

VU Research Portal

Glucocorticoid sensitivity in multiple sclerosis; what makes the difference?

van Winsen, L.M.L.

2009

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van Winsen, L. M. L. (2009). *Glucocorticoid sensitivity in multiple sclerosis; what makes the difference?* [PhD-Thesis - Research and graduation internal, S.I.]. s.n.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Verschillen in de gevoeligheid voor glucocorticoïden in multiple sclerosis

Glucocorticoïden (GC), waarvan de belangrijkste bij mensen het endogene cortisol is, zijn hormonen die geproduceerd worden door de bijnieren. De productie van GC staat onder controle van de hypofyse-hypothalamus-bijnierschors as (HHB as). Allerlei soorten stressoren hebben een invloed op deze as, en dus op de cortisol productie. GCen zetten uiteenlopende functies in gang door zich te binden aan glucocorticoïd receptoren (GR), die zich op bijna elke cel van het lichaam bevinden. Een van de vele functies waarbij GCen zijn betrokken, is het onderdrukken van ontstekingsreacties, zodat deze niet uit de hand lopen, als ze eenmaal in gang zijn gezet. Bij gezonde personen, maar ook bij patiënten met allerlei chronische ontstekingsziekten, zoals astma, reumatoïde artritis en darmziekten als colitis ulcerosa en de ziekte van Crohn zijn er verschillen gevonden in GC gevoeligheid van bloedcellen/immuuncellen. In dit proefschrift worden verschillende aspecten van GC gevoeligheid bij patiënten met multiple sclerosis (MS) bestudeerd. In het eerste deel van dit proefschrift komen verschillen in gevoeligheid van bloedcellen voor GCen, en 'single nucleotide polymorphisms' (SNP) (kleine veranderingen in een gen) in het gen van de GR, die de GC gevoeligheid beïnvloeden, aan de orde.

Exogene GCen (bijvoorbeeld methylprednisolon) worden op grote schaal gebruikt als behandeling voor chronisch inflammatoire ziekten, zoals MS, vanwege hun anti-ontstekings effecten. Er zijn in de loop van de jaren verschillende meetinstrumenten ontwikkeld om het ziektebeloop bij MS te meten (waarbij het meestal om geleidelijke verslechtering gaat). Minder bekend is in hoeverre deze meetinstrumenten in staat zijn om verbetering aan te tonen. In het tweede deel van dit proefschrift onderzoeken we een aantal van deze meetinstrumenten en hun eigenschappen om veranderingen aan te tonen, na behandeling met hoge dosering intraveneus methylprednisolon (IVMP).

Hoofdstuk 1 geeft algemene informatie gegeven over de ziekte MS. Ik bespreek epidemiologische en genetische factoren, diagnose, en behandelmogelijkheden. Meer specifiek behandel ik exogene en endogene GCen en de regulatie door de HHB as, evenals de verschillende mechanismen die een rol spelen bij de interactie tussen GCen de GR. Dit om een basis te leggen voor meer inzicht in de factoren die van invloed te zijn op de GC gevoeligheid. We concentreren ons vervolgens op de variatie in het gen (veroorzaakt door kleine veranderingen in het gen (SNPs)) van de GR als een van de factoren die GC gevoeligheid beïnvloeden. MS verloopt bij de meeste patiënten relapsing -remitting (RRMS), dit betekent dat perioden van verslechtering (exacerbaties) zich afwisselen met stabiele perioden. Een kleinere groep patiënten heeft een progressief beloop, primair progressief (PPMS), waarbij patiënten geleidelijk achteruit gaan. Een groot deel van de patiënten met relapsing remitting MS, komen op een gegeven moment in de progressieve fase, secundair progressief MS (SPMS).

Hoofdstuk 2 Glucocorticoïd gevoeligheid in MS

Er zijn velerlei aanwijzingen dat er bij patiënten met MS sprake is van een verhoogde activiteit van de HHB as. Ondanks verhoogde cortisol spiegels in het bloed bij een patiënt met MS, is het echter ongebruikelijk dat de daarmee samenhangende klinische verschijnselen worden gevonden. Deze combinatie van gegevens leidt tot de hypothese dat er sprake is van verhoogde HHB as activiteit die samengaat met een verminderde gevoeligheid van bloedcellen in MS patiënten. In **hoofdstuk 2.1** toetsen we deze hypothese. Bij ontstekingen in het lichaam komt o.a. een eiwit vrij, dit heet TNF- α . GC onderdrukken deze productie. Als maat voor GC gevoeligheid werd het onderdrukkende effect van GCen op door lipopolysaccharide (LPS) (een soort bacterie schilletje) gestimuleerde TNF- α productie in een volbloed assay *in vitro* (in een reageerbuisje) bepaald. De bloedcellen van 117 MS patiënten, vooral RRMS patiënten, waren minder gevoelig voor GCen, vergeleken met bloedcellen van de 45 controle personen. Het bleek dat dit onafhankelijk was van eerdere behandeling met exogene GCen, in de vorm van IVMP. Dit laatste werd op twee manieren gemeten; door het aantal kuren dat patiënten in het verleden hadden ondergaan te nemen, en door het tijdsinterval tussen de laatste en huidige kuur te nemen. Het gebruik van interferon β , (IFN β) ging samen met een verminderde gevoeligheid voor GCen. Ook na correctie voor het gebruik van IFN β , bleven bloedcellen van RRMS patiënten minder gevoelig voor GCen. Behandeling met IFN β wordt gestart bij patiënten met een klinisch actief ziektebeloop. Dit actieve ziektebeloop wordt mogelijk veroorzaakt door een versterkte en een als maar doorgaande ontstekingsreactie in het centrale zenuwstelsel. Mogelijk is er een verband tussen deze voortdurende ontstekingsactiviteit en verminderde GC gevoeligheid. Sterker nog, de verminderde onderdrukking van de ontstekingsactiviteit door een verminderde gevoeligheid voor cortisol, zou misschien zelfs de oorzaak hiervan zou kunnen zijn. De bevinding dat bloedcellen van patiënten die met IFN β behandeld worden, minder gevoelig zijn voor GCen, is waarschijnlijk niet toe te schrijven aan een direct effect van IFN β , maar wellicht is deze bevinding een gevolg van selectie bias. Immers, na nadere vergelijking van de ziektekenmerken van de MS patiënten met en zonder IFN β , valt op dat de patiënten die behandeld worden met IFN β , significant vaker IVMP kuren hebben gekregen in het verleden. Dit wijst erop dat deze patiënten inderdaad een verhoogde ontstekingsactiviteit hebben, en dit geeft enige steun aan de laatste hypothese.

Er zijn verschillende factoren die variatie in GC gevoeligheid kunnen beïnvloeden. Eén daarvan is genetische variatie in het gen voor de GR. In **hoofdstuk 2.2** onderzoeken we verschillende SNPs in het GR-gen (N363S, ER22/23EK, en Bcl 1), die samengaan met verminderde danwel verhoogde GC gevoeligheid. De hypothese is dat bloedcellen van dragers van SNPs waarvan beschreven is dat ze samen gaan met een verminderde gevoeligheid voor GC, ook aantoonbaar minder gevoelig zijn in de *in vitro* test zoals in hoofdstuk 2.1 beschreven. Omgekeerd, dat bloedcellen van dragers van een SNP die samengaat met een verhoogd gevoeligheid, ook *in vitro* verhoogd gevoelig zijn voor GC. We onderzochten dit voor zowel MS patiënten als voor controle personen. We vonden bij controle personen een samenhang tussen het hebben van één van de SNPs (de N363S) en een

verminderde GC gevoeligheid *in vitro*. Bij MS patiënten vonden we geen samenhang tussen de verschillende SNPs en de *in vitro* GC gevoeligheid. Hoewel deze studie gebaseerd is op een kleine steekproef, lijkt het erop dat GC gevoeligheid deels beïnvloed wordt door genetische factoren in controle personen. Wanneer het MS patiënten betreft, lijken andere factoren van grotere invloed te zijn. Hierbij kan gedacht worden aan cytokinen, INF β , of andere nog onbekende factoren, die het genetische effect op GC gevoeligheid overstemmen.

Hoofdstuk 3 Klinische implicaties van verschillen in GC gevoeligheid

GC gevoeligheid en klinisch effect na IVMP behandeling

GCen worden op grote schaal ingezet als behandeling van chronische ontstekingsziekten. Er zijn subgroepen gevonden van patiënten met verschillende chronisch ontstekingsziekten, zoals reumatoïde artritis, astma, darmziekten als de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa, die minder gevoelig zijn voor exogene GCen. Hiervoor zijn aanwijzingen gevonden in *in vitro* studies, maar ook in klinische studies, waaruit blijkt dat een deel van de patiënten niet duidelijk verbetert na een behandeling. In hoofdstuk 3.1 gaan we na of MS patiënten die goed reageren op behandeling met IVMP, in de zin van dat ze minder neurologische uitval hebben na de kuur, gevoeliger zijn voor GC zoals gemeten in hoofdstuk 2.1. Bovendien wilden we weten of we het klinische effect van een IVMP kuur konden voorspellen aan de hand van de *in vitro* gevoeligheid van bloedcellen vóór de kuur. We volgden prospectief 27 MS patiënten, die behandeld werden met IVMP, vanwege een exacerbatie (plotselinge verslechtering in het ziektebeloop). De mate van onderdrukking van GC op door *in vitro* LPS gestimuleerde TNF- α productie in volbloed, werd als maat voor GC gevoeligheid gebruikt. Dit werd voor en na de behandeling onderzocht. We waren nieuwsgierig naar de mate waarin *in vitro* als ook *in vivo* GC gevoeligheid voor en na behandeling met IVMP, samenging met het klinische effect. We vonden dat de mate van TNF- α productie na de behandeling, en het *in vitro* onderdrukkende effect voor de behandeling, inderdaad gerelateerd was aan klinische verbetering. De resultaten suggereren dat er patiënten zijn die een verminderde gevoeligheid hebben voor GC. Deze verminderde gevoeligheid kan een rol spelen in het verminderde effect van IVMP. Als deze verminderde gevoeligheid ook het (endogene) cortisol betreft, dan kan dit leiden tot een onvermogen van cortisol om de immuunrespons in toom te houden, waardoor een actiever ziekteproces ontstaat. Zo'n actiever ziekte proces, met meer exacerbaties, geeft dan weer aanleiding om met GC te behandelen. Echter, juist door de verminderde gevoeligheid, zal het effect van de behandeling vervolgens teleurstellend kunnen zijn.

Variatie in het gen voor de glucocorticoïd receptor en ziektebeloop.

Men denkt dat endogene GCen, waarvan cortisol de belangrijkste is, het immuunsysteem zodanig in toom houden dat zij een rol spelen bij het beteugelen van exacerbaties. Bij MS patiënten, kan een levenslang iets verminderde GC gevoeligheid, bijvoorbeeld door een kleine verandering in het gen (SNP) van de GR, leiden tot een alsmaar doorgaande ontstekingsactiviteit. Dat kan vervolgens het beloop van de ziekte ongunstig beïnvloeden. We onderzochten 3 SNP's (N363S, ER22/23EK

en Bcl I C/G) in het gen van de GR, waarvan beschreven is dat ze de gevoeligheid voor GC *in vivo* beïnvloeden. We wilden weten of ze een invloed hadden op het ziektebeloop, en daarnaast of er een samenhang was met een veranderd risico om MS te krijgen. In eerdere studies werd er een samenhang gevonden tussen dragers van het ER22/23EK SNP en hogere cortisol spiegels na de dexamethason (dit is ook een exogeen GC) suppressie test (DST). Dit wijst erop dat mensen die drager zijn van dit SNP relatief resistent zijn voor de effecten van GC. We vonden inderdaad dat patiënten die drager waren van dit SNP, een aggressiever ziektebeloop hadden. Dit bleek uit een verminderde tijdsduur tussen begin van de ziekte en het moment waarop patiënten niet meer zelfstandig konden lopen. Voor een subgroep van patiënten hadden we de beschikking over MRI data. Draggers van het ER22/23EK hadden een grotere toename van (zogenoemde T1) lesies op MRI. Deze MRI bevindingen zouden beschouwd kunnen worden als een maat voor degeneratie (axonale schade). Dit wijst erop dat naast een verhoogde mate van ontstekingsactiviteit, er ook uitgebreidere degeneratieve afwijkingen (zich uitend als axonale schade op de MRI) een rol spelen bij de sneller ziektebeloop. Het is mogelijk dat het hebben van het ER22/23EK SNP, hier een invloed op heeft (hoofdstuk 3.2).

In hoofdstuk 3.3 evalueerden we de in hoofdstuk 3.2 gevonden bevindingen in een grotere patiënten groep. Daarbij keken we ook naar het effect van andere SNP's (9 β -G and Tth/III, naast de eerder onderzochte SNP's Bcl I C/G, ER22/23EK en N363S). We maakten haplotypen, dit zijn kleine stukjes van het gen, waarop de SNP's als kleine vlaggetjes kunnen worden gezien (zie figuur 5 in de introductie). Op deze manier kijken we niet alleen naar de SNPs op zich, maar naar kleine gebieden op het gen tussen de SNP's, waarop nog meer genetische variatie mogelijk kan zijn. Van 646 MS patiënten en 317 controle personen werd bloed afgenomen en werden de haplotypen bepaald. Van de SNPs ER22/23EK en 9 β , is beschreven dat zij samen hangen met een verminderde GC gevoeligheid. We wilden weten of patiënten die drager waren van haplotypen waarin zich één van deze SNP's bevonden, een aggressiever ziektebeloop hadden. Opnieuw namen we de tijdsduur tussen de eerste ziekteverschijnselen en het tijdstip waarop een patiënt niet meer zelfstandig kan lopen, als maat voor ernst van het ziektebeloop. We keken ook of er een relatie was met een verhoogd risico om MS te krijgen en een van deze haplotypen. Hiervoor vonden we geen aanwijzingen. Ook was er geen samenhang tussen de leeftijd waarop de ziekte begon, of het type MS aan het begin, relapsing versus progressief. Het haplotype 6, (met daarop de SNPs Tth/III, ER22/23EK en 9 β -G), hing samen met een agressiever ziektebeloop. Hoewel het effect van de aanwezigheid van dit haplotype op zich klein is, is het niet onwaarschijnlijk dat een levenslange net iets verminderde gevoeligheid voor GCen, zeker binnen een ingewikkeld netwerk van interacties tussen de HHB as en het immuunsysteem, een invloed heeft op het ziektebeloop.

Hoofdstuk 4 Meetinstrumenten om behandelingseffect van IVMP te meten

Het is niet eenvoudig om bij MS patiënten het effect van een behandeling goed te meten. Dit komt omdat de klachten waarmee MS patiënten zich presenteren sterk uiteenlopend zijn, afhankelijk van waar in de hersenen of ruggemerg een nieuwe lesie ontstaat. Daarnaast zijn klachten als

moetheid en problemen met het geheugen niet eenvoudig in een test zijn vast te leggen. Dit maakt het moeilijk om een accurate test te ontwikkelen om veranderingen aan te tonen. Al in 1955 werd door Kurtzke de basis gelegd voor de expanded disability status scale (EDSS). Deze test wordt gebruikt om het behandelingseffect te evalueren of ziekte progressie te meten. Dit is sindsdien de meest gebruikte test in klinische trials. De EDSS is een meetinstrument dat gebaseerd is op de bevindingen tijdens het neurologisch onderzoek, maar ook de loopfunctie speelt een belangrijke rol. De laatste 20 jaar zijn er meer behandelingsmogelijkheden ter beschikking gekomen. Daarnaast kwamen er aanwijzingen dat de EDSS minder gevoelig leek om veranderingen aan te tonen. Tegelijkertijd werd men ook meer bewust van het belang van patiënt-georiënteerde meetinstrumenten. Dit heeft er onder andere toe geleid dat er nieuwe meetinstrumenten werden ontwikkeld. Zij hebben tot doel meer responsief te zijn, dat wil zeggen, beter in staat om een voor de patiënt klinisch relevante veranderingen aan te tonen. In **hoofdstuk 4.1**, hebben we een vanuit de 'dokter'-georiënteerde kwantitatieve test (de MS functional composite) en een patiënt-georiënteerde test (Guys neurological disability scale (GNDS)), vergeleken met de EDSS. We volgden 60 patiënten die behandeld werden met een IVMP kuur vanwege een exacerbatie. Zij werden getraind in de drie domeinen van de MSFC. Dit zijn de Timed 25-foot Walk (T25FW) om de loopfunctie te testen, de 9-Hole Peg (9-HPT) om de arm/hand functie te testen, en de 3" versie van de paced auditory serial addition test (PASAT) om de cognitie te testen. Op de tweede dag van de kuur werden de uitgangswaarden bepaald van de MSFC, EDSS en de GNDS. Na zes tot acht weken, als patiënten terug kwamen voor controle, werden de testen herhaald.

Dit onderzoek liet zien dat de GNDS een hogere sensitiviteit heeft voor het aantonen van verbetering vergeleken met de EDSS en de MSFC. Veranderingen in de GNDS subcategorieën hadden met name betrekking op subjectieve symptomen. Het idee dat GC met name een effect zouden hebben op subjectieve klachten wordt deels gesteund door de gegevens uit dit onderzoek.

Er zijn weinig studies gedaan naar de mogelijkheid van verschillende meetinstrumenten om verbetering aan te tonen. Vaker is de mate waarin deze meetinstrumenten in staat zijn om geleidelijk achteruitgang te detecteren onderzocht (om ziektebeloop te meten). In **hoofdstuk 4.2** onderzochten we voorspellende waarden om een klinisch relevante verandering aan te tonen van twee kwantitatieve testen (onderdelen van de MSFC) de T25FW en de 9-HPT (respectievelijk de loop en armhand functie) en de EDSS. We onderzochten 101 patiënten voor en zes weken na IVMP. Ook onderzochten we de invloed van de mate van handicap, in de vorm van EDSS score, op het moment waarop de uitgangswaarden werden verzameld (baseline), op de responsiviteit (de mate waarin een meetinstrument een verandering in de gezondheidstoestand aantoonde) van de verschillende uitkomstmaten. We vroegen patiënten hun situatie zelf te beoordelen, en gebruikten dit gegeven als een 'gouden standaard' om de andere testen mee te vergelijken.

Een combinatie van de T25FW test en de 9-HPT test bleek de optimale combinatie te zijn om een verbetering, zoals door de patiënt werd ervaren, te voorspellen. In de groep patiënten

met hogere scores van handicap bleken alle testen beter te voorspellen of een patiënt een verbetering ervaren had, dan in de groep met de lagere handicap score.

Uit deze studie bleek, hoewel het om een relatief kleine groep ging, dat de EDSS niet de uitkomst maat van keuze is om verbetering na IVMP, zoals door de patiënt wordt ervaren, aan te tonen. Dit was nog minder het geval in de groep patiënten met weinig handicap bij baseline. Wanneer de de T25FW en de 9-HPT gecombineerd werden, verbeterde de voorspellende waarde om een, door de patiënt ervaren, verbetering aan te tonen, zonder dat het veel af deed aan de specificiteit van deze testcombinatie. We stellen dat het combineren van verschillende meetinstrumenten verder zou moeten worden onderzocht om na te gaan in hoeverre deze combinaties beter in staat zijn om door de patiënt ervaren verbetering te detecteren.

Hoofdstuk 5 Discussie en ideeën voor toekomstig onderzoek

In hoofdstuk 5 worden de belangrijkste conclusies uit dit proefschrift samengevat en geplaatst deze binnen de huidige kennis over de pathogenese van MS. Ook geef ik aanbevelingen voor verder onderzoek. Een van de belangrijkste bevindingen is dat bloedcellen van MS patiënten, en in het bijzonder bloedcellen van RRMS patiënten, minder gevoelig zijn voor GCen vergeleken met bloedcellen van gezonde controle personen. Onze hypothese is dat GC gevoeligheid deels genetisch bepaald wordt, en dat dit daarnaast verandert onder invloed van factoren, zoals ontsteking, behandeling met IFN β en andere vooralsnog onbekende factoren.

De aanwezigheid van het ER22/23EK allel gaat gepaard met een verminderde GC gevoeligheid. Daarnaast is beschreven dat dragers van dit allel een verhoogd HHB as activiteit hebben, mogelijk ten gevolge van een verstoring van de negatieve feedback. Deze combinatie resulteert in een ongunstige situatie voor patiënten met een chronisch ontstekingsziekte, zoals MS. We vonden dat patiënten die drager zijn van het haplotype TthIII1, ER22/23EK, 9 β , een agressiever ziektebeloop hebben. Dit wil zeggen de tijd vanaf de eerste symptomen tot het moment dat patiënten met een hulpmiddel gaan lopen, korter is. Het is interessant om te onderzoeken in hoeverre dit haplotype mede een rol zou kunnen spelen als een prognostische factor, om patiënten te kunnen identificeren die een hoog risico hebben op een agressief beloop.

Ten tweede onderzochten we verschillende meetinstrumenten en hun mogelijkheid om behandel-effecten aan te tonen na een IVMP kuur. We vonden aanwijzingen dat de EDSS minder gevoelig is om een verbetering, vanuit de patiënt gezien, aan te tonen na IVMP. We konden aantonen dat combinaties van meetinstrumenten zoals de T25FW en de 9-HPT, accurater zijn voor het aantonen van klinische verbetering, zoals door de patiënt wordt ervaren, zonder dat dit leidt tot een afname van de specificiteit. Mogelijk leiden combinaties van meetinstrumenten tot nieuwe meetinstrumenten die zowel in staat zijn verbetering na IVMP aan te tonen die voor de patiënt klinisch relevant zijn, als ook veranderingen aan kunnen tonen in het ziektebeloop.