

**Nederlandse samenvatting
algemene discussie en conclusie**

Het doel van dit proefschrift is het onderzoek van de mogelijke rol van de eiwitpomp P-glycoproteïne (P-gp), dat aanwezig is in de bloed-hersenbarrière (BHB) in depressie en schizofrenie.

Zowel depressie (MDD, Major Depressive Disorder) als schizofrenie zijn ernstige psychiatrische stoornissen, die wereldwijd voorkomen en gekenmerkt worden door een chronisch beloop.

Schizofrenie is vaak een invaliderende ziekte, die gekenmerkt wordt door terugkerende psychotische episodens en afname van cognitieve en sociale vaardigheden. Vaak treedt er verlies van zowel sociale als maatschappelijke rollen. Afwijkingen in de normale ontwikkeling van het zenuwstelsel en ook genetische factoren kunnen een rol spelen in het ontstaan van deze ziekte.

Depressie wordt beschouwd als een heterogene stoornis, waarbij verscheidene biologische afwijkingen een rol kunnen spelen in het symptomencomplex. De 'life time' prevalentie van depressie in Nederland is ongeveer 15%, terwijl de eenjaarsprevalentie in 1998 5.8% was.¹ Volgens een WHO rapport staat depressie qua omvang en leed tegenwoordig wereldwijd op de derde plaats.² Ondanks intensief wetenschappelijk onderzoek sinds de laatste decennia, zijn kennis over het ontstaan en oorzaken van de ziekte grotendeels nog onopgehelderd. Wel is bekend dat genetische factoren en psychotrauma's in de kinderleeftijd een rol kunnen spelen.

Wat betreft de onderliggende ziekteverschijnselen, geldt voor beide stoornissen dat sprake is van ontstekingsreacties in het centrale zenuwstelsel. Stressvolle gebeurtenissen kunnen leiden tot aan stress gerelateerde stoornissen (zoals depressie). Ook bij schizofrenie speelt stress een belangrijke rol. Ten gevolge van stressreacties kunnen allerlei veranderingen optreden in het brein, zoals veranderingen in de plasticiteit van zenuwcellen, afname van nieuwvorming van zenuwweefsel en ontstekingsverschijnselen in het brein.³ Een mogelijke verklaring voor het ontstaan van beide ziekten wordt gevormd door de hypothese dat ontstekingsreacties in het brein ontstaan door schadelijke stoffen die (onder invloed van stress) het brein binnendringen. Deze kunnen vervolgens bijdragen aan het ontstaan van neurodegeneratie (stoornissen waarbij sprake is van verlies of achteruitgang van mentale functies, waartoe zowel depressie als schizofrenie soms worden gerekend). Ophoping van schadelijke stoffen in het brein kan optreden als gevolg van een verminderde functie van de BHB.^{4,5} Een PET-studie (positron emission tomography, dit is functioneel beeldvormend onderzoek) bij mensen met de ziekte van Parkinson ondersteunt deze theorie.⁶ In deze studie vond men een afgenomen pompfunctie van P-gp, een belangrijke pomp in de BHB, die vanuit het hersenweefsel moleculen

terugpompt in de bloedbaan. Deze verminderde pompfunctie was gelokaliseerd in hetzelfde hersengebied gelokaliseerd als de ziekte van Parkinson.

De BHB is aanwezig in de kleinste bloedvatjes van de hersenen (capillairen). Deze capillairen zijn zo gebouwd dat vrijwel geen enkel molecuul doorgelaten wordt. De vaatwandcellen hebben nauwelijks openingen en zitten tegen elkaar aangekit door speciale strengen "tight junctions"). Kleinere moleculen kunnen door diffusie het brein binnenkomen. Mogelijk schadelijke stoffen, zowel lichaamseigen als lichaamsvreemde, worden door naar buiten gerichte pompen (effluxpompen) teruggepompt in de bloedbaan. P-glycoproteïne is de belangrijkste effluxpomp in de BHB. P-gp wordt door het ABCB1-gen gecodeerd. Deze pomp heeft een enorme capaciteit, maar het meest opmerkelijke aan deze pomp is dat het talloze geheel verschillende moleculen kan transporteren.⁷ Een afgenomen (P-gp)pompfunctie, bijvoorbeeld door een farmacologische remmer, kan leiden tot een sterk toegenomen hersenopname van moleculen die door P-gp getransporteerd worden ('substraten').^{8,9}

Wij veronderstelden dat de functie van P-gp veranderd zou zijn bij mensen met een depressie en schizofrenie, mogelijk ten gevolge van de ontstekingsreactie in het brein. In de eerste studie (hoofdstuk 4) werd de functie van P-gp onderzocht in 13 mensen met een depressie. Allen gebruikten een antidepressivum. De groep werd vergeleken met een qua leeftijd en sexe gematchte controlegroep. [¹¹C]-verapamil werd gebruikt als tracer. Het distributievolume (V_T) werd gebruikt als maat voor de activiteit van P-gp. Er werd bloed afgenomen voor genetisch onderzoek. Eventuele genvariatie van drie veel voorkomende polymorfismen (van ABCB1) werden als covariaat van het distributievolume geanalyseerd. Zowel een statische (region-of-interest) als dynamische analyse (voxelwise analysis) werd gedaan, deze laatste met behulp van het programma SPM2 ("statistical parametric mapping"), om de regionale P-gp functie te bepalen. We vonden een significante verlaging van het distributievolume, hetgeen correspondeert met een toegenomen functie van P-gp. Deze bevinding werd gedaan met beide methoden, en was met name gelokaliseerd in de prefrontale schors en temporale kwabben, gebieden die beiden geassocieerd zijn met depressie. We vonden geen relatie met variatie in genotype, hetgeen ook niet te verwachten was in zo'n kleine groep. In een posthoc analyse bleek dat 7 patiënten een therapie resistente depressie (TRD) hadden. Een vergelijking tussen de zo ontstane subgroepen (TRD versus non-TRD) liet geen verschillen zien, maar was formeel ook niet mogelijk omdat de groepen niet gematcht waren. Daarmee kon de mogelijkheid van bias van de resultaten door therapieresistentie niet weerlegd worden. Het was dus mogelijk dat de toegenomen P-gp activiteit gerelateerd was aan therapieresistentie, hetgeen zeer belangwekkend zou zijn, aangezien hiermee een verklaring voor therapieresistente depressie gegeven kon worden: doordat P-gp activiteit toegenomen was, kon het

antidepressivum onvoldoende werkzaam kunnen zijn in de hersenen, omdat het in versterkte mate uitgepompt werd door P-gp. De studie kende verschillende tekortkomingen. In de eerste plaats was geen metabolietanalyse verricht, hetgeen de interpretatie van de resultaten bemoeilijkt. Zonder deze inputfunctie kan niet worden uitgesloten dat de verschillen tussen de groepen veroorzaakt worden door verschillen in metabolisme van de tracer. In *hoofdstuk 4* beargumenteren we waarom we aannemen dat metabolisme geen belangrijke invloed heeft gehad op de activiteit van P-gp. Een andere belangrijke beperking van de studie betrof het gebruik van verschillende antidepressiva en andere farmaca bij de onderzoeksgroep. Van sommige farmaca kon niet worden uitgesloten worden dat ze de P-gp activiteit beïnvloedden. In *hoofdstuk 5* werd hetzelfde protocol gebruikt om de *in vivo* functie van P-gp in schizofrenie te bepalen. Dit is gedaan in 10 patienten en 10 gematchte controlepersonen. De resultaten kwamen in sterke mate overeen met de resultaten van de depressiestudie, al was het resultaat van de dynamische analyse alleen significant wanneer de analyse alleen de gebieden van potentieel belang betrof (“small volume correction”). De resultaten uit beide studies suggereerden dat sprake was van een regionale toename van P-gp activiteit, hetgeen theoretisch zou kunnen passen bij de ziekte, m.a.w. de lokaal verhoogde activiteit van de pomp zou een ziektekenmerk (bijv. een ontstekingsreactie) kunnen zijn. Ook zou de verhoogde activiteit te verklaren kunnen zijn door het gebruik van medicatie. We hadden weliswaar het gebruik van medicatie met een duidelijk remmende werking op P-gp uitgesloten voor deelnemers aan de studie, zowel antidepressiva als antipsychotica blijken echter in celstudies lage tot matige activiteit te hebben voor P-gp. Bovendien blijken sommige middelen ook nog een remmend effect op P-gp te kunnen hebben in zulke celstudies.¹⁰⁻¹³ Het is niet bekend of dit effect ook in de mens zal kunnen optreden, en waarschijnlijk is het effect te verwaarlozen, omdat het remmende effect in deze cellijnen (modellen voor de BHB) pas optrad bij concentraties die ver boven het therapeutische niveau lagen.¹² Toch is het niet geheel uit te sluiten dat medicatie de verschillen in P-gp activiteit veroorzaakte. In een diermodel (muizen) toonden Grauer en Uhr aan dat langdurige toediening van amitriptyline (een antidepressivum met een zwak tot matige affiniteit voor P-gp) geen verschil in concentratie gaf in de hersenen bij muizen zonder P-gp in de hersenen (“knock out” model) ten opzichte van genetisch normale muizen (“wild type”), terwijl de metabolieten van amitriptyline juist in sterke mate waren opgehoopt in de hersenen bij het knock out model.¹⁴

De gevonden effecten op de activiteit van P-gp door zowel medicatie als depressie, stress en psychose (zie *hoofdstuk 4,5, en 8*) kunnen ook beïnvloed zijn door genetische variatie. Alhoewel we in de humane PET studies geen aanwijzingen vonden voor genveranderingen in drie polymorfismen (3435T>C, 2677G>T/A, -129T>C), is daarmee nog geen uitspraak te doen over een relatie tussen de gevonden P-gp veranderingen in

functie en genvariatie, omdat de getoetste sample veel te klein was. De literatuur betreffende de relatie tussen het *ABCB1* gen en fenotype is alles behalve eensluidend. In de *hoofdstukken 6 en 7* presenteren we de resultaten van de NESDA studie (NEtherlands Study on Depression and Anxiety). DE NESDA studie is een groot multicenter cohort onderzoek, dat de lange termijn uitkomsten van depressie (en angststoornissen) onderzoekt, zoals deze stoornissen zich in de algemene populatie voordoen. Op basis van de resultaten, gepresenteerd in *hoofdstuk 4,5 en 8*, namelijk dat sprake is van een verlaagde activiteit van P-gp in depressie, was onze hypothese dat genetische variatie van het *ABCB1* gen geassocieerd zou kunnen zijn met een verhoogde kwetsbaarheid voor het ontstaan van depressie, ofwel het beloop van depressie. Verder waren we geïnteresseerd in de mogelijke relatie tussen *ABCB1* polymorfismen en bijwerkingen op antidepressiva (P-gp substraten). We onderzochten de mogelijke associatie van 6 SNPs (single nucleotide polymorphisms) met mogelijke kwetsbaarheidsfactoren voor depressie. Drie veel voorkomende SNPs en drie polymorfismen, voor welk een relatie was aangetoond met respons op antidepressieve behandeling bij depressie^{25,26} werden geanalyseerd. Data uit meta-analyses hebben laten zien dat familiair voorkomen van depressie met name voorspeld kan worden door het voorkomen van recidiverende depressieve episoden (het voorkomen van meer dan een episode) en een vroeg ontstaan van de ziekte (beginleeftijd voor het 30^e jaar).²⁷ Voor 2 van de onderzochte SNPs (rs2235040 en rs 2032583) vonden we een negatieve associatie met het vroeg ontstaan van depressie, hetgeen impliceert dat een persoon met het recessieve allel van een van deze SNPs beschermd is tegen het vroeg optreden van depressie. Voor 3435CC vonden we een zelfde verband, dat niet significant was na correctie voor het aantal tests. Er werd ook een significant verband gevonden tussen het haplotype 1236T-2677T-3435C en het aantal recidief depressies. De Odds ratio's waren klein (0.735 – 0.785), hetgeen aangeeft dat deze polymorfismen niet bruikbaar zijn als enkele indicator voor het bepalen van kwetsbaarheid in een individu. De gevonden verbanden hebben elk afzonderlijk een kleine invloed op het fenotype. Niettemin is het vinden van dergelijke associaties van groot belang voor het verder in kaart brengen van kwetsbaarheidsfactoren van de depressieve stoornis.

Een andere belangrijke bevinding in de studie met de NESDA, beschreven in *hoofdstuk 7*, was de associatie tussen twee *ABCB1* polymorfismen (rs2235040 en rs2032583) en het optreden (incidentie) en de ernst van bijwerkingen gelateerd aan SSRIs (selectieve serotonine heropnameremmers), die affiniteit hebben voor P-gp. De twee SNPs voorspelden ook significant de ernst van anticholinerge en serotonerge bijwerkingen. De relatieve overrepresentatie van paroxetine (>35%) in de sample kan verklaren waarom een relatie gevonden werd met anticholinerge bijwerkingen. Een verklaringsmechanisme kon ook voorspeld worden in paroxetine (n=110), een SSRI met meer anticholinerge bijwerkingen dan andere SSRI's, hetgeen mede kan verklaren dat juist op dit middel een verband gevonden wordt. Voor venlafaxine, dat minder

anticholinerge werking heeft dan paroxetine, vonden we een significante trend naar een verband tussen anticholinerge bijwerkingen en rs2235040 en rs2032583. Voor citalopram, dat vrijwel geen anticholinerge bijwerkingen heeft, werd geen effect gevonden. Onze resultaten suggereren een verband tussen het optreden en ernst van (anticholinerge) bijwerkingen op SSRI's (indien P-gp substraat) en ABCB1 genpolymorfismen. De vele tegenstrijdige resultaten tot op heden manen tot voorzichtigheid in de interpretatie van onze bevindingen.

In hoofdstuk 8 wordt een dierstudie beschreven, waarin we zoeken naar de verklaring van de resultaten beschreven in *hoofdstuk 4 en 5*. De regionale verhoging van P-gp activiteit zou verklaard kunnen worden door de stoornis (i.e. stress als pathofysiologisch mechanisme) of door het gebruik van medicatie. In verschillende groepen ratten vergeleken we (ten opzichte van een controlegroep) het effect van chronische stress en het effect van langdurig gebruik van het antidepressivum venlafaxine. Met een procedure, waarbij ratten gedurende 3 weken werden blootgesteld aan elektrische schokken, werd een depressie nagebootst. [¹¹C]-verapamil-PET werd gebruikt om de activiteit van P-gp *in vivo* te bepalen. Venlafaxine heeft zwakke tot matige affiniteit voor P-gp^{15,16} en heeft geen modulerende invloed op cyp3A4, het enzym dat grotendeels [¹¹C]-verapamil metaboliseert. Alhoewel het niet mogelijk was in de proefdieren een metabolietafmeting te verrichten, werd in deze studie gecorrigeerd voor het metabolisme door [¹¹C]-verapamil metabolisme data te gebruiken van een andere studie. We hebben hierbij gekeken naar eventuele gevolgen van veranderingen in het metabolisme door de metabolietafmeting te manipuleren. Het bleek dat een iets langzamer of iets sneller metabolisme geen grote veranderingen op de uitkomstmaat (V_T) had, hetgeen het onwaarschijnlijk maakte dat de verschillen tussen de groepen ratten zouden berusten op verschillen in metabolisme. In beide experimenten waren significante verschillen tussen de groepen te zien. In de groep ratten die venlafaxine ontvingen, werd een significante toename van P-gp gezien, terwijl chronische stress juist leidde tot een significante verlaging van P-gp. De verschillen werden gezien op 'whole brain' niveau. De betekenis van deze bevindingen is dat chronische stress (als model voor depressie) leidt tot een verminderde pompfunctie van P-gp, hetgeen ondersteund wordt door de 'cytokine hypothese' in depressie. Hierin wordt depressie gezien als resultante van een ontstekingsreactie in het centrale zenuwstelsel. Ontstekingsbevorderende eiwitten veroorzaken hierbij schade aan de BHB en zorgen voor remming van P-gp.¹⁷⁻¹⁹ In enkele *in vitro* studies zijn aanwijzingen gevonden voor een toename van de P-gp activiteit door chronische stress.^{20,21} Er zijn echter geen *in vivo* studies die deze hypothese kunnen bevestigen. Onze studie is de eerste in dit opzicht, waarin een verband gezien wordt tussen chronische stress en verandering van de P-gp activiteit. Aan de veranderde activiteit in zowel chronische stress en na chronische toediening van venlafaxine kan

respectievelijk een af- of toename van de hoeveelheid P-glycoproteïne ten grondslag liggen, zgn. down- of upregulatie. De studies van Uhr *et al.* en Grauer en Uhr ondersteunen deze gedachte. In twee studies toonden zij aan dat een enkele gift amitriptyline (een P-gp substraat) in muizen leidde tot een significant verlaagde hersenopname in genetisch normale muizen (wild type) ten opzichte van muizen die P-gp misten ('ABCB1a -/- knock out' muizen). Wanneer echter gedurende 10 dagen amitriptyline toegediend werd, werd geen verandering meer gezien tussen beide groepen in de concentratie amitriptyline in de hersenen (zie figuur 10.1).^{14,22}

In *hoofdstuk 9* worden de resultaten van *hoofdstuk 8* verder uitgewerkt. We veronderstelden dat chronische toediening van [¹¹C]-venlafaxine niet zou leiden tot regionale verschillen in distributievolume (V_T) (als maat voor P-gp activiteit, het V_T is omgekeerd evenredig met de P-gp activiteit), maar dat de verschillen alleen globaal zouden zijn, hetgeen inderdaad het geval was: in alle regio's werd een vergelijkbare afname van V_T gevonden. Het V_T was in de hypofyse veel hoger in beide groepen, hetgeen een bevestiging is van de veronderstelling dat de hypofyse 'buiten' de bloed-hersen barrière ligt.²³ Daarnaast was sprake van toegenomen V_T waarden in de gebieden grenzend aan niet-hersenweefsel, dat niet door verlaagde P-gp activiteit verklaard werd, maar als gevolg van 'overstraling' uit deze gebieden gezien werd. Wanneer deze perifere gebieden (i.e. bulbus, frontopolaire kwabben, cerebellum, pons, medulla) niet in de analyse werden meegenomen, waren de distributievolumes vergelijkbaar met de resultaten zoals in *hoofdstuk 8* beschreven.

We onderzochten ook de regionale verdeling van [¹¹C]-venlafaxine in ratten, die blootgesteld waren aan chronische stress en vergeleken dit met de controlegroep. Een regionaal verschil in distributievolume zoals in de depressiestudie werd niet gevonden, er was sprake van een algemene verhoging van V_T (passend bij een verlaging van P-gp functie) en net als bij de venlafaxinestudie werd er verhoogde activiteit gemeten in de perifere gebieden en in de hypofyse, die geen P-gp in haar capillairen heeft. Een vergelijking met de humane (depressie)studie gaat echter op verschillende fronten mank: ten eerste, is het stressexperiment bij ratten een model voor humane depressie, en zodoende nooit geheel vergelijkbaar. In de humane studie werden bovendien slechts 5 gebieden (gerelateerd aan psychopathologie) geselecteerd voor vergelijking, in plaats van de 18 gebieden bij de rat. Als we deze gebieden ook in het rattenexperiment gekozen hadden voor multipale vergelijking, zou sprake zijn van een trend naar significante verhoging van V_T in hippocampus ($p = 0.094$) en cortex ($p = 0.064$). Op basis van deze studie kan daarom niet uitgesloten worden dat sprake is van een regionale veranderingen (verlaging) in P-gp activiteit t.g.v. stress.

Hoofdstuk 9 bevat ook een beschrijving van experimenten met het hersenweefsel van ratten, die na de studie (hoofdstuk 8) getermineerd werden. Het betreft de 'Western

Blot', een techniek, waarbij de hoeveelheid eiwit (in dit geval P-glycoproteïne) bepaald kan worden. Met deze techniek is het mogelijk te onderzoeken of verschil in pompactiviteit berust op een verschil in het aantal pompjes (up- of downregulatie). Een andere nog toe te passen techniek is 'immunohistochemie', die ook regionale verschillen in eiwithoeveelheid kan aantonen. In dit stadium zijn de analyses niet afgerond, en is definitieve bespreking van de resultaten nog voorbarig. Wel kan gezegd worden dat de voorlopige resultaten de resultaten van de PET analyses ondersteunen: de veranderde functie van P-gp gaat samen met een veranderde expressie van het eiwit in het brein.

Concluderende opmerkingen en richting voor verder onderzoek

De bloed-hersen-barrière (BHB) is lange tijd beschouwd als een rigide structuur om het brein, die passage van vele stoffen onmogelijk maakte. Intensief onderzoek in de laatste decennia heeft bijgedragen aan een beter inzicht in de manier waarop het transport van moleculen via de BHB verloopt.

Duidelijk is dat P-glycoproteïne als transporteiwit betrokken is bij het terugwaartse transport (van brein naar bloedbaan) van vele moleculen, die ook bij depressie een rol spelen. In sommige gevallen is niet geheel opgehelderd welke rol P-glycoproteïne speelt bij het transport van een bepaald substraat, zoals bij cortisol bijvoorbeeld. Verder is aangetoond dat de P-gp functie gemoduleerd kan worden door vele factoren, zoals ook factoren die een rol spelen bij psychotische en depressieve stoornissen. Onze resultaten wijzen op een verlaging van P-gp activiteit in de BHB bij blootstelling aan chronische stress in ratten, (als model voor depressie) en toediening van een antidepressivum (een P-gp substraat) doet de functie van P-gp toenemen. Het is niet bekend of zulk een verandering pompfunctie op een of andere manier nadelig is, of dat het consequenties heeft voor de dosis van een antidepressivum. Het is mogelijk dat verlaging van de activiteit van P-gp in de acute fase van de stressreactie, zoals bij de depressieve stoornis, nodig is om passage van pro-inflammatoire eiwitten mogelijk te maken. In de chronische fase of in de herstelfase van een depressieve episode kan de activiteit van P-gp anders zijn. Deze hypothetische functie van P-gp in verschillende fasen van een ziekteproces kan onderzocht worden in nieuwe PET studies, door gebruik te maken van verschillende liganden, die zowel inflammatie als P-gp activiteit in kaart kunnen brengen. Nieuwe strategieën kunnen worden uitgewerkt, zoals het labelen van nieuwe potentiële medicijnen, na toediening van een P-gp remmer, of dubbele PET scans, voor en na toediening van een modulator.

Een andere belangrijke bevinding die in dit proefschrift wordt gepresenteerd, is de relatie tussen het depressiefenotype en het gen dat codeert voor P-gp. Ten eerste bleken ABCB1 polymorfismen geassocieerd te zijn met het optreden en de ernst van bijwerkingen op SSRIs (venlafaxine, citalopram, paroxetine, fluvoxamine), die getransporteerd worden door P-gp. Als deze bevindingen gerepliceerd worden, is het

een stapje vooruit in de richting van de zogenaamde gepersonaliseerde geneeskunde, hetgeen impliceert dat onnodige medicatie trials worden vermeden, en een medicatiekeuze zoveel mogelijk gebaseerd is op het genetische profiel van de patient. Toekomstige doelen in dit opzicht zijn optimalisatie van het voorspelde effect van medicatie voor iedere gebruiker. Ook dienen mogelijke epigenetische veranderingen in het P-gp molecuul bestudeerd te worden.

Ten tweede, drie ABCB1 polymorfismen waren geassocieerd met een lagere kans op een vroeg begin van de depressieve stoornis. Een haplotype was geassocieerd met recidief depressie. Deze bevindingen - mits gerepliceerd - kunnen bijdragen aan blootleggen van het genetisch profiel dat kwetsbaarheid voor depressie beschrijft. Om hier meer inzicht in te krijgen, zijn meer grootschalige studies nodig, die licht kunnen werpen op de relatie tussen het depressiefenotype en ABCB1 en andere genen.