

Uloga genskog polimorfizma tiopurinmetiltransferaze u optimizaciji terapije azatioprinom u bolesnika s upalnom bolešću crijeva

Bakalović, Paula

Professional thesis / Završni specijalistički

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:372992>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Paula Bakalović

ULOGA GENSKOG POLIMORFIZMA TIOPURINMETILTRANSFERAZE U
OPTIMIZACIJI TERAPIJE AZATIOPRINOM U BOLESNIKA S
UPALNOM BOLEŠĆU CRIJEVA

Specijalistički rad

Zagreb, 2021.

PSS studij: Klinička farmacija

Mentor rada: Nada Božina, prof. dr. sc.

Specijalistički rad obranjen je dana 28. svibnja 2021. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Karmela Barišić
2. izv. prof. dr. sc. Nada Božina
3. izv. prof. dr. sc. Vesna Bačić-Vrca

Rad ima 34 stranice.

Predgovor

Istraživanje je provedeno u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Nadi Božini što mi je omogućila da pod njenim vodstvom izradim ovaj specijalistički rad.

Sažetak

Cilj istraživanja

Važan čimbenik rizika za nastanak nuspojava prilikom liječenja azatioprinom predstavlja polimorfizam gena koji kodira tiopurinmetiltransferazu (TPMT), metabolički enzim odgovoran za ravnotežu između terapijskog i citotoksičnog učinka tiopurina.

Cilj ovog rada je pregledno prikazati stanje u provođenju genotipizacije *TPMT* u hrvatskoj populaciji, odnosno odrediti učestalost varijantnih alela (*TPMT**2,*3A,*3C) odgovornih za smanjenu aktivnost TPMT-a. Također, cilj je prikazati raspodjelu polimorfizama gena *TPMT* po dobi i spolu te raspodjelu zahtjeva za analizom *TPMT* prema razini zdravstvene zaštite (primarna, sekundarna, tercijarna).

Materijal i metode

Istraživanje je provedeno u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Analizirani su rezultati 494 prispjela zahtjeva za rutinsko određivanje genotipa *TPMT* u bolesnika koji boluju od upalnih bolesti crijeva, u 2019. godini.

Podaci dobiveni iz genotipizacije *TPMT* analizirani su retrospektivno. Određivanje genotipa provedeno je iz uzorka krvi od 3 ml u epruveti s Na-EDTA.

Genotipizacija polimorfizama *TPMT**2, *TPMT**3B i *TPMT**3C provedena je TaqMan® metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu za otkrivanje i analizu polimorfizama jednog nukleotida. Određivanje polimorfizama izvedeno je na uređaju za PCR u stvarnom vremenu analizom alelne diskriminacije.

Rezultati

Divlji genotip pronađen je u 93,9 % ispitivanih uzoraka, a udio varijantnih genotipova iznosio je 6,07 %. Najčešće zabilježeni varijantni genotip bio je *TPMT**1/*3A (5,9 %), a u jednog bolesnika nađen je varijantni genotip *TPMT**1/*3C.

Najveći broj bolesnika upućen je na testiranje od strane izabranog doktora primarne zdravstvene zaštite, a prema preporuci specijaliste gastroenterologa. Slijede po učestalosti

zahtjevi iz tercijarnih ustanova - kliničkih bolnica i kliničkih bolničkih centara, te zahtjevi iz općih bolnica odnosno ustanova sekundarne razine zdravstvene zaštite.

Zaključak

Rezultati ovog istraživanja podudaraju se s rezultatima ranije provedenih istraživanja u hrvatskoj populaciji. Učestalost varijantnih genotipova slična je onoj u drugim europskim populacijama.

Genotipizacija *TPMT* je koristan alat za probir bolesnika oboljelih od upalne bolesti crijeva koji imaju povećan rizik od mijelotoksičnosti, prilikom primjene standardnih doza azatioprina. Kod osoba koji su heterozigoti ili homozigoti za mutirani alel zbog čega imaju reduciranu enzimsku aktivnost TPMT-a, potrebno je prilagoditi početnu dozu kao i daljnju titraciju doze.

Abstract

Objectives

An important risk factor for the occurrence of side effects during azathioprine treatment is the polymorphism of the gene encoding thiopurine methyltransferase (TPMT), a metabolic enzyme responsible for the balance between the therapeutic and cytotoxic effects of thiopurine.

The aim of this paper is to present the situation in the implementation of *TPMT* genotyping in the Croatian population, that is to determine the frequency of variant alleles (*TPMT**2, *3A, *3C) responsible for the reduced TPMT activity. Also, the aim is to present the distribution of *TPMT* gene polymorphisms by age and sex and the distribution of requirements for *TPMT* analysis according to the level of health care (primary, secondary, tertiary).

Material and Methods

The research was conducted in the Department of Pharmacogenomics and Individualization of Therapy at the Clinical Institute for Laboratory Diagnostics of the Clinical Hospital Center Zagreb. The results of 494 received requests for routine *TPMT* genotyping in patients with inflammatory bowel disease in 2019 were analyzed.

Data obtained from *TPMT* genotyping were analyzed retrospectively. Genotyping was performed from a 3 ml blood sample in a Na-EDTA tube.

Genotyping of *TPMT**2, *TPMT**3B and *TPMT**3C polymorphisms was performed by the TaqMan® real-time polymerase chain reaction method for detection and analysis of single nucleotide polymorphisms. Determination of polymorphisms was performed on a real-time PCR device by allelic discrimination analysis.

Results

The wild genotype was found in 93,9 % of the examined samples, and 6,07 % were heterozygous and harbored polymorphisms. The most commonly reported variant genotype was *TPMT**1/*3A (5,9 %), and a variant genotype *TPMT**1/*3C was found in one patient.

Most patients were referred for testing by a selected primary care physician, as recommended by a gastroenterologist. This is followed by the frequency of requests from tertiary institutions

- clinical hospitals and clinical hospital centers, and requests from general hospitals and institutions of the secondary level of health care.

Conclusion

The results of this research coincide with the results of previous research conducted in the Croatian population. The frequency of variant genotypes is similar to that in other European populations.

Genotyping TPMT is a useful tool for screening patients with inflammatory bowel disease who have an increased risk of myelotoxicity, when standard doses of azathioprine are administered. In individuals who are heterozygous or homozygous for the mutant allele and therefore have reduced TPMT enzyme activity, the starting dose as well as further dose titration should be adjusted.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. UPALNE BOLESTI CRIJEVA.....	1
1.2. EPIDEMIOLOGIJA.....	1
1.3. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA.....	2
1.4. FENOTIPOVI UPALNIH BOLESTI CRIJEVA.....	5
1.4.1. CROHNOVA BOLEST.....	5
1.4.2. ULCEROZNI KOLITIS.....	6
1.5. LIJEČENJE UPALNIH BOLESTI CRIJEVA.....	6
1.6. AZATIOPRIN.....	8
1.6.1. FARMAKOLOŠKA SVOJSTVA.....	9
1.6.2. UČINKOVITOST TERAPIJE.....	11
1.6.3. SIGURNOST PRIMJENE AZATIOPRINA.....	11
1.6.4. INTERAKCIJE AZATIOPRINA I DRUGIH LIJEKOVA.....	13
1.6.5. PRAĆENJE BOLESNIKA.....	14
1.7. GENSKI POLIMORFIZAM TIOPURINMETILTRANSFERAZE.....	14
1.8. OPTIMIZACIJA TERAPIJE AZATIOPRINOM S OBZIROM NA GENOTIP TPMT.....	18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	22
3. MATERIJALI I METODE	23
4. REZULTATI.....	24
5. RASPRAVA.....	26
6. ZAKLJUČAK	29
7. LITERATURA.....	30
8. ŽIVOTOPIS	35

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. UPALNE BOLESTI CRIJEVA

Upalne bolesti crijeva (UBC) su idiopatske bolesti karakterizirane kroničnom, recidivirajućom, neinfektivnom upalom crijeva, a prema stupnju zahvaćenosti gastrointestinalnog trakta i značajkama upale razlikuju se dva glavna fenotipa - Crohnova bolest (CB) i ulcerozni kolitis (UK). U otprilike 10 % bolesnika u kojih se ne može pouzdano utvrditi o kojem se obliku bolesti radi, postavlja se dijagnoza neklasificirane upalne bolesti crijeva.

Vrhunac pojave UBC-a obično se događa u drugom do četvrtom desetljeću života, ujedno i najproduktivnijem razdoblju života pojedinca. UBC može nepovoljno utjecati na sve aspekte svakodnevnog funkcioniranja bolesnika. Kronični tijek bolesti, česti relapsi, trajna primjena lijekova i moguće komplikacije značajno smanjuju kvalitetu života bolesnika.

Etiologija UBC-a je još uvijek u velikoj mjeri nepoznata, no, pretpostavlja se da je bolest rezultat nekontroliranog imunološkog odgovora na neki okidač kod genetički sklonih pojedinaca. O ulozi okolišnih čimbenika bilo kao pokretača ili uzroka nekontroliranog imunološkog odgovora i dalje se raspravlja.

1.2. EPIDEMIOLOGIJA

Tradicionalno se UBC smatra bolešću zemalja s visokim dohotkom, međutim, posljednjih godina bilježi se promjena u epidemiološkom obrascu, pri čemu incidencija u visokoindustrijaliziranim zemljama ostaje stabilna s velikim opterećenjem i prevalencijom, a prisutan je brzi rast incidencije u manje razvijenim, novoindustrijaliziranim zemljama Južne Amerike, istočne Europe, Azije i Afrike.

S obzirom na ove brze promjene epidemioloških karakteristika, potrebna je globalna procjena kako bi se omogućio uvid u pobol i nove trendove bolesti. Nadalje, definiranje varirajuće incidencije, prevalencije i prognoze UBC-a u različitim geografskim područjima moglo bi

pružiti znanstvenicima tragove o uzroku bolesti te je od presudne važnosti za razvoj učinkovitih strategija prevencije i liječenja ovog kompleksnog medicinskog entiteta (1).

Prema rezultatima populacijskih studija provedenih u područjima visoke incidencije, incidencija Crohnove bolesti kreće se u rasponu od 2,3-9,8 slučajeva na 100 000 stanovnika, dok se incidencija ulceroznog kolitisa kreće u rasponu od 1,5-15,1 na 100 000 stanovnika (2, 3). Također, opaža se gradijent sjever-jug pri čemu je incidencija CB-a na sjeveru Europe 80 % veća u odnosu na incidenciju na jugu, a incidencija UK-a 40 % veća na sjeveru Europe u odnosu na južnoeuropske zemlje (4). Slične geografske varijacije bilježe se i u SAD-u (5).

Prema rezultatima epidemioloških istraživanja, među crnačkim i latinoameričkim stanovništvom incidencija upalnih bolesti crijeva je niža u usporedbi s bijelcima (5, 6).

Zanimljivo, prema rezultatima studija učestalosti upalnih bolesti crijeva u različitim rasnim i etničkim skupinama, prisutna je značajno viša učestalost upalnih bolesti crijeva u Askhenazi Židova u usporedbi s bjelačkom populacijom (7).

Upalne bolesti crijeva pojavljuju se između 15. i 40. godine života. Međutim, smatra se da postoji bimodalna dobna distribucija s vjerojatnim drugim malim vrškom između 50. i 80. godine života (8). Obje bolesti podjednako zahvaćaju oba spola. Prema nekim istraživanjima prisutna je mala razlika u spolnoj incidenciji pri čemu je u žena učestalija pojava CB-a, dok muškarci više oboljevaju od UK-a (9, 10).

1.3. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Etiologija upalnih bolesti crijeva još uvijek je nerazjašnjena, no smatra se multifaktorijskom, tj. ulogu u pojavi bolesti imaju genetičko naslijeđe, neprimjereni imunološki odgovor na endogenu mikrobiotu i okolišni čimbenici. Iako patogeneza bolesti još uvijek nije u potpunosti poznata, pretpostavlja se da specifične genske promjene stvaraju predispoziciju za nastanak abnormalnog imunog odgovora na antigene uobičajene intestinalne flore što dovodi do nastanka bolesti (11).

Prema brojnim studijama animalnih i ljudskih modela, genetičko naslijeđe predstavlja čimbenik rizika za razvoj UBC-a (12). Klinički dokaz nasljednog rizika UBC-a pokazan je u studijama blizanaca, te je uočena puno jača genetička predispozicija u CB-u nego u UK-u.

Naime, prema studiji koja je koristila švedski registar blizanaca stopa podudarnosti u jednojajčanih blizanaca iznosila je 6,3 % za UK i čak 58,3 % za CB (13). Danska studija koja je uključila podatke o gotovo 30 000 blizanaca, također je pokazala znatno veću stopu podudarnosti u jednojajčanih blizanaca za CB (58,3 %), u usporedbi s UK-om (18,2 %), dok je u dvojajčanih blizanaca stopa podudarnosti iznosila 0 i 4,5 % (14).

Rizik razvoja bolesti je 3-20 puta veći kod srodnika prve linije bolesnika s UBC-om. Djeca čija oba roditelja boluju od UBC-a imaju do 33 % šanse razvoja UBC-a do 28. godine života. Imati brata ili sestru koji boluju od CB-a znači povećanje rizika nastanka CB-a 30 puta u odnosu na opću populaciju.

Značajan napredak u genetici UBC-a iz temelja je unaprijedio razumijevanje patogeneze bolesti. Analiza genoma oboljelih od UBC-a te cjelogenomske studije povezanosti (engl. *genome-wide association studies, GWAS*), otkrili su više od 100 genskih lokusa koji pokazuju značajnu povezanost s UBC-om te se smatra da fenotipu UBC-a doprinosi zajednički učinak više lokusa, a ne samo jedna genska promjena kao što je to pokazano u miševa.

Iako ti lokusi čine samo 20 % procijenjenog genetičkog rizika za UBC, oni ukazuju na specifične putove s implikacijama na crijevnu homeostazu (15).

Istraživanja na animalnim modelima su pokazala da je UK relativno nespecifičnog fenotipa koji može biti rezultat promjena u različitim genima. Te promjene u genima koji utječu na urođeni i stečeni odgovor imunološkog sustava, kao i u genima koji utječu na funkciju epitela, mogu dovesti od intestinalne upale. Međutim, u genetički promijenjenim miševima držanim u sterilnom okolišu, zabilježena je odsutnost upale što ukazuje da iako geni donose veću sklonost bolesti, pojava bolesti je ovisna i o prisutnosti mikroorganizama.

Kod Crohnove bolesti identificiran je gen *IBDI* na kromosomu 16 koji kodira protein NOD2 (engl. *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2, CARD15*). Mutacije u genu *IBDI* onemogućuju aktivaciju staničnog faktora kappa B putem proteina NOD2, što blokira prirodni imunološki odgovor na mikrobne produkte u citoplazmi.

Osim toga, nekoliko gena povezanih s CB-om (*ATGL16L1, IRGM, LRRK*) regulira put autofagije, prirodni homeostatski proces koji omogućava recikliranje intracelularnih organela te sudjeluje u odstranjivanju intracelularnih mikroorganizama (16).

Povećan rizik razvoja UBC-a predstavljaju i mutacije u genima koji reguliraju stečenu imunost te genima uključenim u IL-17 i IL-23 receptorski put, poput *IL23R*, *IL12B*, *STAT3*, *JAK2* i *TYK2*, te genima uključenim samo u CB-u poput *IL27*, *TNFSF15*. Neki od tih gena preklapaju se s IL-10 regulatornim putem koji je također neovisno povezan s UK-om i CB-om. Brojni su geni epitelne barijere specifično povezani s ulceroznim kolitisom, ali ne i Crohnovom bolesti (npr. *OCTN2*, *ECM1*, *CDH1*) (16).

Brojna istraživanja proučavala su utjecaj različitih čimbenika okoliša na pojavu i tijek upalnih bolesti crijeva. Oni uključuju pušenje, način ishrane, tjelesnu aktivnost, debljinu, infekcije, dojenje, uporabu antibiotika i drugih lijekova te apendektomiju.

Na temelju dosadašnjih istraživanja, najznačajniji čimbenik okoliša za razvoj upalnih bolesti crijeva jest pušenje koje, zanimljivo, ima različit učinak na CB, odnosno UK. Pušenje se smatra faktorom rizika za pojavu CB-a, dok za UK to ne vrijedi. Naprotiv, ima zaštitno djelovanje na razvoj UK-a, a prestanak pušenja kod bolesnika s UK-om može negativno utjecati na tijek bolesti (16).

Povezanost hrane i upalnih bolesti crijeva predmet je brojnih istraživanja. Veliki broj namirnica i prehrambenih tvari smatra se potencijanim čimbenikom rizika za razvoj bolesti. Pretpostavlja se da antigeni iz hrane pokreću imunološki odgovor, što rezultira razvojem upale. Ipak, do sad nisu identificirani specifični patogeni antigeni. Sve je više podataka koji upućuju na povezanost „zapadnjačkog“ stila prehrane s velikim udjelom procesirane, pržene i slatke hrane, s malo vlakana i prekomjernim unosom omega-6 masnih kiselina i povišenog rizika za razvoj CB-a te moguće i UK-a. Preosjetljivost na proteine kravljeg mlijeka u djetinjstvu također se smatra mogućim uzrokom UBC-a, posebice UK-a. Unos rafiniranog šećera povezan je s razvojem UBC-a, posebice CB-a. Povećan unos totalnih masnoća, životinjskih masnoća, polinezasićenih masnih kiselina i proteina mlijeka povezan je s povećanom incidencijom UK-a i CB-a te relapsom kod bolesnika s UK-om. Suprotno, prehrana koja uključuje veći unos omega-3 masnih kiselina te dugotrajno uzimanje dijetalnih vlakana, poglavito iz voća, povezana je sa smanjenjem rizikom od razvoja CB-a, što međutim nije potvrđeno i za UK (16).

Tjelesna aktivnost povezana je sa smanjenim rizikom nastanka UBC-a te prema nekim studijama, s redukcijom aktivnosti bolesti kod bolesnika s CB-om. Nije potvrđeno da je debljina povezana s povećanim rizikom razvoja UBC-a, ali je uočeno da bolesnici

prekomjerne tjelesne mase imaju veću šansu razviti aktivnu bolest i zahtijevati hospitalizaciju (16).

Što se tiče ranog života, povezanost između dojenja i razvoja UBC-a nije višestruko potvrđena, iako postoje podaci koji upućuju na protektivnu ulogu dojenja. Također, prema nekim podacima, rizik pojave bolesti je veći kod djece koja su dojena kraće, u usporedbi s djecom koja su dojena duži vremenski period. Nekoliko studija potvrdilo je povezanost povećane incidencije dijareje tijekom ranog djetinjstva i pojave UK-a u kasnijoj dobi (16).

1.4. FENOTIPOVI UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

1.4.1. CROHNOVA BOLEST

Crohnova bolest je fenotip kronične upalne bolesti crijeva koji može zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava, od usta do anusa. Crohnovu bolest karakterizira diskontinuirana upala s tzv. preskačućim (engl. *skip*) lezijama, između kojih se nalazi normalna sluznica. Najčešće se javlja u terminalnom ileumu, a potom u kolonu. 30-40 % bolesnika s Crohnovom bolešću ima samo bolest tankog crijeva, u 40-55 % bolesnika zahvaćeno je i tanko i debelo crijevo, dok 15-25 % ima upalne promjene samo u debelom crijevu (17). Zahvaća sve slojeve stijenke crijeva. Javljaju se strikture, fistule i apscesi. Histološki se nalaze granulomi (nakupine divovskih stanica). U kasnoj fazi bolesti sluznica postaje kaldrmast (duboke ulceracije oko normalne sluznice).

Klinička slika ovisi o tome koji je dio sluznice probavnog sustava zahvaćen upalom, no često se prezentira bolovima u abdomenu, vrućicom, proljevastim stolicama uz prisustvo sluzi i/ili krvi, te gubitkom na tjelesnoj težini i/ili gubitkom apetita. Dio bolesnika javlja se sa slikom perianalne bolesti, koju čine fisure ili fistule, a koje su nekad i inicijalna smetnja.

Potencijalne komplikacije Crohnove bolesti su brojne. Crijevne komplikacije uključuju tešku, životno ugrožavajuću upalu kolona, perforaciju tankog crijeva ili kolona, teško akutno krvarenje, fistule i perianalne apscese, povećanu incidenciju kolelitijaze i nefrolitijaze zbog malapsorpcije žučnih soli i masti te karcinom. Moguća je pojava i ekstraintestinalnih manifestacija bolesti.

1.4.2. ULCEROZNI KOLITIS

Ulcerozni kolitis predstavlja najčešći oblik upalne bolesti crijeva koja zahvaća rektum uz širenje bolesti prema proksimalnim dijelovima kolona, pri čemu može biti zahvaćen dio kolona ili cijeli kolon (pankolitis). U otprilike polovice bolesnika bolest je ograničena na rektum i rektosigmoidni kolon, 30-40 % ima proširenje bolesti iznad sigmoidnog kolona, dok je u 20 % bolesnika zahvaćen cijeli kolon (17).

Ulcerozni kolitis se češće pojavljuje u obiteljima u kojima ima oboljelih od UBC-a. Javlja se u oba jednojajčana blizanaca u 10 % te kod oba od nejednojajčanih blizanaca u 3 %. Učestalija je pojavnost u određenih etničkih skupina.

Bolest je karakterizirana ulceracijama sluznice kolona. Za razliku od diskontinuirane upale u bolesnika s Crohnovom bolesti, u ulceroznom kolitisu prisutna je kontinuirana upala od rektuma prema proksimalnom dijelu kolona. Bolest ima postepen početak pri čemu se bilježi gubitak na tjelesnoj težini. Vodeći simptom aktivne bolesti su proljevaste stolice pomiješane s krvi, a u kliničkoj slici prisutni su i tenezmi, pasaža sluzi te abdominalni bolovi koji mogu biti blage do vrlo jake grčevite prirode.

Ulcerozni kolitis je sustavna bolest koja zahvaća mnoge dijelove tijela osim kolona. Ekstraintestinalne manifestacije uključuju iritis, episkleritis, aftozne ulkuse jezika, usni, nepca i ždrijela, artritis, ankilozantni spondilitis, nodozni eritem, duboku vensku trombozu, plućnu emboliju, autoimunu hemolitičku anemiju, batičaste prste. Kirurško odstranjenje kolona dovodi do izlječenja, uključujući i nestanak ekstraintestinalnih manifestacija bolesti.

1.5. LIJEČENJE UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Ciljevi liječenja bolesnika s upalnim bolestima crijeva su osim smanjenja aktivnosti bolesti i simptoma te postizanja i održanja remisije, također i prevencija komplikacija, smanjenje potrebe za kirurškim liječenjem, poboljšanje nutritivnog statusa i poboljšanje kvalitete života. S obzirom da se liječenje dvaju glavnih entiteta – UK-a i CB-a provodi na različite načine, temelj uspješnog liječenja je postavljanje točne dijagnoze, odnosno definiranje fenotipa

bolesti. Odabir liječenja ovisi o lokalizaciji i aktivnosti bolesti te komorbiditetima. Također, liječenje ovisi o ranijem odgovoru na terapiju.

Liječenje može biti medikamentozno i kirurško, pri čemu se kirurško liječenje provodi kada bolest više nije moguće kontrolirati lijekovima ili je nastupila neka od akutnih ili kroničnih komplikacija bolesti koja zahtijeva kirurški pristup. Kada je riječ o medikamentoznom liječenju, valja voditi računa o mehanizmima djelovanja lijekova te potencijalnim toksičnim učincima istih.

U liječenju upalnih bolesti crijeva koriste se različite skupine lijekova: protuupalni lijekovi (5-aminosalicilati, kortikosteroidi), imunomodulatori (azatioprin, 6-merkaptopurin, metotreksat), anti-TNF lijekovi (monoklonska protutijela - infliksimab, adalimumab), antibiotici, antidijaroici i laksativi, spazmolitici te suportivna terapija koja uključuje suplemente i pripravke enteralne prehrane.

Godinama je osnovni cilj terapije bila kontrola simptoma i postizanje kliničke remisije primjenom tzv. "step-up" pristupa, prema kojem se najmanje toksična terapija koristila u ranoj fazi bolesti, a odluka o uvođenju sljedećeg lijeka bazirana je na nedostatku odgovora na dotadašnju terapiju ili njenoj toksičnosti. Međutim, takav pristup često je rezultirao progresijom bolesti s razvojem komplikacija, brojnim hospitalizacijama i kirurškim zahvatima uz lošu kvalitetu života i razvoj invaliditeta. Današnja terapijska strategija temelji se na procjeni djelotvornosti određene terapije u točno određenim vremenskim okvirima. Liječenje danas podrazumijeva brzo postizanje značajne kliničke, laboratorijske i endoskopske remisije uz mukozno cijeljenje. Primjena biološke terapije u suvremenom liječenju omogućila je postizanje dugotrajne remisije bez kortikosteroida, smanjenje potrebe za kirurškim zahvatima i hospitalizacijama. Promjenom prirodnog tijeka bolesti pacijentima je značajno poboljšana kvaliteta života i radna sposobnost (18).

Za uspješno liječenje, od iznimne je važnosti pridržavanje dijete i promjene životnih navika, već od postavljanja dijagnoze. Navedeno uključuje uzimanje nutritivnih dodataka, ograničenje mliječnih proizvoda, konzumiranje hrane bez masti, izbjegavanje hrane s neprobavljivim vlaknima te jedenje češćih, manjih obroka. Za akutnu fazu bolesti karakteristični su gubitak tjelesne mase, proteinsko-energetska malnutricija te vitaminsko-mineralni deficit. Također, neki lijekovi poput kortikosteroida i aminosalicilata smanjuju apsorpciju nutrijenata iz hrane.

Stoga, pažljivo odabrana dijetoterapija predstavlja središnju komponentu u liječenju upalnih bolesti crijeva, kao primarna ili potporna terapija i ima važnu ulogu u korekciji nutritivnih deficita koji se javljaju kod mnogih bolesnika s UBC-om.

1.6. AZATIOPRIN

Azatioprin (AZA), uz 6-merkaptopurin (6-MP) i 6-tiogvanin (6-TG) čini skupinu tiopurinskih lijekova, koji se koriste kao imunosupresivni antimetaboliti u monoterapiji ili u kombinaciji s drugim lijekovima i postupcima koji utječu na imuni odgovor organizma. Indikacije za primjenu azatioprina uključuju upalne bolesti crijeva, reumatoidni artritis, sistemski eritematozni lupus, hematološke maligne bolesti i poboljšanje preživljenja transplantiiranih organa.

U liječenju bolesnika s upalnim bolestima crijeva, azatioprin je indiciran za liječenje umjerenog do teškog oblika bolesti, u bolesnika kojima je potrebna terapija kortikosteroidima, bolesnika koji ne podnose terapiju kortikosteroidima ili bolesnika čija je bolest otporna na druge standardne terapije prve linije (19).

Tablica 1. Indikacije za primjenu azatioprina u liječenju UBC-a.

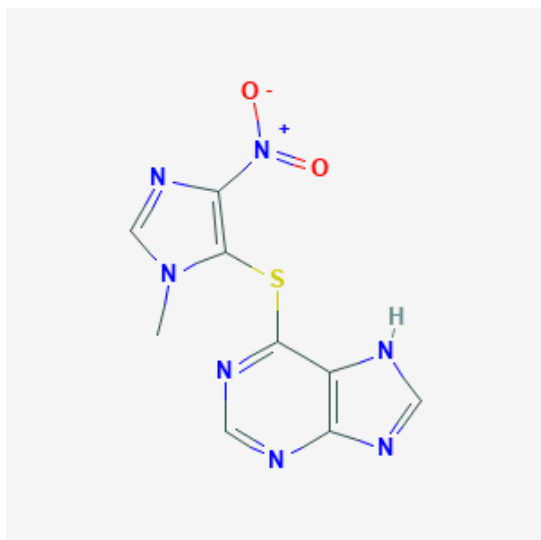
CB	UK
- održavanje remisije umjerenog do teškog oblika, bilo koje lokalizacije	- održavanje remisije u bolesnika u kojima je neophodna primjena kortikosteroida
- održavanje remisije kod ranog relapsa (ukoliko je prošlo manje od 3 mjeseca nakon zadnjeg relapsa) ili kod čestih relapsa (više od dva na godinu)	- održavanje remisije UK-a s ranim relapsom koji zahtijeva steroidnu terapiju
- u fistulizirajućem obliku CB-a, gdje u kombinaciji s antibioticima čini osnovu terapije (osim ako je potrebno rano uvođenje anti-TNF terapije ili kirurškog liječenja)	- održavanje remisije kod bolesnika s čestim relapsima koji zahtijevaju steroidnu terapiju

- u postoperativnoj prevenciji relapsa	- održavanje remisije nakon indukcije remisije ciklosporinom, takrolimusom ili intravenskim steroidima
- u kombinaciji s anti-TNF terapijom u slučajevima teškog oblika CB-a	- akutna ili kronična refrakтерна upala ilealnog spremnika („pouchitis“)

Azatioprin nije indiciran za indukciju remisije kao samostalna terapija u aktivnoj bolesti, što vrijedi i za CB i UK (20).

1.6.1. FARMAKOLOŠKA SVOJSTVA

Azatioprin je prekursor 6-merkaptopurina, prvi put sintetiziran 1956. godine s ciljem postizanja boljeg terapijskog indeksa u odnosu na 6-MP (21).

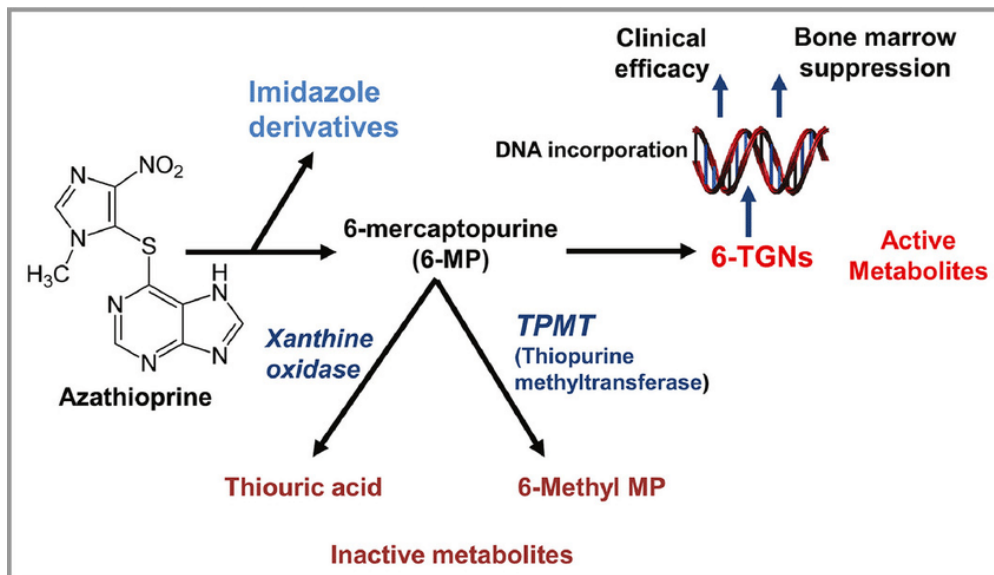


Slika 1. Kemijska struktura azatioprina (22)

Nakon oralne primjene lijeka, jetreni enzim glutation-S-transferaza brzo razgrađuje azatioprin do 6-MP i metil-nitroimidazola u istom omjeru.

Nakon ulaska u stanicu, 6-MP lako prelazi staničnu membranu i može se metabolizirati trima kompetitivnim metaboličkim putevima u nekoliko koraka pri čemu nastaju djelatni i

nedjelatni metaboliti. Tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT) inaktivira 6-MP stvarajući 6-metilmercaptapurin (6-MMP). Pomoću ksantin oksidaze 6-MP se oksidira u 6-tiouričnu kiselinu, također inaktivni metabolit. Djelovanjem hipoksantin-gvaninfosforibozil transferaze (HGPRT) 6-MP se konvertira u citotoksične 6-tiogvaninske nukleotidne (6-TGN) analoge.



Slika 2. Metabolički putevi razgradnje azatioprina (23)

Nukleotidi tiogvanina ostvaruju imunosupresivno djelovanje inhibicijom sinteze endogenih purina, inhibicijom interkonverzije purinskih nukleotida te ugrađivanjem u nukleinske kiseline. Zbog svoje strukturne sličnosti s purinskom bazom gvaninom mogu se ugraditi u DNA u leukocitima i na taj način ometati njeno umnožavanje, posebice u stanicama koje se najbrže dijele kao što su aktivirani T-limfociti. Dakle, inhibicijom različitih putova sinteze nukleinskih kiselina, azatioprin blokira proliferaciju stanica imunološkog sustava, koje određuju i pojačavaju imuni odgovor. Jedan od alternativnih mehanizama ostvarivanja imunosupresivnog učinka je i supresija genske ekspresije inflamatornih gena (24).

Još jedan od opisanih mehanizama je i aktivacija apoptoze. Metaboliti azatioprina induciraju T-staničnu apoptozu uz kostimulaciju s CD28, modulacijom Rac1 molekule na način da se 6-tiogvanin trifosfat (6-tio-GTP) veže na Rac1 umjesto GTP-a. Posljedica toga je supresija aktivacije ciljnih gena Rac1 što dovodi do mitohondrijskog puta apoptoze (25).

1.6.2. UČINKOVITOST TERAPIJE

Tiopurini neizravno smanjuju potrebu za primjenom kortikosteroida zbog svoje učinkovitosti u održavanju produljene kliničke remisije, posebno kada se koriste u umjerenim do teškim oblicima UBC-a. Uz primjenu tiopurina, zabilježene su smanjene stope prve laparotomije u odraslih s CB-om i smanjenje incidencije uznapredovalog kolorektalnog karcinoma. Međutim, prema populacijskoj studiji koja je istraživala odnos primjene imunosupresivnih lijekova i stopu kirurških zahvata, nisu nađeni jasni dokazi da primjena tih lijekova smanjuje potrebu za kirurškim zahvatima. U prospektivnoj studiji na 92 bolesnika, dokazano je da uporaba tiopurina poboljšava kvalitetu života već nakon 6 mjeseci, a poboljšanja na svim aspektima nakon 12 mjeseci bila su još značajnija. Studije na pedijatrijskoj populaciji pokazale su da djeca također dobro podnose terapiju tiopurinima i mogu postići produljenu remisiju (24).

Kako navode Konidari i Matary, prema meta-analizi koju su proveli French i sur., u kojoj je istraživana stopa recidiva nakon ukidanja terapije azatioprinom u bolesnika oboljelih od Crohnove bolesti, postoje jasni dokazi o pozitivnim učincima nastavka terapije tiopurinskim lijekovima s ciljem održavanja remisije tijekom minimalno 18 mjeseci (24). Međutim, nije bilo dovoljno dokaza u prilog duljoj kontinuiranoj terapiji tiopurinima s ciljem održavanja remisije. Fraser i sur. su u 30-godišnjem pregledu izvijestili o trajnoj učinkovitosti terapije tiopurinima tijekom pet godina kod odraslih pacijenata s UBC-om (24). Prema toj retrospektivnoj studiji, zabilježeni su minimalni toksični učinci te nije zabilježena smrtnost uslijed neutropenične sepse, čime je potvrđena sigurnost ove terapije. Randomizirano kontrolirano ispitivanje Hawthornea i sur. izvijestilo je da je rano ukidanje azatioprina iz terapije u bolesnika s UK-om koji su najmanje šest mjeseci bili u kliničkoj remisiji rezultiralo značajno većom stopom recidiva u usporedbi s pacijentima na dvogodišnjem kontinuiranom liječenju (24). Stoga, tiopurini se smatraju sigurnim i učinkovitim lijekovima s ključnom ulogom u liječenju UBC-a.

1.6.3. SIGURNOST PRIMJENE AZATIOPRINA

Idiosinkratske nuspojave azatioprina su vjerojatno imunološki posredovane, nepredvidljive i mogu se dogoditi u periodu od nekoliko tjedana od početka liječenja. Uključuju reakcije

netolerancije i preosjetljivosti, kao što su malaksalost, vrtoglavica, povraćanje, proljev, vrućica, mialgija, artralgiya, osip i hipotenzija. Rijetke idiosinkratske reakcije uključuju oštećenje bubrega, pneumonitis i pankreatitis.

Tiopurinima-inducirana disfunkcija jetre koju posreduju metilirani intermedijarni metaboliti manifestira se povišenjem jetrenih enzimima, hepatitisom, kolestatskom žuticom ili veno-okluzivnom bolesti jetre. Oštećenje jetre nakon primjene tiopurina podijeljeno je u tri kategorije: preosjetljivost, idiosinkratske kolestatske reakcije i nodularna regenerativna hiperplazija (NRH). Patogeneza NRH-a je nejasna, a čimbenicima rizika, uz primijenjenu dozu tiopurina, smatraju se muški spol, starija dob, prisutnost striktura u kliničkoj slici i resekcija tankog crijeva. U većini slučajeva ipak je riječ o blagom oštećenju jetre s povišenjem vrijednosti jetrenih enzima, što se može riješiti sa ili bez smanjenja doze tiopurina.

Mijelosupresija je najozbiljnija hematološka nuspojava tiopurina koja dovodi do prekida liječenja. Mijelotoksičnost je moguće izbjeći smanjenjem doze, međutim, prema nekim studijama ova vrsta toksičnosti nije povezana s dozom. Depresija funkcije koštane srži je općenito reverzibilna nuspojava. Najčešće se manifestira u obliku leukopenije, ponekad anemije i trombocitopenije, a rijetko u obliku agranulocitoze, pancitopenije i aplastične anemije. Ove se nuspojave javljaju osobito u bolesnika koji imaju predispoziciju za mijelotoksičnost, poput onih s nasljednim nedostatkom TPMT-a, bubrežnim ili jetrenim zatajivanjem. U bolesnika koji primaju azatioprin primijećena su reverzibilna i dozi proporcionalna povećanja srednjeg volumena eritrocita i razine hemoglobina u eritrocitima. Primijećene su i megaloblastične promjene u koštanoj srži, no pojava teške megaloblastične anemije i eritroidne hipoplazije je rijetka (19).

Među pacijentima s ulceroznim kolitisom liječenim imunomodulatorima zabilježena je veća učestalost infekcija, zbog smanjenog imunološkog odgovora. Pacijenti s upalnom bolesti crijeva imaju povećani rizik od stjecanja oportunističkih infekcija, na primjer infekcije citomegalovirusom (posebno pneumonitis ili enteritis), što može uzrokovati pogoršanje osnovne bolesti i neuspjeh imunosupresivne terapije. Antibiotiku profilaksu treba razmotriti u bolesnika starije životne dobi, onih s težom kliničkom slikom i uznapredovalom bolešću. Parazitske ili druge gljivične infekcije izuzetno su rijetke kod bolesnika s upalnom bolesti

crijeva. Zbog imunosupresije inducirane tiopurinima, preporučuju se periodična cijepljena protiv pneumokoka i godišnja cijepljenja protiv gripe.

U starijoj populaciji s upalnom bolesti crijeva bakterijske infekcije poput infekcija mokraćnog sustava i izvanbolničke pneumonije te virusne infekcije poput gripe, češće su i ozbiljnije nego u mlađih odraslih osoba. Bolesnici starije životne dobi na imunosupresivima imaju povećani rizik od razvoja zloćudnih bolesti u usporedbi s bolesnicima mlađe odrasle dobi i djecom. Neželjeni događaji poput NRH uslijed primjene tiopurina češći su u starijoj dobi. Stoga, upitno je da li u starijih bolesnika korist od dugotrajne primjene tiopurina nadmašuje rizike (24).

1.6.4. INTERAKCIJE AZATIOPRINA I DRUGIH LIJEKOVA

Potreban je oprez pri istodobnoj primjeni azatioprina i lijekova koji mogu promijeniti farmakokinetiku AZA ili 6-MP do klinički značajne razine te povećati rizik razvoja nuspojava. Alopurinol inhibira djelovanje enzima ksantin-oksidaze, što može rezultirati višekratnim povećanjem koncentracija MP u plazmi i 6-TGN u eritrocitima, pa se preporuča dozu azatioprina smanjiti na 25 % uobičajene doze.

Primjenu nižih doza azatioprina treba razmotriti kad se azatioprin primjenjuje istodobno s derivatima aminosalicilata koji se često koriste u terapiji UBC-a, budući da postoje *in vitro* i *in vivo* dokazi da istodobna primjena može dovesti do značajne leukopenije. Aminosalicilati, od kojih su u Hrvatskoj registrirani sulfasalazin i mesalazin su potentni inhibitori aktivnosti TPMT, što je pokazano u studijama *in vitro* (26). Prema studiji *in vivo* koja je uključila 16 pacijenata na stabilnoj dozi azatioprina, a koji u terapiji imaju i sulfasalazin ili mesalazin, koncentracija 6-TGN u eritrocitima se značajno smanjila nakon ukidanja terapije aminosalicilatima. Međutim, nije zabilježena statistički značajna promjena aktivnosti TPMT-a u smislu njezinog povećanja, što upućuje na neki drugi mehanizam u podlozi interakcije azatioprina i aminosalicilata (27).

Također, istovremena terapija s nekim drugim lijekovima poput nesteroidnih protuupalnih lijekova, furosemida i tiazidskih diuretika može rezultirati smanjenjem enzimske aktivnosti TPMT-a (28, 29).

Metotreksat povećava razine 6-MP, stoga pri istodobnoj primjeni treba prilagoditi dozu azatioprina i pratiti broj bijelih krvnih stanica. Kad god je moguće, treba izbjegavati istodobnu primjenu azatioprina i citostatika ili lijekova koji mogu imati mijelosupresivni učinak.

1.6.5. PRAĆENJE BOLESNIKA

Procjena sigurnosti liječenja i analiza rizika/koristi trebaju se provesti prije i nastaviti provoditi tijekom liječenja tiopurinima. Čimbenici poput genetike, dobi, trajanja i težine bolesti, komorbiditeta i okoliša mogu utjecati na učinkovitost i sigurnost liječenja.

Redovito praćenje kliničkog stanja bolesnika na terapiji tiopurinima važno je radi otkrivanja slabog odgovora, prilagodbe doze ili modifikacije liječenja. Nadzor je bitan u prevenciji i pravovremenom detektiranju neželjenih štetnih događaja povezanih s liječenjem. To uključuje praćenje krvne slike jednom tjedno ili čak i češće ako se primjenjuju visoke doze lijeka ili je riječ o bolesnicima s teškim bubrežnim i/ili jetrenim oštećenjem. Kasnije tijekom liječenja preporučuje se jednom mjesečno ili barem svaka 3 mjeseca napraviti kompletnu krvnu sliku. Liječenje se privremeno prekida već kod prvih znakova prekomjernog smanjena broja krvnih stanica budući da broj leukocita i trombocita može nastaviti padati i nakon prekida terapije. Također, bolesnici su upućeni da se odmah jave liječniku ako primijete pokazatelje depresije koštane srži poput infekcije, neočekivane pojave modrica ili krvarenja i drugo (19).

Još uvijek nema dovoljno znanstvenih dokaza na temelju kojih bi se preporučilo rutinsko određivanje koncentracija aktivnih metabolita azatioprina – 6-MMP i 6-TG. Terapijsko praćenje azatioprina nije široko prihvaćeno i uvelike ovisi o lokalnoj praksi i individualnim preferencijama kliničara. Određivanje koncentracija metabolita može biti korisno kod provjere adherencije odnosno nepridržavanja uzimanja terapije, otkrivanja rezistencije na lijek te predviđanja toksičnosti ovisne o dozi za svakog pojedinog bolesnika.

1.7. GENSKI POLIMORFIZAM TIOPURINMETILTRANSFERAZE

Tiopurinmetiltransferaza je citoplazmatski enzim pronađen u sisavaca koji katalizira S-metilaciju aromatskih i heterocikličkih sulfihidrilnih spojeva, te se smatra najvažnijim

enzimom za metabolizam tiopurinskih lijekova. Osim metabolizma ksenobiotika, druge, fiziološke funkcije tiopurinmetiltransferaze nisu poznate (30).

Enzim je kodiran genom *TPMT* koji se nalazi na 6. kromosomu, veličine je 27 kilobaza i nasljeđuje se autosomno kodominantnim putem. Razina enzimske aktivnosti uvjetovana je genskim polimorfizmom te može biti visoka, srednja i niska ili nepostojeća. Prva studija koja je opisala interindividualne varijacije u aktivnosti enzima TPMT u eritrocitima je studija Weinshilbouma i sur. iz ranih sedamdesetih godina prošlog stoljeća, na 298 ispitanika (31). U toj i kasnije provedenim studijama, pokazano je da aktivnost TPMT-a ima trimodalnu distribuciju (tablica 2.). Približno 89 % stanovništva ima „divlji“ genotip, tj. homozigoti su za normalne, divlje alele, i visoku aktivnost enzima, oko 11 % su heterozigoti s jednim varijantnim alelom i imaju srednju aktivnost, a otprilike 0,3 % ili 1 od 300 osoba nasljeđuje oba varijantna alela što rezultira nedostatkom TPMT proteina i izostankom enzimske aktivnosti (32).

Tablica 2. Trimodalna distribucija TPMT aktivnosti i korelacija s koncentracijom tiogvaninskih nukleotida

TPMT genotip	Prevalencija	Predviđena enzimska aktivnost	Koncentracija 6-TGN u eritrocitima
<i>TPMT</i> *1/*1	90 %	Normalna	Niska
Heterozigotni genotip	10 %	Srednja	Srednja
Homozigotni genotip	0,3 %	Niska ili ne postoji	Visoka

Na temelju tih opažanja autori su zaključili da interindividualne varijacije u aktivnosti TPMT-a predstavljaju jedan od čimbenika odgovornih za razlike u terapijskim i toksičnim učincima među pojedincima (33). Nekoliko godina kasnije, isti autor je objavio studije o utjecaju genskog polimorfizma na aktivnost enzima TPMT u drugim stanicama i tkivima osim eritrocita (34, 35, 36).

Tek sredinom devedesetih godina prošlog stoljeća gen *TPMT* je izoliran, sekvenciran te su na genskoj razini opisane alelne varijante (37). Do sada su poznata 3 alela povezana s normalnom enzimskom aktivnosti – *TPMT**1 i 2 tiha polimorfizma, te je opisano više od 30 varijantnih alela uz koje se veže većinom smanjena enzimska aktivnost ili ekspresija proteina u usporedbi s divljim genotipom. U 80-95 % osoba sa smanjenom enzimskom aktivnosti nalazi se jedna od 3 najčešće alelne varijante – *TPMT**2, *TPMT**3A ili *TPMT**3C. Navedene polimorfne varijante imaju polimorfizam jednog ili dvaju nukleotida što dovodi do supstitucije aminokiseline pri čemu kao rezultat nastaje novi nestabilni protein koji se vrlo brzo proteolizira (38).

Prva otkrivena polimorfna varijanta je *TPMT**2, koja sadrži G>C supstituciju na 238. nukleotidu, što dovodi do zamjene rigidnog prolina u fleksibilni alaninski ostatak (37). Kada se procijeni na kvašćevom heterolognom staničnom ekspresijskom sustavu, ova mutacija dovodi do >100 puta smanjene aktivnosti TPMT-a u odnosu na komplementarnu DNA divljeg tipa, unatoč usporedivoj razini ekspresije glasničke RNA (39). *TPMT**3A sadrži dvije nukleotidne zamjene G460A i A719G, što dovodi do zamjena alanina u treonin, te tirozina u treonin. Kada je heterologno eksprimiran u stanicama kvasca, *TPMT**3A alel imao je > 200 puta nižu TPMT aktivnost u usporedbi s komplementarnom DNA divljeg tipa (39). Varijantni alel *TPMT**3B koji ima samo nukleotidnu zamjenu G460A se rijetko pojavljuje samostalno; najčešće je usko povezan s varijantnim alelom *TPMT**3C koji također ima samo jedan tranzicijski polimorfizam - A719G. *TPMT**3A je najčešća varijanta u heterozigota bijele rase, dok je *TPMT**3C alel koji se najviše detektira u populacijama Afrike i jugoistočne Azije (40, 41).

U bjelačkoj populaciji prevalencija polimorfizama je otprilike 10 %, dok je u jugozapadnih azijata 2 %, a u populaciji Kineza 5 % (41).

Utvrđivanjem prisutnosti alela *TPMT**2, *TPMT**3A ili *TPMT**3C moguće je predvidjeti fenotip - pacijenti heterozigoti za ove alele imaju srednju aktivnost, a homozigoti za te alele imaju nedostatak aktivnosti enzima TPMT (42).

Sama fenotipizacija je metoda određivanja enzimске aktivnosti u crvenim krvnim stanicama, mjerenjem količine 6-MMP ili 6-metiltiliogvanina (6-MTG), koji se stvaraju metilacijom 6-MP ili 6-TG. Metilaciju omogućuje TPMT u prisustvu donora metila, što je najčešće S-adenozil-

L-metionin (SAM) (43). Na taj način se otkrivaju 3 različita metabolička fenotipa (brzi, intermedijarni i spori). Mjerenje enzimske aktivnosti nužno je provoditi pod konstantnim uvjetima i pod standardnim doziranjem tijekom određene faze liječenja (44). Pri tome treba imati na umu da transfuzije utječu na TPMT fenotip, te je aktivnost enzima potrebno mjeriti najmanje tri mjeseca nakon transfuzije.

S druge strane, genotipizacija *TPMT* varijanti je metoda na čije rezultate ne utječu vanjski čimbenici te se treba provesti samo jednom u životu, stoga predstavlja metodu izbora za predviđanje smanjene aktivnosti enzima. Standardnom genotipizacijom koja se rutinski primjenjuje, može se identificirati do 95 % pacijenata s najčešćim mutacijama, međutim, nije moguće identificirati bolesnike s rjeđim mutacijama. Tehnike kojima se najčešće izvodi genotipizacija su lančana reakcija polimeraze/polimorfizam dužine restrikcijskog fragmenta (PCR/RFLP), PCR u stvarnom vremenu (engl. Real-time PCR) i gensko sekvenciranje.

Prema studiji švedskih autora, ukupna podudarnost između genotipizacije i fenotipizacije TPMT-a bila je 95 %, dok je među bolesnicima s UBC-om bila 96 % (n = 4024). Zaključak studije bio je da postoji rizik od pogrešne klasifikacije TPMT-a kada se koristi samo genotipizacija ili fenotipizacija, ali nije razumno provjeriti oboje u svih bolesnika. Budući da se genotipizacija smatra pouzdanijim testom, posebno u TPMT heterozigota, genotipizaciju treba smatrati primarnim izborom za procjenu funkcije TPMT-a prije početka terapije tiopurinskim lijekovima (45).

U određivanju enzimske aktivnosti TPMT-a, važna je i kronološka dob. Prema studiji McLeod i sur. na uzorcima eritrocita od 60 novorođenih beba, novorođenčad u usporedbi s odraslom populacijom ima veći sadržaj TPMT proteina u eritrocitima, pri čemu postoji značajna korelacija između sadržaja TPMT-a u eritrocitima i enzimske aktivnosti TPMT-a. Iako je enzimska aktivnost TPMT-a bila značajno veća u novorođenčadi, raspodjela aktivnosti bila je u skladu s genskim polimorfizmom prethodno opisanim u odrasloj populaciji.

Također, studije su pokazale, kad je riječ o divljem genotipu mlađa djeca u dobi do 5 godina imaju značajniju aktivnost u odnosu na stariju djecu, kao i starija djeca u dobi do 17 godina u odnosu na odraslu dob (18-68 godina) (46).

Prema studiji Klemetsdal i sur. na 105 zdravih dobrovoljaca s visokom aktivnosti enzima TPMT, muškarci su imali 8,3 % veću aktivnost enzima od žena. Autori su naveli da se razlike u aktivnosti među spolovima mogu pripisati utjecaju testosterona na TPMT što je pokazano na modelu štakora, te općenitim razlikama u metabolizmu lijekova, pri čemu su u muškaraca općenito brže reakcije II. faze metabolizma te brže izlučuju lijekove od žena (47).

1.8. OPTIMIZACIJA TERAPIJE AZATIOPRINOM S OBZIROM NA AKTIVNOST TPMT

Prije početka terapije azatioprinom, preporuka je učiniti genotipizaciju ili fenotipizaciju TPMT-a, budući da enzimska aktivnost tog proteina određuje ravnotežu između farmakološki aktivnih metabolita azatioprina – 6-metil-merkaptopurina (6-MMP) i 6-tiogvanina (6-TGN). Enzimska aktivnost TPMT-a obrnuto je proporcionalna koncentraciji nukleotida tiogvanina koji nastaju iz 6-MP u crvenim krvnim stanicama putem hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferaze (HGPRT) (tablica 2.). Tiogvaninski nukleotidi su dominantno aktivni metaboliti, međutim više koncentracije nukleotida rezultiraju većim smanjenjem broja bijelih krvnih stanica i neutrofila, odnosno mogu djelovati mijelotoksično. Homozigotima za divlji tip TPMT-a koji posjeduju visoku aktivnost enzima lijek se može dati u punoj dozi, jer nema rizika za nastanak citotoksičnih koncentracija aktivnog metabolita 6-TGN i razvoj mijelosupresije. Bolesnicima s heterozigotonom konstelacijom TPMT-a koji imaju intermedijarnu aktivnost enzima, preporuča se započeti liječenje s 30-80 % ciljne doze lijeka, uz titraciju do doze koja se dobro podnosi. Kod bolesnika koji su homozigoti za varijantni TPMT genotip početnu dozu lijeka treba značajno reducirati, čak do 10 puta, uz doziranje tri puta tjedno umjesto svakodnevnog uzimanja i prilagođavati ovisno o stupnju mijelosupresije. Ako je moguće, preporuka je primijeniti alternativnu terapiju.

Navedene varijacije u nasljeđivanju enzimске aktivnosti doprinose interindividualnoj razlici u osjetljivosti na terapiju azatioprinom i drugim tiopurinskim lijekovima i razvoju nuspojava koje mogu imati potencijalno fatalni ishod uslijed razvoja neutropenične sepse.

Iako su znanstvena zajednica, te regulatorne agencije koje se bave javnim zdravstvom prepoznale doprinos farmakogenetičkog testiranja u individualizaciji i optimizaciji farmakoterapije u svrhu povećanja sigurnosti terapije, implementacija farmakogenomike u kliničku praksu zaostaje za tim spoznajama. Iz tog je razloga osnovano nekoliko stručnih

organizacija koje imaju za cilj pružiti ažurirane, detaljne i na dokazima utemeljene smjernice za primjenu farmakogenomike u kliničkoj praksi. Jedna od njih je Konzorcij za implementaciju kliničke farmakogenetike (CPIC, od engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) koji je prvi put u ožujku 2011. izdao smjernice za određivanje genotipa *TPMT* i doziranje tiopurinskih lijekova (engl. *CPIC Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing*). Smjernice su potom ažurirane u travnju 2013. godine, a zadnja verzija publikacije je iz studenog 2018. godine (tablica 3.). Za izradu smjernica napravljen je sustavni pregled literature na PubMedu objavljene od 1966. do 2017. godine, te su koristeći ključne pojmove i kriterije uvrštenja, uključene 133 publikacije (48).

Tablica 3. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* preporuke za doziranje azatioprina prema genotipu *TPMT*

TIP METABOLIZATORA	PREPORUKA
Normalni metabolizatori	Započeti s uobičajenom početnom dozom (npr. 2-3 mg / kg / dan) i prilagođavati dozu ovisno o smjernicama za pojedinu indikaciju (ravnotežno stanje se postiže 2 tjedna nakon svake prilagodbe doze)
Intermedijarni metabolizatori	Započeti sa smanjenom početnom dozom (30–80 % normalne doze) i prilagođavati dozu na temelju stupnja mijelosupresije i smjernica specifičnih za bolest (ravnotežno stanje se postiže 2-4 tjedna nakon svake prilagodbe doze).
Slabi metabolizatori	Za nemaligne dijagnoze razmotriti alternativnu imunosupresivnu terapiju. Kod malignih bolesti započeti s drastično smanjenom dozom (smanjiti dnevnu dozu 10 puta i doza tri puta tjedno umjesto svakodneвно) i prilagođavati dozu ovisno o stupnju mijelosupresije i smjernica specifičnih za bolest. Uzeti u obzir da se ravnotežno stanje postiže 4-6 tjedna nakon svake prilagodbe doze.

Američko gastroenterološko društvo u smjernicama objavljenim 2017. godine preporučuje rutinsko TPMT testiranje u prilagodbi doze tiopurinskih lijekova. Unatoč tome što je rizik neprovođenja testa prije uvođenja terapije u većini slučajeva minimalan, u 0,3 % pacijenata koji su homozigoti, odnosno imaju nisku enzimsku aktivnost, rizik od ozbiljnih hematoloških nuspojava je značajan (49).

Coenen MJH, de Jong DJ, van Marrewijk i sur. su 2015. godine objavili rezultate randomizirane kontrolirane studije nazvane TOPIC (*Thiopurine response Optimization by Pharmacogenetic testing in Inflammatory bowel disease Clinics*) u kojoj su ispitali smanjenje incidencije hematoloških nuspojava kod osoba kojima je učinjena genotipizacija TPMT prije uvođenja tiopurina u terapiju te zatim ovisno o genotipu, prilagođeno doziranje lijeka. U interventnoj skupini su analizirane 3 najčešće varijante alela TPMT*2, TPMT*3A i TPMT*3C. Studija nije dokazala statistički značajnu razliku rizika za razvoj hematoloških nuspojava u grupi kojoj je učinjeno predterapijsko testiranje TPMT-a, u odnosu na grupu kojoj testiranje nije učinjeno, 20 tjedana nakon početka terapije. Međutim, u post hoc analizi zabilježen je 10 puta manji rizik od hematoloških nuspojava u skupini bolesnika koji su imali gensku varijantu i kojima je prilagođena doza lijeka, u odnosu na bolesnike s genskom varijantom koji nisu bili u interventnoj skupini te su primili uobičajenu dozu lijeka (50).

Prema randomiziranoj kontroliranoj studiji Newmana i sur. koja je uključila 333 ispitanika koja su većinom imala dijagnozu upalne bolesti crijeva, osobe s intermedijarnom aktivnošću TPMT enzima (10 %) nemaju povećani rizik za razvoj ozbiljnih nuspojava uslijed primjene azatioprina. Međutim, autori studije podržavaju genotipizaciju TPMT prije uvođenja terapije s ciljem identifikacije osoba koje imaju povećani rizik za razvoj ozbiljne neutropenije kao nuspojave azatioprina. Naime, tijekom četveromjesečnog praćenja, jedan pacijent koji prehodno nije bio podvrgnut farmakogenetičkom testiranju, razvio je ozbiljnu neutropeniju, te se pokazalo da je homozigot za varijantne alele (51).

Nizozemsko društvo „*The Royal Dutch Pharmacists Association - Pharmacogenetics Working Group*“ je izdalo preporuke za doziranje azatioprina na temelju genotipa TPMT (tablica 4.). Preporučuju smanjenje početne doze za pacijente koji su intermedijarni metabolizatori i odabir alternativnog lijeka ili značajno smanjenje početne doze za pacijente koji su slabi metabolizatori (52).

Tablica 4. The Royal Dutch Pharmacists Association - Pharmacogenetics Working Group
preporuke za doziranje azatioprina prema genotipu *TPMT*

TIP METABOLIZATORA	OPIS	PREPORUKA
Intermedijarni metabolizatori	Leukopenija stupnja ≥ 2 javlja se u 23 % ovih bolesnika s uočičajenom imunosupresivnom terapijom. Genska varijacija povećava količinu aktivnih metabolita azatioprina i merkaptopurina.	-IMUNOSUPRESIJA Početna doza je 50 % standardne doze. Prilagođavati početnu doze ovisno o toksičnosti (praćenje krvne slike) i učinkovitosti. Prilagođavanje doze nije potrebno za doze niže od 1,5 mg/kg dnevno za azatioprin ili 0,75 mg/kg dnevno za merkaptopurin. Napomena: potrebno je značajnije smanjenje doze ako je pacijent također intermedijarni ili slabi metabolizator za NUDT15.
Slabi metabolizatori	Leukopenija stupnja ≥ 2 i netolerancija pojavili su se u 98 % ovih bolesnika sa standardnom terapijom. Genska varijacija povećava količinu aktivnih metabolita azatioprina i merkaptopurina.	Odabrati alternativnu terapiju ili započeti s 10 % standardne doze. Prilagođavati početnu dozu ovisno o toksičnosti (praćenje krvne slike) i učinkovitosti. Savjetovati pacijentima da potraže liječničku pomoć kada se pojave simptomi mijelosupresije (poput jake upale grla u kombinaciji s vrućicom, česta krvarenja iz nosa i sklonost modricama).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Prema dostupnim podacima iz literature, poznato je da liječenje azatioprinom pokazuje značajnu interindividualnu varijabilnost u učinkovitosti i razvoju hematoloških i drugih nuspojava. Važan čimbenik rizika za nastanak nuspojava predstavlja polimorfizam gena koji kodira tiopurinmetiltransferazu (TPMT), metabolički enzim odgovoran za ravnotežu između terapijskog i citotoksičnog učinka tiopurina.

Cilj ovog rada je pregledno prikazati stanje u provođenju genotipizacije TPMT-a u hrvatskoj populaciji, odnosno odrediti učestalost varijantnih alela (*TPMT**2,*3A,*3C) odgovornih za smanjenu aktivnost TPMT-a. U radu će biti prikazani podaci statističke obrade rezultata genotipizacije *TPMT* provedene u 2019. godini u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog bolničkog centra Zagreb, gdje se provodi analiza TPMT-a za područje cijele Republike Hrvatske. Cilj je prikazati raspodjelu polimorfizama gena *TPMT* po dobi i spolu te raspodjelu zahtjeva za analizom *TPMT* prema razini zdravstvene zaštite (primarna, sekundarna, tercijarna).

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je provedeno u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb, koji provodi testiranje na farmakogenetičke varijacije koje mogu utjecati na učinkovitost i nuspojave lijekova.

Podaci dobiveni iz genotipizacije *TPMT* analizirani su retrospektivno. Određivanje genotipa provedeno je iz uzorka krvi od 3 ml u epruveti s Na-EDTA. Automatizirano izdvajanje DNA iz uzoraka pune krvi pomoću kita iPrep® PureLink® gDNA Blood Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) provodi se na sistemu AutoMate Express™ DNA Extraction System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Genotipizacija polimorfizama *TPMT**2 (rs1800462), *TPMT**3B (rs1800460), *TPMT**3C (rs1142345), provedena je TaqMan® metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) u stvarnom vremenu za otkrivanje i analizu polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), koristeći reagense TaqMan® SNP Genotyping Assay: *TPMT**2, ID C_12091552_30; *TPMT**3B, C_30634116_20; *TPMT**3C C_19567_20 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), prema uputama proizvođača. Određivanje polimorfizama izvedeno je na uređaju za PCR u stvarnom vremenu ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD) analizom alelne diskriminacije.

Analizirani su prispjeli zahtjevi za rutinsko određivanje genotipa *TPMT* u bolesnika koji boluju od upalnih bolesti crijeva, u 2019. godini.

4. REZULTATI

U istraživanje su uključeni podaci o 494 bolesnika koji boluju od upalne bolesti crijeva, pri čemu je 244 ženskog spola, a 250 muškog spola.

Tablica 5. Raspodjela bolesnika po dobi

DOB	BROJ BOLESNIKA N (%)
<20 godina	89 (18 %)
20-40 godina	171 (34,6 %)
40-60 godina	120 (24,3 %)
>60 godina	114 (23,1 %)

Ukupno je u 30 bolesnika zabilježen varijantni genotip, što znači da je udio varijantnih u odnosu na divlji genotip 6,07 %.

Najčešće zabilježeni varijantni genotip je *TPMT**1/*3A, prisutan u 29 bolesnika. U jednog bolesnika nađen je varijantni genotip *TPMT**1/*3C.

Tablica 6. Učestalost varijantnih genotipova u uzorku

GENOTIP	UČESTALOST N (%)
<i>TPMT</i> *1/*1	464 (93,9 %)
<i>TPMT</i> *1/*2	0 (0 %)
<i>TPMT</i> *1/*3A	29 (5,9 %)
<i>TPMT</i> *1/*3C	1 (0,2 %)

Tablica 7. Udio varijantnih genotipova po dobnim skupinama

DOBNA SKUPINA	UDIO VARIJANTNIH GENOTIPOVA N (%)
<20 godina	5 (5,6 %)
20-40 godina	12 (7 %)
40-60 godina	6 (5 %)
>60 godina	7 (6,1 %)

Prema razini zdravstvene zaštite s koje su upućeni zahtjevi za analizom *TPMT*, najveći broj bolesnika upućen je na testiranje od strane izabranog doktora primarne zdravstvene zaštite a prema preporuci specijaliste gastroenterologa. Slijede po učestalosti zahtjevi iz tercijarnih ustanova - kliničkih bolnica i kliničkih bolničkih centara, te zahtjevi iz općih bolnica odnosno ustanova sekundarne razine zdravstvene zaštite.

Tablica 8. Raspodjela zahtjeva za analizom *TPMT* prema razini zdravstvene zaštite

RAZINA ZDRAVSTVENE ZAŠTITE	UČESTALOST PRISPJELIH ZAHTJEVA N (%)
primarna	272 (55,1 %)
sekundarna	45 (9,1 %)
tercijarna	177 (35,8 %)

5. RASPRAVA

Učestalost heterozigotnih genotipova *TPMT* u ukupnom uzorku ispitanika je 6,07 %. Rezultati pokazuju da je u analiziranom uzorku ispitanika najčešći varijantni alel *TPMT* gena varijanta *TPMT*3A*, koja je nađena u 5,9 % ispitanika. Varijanta *TPMT*3C* nađena je u jednog ispitanika, a varijanta *TPMT*2* nije bila prisutna u ispitivanom uzorku. Navedeno se podudara s recentno objavljenim rezultatima istraživanja provedenog na istom odjelu na uzorku od 685 ispitanika (koji su testirani u prethodnom razdoblju, prije 2019.godine), i koje je također uključivalo bolesnike s upalnom bolesti crijeva. U toj je studiji ukupna učestalost svih varijantnih alela iznosila 6,8 %, a učestalost varijante *TPMT*3A* bila je 3,05 % (53). Prema ranije provedenom drugom istraživanju u hrvatskoj populaciji, frekvencija varijantnih genotipova bila je 5,7 %. U toj studiji najučestaliji varijantni alel bio je također *TPMT*3A*, s učestalošću 4,2 %. Učestalost varijantnih alela *TPMT*2* i *TPMT*3C* bila je 0,6 % i 0,9 % (54).

Podaci se podudaraju s rezultatima istraživanja provedenog u Slovačkoj koje je uključilo 330 ispitanika koji boluju od upalne bolesti crijeva. Prema toj studiji, heterozigotni genotip bilo kojeg od ispitivanih polimorfizama bio je prisutan u 6 % bolesnika, dok je samo jedan bolesnik bio homozigotan za alel *TPMT*3A*. Najzastupljeniji mutantni alel bio je također *TPMT*3A* (3,2 %) (55).

Prema studiji provedenoj u Litvi na uzorku od 551 bolesnika s upalnom bolesti crijeva, učestalosti alela *TPMT*3A*, *TPMT*3B* i *TPMT*3C* iznosile su 3,1 %, 0,5 % i 0,1 %. Među bolesnicima na terapiji azatioprinom u kojih je kao nuspojava zabilježena mijelotoksičnost, 44,4 % je imalo heterozigotni genotip (56).

Prema studiji provedenoj u latvijskoj populaciji koja je uključila DNA uzorke 244 bolesnika s upalnom bolesti crijeva, učestalost heterozigotnih genotipova bila je 6.1 %. Najprevalentniji varijantni genotip bio je *TPMT*1/*3A* (5,3 %), zatim *TPMT*1/*3C* (0,4 %), te *TPMT*1/*2* (0,4 %). Niti jedan bolesnik nije bio homozigotan za neku od mutacija (57).

Laboratorij u KBC Zagreb je uključen u shemu vanjske kontrole kvalitete (Referenzinstitut für Bioanalytik –RfB i European Molecular Genetics Quality Network - EMQN) koja

uključuje i analizu polimorfizama gena *TPMT*, podatci dobiveni ovim istraživanjem smatraju se u potpunosti validnim.

Analiza učestalosti prispjelih zahtjeva za analizom *TPMT* s obzirom na razinu zdravstvene zaštite s koje su pacijenti upućeni pokazala je da je najveći broj pacijenata upućen s razine primarne zdravstvene zaštite (55,1 %), zatim tercijarne (35,8 %), te potom sekundarne (9,1 %). Liječnici primarne zdravstvene zaštite upućuju pacijente na genotipizaciju *TPMT* prema preporuci specijaliste gastroenterologa.

U ovom radu, zbog nedostupnosti podataka, nije analiziran utjecaj konkomitantne terapije koja se često koristi u liječenju UBC, a također potencijalno može utjecati na aktivnost enzima. Valja uzeti u obzir da, osim smanjene enzimске aktivnosti *TPMT*-a zbog genskog polimorfizma ili inhibicije drugim lijekovima, inter-individualnoj varijabilnosti u kliničkom odgovoru na azatioprin mogu pridonijeti i težina i kronicitet bolesti, komorbiditeti, okolišni čimbenici, duljina i suradljivost u uzimanju terapije (24).

Unatoč tome što testiranje genotipa *TPMT* može biti od koristi u predviđanju rizika od mijelosupresije, ono ne može zamijeniti praćenje kompletne krvne slike tijekom liječenja tiopurinskim lijekovima. Također, polimorfizmi drugih gena uključenih u metabolizam tiopurina, od kojih se mnogi još istražuju, također mogu imati utjecaj na učinkovitost i sigurnost liječenja. Konzorcij za implementaciju kliničke farmakogenetike u posljednjim objavljenim smjernicama iz 2018. za optimizaciju doze tiopurina uvrstio je i preporuke za određivanje genotipa *NUDT15*, nukleozidne difosfataze koja katalizira konverziju citotoksičnih tiogvanin-trifosfat metabolita u manje toksične tiogvanin-monofosfate. Smanjena aktivnost enzima zbog prisutnosti polimorfizma gena *NUDT15* dovodi do veće dostupnosti trifosfata za ugradnju u DNA što za posljedicu ima oštećenje DNA i apoptozu (58). Genske varijante *NUDT15* imaju relativno nisku učestalost u europskim populacijama, manju od 1 %, dok je učestalost gotovo 10 % u istočnoazijskim populacijama (59). Jedan od 50 pacijenata istočnoazijskog podrijetla nosi fenotip slabog metabolizatora, stoga genotipiziranje *NUDT15* u ovoj populaciji može biti od posebne kliničke važnosti. Preporuke vezane za doziranje tiopurina s obzirom na genotip *NUDT15* ne razlikuju se od onih vezanih za genotip *TPMT* – u homozigota za varijantu gena *NUDT15* c.415C>T predlaže se odabir alternativne terapije, a u slučaju heterozigotnosti, savjetuje se prepoloviti dozu azatioprina

čime se postiže učinkovitost usporediva s dozama primijenjenima u pacijenata koji nisu nositelji polimorfizama.

Genetičke razlike koje dovode do promijenjene biotransformacije lijekova imaju veliki značaj u odrasloj populaciji, međutim, malo je podataka o njihovoj ulozi u djece jer su farmakogenetička ispitivanja u dječjoj populaciji ograničenog opsega. Istodobno, nuspojave lijekova su češće među pedijatrijskom populacijom te se ne moraju nužno predvidjeti prema iskustvima odraslih. Trenutno se farmakogenetičke preporuke za primjenu tiopurina u pedijatriji ne razlikuju od preporuka za odrasle (59).

6. ZAKLJUČAK

Prema rezultatima ovog istraživanja, najčešći polimorfizam gena *TPMT* u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva bio je *TPMT*3A*. Navedeno se podudara s rezultatima ranije provedenih istraživanja u hrvatskoj populaciji. Najveći broj zahtjeva za analizom *TPMT* bio je upućen od izabраниh doktora primarne zdravstvene zaštite na preporuku liječnika specijaliste.

Genotipizacija *TPMT* je koristan alat za probir bolesnika oboljelih od upalne bolesti crijeva koji imaju povećan rizik od ozbiljne nuspojave – mijelotoksičnosti, prilikom primjene standardnih doza azatioprina. Uvid u status genotipa *TPMT* prije uvođenja terapije može doprinijeti smanjenju rizika za razvoj hematopoetske toksičnosti. Kod osoba koji su heterozigoti ili homozigoti za mutirani alel zbog čega imaju reduciranu enzimsku aktivnost *TPMT*-a, potrebno je prilagoditi početnu dozu kao i daljnju titraciju doze.

Primjena farmakogenetike i farmakogenomike, u konceptu personalizirane medicine, može omogućiti uvid u individualno predviđanje odgovora na terapiju i na taj način imati veliki doprinos u poboljšanju učinkovitosti i sigurnosti primjene lijekova. Ipak, implementacija rezultata farmakogenomike u kliničku praksu zaostaje za dosadašnjim spoznajama o koristima koje ovo polje medicine može pružiti. Očekivanja su da će u narednim desetljećima u kontekstu individualiziranog pristupa liječenju ova disciplina značajno pridonijeti zdravstvenoj skrbi za bolesnika.

7. LITERATURA

1. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020;5(1):17-30.
2. Gower-Rousseau, Salomez JL, Dupas JL i sur. Incidence of inflammatory bowel disease in northern France (1988-1990). *Gut* 1994;35:1433-8.
3. Devlin HB, Datta D, Dellipiani AW. The incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in North Tees Health District. *World J Surg* 1980;4:183-93.
4. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R i sur. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south ? Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD). *Gut* 1996; 39:690-7.
5. Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 1991;100:143-9.
6. Calkins BM, Lilienfeld AM, Garland CF, Mendeloff AI. Trends in incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1984;29:913-20.
7. Acheson ED. The distribution of ulcerative colitis and regional enteritis in United States veterans with particular reference to the Jewish religion. *Gut* 1960;1:291-3.
8. Ekblom A, Helmick C, Zack M i sur. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 1991;100:350.
9. Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH i sur. Incidence and prevalence of Crohn's disease in the county of Copenhagen, 1962-87: a sixfold increase in incidence. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:609.
10. Loftus EV Jr, Silverstein MD, Sandborn WJ i sur. Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gut* 2000;46:336.
11. Podolsky DK. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* 2002;347:417-29.
12. Satsangi J, Jewell DP, Bell JI. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40:572.
13. Tysk C, Lindberg E, Järnerot G i sur. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29:990.

14. Orholm M, Binder V, Sørensen TI i sur. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1075.
15. Saleh M, Elson CO. Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog. *Immunity* 2011;34:293.
16. Marušić M i sur. Upalne bolesti crijeva: od etiologije do terapije. Monografija za liječnike. Klinika za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku, KB Sveti Duh.
17. Vucelić B. Upalne bolesti crijeva. U: *Gastroenterologija i hepatologija*. Vucelić B. i sur., urednici, Zagreb, Medicinska naklada 2002;723-60.
18. Vucelić B, Čuković-Čavka S, Banić M i sur. Hrvatski konsenzus o liječenju upalnih bolesti crijeva biološkom terapijom *Acta Med Croatica* 2013;67:75-87.
19. Agencija za lijekove i medicinske proizvode - HALMED. Sažetak opisa svojstava lijeka.
20. Frei P, Biedermann L, Haagen Nielsen O i sur. Use of thiopurines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2013;19:1040–8.
21. Azathioprine, <https://go.drugbank.com/drugs/DB00993>, pristupljeno 02.12.2020.
22. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM i sur. Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clin Pharmacol Ther* 2012;92(4):414-7.
23. Reynolds NJ, Sinha A, Elias MS i sur. Translating translation into patient benefit for atopic eczema. *British Journal of Dermatology* 2016;175:8-12.
24. Konidari A, Matary WE. Use of thiopurines in inflammatory bowel disease: Safety issues. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2014;5(2):63-76.
25. Tiede I, Fritz G, Strand S i sur. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* 2003;111(8): 1133-45.
26. Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 1995;39:456–9.
27. Dewit O, Vanheuverzwyn R, Desager JP i sur. Interaction between azathioprine and aminosalicylates: an in vivo study in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(1):79-85.

28. Oselin K, Anier K. Inhibition of human thiopurine S-methyltransferase by various nonsteroidal anti-inflammatory drugs in vitro: a mechanism for possible drug interactions. *Drug Metab Dispos* 2007;35(9):1452-4.
29. Lysaa RA, Giverhaug T, Wold HL i sur. Inhibition of human thiopurine methyltransferase by furosemide, bendroflumethiazide and trichlormethiazide. *Eur J Clin Pharmacol* 1996;49(5):393-6.
30. L. Lennard. Biotransformation. U: *Comprehensive Toxicology*, McQueen CA, urednik. Elsevier Science 2010; 435-57.
31. Weinshilboum RM, Raymond FA, Pazmino PA. Human erythrocyte thiopurine methyltransferase: radiochemical microassay and biochemical properties. *Clin Chim Acta* 1978;85:323-33.
32. Weinshilboum R. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug Metab Dispos* 2001;29:601-5.
33. Weinshilbourn RM, Sladek SL. *Am J Hum* 1980;32:651-62.
34. Van Loon J, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase biochemical genetics: human lymphocyte activity. *Biochem Genet* 1982;20:637-58.
35. Woodson LC, Dunnette JH, Weinshilboum RM. Pharmacogenetics of human thiopurine methyltransferase: kidney-erythrocyte correlation and immunotitration studies. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;222:174-81.
36. Szumlanski CL, Honchel R, Scott MC i sur. Human liver thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: biochemical properties, liver-erythrocyte correlation and presence of isozymes. *Pharmacogenetics* 1992;2:148-59.
37. Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ i sur. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:949-53.
38. Otterness DM, Szumlanski CL, Wood TC i sur. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics kindred with a terminal exon splice junction mutation that results in loss of activity. *J Clin Invest* 1998;101:1036-44.
39. Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG i sur. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6444-9.
40. Krynetski E, Evans WE. Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. *Oncogene* 2003;22:7403-13.

41. Collie-Duguid ES, Pritchard SC, Powrie RH i sur. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics* 1999;9:37–42.
42. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T i sur. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance *Ann Intern Med* 1997;126:608–16.
43. Hogarth LA, Redfern CP, Teodoridis JM i sur. The effect of thiopurine drugs on DNA methylation in relation to TPMT expression. *Biochem Pharmacol* 2008;76:1024-35.
44. Loit E, Tricco AC, Tsouros S i sur. Pre-analytic and analytic sources of variations in thiopurine methyltransferase activity measurement in patients prescribed thiopurine-based drugs: A systematic review. *Clin Biochem* 2011;44:751–7.
45. Ulf Hindorf, Malin Lindqvist Appell. Genotyping should be considered the primary choice for pre-treatment evaluation of thiopurine methyltransferase function. *J Crohns Colitis* 2012;6(6):655-9.
46. Serpe L, Calvo PL, Muntoni E i sur. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics in a large-scale healthy Italian-Caucasian population: differences in enzyme activity. *Pharmacogenomics* 2009;10:1753–65.
47. Klemetsdal B, Wist E, Aarbakke J. Gender difference in red blood cell thiopurinemethyltransferase activity. *Scand J Clin Lab Invest* 1993;53:747-9.
48. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing. *Clin Pharm Therapeutics* 2011;89(3):387-91.
49. Feuerstein JD, Nguyen G, Kupfer SS i sur. Therapeutic Drug Monitoring in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2017;153(3):827-34.
50. Coenen MJH, de Jong DJ, van Marrewijk i sur. Identification of Patients with Variants in TPMT and Dose Reduction Reduces Hematologic Events during Thiopurine Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2015;149:907–17.
51. Newman WG, Payne K, Tricker K i sur. A pragmatic randomized controlled trial of thiopurine methyltransferase genotyping prior to azathioprine treatment: the TARGET study. *Pharmacogenomics* 2011;12(6):815-26.
52. Annotation of DPWG Guideline for azathioprine and TPMT. <https://www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166104934>, pristupljeno 20.02.2020.

53. Ladić A. Polimorfizam gena tiopurinmetiltransferaze u bolesnika s upalnom bolešću crijeva. Doktorski rad. 2018. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet.
54. Kapitanovic S, Jokic M, Jurisic G. TPMT Gene polymorphisms in Croatian population. Abstracts of the European Human Genetics Conference 2006 in European Journal of Human Genetics. Amsterdam: Nature Publishing Group 2006, 353.
55. Desatova B, Hlavaty T, Balakova D i sur. Prevalence of mutations in thiopurine S-methyltransferase gene among Slovak IBD patients. Bratisl Lek Listy 2013;114(6):330-2.
56. Steponaitiene R, Kupcinskas J, Survilaite S i sur. TPMT and ITPA genetic variants in Lithuanian inflammatory bowel disease patients: Prevalence and azathioprine-related side effects. Adv Med Sci 2016;61(1):135-40.
57. Zalizko P, Stefanovics J, Sokolovska J i sur. Thiopurine S-methyltransferase genetic polymorphisms in adult patients with inflammatory bowel diseases in the Latvian population. Ther Adv Gastroenterol 2020;13:1-8.
58. Relling MV, Schwab M, Whirl-Carillo M i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine dosing based on TPMT and NUDT15 genotypes: 2018 update. Clin Pharmacol Ther 2019;105(5):1095-105.
59. Božina N i sur. Farmakogenomika u pedijatrijskoj populaciji. Paediatr Croat 2017;61:184-92.