

Biomarkers voor de effecten van geneesmiddelen: het UPOD-initiatief

M.J. ten BERG, H. den BREEIJEN¹, T.C.G. EGBERTS¹ en W.W. van SOLINGE

Op het moment dat een nieuw geneesmiddel door de registratieautoriteit wordt toegelaten tot de markt, zijn nog niet alle effecten van het geneesmiddel bekend. Regelmatig blijkt dat een geregistreerd geneesmiddel, nadat het gedurende langere tijd door een groot aantal patiënten in de dagelijkse praktijk is gebruikt, schadelijke, of zelfs zeer ernstige, neveneffecten (bijwerkingen) heeft, welke niet zijn ontdekt in het onderzoek dat voorafging aan het op de markt komen van het geneesmiddel. Verklaringen hiervoor zijn dat in pre-registratie onderzoeken maar een beperkt aantal en bovendien streng geselecteerde patiënten gedurende een beperkte tijdsperiode kan worden bestudeerd. De ontdekking van een aantal ernstige bijwerkingen na toelating van het geneesmiddel tot de markt heeft in de afgelopen decennia geleid tot de ontwikkeling van farmacovigilantie (geneesmiddelenbewaking) en farmacoepidemiologie. Farmacovigilantie is de wetenschap die zich bezighoudt met de detectie, beoordeling en preventie van bijwerkingen van geneesmiddelen nadat deze zijn toegelaten tot de markt (1). Farmacoepidemiologie is de wetenschap die zich bezighoudt met het bestuderen van het gebruik van geneesmiddelen in patiëntenpopulaties, waaronder het bestuderen van het risicomanagement van bijwerkingen van geneesmiddelen (2).

Achtergrond

Een instrument dat in het kader van deze typen onderzoek veel wordt gebruikt is een databank met geautomatiseerde zorggegevens uit verschillende bronnen, welke door middel van record-linkage technieken op patiëntniveau met elkaar zijn gekoppeld (3). De afgelopen jaren zijn binnen een aantal van dit soort databanken ook geautomatiseerde gegevens over laboratoriumuitslagen beschikbaar gekomen. Het koppelen van deze laboratoriumgegevens aan gegevens over medicatieblootstelling creëert nieuwe mogelijkheden voor het verrichten van epidemiologisch onderzoek naar bijwerkingen na het op de markt komen van een geneesmiddel. Een groot aantal bijwerkingen van geneesmiddelen, zoals bloedbeeldafwijkingen, lever- en nierschade en verstoringen van de elektrolytenbalans, is namelijk te detecteren met een laboratoriumtest.

Universitair Medisch Centrum Utrecht, Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie, Utrecht; Apotheek van het UMC Utrecht¹

E-mail: wsolinge@umcutrecht.nl

Utrecht Patient Oriented Database: een data-platform voor klinisch farmacoepidemiologisch onderzoek

Specifiek voor het onderzoeken van bijwerkingen van geneesmiddelen na marktregistratie is de afgelopen jaren vanuit het Laboratorium voor Klinische Chemie en Haematologie (LKCH) en de Apotheek van het UMC Utrecht, in samenwerking met de divisie Farmacoepidemiologie en Klinische Farmacologie van de Bètafaculteit van de Universiteit Utrecht een nieuwe databank gerealiseerd (4). Deze databank, met de naam Utrecht Patient Oriented Database (UPOD), bevat onder meer gegevens over laboratoriumuitslagen, medicatieblootstelling, diagnoses, verrichtingen en demografische patiëntkenmerken van alle patiënten die een medische behandeling hebben ondergaan in het UMC Utrecht. Bijzonder is dat in UPOD naast de aan de aanvrager gerapporteerde laboratoriumuitslagen afkomstig uit het laboratoriuminformatiesysteem ook niet-gerapporteerde achtergrondgegevens over het bloedbeeld aanwezig zijn. Het betreft alle bloedbeeldparameters gemeten met hemocytometrie-analysers (Cell-Dyn Sapphire, Abbott, Santa Clara, USA) die in het UMC Utrecht gebruikt worden, waaronder bijvoorbeeld de lichtverstrooiingsparameters die nodig zijn om leukocyten te differentiëren. Daarbij worden de bestanden met metingen per individuele bloedcel (FCS-files) opgeslagen. Sinds de realisatie in 2005 is UPOD gegroeid tot een databank met gegevens van 303.045 patiënten, waaronder 26 miljoen laboratoriumuitslagen, 1 miljoen monsters met complete bloedbeeldgegevens (van 153.724 patiënten) en 1,5 miljoen medicatieopdrachten (data 31-12-2010).

Onderzoek naar biomarkers voor effecten van geneesmiddelen

De huidige focus van het onderzoek met UPOD ligt op onderzoek naar hematologische bijwerkingen van geneesmiddelen, waaronder anemie, trombocytopenie en agranulocytose. In de afgelopen decennia zijn bloedbeeldafwijkingen regelmatig een reden geweest voor het terugtrekken van een geneesmiddel van de markt of voor het opnemen van een waarschuwing voor de bijwerking op de verpakking en/of in de bijsluiters van het geneesmiddel (5, 6). Een bekend voorbeeld van een dergelijke bijwerking is aplastische anemie veroorzaakt door chloramphenicol. Deze bijwerking is, samen met het thalidomide-drama, een van de redenen geweest dat geneesmiddelenbewakingprogramma's zijn opgezet, zoals dat van het Nederlandse Lareb (2).

Ondanks dat voor vele geneesmiddelen hematologische bijwerkingen zijn gemeld via dit soort programma's of zijn beschreven in de wetenschappelijke literatuur (voor meer dan 300 geneesmiddelen is gerapporteerd dat ze trombocytopenie kunnen veroorzaken), is er nog altijd weinig kennis over de incidentie, de risicofactoren, de onderliggende mechanismen en biomarkers voor deze bijwerkingen (7). Het onderzoek met UPOD heeft tot doel bij te dragen aan deze kennis. Onderzoeksdoelen die hierbij gesteld worden zijn onder andere 1) het identificeren en kwantificeren van associatie tussen blootstelling aan een geneesmiddel en een mogelijke bijwerking op basis van onder andere afwijkende laboratoriumbepalingen; 2) het identificeren van nieuwe biomarkers voor het voorspellen van de individuele reactie van een patiënt op het geneesmiddel (bijwerkingen en therapeutisch effect), voor het vroegtijdig detecteren van bijwerkingen en voor therapietrouw aan de behandeling met geneesmiddelen en 3) het evalueren van het aanbevolen gebruik van biomarkers om het risico op bijwerkingen van geneesmiddelen in de klinische praktijk te managen. Een aantal recente voorbeelden van studies met betrekking tot deze onderwerpen wordt onderstaand besproken.

Identificeren en kwantificeren van bijwerkingen

Van veel cytostatica is bekend dat zij trombocytopenie kunnen veroorzaken, meestal door het veroorzaken van aplasie of hypoplasie van de megakaryocytaire reeks (8). Cytostatica kunnen echter ook trombocytopenie veroorzaken door immuun-gemedieerde mechanismen (8). Ondanks de bekendheid van de bijwerking zijn er weinig data over de frequentie van chemotherapie-geïnduceerde trombocytopenie in patiënten die in de dagelijkse praktijk met cytostatica worden behandeld. In een retrospectieve cohortstudie met data uit UPOD zijn de frequentie en het relatief risico op chemotherapie-geïnduceerde trombocytopenie in volwassen met solide tumoren bestudeerd (9). Voor dit onderzoek werden naast gegevens uit UPOD gegevens van de Kankerregistratie Midden-Nederland gebruikt. In een populatie van 614 patiënten die in de periode 2004-2006 in het UMC Utrecht voor kanker werd behandeld werd in 21,4% graad 1-4 trombocytopenie (trombocytenaantal $<100 \cdot 10^9/l$) waargenomen. De hoogste frequenties werden waargenomen in patiënten die werden behandeld met monotherapie carboplatin (81,8%) en met combinatietherapieën met carboplatin (58,2%), gemcitabine (64,4%) en paclitaxel (59,3%). Daarnaast werd de frequentie van geïsoleerde trombocytopenie, als proxy voor immuun-gemedieerde trombocytopenie bestudeerd. Geïsoleerde trombocytopenie werd waargenomen in 6,2% van de geïncludeerde patiënten, met de hoogste frequentie in patiënten die behandeld werden met combinatietherapie met oxaliplatin (28,6%) of gemcitabine (28,9%). De resultaten van dit onderzoek suggereren dat chemotherapie-geïnduceerde trombocytopenie een relevant probleem is in de klinische praktijk. Vervolgonderzoek moet uitwijzen wat de klinische consequenties van deze bijwerking zijn. De observatie dat oxaliplatin en gemcitabine mogelijk geassocieerd zijn met een verhoogd risico op immuun-gemedieerde trombocytopenie sluit aan bij recente case-reports over

deze bijwerking bij deze cytostatica. Kennis over het onderliggende mechanisme van de trombocytopenie is klinisch relevant omdat in geval van beenmergtoxiciteit een dosisverlaging of uitstel een oplossing kan zijn, terwijl in het geval van immuun-gemedieerde trombocytopenie verdere blootstelling moet worden voorkomen. Voor de kliniek zou een simpele parameter waarmee het onderliggend mechanisme van een geneesmiddel-geïnduceerde trombocytopenie geduid kan worden waardevol zijn. In eerdere studies is gevonden dat met de trombocytenparameters volume (MPV) en volumespreiding (PDW) onderscheid gemaakt kan worden tussen trombocytopenie ten gevolge van verminderde aanmaak in het beenmerg en trombocytopenie ten gevolge van verhoogde afbraak in perifere bloed (10-12). Door de beschikbaarheid in UPOD van het MPV en PDW voor alle patiënten waarvoor in het UMC Utrecht een bloedbeeldbepaling wordt uitgevoerd was het mogelijk om met UPOD te bestuderen of het MPV en PDW potentiële biomarkers zijn voor het onderliggende mechanisme van chemotherapie-geassocieerde trombocytopenie (13). Uit het patiëntencohort van de hierboven beschreven studie werden patiënten geselecteerd waarvoor gegevens over MPV en PDW beschikbaar waren. MPV- en PDW-waarden werden vergeleken tussen patiënten i) met niet-geïsoleerde trombocytopenie (proxy voor beenmergtoxiciteit-gerelateerde trombocytopenie), ii) met geïsoleerde trombocytopenie (proxy voor immuun-gemedieerde trombocytopenie) en iii) zonder trombocytopenie (controlegroep). Het gemiddeld MPV en gemiddeld PDW was significant verschillend tussen patiënten zonder trombocytopenie en beide patiëntgroepen met trombocytopenie. Echter werd geen verschil in gemiddeld MPV en gemiddeld PDW gevonden tussen de patiënten met niet-geïsoleerde trombocytopenie en de patiënten met geïsoleerde trombocytopenie, leidend tot de conclusie dat de gepostuleerde hypothese moet worden verworpen. Bij vervolgonderzoek naar een potentiële biomarker voor chemotherapie-geïnduceerde trombocytopenie zou gekeken kunnen worden naar het aantal 'reticulated platelets' en de fractie 'immature platelets'. Een recent ander voorbeeld van een vergelijkbare studie door onze groep is een cohortstudie waarin het risico op trombocytopenie tijdens behandeling met rituximab (monoklonaal anti-CD20) is onderzocht (cumulatieve incidentie 30%), en waarin bestudeerd is wat het onderliggend mechanisme is (in 67% van de patiënten was een immuun-gemedieerd mechanisme het meest waarschijnlijk) (14).

Nieuwe biomarkers

Een databank als UPOD maakt het mogelijk om op relatief snelle en goedkope wijze onderzoek te doen naar nieuwe biomarkers voor de effecten van geneesmiddelen in patiënten, waarbij een vooraf gedefinieerde hypothese kan worden getoetst, maar waarbij ook voor een data-mining benadering kan worden gekozen. Een voorbeeld van een onderzoek naar een nieuwe biomarker voor het effect van een geneesmiddel is een recent onderzoek naar de associatie tussen FL3-fluorescentie van neutrofiele granulocyten en blootstelling aan het antipsychoticum clozapine (15). In een cross-sectiono-

neel onderzoek met alle volwassen patiënten die in de periode 2007-2010 in het UMC Utrecht waren opgenomen en waarbij een bloedbeeldbepaling is verricht (N=38.141) is bestudeerd of blootstelling aan clozapine verhoging van FL3-fluorescentie van neutrofiële granulocyten geeft. In clozapine gebruikers (n=124) werd een significant hogere gemiddelde FL3-fluorescentie waargenomen dan in niet-gebruikers (91 (SD 11,8) vs. 70 (SD 3,6)). In patiënten die starten met clozapine-therapie werd waargenomen dat de FL3-fluorescentie over een periode van 4 weken opliep tot een maximale plateauwaarde. In patiënten die stopten met clozapine-therapie werd waargenomen dat de FL3-fluorescentie over een periode van 4 weken afnam tot een waarde die normaal is voor een niet-clozapine gebruiker. Deze resultaten suggereren dat FL3-fluorescentie van neutrofiële granulocyten mogelijk een biomarker is voor therapietrouw aan de behandeling met clozapine. Een betrouwbare biomarker voor dit doel is zeer welkom omdat de therapietrouw vaak laag is in patiënten met schizofrenie en omdat de nu gebruikte serumclozapine-spiegel geen goed beeld geeft van langdurige trouwe inname. In prospectief klinisch onderzoek moet worden bestudeerd of FL3-fluorescentie werkelijk een geschikte biomarker voor therapietrouw aan behandeling met clozapine is. Met laboratoriumonderzoek zal nader onderzoek worden gedaan naar de moleculaire oorzaak van verhoogde FL3-fluorescentie in patiënten die clozapine gebruiken.

Evaluatie van het gebruik van biomarkers

De UPOD databank biedt ook de mogelijkheid om het risicomanagement van bekende bijwerkingen in de dagelijkse praktijk te bestuderen. Voor veel geneesmiddelen wordt geadviseerd om nauwgezet laboratoriumparameters te monitoren om bijwerkingen van geneesmiddel tijds te detecteren (16). Wij onderzochten in welke mate in het UMC Utrecht de in richtlijnen aanbevolen monitoring van laboratoriumparameters de detectie van heparine-geïnduceerde trombocytopenie (HIT) wordt opgevolgd (17). Uit UPOD werd een cohort van 6.804 patiënten geselecteerd die minimaal 5 achtereenvolgende dagen met laag-moleculair gewichtsheparine (LMWH) werden behandeld. In deze patiënten werd bestudeerd of het trombocytenaantal werd gemonitord volgens de aanbevolen frequentie. Daarnaast werd bestudeerd of er werd getest op de aanwezigheid van antistoffen tegen complexen van heparine en plaatjes factor 4 (HPF4-Ab) bij patiënten waarbij een voor HIT karakteristieke daling in het trombocytenaantal optrad. De resultaten lieten zien dat slechts in een laag percentage patiënten de aanbevolen monitoring van het trombocytenaantal en het testen op HPF4-Ab werd opgevolgd. Zo werd in slechts in 26,3% van de patiënten behandeld met het LMWH dalteparine de aanbeveling gevolgd. Bij een voor HIT kenmerkende daling in trombocytenaantal werd slechts in 5,4% van de patiënten getest op HPF4-Ab. Vervolgonderzoek moet uitwijzen wat de oorzaken zijn van het onvoldoende volgen van de richtlijnen. In het algemeen kan gesteld worden dat het niet opvolgen van aanbevelingen voor het monitoren van de behandeling met geneesmiddelen voor het optreden van

bijwerkingen, de patiënt blootstelt aan een hoger risico op een slechtere uitkomst van deze bijwerkingen. Vanuit het perspectief van patiëntveiligheid moet vervolgonderzoek zich richten op de vraag op welke wijze het opvolgen van richtlijnen in de dagelijkse praktijk kan worden verbeterd.

Deze studies hebben laten zien dat het UPOD een geschikt instrument is voor het bestuderen van hematologische bijwerkingen van geneesmiddelen. Met de aanhoudende introductie van nieuwe geneesmiddelen met nieuwe werkingsmechanismen blijven databanken als UPOD gewenst. UPOD onderscheidt zich van andere databanken voor epidemiologisch onderzoek door het beschikbaar zijn van gedetailleerde complete hematologische parameters per bloedbeeldbepaling. Dit biedt de hierboven beschreven unieke mogelijkheden voor wetenschappelijk onderzoek. Een ander onderscheidend aspect van UPOD is dat het is ingebed in een laboratoriumorganisatie waar basaal hematologisch onderzoek gedaan wordt. Dit biedt de mogelijkheid om waarnemingen uit epidemiologisch onderzoek met UPOD in het laboratorium verder te onderzoeken, bijvoorbeeld onderzoek naar de aanwezigheid van specifieke antistoffen tegen trombocyten in de behandeling met cytostatica of het bestuderen van de effecten van clozapine op neutrofiële granulocyten in celkweeksystemen. Andersom geldt dat UPOD de mogelijkheid biedt om resultaten van basale laboratoriumexperimenten te toetsen in patiëntendata.

Overig onderzoek

Naast onderzoek naar de biochemisch detecteerbare effecten van geneesmiddelen biedt UPOD ook mogelijkheden voor onderzoek naar nieuwe biomarkers voor ziekte. In dit kader zijn er meer samenwerkingsverbanden met onderzoeksgroepen binnen het UMC Utrecht. Recente studies betreffen onder andere het identificeren van potentiële biomarkers voor de exacerbaties voor Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) (18), het voorspellen van het beloop van de ziekenhuisopname van een traumapatiënt aan de hand van hematologische parameters (19), en het ontwikkelen van een diagnostisch model voor meningitis op basis van klinisch chemische en microbiologische laboratoriumuitslagen en gegevens over medicatieblootstelling (20).

Referenties

1. Edwards IR, Aronson JK. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet* 2000; 356: 1255-1259.
2. Strom BL. What is Pharmacoepidemiology? In: Strom BL, editor. *Pharmacoepidemiology*. 3rd ed. Chichester: John Wiley & Sons, LTD; 2000. p. 4-15.
3. Stricker BH, Psaty BM. Detection, verification, and quantification of adverse drug reactions. *Br Med J*. 2004; 329: 44-47.
4. ten Berg MJ, Huisman A, van den Bemt PM, Schobben AF, Egberts AC, van Solinge WW. Linking laboratory and medication data: new opportunities for pharmacoepidemiological research. *Clin Chem Lab Med*. 2007; 45: 13-19.
5. Fung M, Thornton A, Mybeck K, Hsiao-Hui Wu J, Hornbuckle K, Muniz E. Evaluation of the characteristics of safety withdrawals of prescription drugs from worldwide pharmaceutical markets-1960 to 1999. *Drug Inf J*. 2001; 35: 293-317.

6. ten Berg MJ. General introduction. In: Laboratory markers in drug safety research: studies on drug-induced thrombocytopenia. [Thesis]. Utrecht University. 2009.
7. van den Bemt PM, Meyboom RH, Egberts AC. Drug-induced immune thrombocytopenia. *Drug Saf.* 2004; 27: 1243-1252.
8. Jelic S, Radulovic S. Chemotherapy-associated thrombocytopenia: current and emerging management strategies. *Am J Cancer.* 2006; 5: 371-382.
9. ten Berg MJ, van den Bemt PMLA, Shantakumar S, Bennett D, Voest EE, Huisman A, et al. Thrombocytopenia in adult cancer patients receiving cytotoxic chemotherapy: results from a retrospective hospital-based cohort study. *Drug Safety.* 2011; 34: 1151-1160.
10. Bowles KM, Cooke LJ, Richards EM, Baglin TP. Platelet size has diagnostic predictive value in patients with thrombocytopenia. *Clin Lab Haematol.* 2005; 27: 370-373.
11. Kaito K, Otsubo H, Usui N, Yoshida M, Tanno J, Kurihara E, et al. Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2005; 128: 698-702.
12. Ntaios G, Papadopoulos A, Chatzinikolaou A, Saouli Z, Karalazou P, Kaiafa G, et al. Increased values of mean platelet volume and platelet size deviation width may provide a safe positive diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Haematol.* 2008; 119: 173-177.
13. ten Berg MJ, Huisman A, van den Bemt PM, den Breeijen H, Egberts TC, van Solinge WW. Discriminative value of platelet size indices for the identification of the mechanism of chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Biomarkers.* 2011; 16: 51-57.
14. Giezen TJ, Mantel-Teeuwisse A, ten Berg MJ, Straus SMJM, Leufkens HGW, van Solinge WW, et al. Rituximab-induced thrombocytopenia: a cohort study. In: Risk management of biologicals: a regulatory and clinical perspective. [Thesis]. Utrecht University. 2011.
15. Douma JW, Wilting I, ten Berg MJ, Den Breeijen JH, Huisman A, Egberts ACG, et al. Associatie tussen clozapinegebruik en FL3-fluorescentie: een mogelijke biomarker voor therapie(on)trouw? *Pharm Weekbl* 2012; 147: a1210.
16. Pirmohamed M, Ferner RE. Monitoring drug treatment. *Br Med J.* 2003; 327: 1179-1181
17. ten Berg MJ, van den Bemt PM, Huisman A, Schobben AF, Egberts TC, van Solinge WW. Compliance with platelet count monitoring recommendations and management of possible heparin-induced thrombocytopenia in hospitalized patients receiving low-molecular-weight heparin. *Ann Pharmacother.* 2009; 43: 1405-1412.
18. Velthove KJ, Bracke M, Souverein PC, Schweizer RC, ten Berg MJ, Leufkens HG, et al. Identification of exacerbations in obstructive lung disease through biomarkers. *Biomarkers.* 2009; 14: 523-528.
19. Lam SW, Leenen LP, van Solinge WW, Hietbrink F, Huisman A. Evaluation of hematological parameters on admission for the prediction of 7-day in-hospital mortality in a large trauma cohort. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49: 493-499.
20. van Mourik MS, Groenwold RH, Berkelbach van der Sprenkel JW, van Solinge WW, Troelstra A, Bonten MJ. Automated detection of external ventricular and lumbar drain-related meningitis using laboratory and microbiology results and medication data. *PLoS One* 2011; 6 (8): e22846.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2012; 37: 10-14



Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease

M. DAVIDS and T. TEERLINK

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is an endogenously produced inhibitor of nitric oxide synthase that may impair endothelial function and accelerate atherosclerosis. ADMA is generated during proteolysis of posttranslationally methylated proteins. Especially the liver and kidneys serve as sinks for ADMA, by clearing large amounts of ADMA from the circulation. Failure of one these organs leads to elevated plasma levels of ADMA, which, by impairing the function of other organs, ultimately may lead to multiple organ failure. Prospective studies have shown that ADMA, independent of traditional risk factors, predicts cardiovascular events in high risk patients groups as well as in the general population.

Department of Clinical Chemistry, Metabolic Laboratory, VU University Medical Center, Amsterdam

E-mail: t.teerlink@vumc.nl

Endothelium-derived nitric oxide (NO), which is synthesized from arginine by NO synthase (NOS), is an important regulator of vascular homeostasis. In addition to being a powerful vasodilator, NO inhibits the adhesion of inflammatory cells to the vascular wall, the aggregation of platelets and the proliferation of smooth muscle cells (1). Inactivation and/or reduced synthesis of NO is seen in conjunction with risk factors for cardiovascular disease (CVD) and may promote endothelial dysfunction, hypertension, thrombus formation and atherogenesis (2). Asymmetric dimethylarginine (ADMA), a byproduct of cellular protein turnover, is an endogenous competitive inhibitor of NOS (3). Consequently, elevated ADMA levels may initiate and accelerate atherosclerosis and precipitate cardiovascular events.

In the following sections we describe the metabolism of ADMA, discuss some analytical aspects and review the epidemiological evidence for ADMA as a cardiovascular risk factor.