

University of Groningen

Novel treatment strategies for unconjugated hyperbilirubinemia

Cuperus, Frans Jan Christiaan

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2011

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Cuperus, F. J. C. (2011). *Novel treatment strategies for unconjugated hyperbilirubinemia*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

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.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

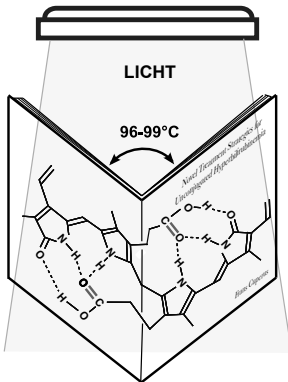
Samenvatting

Bilirubine is een molecuul met paradoxale eigenschappen. In relatief lage concentraties is het een anti-oxidant, maar in hoge concentraties is het zeer toxisch voor onze lichaamscellen. Vooral hersencellen zijn gevoelig voor bilirubine, en bilirubineophoping in ons lichaam kan leiden tot permanente schade in ons brein (zie ook **tekstvak 1**). In dit proefschrift onderzochten wij nieuwe behandelstrategieën om deze schade te voorkomen.

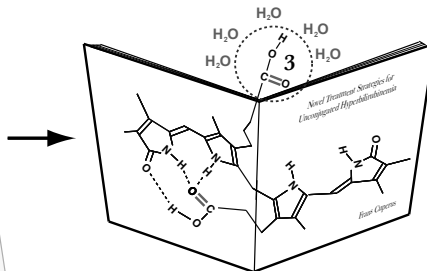
Bilirubine wordt gevormd door de afbraak van rode bloedcellen. Deze afbraak, en dus de productie van bilirubine, is een continu proces. De uitscheiding van bilirubine vindt plaats via de lever, welke bilirubine uit de bloedbaan opneemt en transporteert naar de galwegen. Vanuit de galwegen wordt het molecuul dan uitgescheiden in de darm waarna het ons lichaam verlaat met de ontlasting. De uitscheiding van bilirubine via de galwegen en de ontlasting moet uiteraard net zo groot zijn als de aanmaak van bilirubine uit de rode bloedcellen om te voorkomen dat de bilirubinespiegel stijgt of daalt. Als de balans tussen bilirubine aanmaak en uitscheiding echter wordt verstoord, kan het geelgekleurde molecuul zich ophopen in het bloed (hyperbilirubinemie) en in de weefsels. Dit laatste uit zich in geelzucht: een kenmerkende gele verkleuring van de huid en het oogwit. Ernstige ongeconjugeerde hyperbilirubinemie kan leiden tot hersenschade, omdat het toxische bilirubine zich kan ophopen in ons brein. Deze hersenschade komt vooral voor bij patiënten met de ziekte van Crigler-Najjar en bij sommige pasgeborenen. Patiënten met de ziekte van Crigler-Najjar hebben, door een erfelijk defect, een niet (type I) of nauwelijks (type II) werkzame variant van het leverenzym UDP-glucuronosyltransferase. Dit enzym is essentieel voor de uitscheiding van bilirubine, omdat het bilirubine in de lever koppelt aan twee suikergroepen. Pas na deze koppeling, ook wel conjugatie genoemd, kan bilirubine op een efficiënte manier vanuit de lever in de gal worden uitgescheiden. Omdat de ziekte van Crigler-Najjar berust op een genetisch defect, lijdt deze patiëntengroep aan een levenslange ophoping van ongeconjugerd bilirubine in het bloed (ongeconjugeerde hyperbilirubinemie) en in de weefsels. Ook pasgeborenen ontwikkelen vaak een ongeconjugeerde hyperbilirubinemie, maar deze is slechts in de eerste dagen na de geboorte aanwezig. De oorzaak van deze 'neonatale geelzucht' ligt in een tijdelijk verhoogde afbraak van rode bloedcellen, in combinatie met een nog lage activiteit van het eerder genoemde UDP-glucuronosyltransferase. Meestal is neonatale geelzucht niet ernstig, maar in sommige gevallen is er toch behandeling nodig om hersenschade te voorkomen. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn bij bloedgroep-incompatibiliteit tussen moeder en kind. In dat geval zorgen antistoffen van de moeder voor een massale afbraak

Tekstvak 1.

Bilirubine is een molecuul met twee gezichten. Dit is zowel zichtbaar in haar uitwerking op menselijke cellen (waarover straks meer), als in haar ruimtelijke structuur. Deze structuur lijkt erg op een boek dat half is geopend. Als u dit proefschrift openslaat, in een hoek van 98° , heeft u dan ook een model van het bilirubinemolecuul in uw handen (Figuur 1A). De kanten van het proefschrift vormen de "buitenkant" van het molecuul en bestaan uit de daarop afgebeelde pyrroolringen. Waterstofbruggen tussen de pyrroolringen geven het molecuul haar stabiliteit. Pyrroolringen lossen slecht op in water. Door deze hydrofobe (niet-wateroplosbare) buitenkant moet bilirubine gekoppeld worden aan 2 suikergroepen (glucuronzuren) voordat het uitgescheiden kan worden in de gal. Deze koppeling vindt plaats in de lever onder invloed van het enzym UDP-glucuronosyltransferase. Bij patiënten met de ziekte van Crigler-Najjar werkt dit enzym niet goed, waardoor bilirubine zich in het lichaam ophoopt. Bilirubineophoping kan gevaarlijk zijn omdat bilirubine, nadat het de bloed-hersenbarrière is gepasseerd, soms hersenschade veroorzaakt. Deze schade proberen we te voorkomen met fotherapie. Fotherapie gebruikt lichtenergie om de waterstofbruggen in het molecuul te verbreken. Hierdoor klapt het molecuul (e.g. dit proefschrift) open, en komen de wateroplosbare ("hydrofiële") groepen aan de binnenkant van het molecuul in contact met de omgeving (Figuur 1B). Het nu hydrofiële bilirubine kan dan eenvoudig zonder conjugatie worden uitgescheiden. Het normaal hydrofobe bilirubine kan dus onder invloed van fotherapie omklappen en plots haar hydrofiële "gezicht" tonen. Een ander voorbeeld van de twee gezichten van bilirubine vinden we in haar uitwerking op menselijke cellen. In lage concentraties beschermt bilirubine cellen door haar anti-oxidatieve eigenschappen. Er is bijvoorbeeld beschreven dat mensen met een milde verhoging van de bilirubinespiegel in het bloed minder hart- en vaatziekten hebben. In hoge concentraties, echter, zorgt bilirubine voor celschade en celdood, bijvoorbeeld in de hersenen. Het is deze schade die we in dit proefschrift willen voorkomen.



Figuur 1A



Figuur 1B

van rode bloedcellen, en dus voor een sterk vergrote bilirubine aanmaak, bij de pasgeborene. Ernstige ongeconjugeerde hyperbilirubinemie is gevaarlijk omdat het gepaard kan gaan met hersenschade. Om deze reden moeten Crigler-Najjar patiënten en neonaten met ernstige geelzucht worden behandeld. Deze behandeling bestaat meestal uit fotherapie. Fotherapie gebruikt blauw licht om het bilirubinemolecuul meer wateroplosbaar te maken. Dit wateroplosbare bilirubine kan dan eenvoudig, en zonder conjugatie, door de lever worden uitgescheiden. Fotherapie werd ontdekt door de opmerkzaamheid van een verpleegkundige, die haar afdelingsarts erop wees dat pasgeborenen aan de raamkant van de zaal minder geelzucht leken te hebben. Deze observatie zorgde er uiteindelijk voor dat fotherapie de standaard behandeling werd van ongeconjugeerde hyperbilirubinemie. Sinds de invoering van fotherapie, eind jaren zestig, is het risico op neurologische schade door ongeconjugeerde hyperbilirubinemie enorm afgenomen. Toch kleven er nog altijd nadelen aan deze vorm van behandeling. Crigler-Najjar patiënten moeten, aangezien zij een permanent defect van het UDP-glucuronosyltransferase enzym hebben, levenslang worden behandeld. Dit houdt in dat deze patiënten dagelijks tot 16 uur onder een soort zonnebank moeten liggen, die met (zichtbaar) blauw licht de huid bestraalt. Deze therapie is niet alleen zeer belastend, maar lijkt ook minder effectief te worden naarmate de patiënt ouder wordt. Door dit verlies van effectiviteit ontwikkelt ongeveer 25% van de Crigler-Najjar patiënten uiteindelijk alsnog bilirubine-geïnduceerde hersenschade. Fotherapie lijkt bij neonatale geelzucht minder belastend te zijn; er is immers sprake van een korte behandelperiode. Soms blijven de bilirubinespiegels in het bloed echter fors stijgen ondanks intensieve fotherapie. Om hersenschade te voorkomen wordt er dan vaak voor gekozen om een wisseltransfusie uit te voeren. Bij een wisseltransfusie wordt het bloed van een pasgeborene vervangen door donorbloed met een normaal bilirubinegehalte. Deze vorm van behandeling is echter niet ongevaarlijk, en wordt dan ook het liefst vermeden.

Om bovenstaande redenen besloten wij een alternatieve behandeling te ontwikkelen voor ongeconjugeerde hyperbilirubinemie. In **hoofdstuk 1** en **2** is allereerst een overzicht gemaakt van de reeds bestaande behandelmethoden. Deze behandelingen bleken voornamelijk de bilirubine-uitscheiding via de gal te verhogen. Bilirubine kan het lichaam echter op meer dan één manier verlaten. Als er sprake is van een ernstige ongeconjugeerde hyperbilirubinemie bijvoorbeeld, wordt een groot deel van het in het bloed opgehoopte bilirubine direct getransporteerd naar de darmen. Dit proces heet transmucosale (*i.e.* over het darmslijmvlies) bilirubine excretie en het speelt een zeer grote rol in de bilirubine-uitscheiding van Crigler-Najjar patiënten. Een gedeelte van het transmucosaal uitgescheiden bilirubine wordt echter direct weer opgenomen in het bloed; er is dus sprake van tweerichtingsverkeer over de darmwand. Deze heropname van bilirubine vermindert, uiteraard, de effectiviteit van de

transmucosale excretie. Door nu de heropname van bilirubine te remmen ontstaat er eenrichtingsverkeer waardoor de bilirubinespiegel in het bloed daalt, terwijl de hoeveelheid bilirubine in de darm stijgt. Een logische aanpak om deze heropname te remmen zou een orale behandeling zijn met stoffen die bilirubine binden in de darm. Een “pil voor geelzucht” dus, die door bilirubine te binden in de darm de plasma (ongeconjugeerde) bilirubinespiegels op een veilige en effectieve manier verlaagd.

In **hoofdstuk 3** besloten we te onderzoeken of het galzout ursodeoxycholaat (UDCA) de transmucosale bilirubine-excretie zou kunnen verhogen. Wij kozen voor UDCA omdat dit lichaamseigen galzout makkelijk bindt aan bilirubine, en bovendien al jaren veilig wordt gebruikt voor de behandeling van verschillende leverziekten. Om de invloed van UDCA op de transmucosale bilirubine-excretie te meten was het nodig om radioactief gelabeld bilirubine te gebruiken (^3H -bilirubine). Deze stof kan niet zomaar in mensen worden toegepast en om deze reden besloten we een diermodel te gebruiken, namelijk de Gunn rat. Gunn ratten hebben hetzelfde erfelijke defect als Crigler-Najjar patiënten, en worden gezien als een betrouwbaar model voor ernstige ongeconjugeerde hyperbilirubinemie. Dankzij deze opzet konden wij aantonen dat UDCA de bilirubinespiegel in het bloed verlaagt door haar transmucosale uitscheiding te verhogen. Bovendien verlaagde UDCA niet alleen de bilirubinespiegel van het bloed, maar ook die in de weefsels. Dit laatste is niet onbelangrijk, aangezien juist deze weefselspiegels veel zeggen over het risico op hersenschade.

Nadat we door de resultaten van hoofdstuk 3 overtuigd waren geraakt van het belang van transmucosale bilirubine-excretie, onderzochten we in **hoofdstuk 4** of een versnelling van de darmpassage ook zou kunnen leiden tot lagere bilirubinespiegels in het bloed van Gunn ratten. Dit onderzoek was gebaseerd op de aanname dat een versnelde darmpassage ook de bilirubine uitscheiding met de ontlasting zou bevorderen. Ons onderzoek liet inderdaad zien dat behandeling van Gunn ratten met polyethyleen glycol (een laxerend middel) leidde tot een *versnelde* darmpassage en een *verhoogde* uitscheiding van bilirubine met de ontlasting. Deze verhoogde uitscheiding ging bovendien gepaard met een forse daling van de hoeveelheid bilirubine in het bloed. De toename van bilirubine uitscheiding met de feces hing *niet* samen met een toename van bilirubine uitscheiding via de gal. Dit maakt het zeer waarschijnlijk dat een versnelde darmpassage de transmucosale excretie van bilirubine bevordert, aangezien dit de enige alternatieve manier is waarop bilirubine in de ontlasting kan komen. Mogelijk stimuleert polyethyleen glycol deze excretie door de bilirubineconcentratie in de darm te verlagen. Dit zou zowel de heropname van bilirubine naar de bloedsomloop kunnen verminderen, als het bilirubinetransport van het bloed naar de darm kunnen faciliteren. Door nu andere Gunn ratten met loperamide (een middel tegen diarree) te behandelen, konden we aantonen dat

een *vertraagde* darmpassage leidde tot een *verlaagde* uitscheiding van bilirubine met de feces en een fors hogere bilirubineconcentratie in het bloed. Met behulp van bovenstaande experimenten konden we bovendien bewijzen dat er een lineair verband bestaat tussen de darmpassage tijd en de bilirubinespiegels in het bloed van Gunn ratten. Dit lineaire verband toonde aan dat de uitscheiding van bilirubine direct afhankelijk is van de darmpassagetijd. Deze afhankelijkheid lijkt ook bij patiënten met geelzucht een belangrijke rol te spelen. Eerder onderzoek heeft namelijk aangetoond dat omstandigheden die de darmpassage vertragen, zoals vasten, gepaard gaan met een verhoging van de bilirubinespiegel in het bloed. Om deze reden denken wij dat onze resultaten de mogelijkheid van polyethyleen glycol behandeling bij hyperbilirubinemische patiënten ondersteunen.

In **hoofdstuk 5** onderzochten wij of de snelheid van de darmpassage mogelijk ook een rol speelde in andere behandelingen voor ongeconjugeerde hyperbilirubinemie. Om deze reden bepaalden wij de darmpassagetijd in Gunn ratten die behandeld werden met experimentele orale behandelingen of met fotherapie. De aanleiding voor deze proef lag in eerdere observaties waarin al deze behandelingen geassocieerd leken te zijn met een versnelde darmpassage. Wij toonden echter aan dat geen van de door ons onderzochte behandelingen enig effect had op de snelheid van de darmpassage in Gunn ratten. Hierop besloten wij de onderzochte behandelingen te combineren met polyethyleen glycol. Wij redeneerden dat hun werkingsmechanisme kennelijk niets van doen had met de snelheid van de darmpassage, en dat daarom een versnelling van de passagetijd hun bilirubine-verlagende effect zou kunnen complementeren. Deze proef liet inderdaad een complementair effect zien in ratten die behandeld werden met zowel fotherapie als polyethyleen glycol. Deze combinatie zorgde voor een zeer forse (bijna 70%) daling van de plasma bilirubinespiegels in Gunn ratten. Dit maakt de combinatie van fotherapie en polyethyleen glycol de krachtigste behandeling voor ongeconjugeerde hyperbilirubinemie die ooit in de Gunn rat is beschreven. Onze bevindingen ondersteunen, naast de resultaten van hoofdstuk 4, eens te meer dat polyethyleen glycol een veelbelovend middel lijkt te zijn voor de behandeling van geelzucht.

Het uitgangspunt van ons onderzoek in **hoofdstuk 6** was dat de behandeling van ongeconjugeerde hyperbilirubinemie geen doel op zich hoort te zijn. Een behandeling moet immers in de eerst plaats hersenschade voorkomen, en deze kan ook ontstaan bij relatief lage bilirubinespiegels in het bloed (*e.g.* een milde ongeconjugeerde hyperbilirubinemie). Dit laatste werd duidelijk in de jaren '50, toen een cohort pasgeborenen met slechts een milde ongeconjugeerde hyperbilirubinemie ernstige hersenschade ontwikkelde. Al deze patiëntjes bleken te zijn behandeld met het antibioticum sulfisoxazol. Enige tijd later werd ontdekt dat dit middel de binding tussen bilirubine en albumine in het bloed verstoortde.

Sinds deze observatie hebben vele studies laten zien dat de bilirubinespiegel in het bloed slecht correleert met hersenschade. De reden voor deze slechte correlatie ligt in het feit dat meer dan 99% van het bilirubine in ons bloed gebonden is aan plasma eiwitten (voornamelijk albumine). Deze fractie kan de bloedsomloop hierdoor niet verlaten en zal daarom niet in de hersenen neerslaan. Een zeer klein gedeelte (<1%) van het bilirubine in ons bloed is niet gebonden aan plasma eiwitten en kan de bloed-hersenbarrière wel passeren. Deze vrije, niet-eiwitgebonden fractie (bilirubine_{vrij}) speelt dus een centrale rol in de pathogenese van bilirubine-geïnduceerde hersenschade. In hoofdstuk 6 onderzochten wij daarom of het verlagen van deze fractie, door een injectie met het eiwit albumine, ook daadwekelijk zou leiden tot minder neerslag van bilirubine in de hersenen van Gunn ratten. Dit bleek inderdaad het geval te zijn; Gunn ratten die zowel standaard fotherapie als een albumine-injectie hadden gehad bleken lagere bilirubine_{vrij} spiegels in het bloed en lagere bilirubine spiegels in de hersenen te hebben dan ratten die alleen met fotherapie waren behandeld. Aangezien Gunn ratten een goed model vormen voor de ziekte van Crigler-Najjar, lijkt incidentele behandeling met albumine voor deze patiënten dus aangewezen. Dit zou vooral nuttig kunnen zijn om het gevaar van een plotselinge verergering van de geelzucht, die vaak ontstaat als deze patiënten ziek zijn, te verminderen. Na deze studie besloten we een andere groep Gunn ratten te behandelen met een middel dat rode bloedcellen afbreekt. Deze dieren ontwikkelden een acute hyperbilirubinemie die, net als die bij pasgeborenen, werd veroorzaakt door een toename van de bilirubineproductie uit rode bloedcellen en een verminderde bilirubine uitscheiding door inactief UDP-glucuronosyltransferase. Deze studie liet zien dat de standaardbehandeling voor acute hyperbilirubinemie, namelijk fotherapie, geen significante bescherming bood tegen de neerslag van bilirubine in de hersenen van Gunn ratten. De combinatie van albumine met fotherapie, daarentegen, voorkwam deze neerslag volledig. Zowel in het eerste en in het tweede experiment correleerden de bilirubine_{vrij} concentraties in het bloed uitstekend met de hoeveelheid bilirubine in de hersenen. Bilirubine_{vrij} lijkt dus een goede voorspeller te zijn voor bilirubineaccumulatie in de hersenen. Onze experimenten laten zien dat het loont om niet de ongeconjugeerde hyperbilirubinemie (e.g. de hoeveelheid bilirubine in het bloed), maar de neerslag van bilirubine in de hersenen als uitgangspunt voor behandeling te gebruiken. Aangezien albumine-injecties al veilig worden toegepast in pasgeborenen, lijkt een prospectief gerandomiseerd onderzoek naar de waarde van deze injecties tijdens fotherapie een logische vervolgstap van ons onderzoek.

In **hoofdstuk 7**, tenslotte, houden we de bevindingen van dit proefschrift tegen het licht van de bestaande literatuur. Bovendien bespreken we potentiële klinische en experimentele toepassingen van deze bevindingen.

In dit proefschrift hebben wij verschillende nieuwe behandelstrategieën ontwikkeld voor ongeconjugeerde hyperbilirubinemie. Deze strategieën kunnen wellicht de belasting van de huidige behandelmethoden (*e.g.* fotherapie en wisseltransfusies) voor patiënten verminderen. Bovendien zouden deze nieuwe behandelingen, alleen of in combinatie met fotherapie, de incidentie van bilirubine-geïnduceerde hersenschade verder kunnen terugdringen. De verkregen resultaten kunnen uiteraard dienen als raamwerk voor toekomstig fundamenteel onderzoek, maar rechtvaardigen ook zeker klinische vervolgstudies in Crigler-Najjar patiënten en neonaten.