerders) 20 - 25 (langzame metaboliseerders)
Eliminatie -halfwaardetijd van antipyrine in serum (h)	4,2	6 - 16
Antipyrine -metabolieten* in urine (partiële klaring in ml/min)	HMA 7,5 NORA 9,8 OHA 52,7	5 - 13 10 - 16 7 - 17
p-Hydroxyfenyl -fenyldantoïne: fenytoïne verhouding in urine [gem ± SD (n)]	9,2 ± 4.2(5)	33,0 ± 12.8(8)

*Antipyrine-metabolieten: HMA: 3-hydroxymethylantipyrine; NORA: desmethylantipyrine; OHA: 4-hydroxyantipyrine

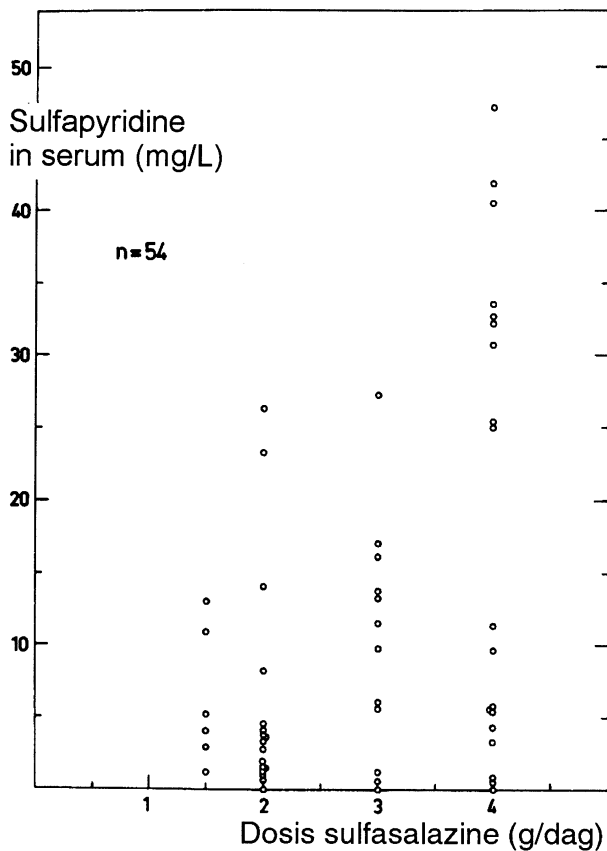
dag kreeg voorgeschreven. Zes dagen na het begin van de therapie kreeg hij moeilijkheden met lopen, en na elf dagen, kort voor de jaarwisseling 1981-1982, werd hij opnieuw opgenomen met ataxie, nystagmus en verminderd bewustzijn. Behalve een verhoogde gamma-GT van 65 U/l - gebruikelijk onder fenytoïne - waren er geen biochemische afwijkingen. De symptomen pasten echter geheel bij een fenytoïne-intoxicatie, bevestigd door de hoge serumconcentratie van 37,4 mg/l. De dosis werd verlaagd tot 200 en later tot 150 mg/dag; niettemin steeg de spiegel door tot 41,3 mg/l (figuur 2). Daarop werd de toediening gestaakt en kon een eliminatie-halfwaardetijd van 180 uur worden bepaald (normaal in de orde van 30 uur). Op een dosis van 100 mg/dag kon de spiegel tenslotte stabiel op 10 mg/l worden gehouden, die voldoende bescherming bleek te bieden tegen epileptische aanvallen.

Omdat een dergelijke reactie op fenytoïne exceptioneel is, poogden wij een verklaring te vinden voor deze fenytoïne-intoxicatie (2). Een accidentele of intentionele overdosis kon worden uitgesloten, evenals een leverfunctiestoornis en enzymremming door comedicatie. De mogelijke verklaring die overbleef, was een genetisch bepaalde of verworven enzymdefect. Deze mogelijkheid hebben wij nader gekarakteriseerd met de ons destijds ter beschikking staande hulpmiddelen. De resultaten daarvan zijn samengevat in tabel 1. Als teststoffen voor fenotypering van xenobiotica-oxydaties werden debrisoquine en antipyrine toegediend. Gemeten werden de metabole ratio van debrisoquine, de antipyrine-halfwaardetijd en de antipyrine-metabolietvorming. De heer F. bleef in tegenstelling tot wat werd verwacht, een snelle metaboliseerder van debrisoquine. De halfwaardetijd van antipyrine was enigszins verkort en de uitscheiding van 4-hydroxyantipyrine sterk verhoogd, hetgeen past bij enzyminductie door fenytoïne. De vorming

van 3-hydroxymethylantipyrine en desmethylantipyrine waren normaal. Bepaling van de verhouding van de concentraties van de metaboliet para-hydroxyfenyl-fenyldantoïne en van fenytoïne in de urine leerde ons dat deze bij de heer F. sterk was verlaagd: gemiddeld 9,2 tegenover gemiddeld 33,0 bij 8 goed op fenytoïne ingestelde patiënten. De conclusie was, dat er bij de heer F. een enzymdefect bestond dat karakteristiek was voor fenytoïne. Dit ondersteunde het destijds postvattende besef dat er meerdere subtypen van het cytochroom-P450 verantwoordelijk waren voor het metabolisme van verschillende xenobiotica. Anno 1999 weten wij dat het een cytochroom is uit de 2C-subfamilie (2C9*3), dat de omzetting van fenytoïne in zijn para-hydroxymetaboliet katalyseert. De vraag of het bij de heer F. geconstateerde enzymdefect verworven of genetisch bepaald is, kon worden onderzocht in een vervolgstudie waarin de metabole capaciteit voor fenytoïne werd bepaald in 3 personen van de eerste, en 22 personen van de tweede generatie van de familie F. Daartoe werd de metabole ratio bepaald van fenytoïne en zijn metaboliet in serum, 6 uur na toediening van een testdosis van 300 mg fenytoïne. Daarmee kon een duidelijk onderscheid worden aangetoond tussen 'snelle' en 'langzame' hydroxyleerders van fenytoïne. Uit dit familie-onderzoek is gebleken dat het betreffende enzymdefect genetisch is bepaald, en autosomaal recessief erfelijk is (3).

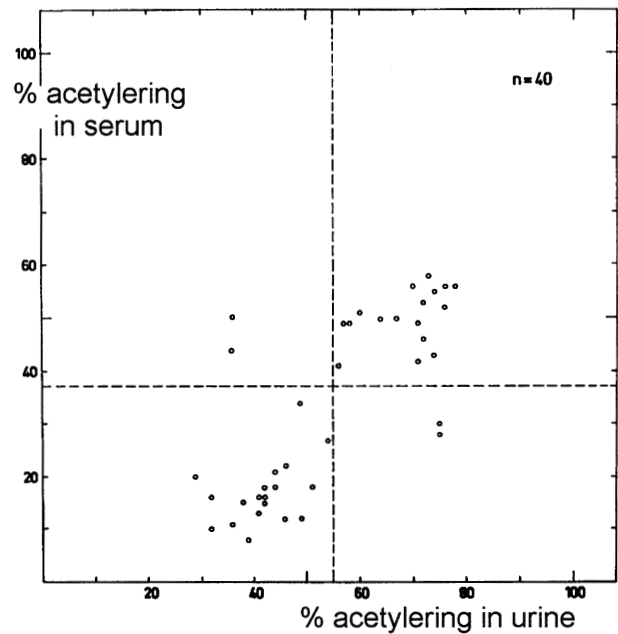
Fenotypering van de acetyleringssnelheid

Al sinds 1960 is bekend dat de snelheid waarmee aminogroepbevattende lichaamsvreemde stoffen geacetylerd worden, genetisch is bepaald (4). Al spoedig bleek dat er twee populaties bestaan: snelle en langzame acetyleerders. Er treedt geen enzyminductie van N-acetyltransferase op, zodat een langzame acetyleerder nooit een snelle kan worden. De acetyleringssnelheid kon eenvoudig worden bepaald door een proefdosis van een sulfonamide, meestal sulfadimidine, te geven om vervolgens de totale en de niet-geacetyleerde fractie sulfonamide in urine te bepalen met behulp van de colorimetrische bepaling van Bratton en Marshall (5,6). De daaruit berekende fractie geacetyleerd/totaal sulfadimidine is de acetyleringssnelheid. Hoewel heden ten dage vooral van chromatografische technieken gebruik wordt gemaakt om de acetyleringssnelheid vast te stellen, zijn de waarnemingen uit vroeger jaren nog steeds geldig. De verhouding snelle/langzame acetyleerder verschilt sterk tussen ethnische groepen (7). Kennis van de acetyleringsstatus van de individuele patiënt is van belang voor de keuze van de dosering van geneesmiddelen die worden geacetyleerd, zoals het tuberculostaticum isoniazide (8). Daarnaast is deze metabole parameter van belang voor preventie van toxiciteit zoals van sulfapyridine, dat gevormd wordt na toediening van het anti-flogisticum sulfasalazine (SASP). Dit middel werd (en wordt soms nog) toegepast bij de behandeling van ontstekingen van de darm, zoals de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa. In de darm wordt SASP gesplitst in 5-aminosalicylzuur en sulfapyridine. Deze laatste stof wordt goed geresorbeerd



Figuur 3. Serumconcentratie van sulfapyridine in relatie tot de dosis sulfasalazine. De grote spreiding suggereert een grote interindividuele variabiliteit in metabolisme.

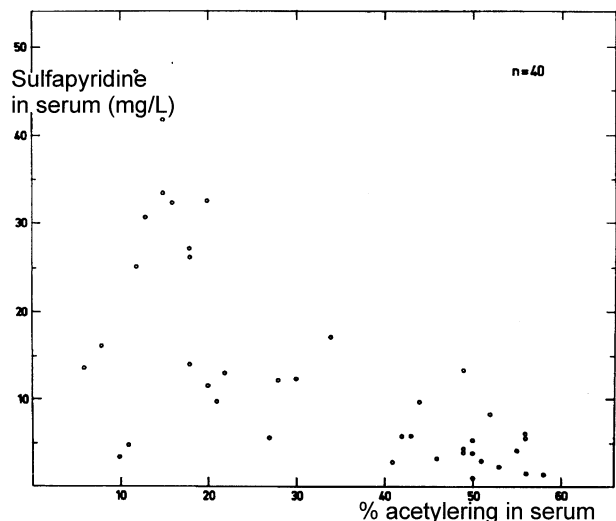
en is verantwoordelijk voor een aantal toxische effecten, zoals neuro- en hepatotoxiciteit, reden waarom tegenwoordig meestal alleen 5-aminosalicylzuur (5-ASA) wordt toegepast. Genoemde toxische effecten treden vooral op bij serumconcentraties van sulfapyridine boven de 20 mg/l. Eind jaren 70 zijn wij nagegaan in hoeverre het acetyleringsfenotype een voorspellende waarde kon hebben ter preventie van de toxische effecten van sulfasalazine. In een willekeurige groep van 54 patiënten, die dagelijks 1,5 tot 4 g SASP gebruikten, bleek de sulfapyridine-concentratie in serum zeer sterk te variëren van niet aantoonbaar tot 50 mg/l; een duidelijke relatie tussen concentratie en dosis ontbrak (figuur 3). Dit houdt in dat de SASP-dosis op zichzelf geen voorspellende waarde voor de toxiciteit van sulfapyridine heeft. Wij zijn daarom nagegaan in hoeverre kennis van de acetyleringssnelheid wél zo'n voorspellende waarde heeft. In 40 patiënten bepaalden wij het percentage acetylering met behulp van de methode volgens Bratton en Marshall, zowel in serum als in urine. Hierbij bleek een duidelijke verdeling in twee populaties te bestaan (figuur 4): de patiënten in het Noordoost-kwadrant zijn snelle, en die in het Zuidwest-kwadrant langzame acetyleerders. Een en ander betekent dat het mogelijk is, patiënten onder SASP-therapie te fenotyperen met het middel dat wordt voorgeschreven, en dat het niet noodzakelijk is tevoren met een proef-dosis sulfadimidine te fenotyperen. Bovendien blijkt dat het mogelijk is, alleen in serum te fenotyperen, wat het verzamelen van urine overbodig maakt.



Figuur 4. Relatie tussen het percentage acetylering in serum, en het percentage in urine. Onderzoek in serum geeft dezelfde informatie als in urine, wat urineverzameling overbodig maakt.

Patiënten met een acetyleringspercentage boven de 40% worden als snelle acetyleerders aangemerkt.

In dezelfde 40 patiënten bepaalden wij de relatie tussen de serumconcentratie van sulfapyridine en de acetyleringssnelheid. Uit figuur 5 blijkt dat van de 19 snelle acetyleerders er geen enkele patiënt een toxische concentratie sulfapyridine bereikte, terwijl 9 van de 21 langzame acetyleerders een potentieel toxische serumconcentratie boven de 20 mg/l had. Uit deze resultaten kon worden afgeleid dat (1) de acetyleringssnelheid is te bepalen van patiënten die een behandeling met SASP ondergaan, en (2) dat langzame acetyleerders een verhoogd risico lopen op toxische verschijnselen van sulfapyridine.



Figuur 5. Serumconcentratie van sulfapyridine in relatie tot de acetyleringssnelheid. Negen van de 21 langzame acetyleerders hebben een concentratie waarbij de kans op toxiciteit groot is. Geen van de snelle acetyleerders heeft een potentieel toxische sulfapyridine-concentratie.

In de loop der jaren is gebleken dat het belang van kennis over het acetyleringsfenotype uitstijgt boven het gebied van bijwerkingen van geneesmiddelen. Zo is bekend dat er onder langzame acetyleerders een hogere incidentie bestaat niet alleen van door geneesmiddelen geïnduceerde lupus, maar ook van idiopathische systemische lupus erythematosus (9). Langzame acetyleerders lopen bovendien een grotere kans dan snelle acetyleerders om blaaskanker te krijgen; snelle acetyleerders hebben echter een verhoogd risico op coloncarcinoom ten opzichte van langzame acetyleerders.

Uit de voorgaande selectie van casuïstiek moge duidelijk zijn dat veertig jaar onderzoek naar het fenotype van xenobiotica-metabolisme een belangrijke bijdrage heeft geleverd aan de kennis over individueel bepaalde toxische reacties op lichaamsvreemde stoffen, en dat deze kennis de farmacotherapie overstijgt. Uit de hiernavolgende bijdragen zal blijken dat genotypering heden ten dage de rol van fenotypering lijkt te hebben ingenomen. Men moet echter niet uit het oog verliezen dat genotypering inzicht verschaft in de potentiële metabole capaciteit van een patiënt, maar dat fenotypering de resultante is van genotypische en externe factoren zoals enzyminductie. Kennis van het fenotype is complementair aan die van het genotype; het is daarom van belang de kennis over fenotypering levend te houden.

Literatuur

1. Linder MW, Valdes R. Pharmacogenetics: fundamentals and applications. *Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology: a professional education resource*. 1999; 20: 9-17.
2. Wolff FA de, Vermeij P, Ferrari MD, Buruma OJS, Breimer DD. Impairment of phenytoin parahydroxylation as a cause of severe intoxication. *Therapeutic Drug Monitoring* 1983; 5: 213 - 215.
3. Vermeij P, Ferrari MD, Buruma OJS, Veenema H, Wolff FA de. Inheritance of poor phenytoin parahydroxylation capacity in a Dutch family. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1988; 44: 588 - 593.

4. Evans DAP, Manley KA, McKuzick VA. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *British Med J* 1960; 2: 482.
5. Evans, DAP. An improved and simplified method of detecting the acetylator phenotype. *J Med Genet* 1969; 6: 405 - 407.
6. Bratton AC, Marshall EK. A new coupling component for sulfanilamide determination. *J Biol Chemistry* 1939; 128: 537 - 550.
7. Lunde PKM, Frislid K, Hansteen V. Disease and acetylation polymorphism. *Clin Pharmacokin* 1977; 2: 182 - 197.
8. Hanson A, Melander A, Wählin-Boll E. Acetylator phenotyping; a comparison of the isoniazid and dapsone test. *Eur J Clin Pharmacol* 1981; 20: 233 - 234.
9. Utrecht JP, Woosley RL. Acetylator phenotype and lupus erythematosus. *Clin Pharmacokin* 1989; 6: 118 - 134.
10. Smith G, Stanley LA, Sim E, Strange RC, Wolf CR. Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility. *Cancer surveys - genetics and cancer: a second look*. Imperial Cancer Research Fund 1995; 25: 27 - 65.

Summary

Pharmacogenetics in a historical perspective. Wolff FA de. Ned Tijdschr Klin Chem 1999; 24: 215-219.

Since the sixties it is known that some individuals metabolise certain drugs more rapidly than others. From this observation the science of pharmacogenetics evolved, in which the genetically determined interindividual differences in the biotransformation of xenobiotics are described. Pharmacogenetics form part of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology (TDM-CT), and aims at elucidating the differences in sensitivity for the therapeutic and toxic effects of drugs. At present, genotyping is being stressed: the potential individual metabolic capacity for a substance. In the past, however, emphasis was laid on phenotyping: the sum total of genetically determined and externally modified metabolic capacity. In this article, the importance of phenotyping is clarified using two examples of biotransformation processes: a phase I- and a phase II-reaction. Hypometabolism of the anticonvulsant phenytoin is shown in a patient who displayed intoxication at a therapeutic dose of phenytoin. This defect was shown to be an inherited, autosomal recessive trait.

The importance of phenotyping of acetylation polymorphism is shown in patients on the antiphlogistic sulfasalazine. Slow acetylators have an increased risk of developing toxicity due to higher levels of the metabolite sulfapyridine, in comparison to fast metabolisers.