

# Terapijsko praćenje metabolita tiopurina u bolesnika s upalnim bolestima crijeva

---

Ćurić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:213012>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-06**



Repository / Repozitorij:

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



**Iva Ćurić**

**Terapijsko praćenje metabolita tiopurina u  
bolesnika s upalnim bolestima crijeva**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Toksikologija na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen je u Laboratoriju za multidisciplinarnu primjenu kromatografije na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mile Lovrić.

*Zahvaljujem svima koji su omogućili da privedem studij kraju i pomogli mi u pisanju ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog studiranja.*

*Hvala što ste vjerovali u mene i gurali me naprijed.*

*Posebno hvala mojoj motivaciji, mom Mateju.*

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Upalne bolesti crijeva.....	1
1.1.1. Crohnova bolest .....	4
1.1.2. Ulcerozni kolitis.....	5
1.2. Tiopurini.....	7
1.2.1. Azatioprin .....	8
1.2.2. 6-merkaptopurin.....	10
1.2.3. 6-tiogvanin.....	12
1.2.4. Tiopurin-S-metiltransferaza.....	13
1.3. Terapijsko praćenje lijekova.....	14
1.3.1. Terapijsko praćenje metabolita tiopurina .....	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	17
3. MATERIJALI I METODE .....	18
3.1. Materijali .....	18
3.1.1. Uzorci .....	18
3.1.2. Oprema .....	18
3.1.3. Kemikalije .....	18
3.1.4. Laboratorijski pribor .....	19
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Obrada uzoraka .....	20
3.2.2. Ekstrakcija uzoraka .....	20
3.2.3. Kromatografski uvjeti .....	21
3.2.4. Priprema mobilne faze.....	22
3.2.5. Priprema kontrolnih uzoraka i kalibratora.....	23
3.3. Statističke metode.....	23
4. REZULTATI.....	24
4.1. Klinički i demografski podaci ispitanih bolesnika .....	24
4.1.1. Koncentracije 6-MMP i 6-TG i dob ispitanika.....	26
4.1.2. Raspodjela koncentracija metabolita tiopurina prema terapijskom intervalu .....	31

5. RASPRAVA.....	34
5.1. Koncentracije 6-MMP i 6-TG ovisno o dobi pacijenata.....	35
5.2. Raspodjela ispitanika prema terapijskim koncentracijama .....	36
6. ZAKLJUČAK .....	39
7. LITERATURA .....	40
8. Sažetak .....	43
9. Prilozi.....	45
9.1. Popis kratica .....	45
Temeljna dokumentacijska kartica	

# 1. UVOD

## 1.1. Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva (*engl. Inflammatory bowel disease - IBD*) su idiopatske, kronične bolesti gastrointestinalnog sustava nepredvidiva tijeka u čijoj je osnovi imunski poremećaj, a primarno uključuju Crohnovu bolest (CB) i ulcerozni kolitis (UK). Etiologija im nije u potpunosti poznata, međutim čimbenici koji se povezuju s razvojem bolesti dijele se na imunosne, genetske i okolišne čimbenike. Pojavnost bolesti veća je 3 do 20 puta kod bliskih srodnika u odnosu na ostalu populaciju. Imunosni čimbenici podrazumijevaju disfunkciju regulacije imunskog sustava što dovodi do povećanog lučenja proupalnih citokina, IFN- $\gamma$  (interferon gama) i TNF- $\alpha$  (tumor nekrotski faktor alfa) koji izazivaju transmuralnu upalu kod CB; dok su kod UK posrednici upale pomagački T-limfociti koji luče proupalne interleukine: IL-4, IL-5 i IL-13. Smatra se da neki mikroorganizmi mogu doprinijeti razvoju IBD poput rodova *Salmonella*, *Shigella*, *Helicobacter*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Clostridia*; dok dugotrajna terapija oralnim kontraceptivima i pušenje povećavaju rizik nastanka Crohnove bolesti (Mohan, 2010). Istraživanja su pokazala da se IBD češće javljaju u razvijenijim zemljama i to u Sjevernoj Europi te kod Anglosaksonaca, a zastupljene su kod svih dobnih skupina, najčešće kod osoba mlađih od 30 godina, između 14. i 24. godine ([www.msd-prirucnici.hr](http://www.msd-prirucnici.hr)).

IBD se pretežito dijagnosticiraju kolonoskopijom, endoskopskom metodom koja se temelji na vizualnom pregledu cijelog debelog i dijela tankog crijeva pomoću fleksibilne cijevi s kamerom ili slikovnim metodama dijagnostike poput UZV i magnetske rezonance (MR).

U terapiji se koristi nekoliko skupina lijekova čiji odabir ovisi o težini bolesti. 5-aminosalicilati (5-ASA) poput sulfasalazina, olsalazina i balsalazida čiji je aktivni oblik mesalamin, svoj protuupalni učinak ostvaruju lokalno u epitelnim stanicama kolona. Točan mehanizam djelovanja nije u potpunosti utvrđen, no smatra se da inhibiraju sintezu proupalnih prostaglandina i leukotriena, smanjuju adheziju i funkciju leukocita, inhibiraju sintezu citokina, aktiviraju PPAR- $\gamma$  receptore i dr. Koriste se za indukciju i održavanje remisije.

Mogući neželjeni učinci su mučnina, nadutost, dijareja, glavobolja te hematološke i bubrežne nuspojave koje zahtijevaju redovitu kontrolu krvne slike i urina. Primjena 5-ASA kontraindicirana je kod osoba s oštećenjem jetre i bubrega te kod ulkusne bolesti.

Kortikosteroidi se uvode u terapiju kod akutnog blagog do srednje teškog oblika bolesti u slučaju izostanka učinka 5-ASA, ali su neprikladni za održavanje remisije. Najčešće se koriste budezonid, hidrokortizon, prednizon te prednizolon. Vezanjem za glukokortikoidne receptore inhibiraju medijatore upale što dovodi do snažnog protuupalnog djelovanja. Oralna terapija traje nekoliko tjedana, a prekida se postupnim smanjenjem doze. Kod dugotrajne primjene postoji opasnost od neželjenih sistemskih učinaka kao što su glaukom, hipertenzija, povećana sklonost infekcijama, osteoporoza i dr.

Imunomodulatori poput tiopurina koriste se kod refraktornih, jakih oblika bolesti i oralno za održavanje remisije. Oni kompetitivno inhibiraju biosintezu nukleotida u stanicama. Zatim se koristi antagonist folata, metotreksat, koji izravno inhibira učinak i proliferaciju upalnih stanica te stimulira njihovu apoptozu. U stanicama se prevodi u aktivni poliglutamtni oblik koji se dugo zadržava u tkivima i manje je toksičan, ali njegov nedostatak je odgođeno djelovanje, mogući hepatoksični učinci i mijelosupresija (smanjenje funkcije koštane srži). Nužna je istovremena primjena folne kiseline kako bi se smanjili neželjeni učinci lijeka i povećala adherencija bolesnika. Primjenjuje se intramuskularno kod bolesnika s Crohnovom bolesti koji ne podnose tiopurine.

Takrolimus je imunomodulator koji inhibira stvaranje proupalnih citokina, aktivaciju i proliferaciju T-stanica, a koristi se kao zadnja linija liječenja kod aktivne bolesti rezistentne na kortikosteroide te za indukciju remisije.

Biološka terapija posljednja je linija liječenja, a uvodi se kod bolesnika kod kojih se nije postigao željeni odgovor na konvencionalnu terapiju. Podrazumijeva primjenu tvari proizvedenih ili izlučenih iz prirodnih izvora kao što su monoklonska protutijela na tumor nekrotski faktor alfa (TNF- $\alpha$ ); primjerice infliksimab, adalimumab, golimumab, zatim humanizirani F<sub>ab</sub> fragment certolizumab pegol te kimerni fuzijski protein etanercept. Ti biološki lijekovi vežu membranski i topljivi TNF- $\alpha$  te tako sprječavaju njegovo vezanje za receptore; smanjuju sintezu i lučenje proupalnih citokina i induciraju apoptozu upalnih stanica. Primjenjuju se u obliku intravenskih infuzija ili supkutanih injekcija, a njihova primjena osim željenih učinaka može dovesti do neželjenih, poput povećane sklonosti infekcijama, stvaranja autoprotutijela i sl. Osim protutijela na TNF- $\alpha$  koristi se i vedolizumab, specifično

monoklonsko protutijelo za integrin  $\alpha 4\beta 7$  na pomagačkim T-limfocitima koji inhibira adheziju integrina na mukoznu molekulu (MadCAM-1) u endotelu crijeva i posljedično smanjuje upalu. Primjenjuje se intravenskom infuzijom, a primjena može povećati rizik nastanka progresivne multifokalne leukoencefalopatije, virusne infekcije mozga uzrokovane humanim polio virusom (Bach-Rojecky, 2018).

U terapiji Crohnove bolesti ponekad se koriste i antibiotici. Baktericidni antibiotik metronidazol može uspješno kontrolirati umjereni oblik bolesti i pospješiti cijeljenje fistula, a mikroorganizme ubija interakcijom s DNA, kojom inhibira sintezu nukleinskih kiselina patogena. Međutim zbog nuspojava, posebice neurotoksičnosti, prednost se daje upotrebi fluorokinolona ciprofloksacina koji inhibicijom topoizomeraza II i IV djeluje baktericidno, a podnošljiviji je od metronidazola ([www.msd-prirucnici.hr](http://www.msd-prirucnici.hr)).

Svakodnevna primjena probiotika, odnosno živih organizama koji pridonose očuvanju zdravlja domaćina, kod ovih bolesti može spriječiti nastanak "pouchitis-a" tj. upale ilealnog spremnika i potencijalno može pomoći kod održavanja remisije, ali o tome nema dovoljno kliničkih dokaza.

Osim farmakoterapije, nekim bolesnicima promjena prehrambenih navika može olakšati probavne tegobe poput dijareje, abdominalnih bolova, nadutosti i sl., međutim ne postoje općenite prehrambene smjernice, već se prehrana individualno prilagođava. Također, poželjno je što manje izlaganje stresu i stresnim situacijama jer postoji korelacija između stresa i pogoršanja simptoma bolesti. Kod bolesnika kojima se bolest ne uspijeva kontrolirati farmakoterapijom i u slučaju nastanka komplikacija, nužan je kirurški zahvat. Kod ulceroznog kolitisa provodi se kolektomija odnosno odstranjenje debelog crijeva zahvaćenog upalom, a kod Crohnove bolesti resekcija zahvaćenog segmenta crijeva.

Kolektomijom se eliminira nastanak kolorektalnog karcinoma, dok kirurški zahvati kod CB poboljšavaju kvalitetu života bolesnika, ali ne sprječavaju ponovni nastanak bolesti.



### 1.1.1. Crohnova bolest

Američki gastroenterolog Burrill Bernard Crohn prvi je opisao slučajeve Crohnove bolesti 1932.godine, iako su upalne bolesti crijeva bile poznate i u 18.stoljeću (Mulder i sur., 2014). Incidencija je 1 do 6 oboljelih na 100 000 stanovnika, a bolest se češće javlja u sjevernijim zemljama, kod žena i pušača (Hovde i sur., 2012).

CB obično je lokalizirana u distalnom ileumu i kolonu, iako može nastati u bilo kojem dijelu probavnog trakta. Karakterizirana je kroničnom transmuralnom upalom što znači da zahvaća cijelu crijevnu stijenku. Bolešću zahvaćeni segmenti crijeva jasno su odijeljeni od normalnog crijeva; odatle i drugi naziv: regionalni enteritis. Bolest započinje kriptalnom upalom i apscesima (nakupine gnoja) koji mogu napredovati do dubokih ulceracija uz edem sluznice što crijevu daje karakterističan izgled. Transmuralno širenje upale dovodi do oteklina nastalih nakupljanjem tekućine u međustaničnom prostoru, odnosno limfedema, zadebljanja stijenke crijeva i mezenterija, a nerijetko dolazi i do opstrukcije crijeva ([www.msd-prirucnici.hr](http://www.msd-prirucnici.hr)). Najveći problem su komplikacije poput malapsorpcije zbog smanjene apsorpcije masti, vitamina B<sub>12</sub>, proteina i elektrolita te čestih apscesa i fistula koje prodiru u susjedne strukture. Maligna oboljenja tankog crijeva mogu nastati kao kasna komplikacija bolesti, iako se češće javljaju kod ulceroznog kolitisa (Mohan, 2010).

Ne postoji jedinstvena dijagnostička metoda za Crohnovu bolest. Dijagnoza se postavlja na temelju procjene rezultata krvnih pretraga, kliničkih simptoma, nalaza slikovne dijagnostike, endoskopije i biopsije crijeva. Najraširenija dijagnostička metoda je ileokolonoskopija, a provode se i slikovne metode poput ultrasonografije, računalne tomografije i magnetske rezonance (Ha i sur., 2015). Provodi se i mikrobiološka analiza stolice radi isključenja parazitskih i bakterijskih infekcija.

Uobičajeni simptomi su učestali proljevi praćeni abdominalnim bolovima, gubitak tjelesne težine, vrućica, a moguće su i primjese krvi u stolici. Kod djece su prvotno izraženije ekstraintestinalne manifestacije u odnosu na gastrointestinalne, poput artritisa, vrućice nepoznate etiologije, anemije ili zastoja rasta ([www.msd-prirucnici.hr](http://www.msd-prirucnici.hr)).

Bolest je praćena egzacerbacijama i remisijama, ali se uz prikladnu farmakoterapiju te po potrebi kiruršku, većini bolesnika poboljša kvaliteta života i omogući normalno funkcioniranje.

Unatoč kroničnoj bolesti većina bolesnika doživi očekivani životni vijek. Kod bolesnika s dijagnosticiranom CB postoji povećan rizik nastanka karcinoma crijeva zahvaćenog upalom.

### **1.1.2. Ulcerozni kolitis**

Iako prvi podaci o kroničnim dijarejama datiraju još iz doba antike, termin "ulcerozni kolitis" prvi je upotrijebio Samuel Wilks 1859.godine (Mulder i sur, 2014). Ulcerozni kolitis je kronična upalna bolest za koju su karakteristične ulceracije sluznice debelog crijeva. Bolest se obično prvo javlja u rektumu, gdje može ostati lokalizirana (ulcerozni proktitis) ili se širi proksimalno, ponekad na cijeli kolon. U mukozni se stvaraju linearne i površinske ulceracije koje najčešće ne prodiru u mišićni sloj. Zbog pseudoplastične regeneracije sluznice mogu se pojaviti pseudopolipi (Mohan, 2010). Kod težih oblika bolesti mogu nastati veliki ulkusi s gnojnim eksudatom, međutim za razliku od CB, nema nastanka fistula i apscesa. Moguće komplikacije koje nastaju zbog širenja upale su galopirajući kolitis i toksični megakolon. U oba slučaja dolazi do dilatacije kolona, dok kod toksičnog megakolona mogu nastati i perforacije koje povećavaju mortalitet ([www.msd-prirucnici.hr](http://www.msd-prirucnici.hr)).

Uz kolonoskopiju koja je nužna za potvrdu dijagnoze, provodi se i mikrobiološka analiza stolice zbog isključenja parazitskih infekcija te laboratorijske pretrage radi probira anemije, hipoalbuminemije te elektrolitskog disbalansa. Mjerenje koncentracije fekalnog kalprotektina, koji je povišen u upalnoj fazi, nije specifično za dijagnostiku, ali korisna je metoda za praćenje tijeka bolesti (Lynch i sur., 2019).

Najčešći simptom bolesti su proljevi s primjesama krvi i sluzi, različitog trajanja i intenziteta, koji mogu biti praćeni grčevima donjeg dijela abdomena. U pojedinim slučajevima krvarenje može biti toliko intenzivno da je neophodna hitna transfuzija. Kod težih oblika bolesti nerijetko se javlja opća slabost, vrućica, anemija, gubitak tjelesne težine, čak i anoreksija.

Tijekom trajanja bolesti izmjenjuju se faze aktivnosti i remisije. Odgovarajuća terapija i praćenje tijeka bolesti, većini bolesnika omogućuje dobru kvalitetu života. Oboljeli imaju povećan rizik nastanka karcinoma debelog crijeva koji je proporcionalan trajanju bolesti i

duljini zahvaćenog segmenta crijeva. Redovite kolonoskopije i biopsije crijeva omogućavaju uvid u stanje bolesti te pravovremeno otkrivanje eventualno nastalog karcinoma.

**Tablica 1.** Usporedba Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa

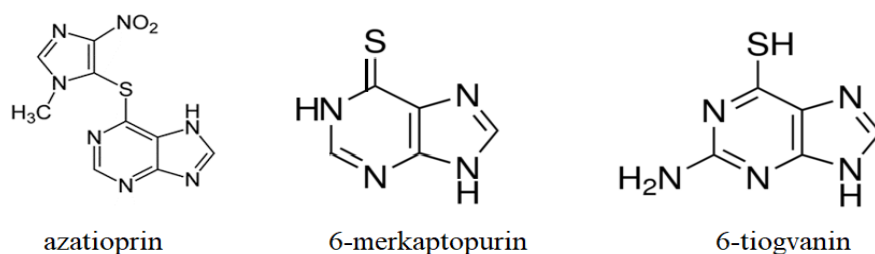
<b>Značajka</b>	<b>Crohnova bolest</b>	<b>Ulcerozni kolitis</b>
<i>Incidencija</i>	1-6/100 000, češće kod pušača	2-10/100 000, rjeđe kod pušača
<i>Distribucija</i>	Segmentalna	kontinuirana
<i>Lokacija</i>	terminalni ileum i/ili uzlazni kolon	rektum (moguće proksimalno širenje)
<i>Ulceracije</i>	vijugave, moguća pretvorba u fisure	površinske
<i>Pseudopolipi</i>	rijetko prisutni	često prisutni
<i>Fibroza</i>	Česta	rijetka
<i>Upala</i>	Transmuralna	mukozna i submukozna
<i>Najčešći simptomi</i>	abdominalni bolovi, proljev, mršavljenje, zastoj rasta	krvavi proljev
<i>Maligne promjene</i>	Rijetke	češće kod bolesti trajanja duljeg od 10 godina

## 1.2. Tiopurini

Lijekovi iz skupine tiopurina su azatioprin (AZA), 6-merkaptopurin (6-MP) te 6-tiogvanin (6-TG). To su imunomodulatorni lijekovi koji su na tržištu više od 60 godina jer su se pokazali djelotvornima u terapiji reumatoidnog artritisa, sistemskog eritemskog lupusa, psorijaze, upalnih bolesti crijeva, akutne limfoblastične leukemije, akutne mijeloične leukemije kod djece te autoimunog hepatitisa (Sahasranaman i sur., 2008).

Mehanizam djelovanja im nije u potpunosti razjašnjen, no smatra se da inhibiraju sintezu purina *de novo*, proliferaciju i funkciju limfocita, najvažnijih stanica stečene imunosti. Azatioprin i 6-merkaptopurin su prolijekovi koji ostvaruju imunosupresivni učinak biotransformacijom u aktivni metabolit 6-tiogvanin nukleotid (6-TGN) koji se zbog strukturne sličnosti s endogenom purinskom bazom gvaninom ugrađuje u DNA i posljedično uzrokuje pucanje lanca molekule. Nadalje, smatra se da 6-tiogvanin trifosfat (6-TGTP) pridonosi supresiji imunskog sustava inhibicijom Rac1 čime se inducira apoptoza T-limfocita koji su iznimno važni u imunskom odgovoru. Rac1 je GTP-aza koja ima ulogu u inhibiciji apoptoze T-stanica. 6-TGTP se umjesto GTP (gvanozin trifosfat) veže na Rac1 i sprječava aktivaciju ciljnih gena poput protein kinaze aktivirane mitogenom, NF- $\kappa$ B i bcl-x<sub>L</sub> (Derijks i sur., 2006).

Tiopurini su strukturno vrlo slični spojevi, imaju zajedničku osnovnu molekulsku strukturu. Sadrže dva kondenzirana heterociklička prstena, imidazolski i pirimidinski, a razlikuju se po supstituentima na položaju C6 i u amino skupini na C2 položaju kod 6-TG. Za razliku od 6-MP i 6-TG, azatioprin ima još jednu cikličku strukturu, metilnitroimidazol koji je tioeterskom vezom povezan s tiopurinskim kosturom molekule.



**Slika 1.** Strukturne formule tiopurina (www.drugbank.ca)

### 1.2.1. Azatioprin

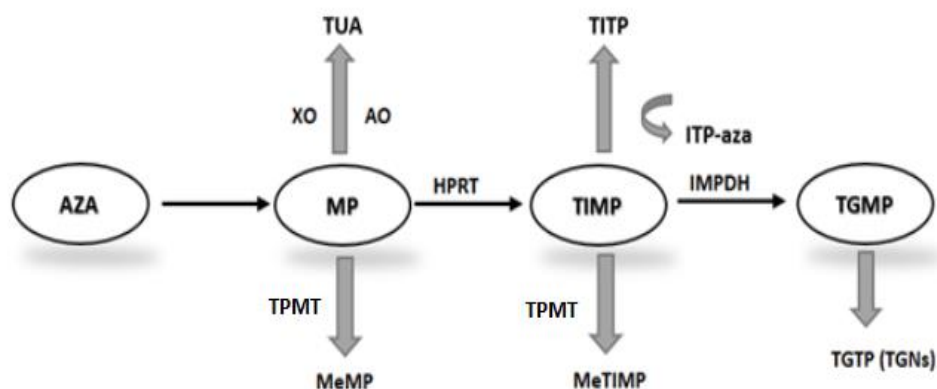
#### *Općenito*

Azatioprin je prolijek 6-merkaptopurina, sintetiziran 1957.godine. Registrirani oblici u Republici Hrvatskoj su filmom obložene tablete, Atsimutin i Imuran. AZA se primjenjuje kao imunosupresiv u monoterapiji ili češće u kombinaciji s ostalim lijekovima (kao što su kortikosteroidi) i postupcima koji imaju imunomodulatorni učinak na organizam. Indiciran je za poboljšanje preživljenja transplahiranih organa, liječenje umjerene do teške upalne bolesti crijeva, a koristi se i u terapiji teškog reumatoidnog artritisa, sistemskog eritemskog lupusa, dermatomiozitisa i polimiozitisa, vulgarnog pemfigusa, nodoznog poliarteritisa, autoimune hemolitičke anemije, autoimunog kroničnog aktivnog hepatitisa te kronične refraktorne idiopatske trombocitopenične purpure ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

#### *Farmakokinetika*

Apsorpcija nakon oralne primjene je promjenjiva, a bioraspoloživost varira od 27% do 83%. Vršne plazmatske koncentracije postižu se 1 do 2 sata nakon primjene.

AZA se brzo raspodjeljuje po tijelu, oko 30% lijeka se veže za proteine plazme, a vrijeme polueliminacije ( $t_{1/2}$ ) iznosi 3 do 5 sati. Tijekom prva 24h do 50% doze izluči se urinom, a unutar 48h oko 13% fecesom. Biotransformacija azatioprina je relativno složena, a sastoji se od međusobno konkurentnih procesa kojima prethodi konverzija u 6-MP uz oslobađanje metilnitroimidazola. AZA i 6-MP brzo se eliminiraju iz krvi te se oksidiraju ili metiliraju u eritrocitima i jetri. Nakon 8h nijedan se više ne može detektirati u urinu. Metaboličke reakcije uključuju tri važna enzima: hipoksantin-fosforibozil-transferazu (HPRT), tiopurin-S-metiltransferazu (TPMT) i ksantin-oksidadu (XO). HPRT katalizira konverziju AZA/MP u 6-tioinozin monofosfat (6-TIMP) koji se nadalje uz TPMT, inozin-monofosfat-dehidrogenazu (IMPDH) i gvanozin-monofosfat-sintetazu (GMPS) metabolizira u aktivni citotoksični metabolit, 6-tiogvaninski nukleotid (6-TGN). IMPDH izravno konvertira 6-TIMP u 6-TGN čime se izbjegava nastanak potencijalno hepatotoksičnog intermedijera 6-metilmerkaptopurin ribonukleotida (6-MMPR) koji može ograničiti fosforilaciju tiopurina. 6-MP se inaktivira na dva načina; ksantin-oksidadza katalizira oksidaciju u inaktivnu 6-tiouričnu kiselinu, dok TPMT katalizira metilaciju u 6-metilmerkaptopurin (6-MMP).



**Slika 2.** Shema biotransformacije tiopurina (prilagođeno prema Warner i sur., 2016)

### *Nuspojave*

Vrsta, učestalost i intenzitet nuspojava ovise o dozi, trajanju terapije, ostalim lijekovima u terapiji i komorbiditetima. Najčešći neželjeni učinci azatioprina su hematološki i gastrointestinalni. Učestale hematološke nuspojave uključuju smanjenje funkcije koštane srži, koje je reverzibilno i proporcionalno dozi, a manifestira se kao trombocitopenija, leukopenija i anemija; rjeđe se javljaju agranulocitoza, aplastična anemija, pancitopenija i sl. Mučnina, povraćanje, dijareja, steatoreja (masna stolica) i pankreatitis su češće gastrointestinalne nuspojave. Primjena AZA također može biti povezana s pojavom onkoloških bolesti kao što su karcinom cerviksa, non-Hodgkinov limfom te Kaposijev sarkom, kod 1 do 10% bolesnika. Kod manje od 1/10 bolesnika upotreba može dovesti do hepatičke disfunkcije, a hepatotoksični učinak koji uključuje povećanje razine alkalne fosfataze, bilirubina i/ili serumskih transaminaza, a manifestira se kolestazom (smanjenje ili zastoj protoka žuči) i/ili akutnom fokalnom hepatocelularnom nekrozom, javlja se rijetko, kod 1% bolesnika ([www.drugs.com](http://www.drugs.com)).

U trudnoći se ne preporuča primjena AZA bez pažljive procjene rizika i koristi obzirom da se pokazao teratogeni i embriotoksični učinak u ispitivanjima na životinjama; dok je njegova upotreba kod dojilja kontraindicirana.

### *Doziranje i način primjene*

Početna dnevna doza u načelu iznosi od 1 do 3 mg/kg tjelesne težine te se prilagođava sukladno kliničkom odgovoru (koji može postati vidljiv tek nakon nekoliko tjedana ili mjeseci) i hematološkoj podnošljivosti. Nakon pojave vidljivog terapijskog odgovora, razmatra se smanjenje doze na najnižu učinkovitu dozu održavanja koja se također kreće između 1 i 3 mg/kg tjelesne težine ovisno o bolesniku. Kod osoba s oštećenom funkcijom jetre i/ili bubrega te kod djece, koriste se najniže učinkovite doze. Azatioprin je kontraindiciran kod osoba s teškom jetrenom insuficijencijom. Optimalna primjena je s najmanje jednom čašom tekućine za vrijeme obroka kako bi se smanjila pojava mučnina ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

### *Predožiranje*

LD<sub>50</sub>, odnosno letalna doza za 50% testiranih bolesnika/jedinki iznosi za miševe 2500mg/kg, a štakore 400mg/kg tjelesne težine. Vrlo visoke doze mogu dovesti do hipoplazije koštane srži, krvarenja, različitih infekcija pa čak i smrti ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)).

## **1.2.2. 6-merkaptopurin**

### *Općenito*

Dobitnici Nobelove nagrade, Gertrude Elion i George Hitchings zaslužni su za otkriće 6 - merkaptopurina 1952.godine. Na tržištu u RH nalazi se kao merkaptopurin monohidrat, u obliku oralne suspenzije pod registriranim nazivom Xaluprine. Indiciran je za liječenje akutne limfoblastične leukemije kod odraslih, adolescenata i djece ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

### *Farmakokinetika*

Kliničke studije pokazale su da je apsorpcija 6-merkaptopurina nakon oralne primjene nepotpuna i varijabilna, a u prosjeku se apsorbira 50% primijenjene doze. Lijek se veže za proteine plazme prosječno 19%. Biotransformacija je analogna azatioprinu, nizom reakcija aktivira se u citotoksični 6 -tiogvaninski nukleotid (6-TGN), a inaktivaciju katalizira ksantin-

oksidaza u tiouričnu kiselinu koja se izlučuje urinom, odnosno TPMT u metilirani metabolit, 6-MMP. Približno 7% oralne doze izlučuje se kao nepromijenjeni 6-MP unutar 12h nakon primjene. Vrijeme polueliminacije za 6-MP iznosi prosječno 90min, dok je za metabolite dulje, oko 5h.

### *Nuspojave*

Najvažnija nuspojava izazvana primjenom 6-MP je supresija koštane srži koja dovodi do leukopenije i trombocitopenije. Česti neželjeni učinci su hepatotoksičnost i moguća nekroza jetre, zastoj žuči, stomatitis, probavne tegobe (dijareja, mučnina, povraćanje), anoreksija, anemija, može se javiti i osip na koži te artralgiya. Rijetke i vrlo rijetke nuspojave podrazumijevaju pojavu dobroćudnih, zloćudnih i nespecificiranih novotvorina, alopecije, edema lica, ulceracije donjeg dijela probavnog trakta, a javljaju se kod jedne osobe na 1000, odnosno 10 000 ljudi. U trudnoći se ne preporuča primjena 6-MP bez pažljive procjene rizika i koristi obzirom da se pokazao embriotoksični i za embrij fatalni učinak u ispitivanjima na životinjama; dok je njegova upotreba za vrijeme dojenja kontraindicirana.

### *Doziranje i način primjene*

Doza se prilagođava ovisno o moguće nastalim hematotoksičnim učincima i individualnim potrebama bolesnika. Početna dnevna doza kreće se između 25 i 75mg/m<sup>2</sup> tjelesne površine. Preporuča se smanjenje početne doze kod bolesnika s bubrežnom i jetrenom insuficijencijom. Kod istovremene primjene inhibitora ksantin-oksidaze, potrebno je smanjiti dozu 6-MP. Lijek je potrebno primijenjivati uvijek na isti način, optimalno je navečer tijekom obroka ili natašte, sat vremena prije ili 2 sata poslije konzumacije mlijeka i mliječnih proizvoda.

### *Predoziranje*

Prvi simptomi predoziranja su probavne tegobe, mučnina, dijareja, povraćanje i anoreksija. Kod kroničnog predoziranja bit će izraženija hematotoksičnost, a može doći i do disfunkcije jetre te gastroenteritisa. Rizik predoziranja povećan je kod istodobne primjene inhibitora



ksantin-oksidade. Potrebno je redovito kontrolirati krvnu sliku kako bi se spriječile teške nuspojave. LD<sub>50</sub> kod miševa iznosi 480 mg/kg, a za štakore je niža vrijednost i iznosi 425 mg/kg.

### **1.2.3. 6-tiogvanin**

#### *Općenito*

Antineoplastik tiogvanin razvijen je 1950.godine, a na području Republike Hrvatske nije registriran. Koristi se u terapiji nekoliko vrsta leukemije, posebice kod akutne mijeloične leukemije. Aktivni metaboliti tiogvanina ugradnjom u DNA u S-fazi staničnog ciklusa sprječavaju ugradnju endogenih nukleotida u DNA i posljedično zaustavljaju rast, razvoj i diobu stanica.

#### *Farmakokinetika*

Farmakokinetički parametri 6-tiogvanina nisu u potpunosti definirani. Apsorpcija oralno primijenjenog lijeka je nepotpuna i varijabilna; kreće se od 14% do 46%, a prosječna iznosi 30%. Metaboličkim reakcijama 6-TG prevodi se u aktivne tiogvanozin mono-, di- i trifosfate. Vrijeme polueliminacije iznosi 80 min.

#### *Toksičnost*

Simptomi predoziranja uključuju mučninu, povraćanje, slabost, pojačano znojenje i hipotenziju. Letalna doza za 50% jedinki izmjerena kod miševa iznosi 160mg/kg ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)).

#### 1.2.4. Tiopurin-S-metiltransferaza

Tiopurin-S-metiltransferaza citosolni je enzim najvećim dijelom lokaliziran u jetri i eritrocitima, a ključan je u regulaciji metabolizma tiopurina jer katalizira S-metilaciju kojom ih prevodi u inaktivni oblik. Kodiran je TPMT genom koji se nasljeđuje autosomno kodominantnim putem. U populaciji se javljaju genetski polimorfizmi za TPMT koji uzrokuju varijabilnu aktivnost enzima što pridonosi razvoju individualne osjetljivosti na tiopurine, kao i razvoju neželjenih učinaka. Otprilike 90% bijele rase su homozigoti za divlji tip TPMT-gena koji ima normalnu ili visoku enzimatsku aktivnost; 10% su heterozigoti za umjerenu enzimatsku aktivnost, dok je 0,5% homozigot za nisku aktivnost enzima. Kod snižene aktivnosti TPMT dolazi do povećanog stvaranja citotoksičnih 6-tiogvaninskih nukleotida s čime je povezan povećan rizik nastanka leukopenije (smanjen broj leukocita u krvi) zbog koje se povećava sklonost infekcijama. Kod ovih bolesnika ne preporuča se upotreba tiopurina, a ako se primjenjuju onda su to niske doze i redovno se kontrolira krvna slika. S druge strane, kod visoke aktivnosti enzima, pojačano je stvaranje 6-MMP umjesto 6-TGN što može rezultirati izostankom kliničkog učinka i pojavom hepatotoksičnosti.

Dosad je pronađeno više od 30 varijanti polimorfnih alela za TPMT, od kojih TPMT\*2, TPMT\*3A, TPMT\*3B i TPMT\*3C imaju najveći utjecaj na smanjenje enzimatske aktivnosti. Većina ovih alelnih varijanti sadrži polimorfizam jednog nukleotida koji dovodi do supstitucije aminokiseline te time do novog proteinskog produkta. Alel TPMT\*3A koji se najčešće pojavljuje u populaciji bijelaca sadrži dvije mutacije: G460A i A719G, što dovodi do zamjene alanina u treonin te tirozina u treonin, a najčešći alel kod žute i crne rase, TPMT\*3C, sadrži A719G mutaciju – zamjenu tirozina za treonin (Ladić, 2018).

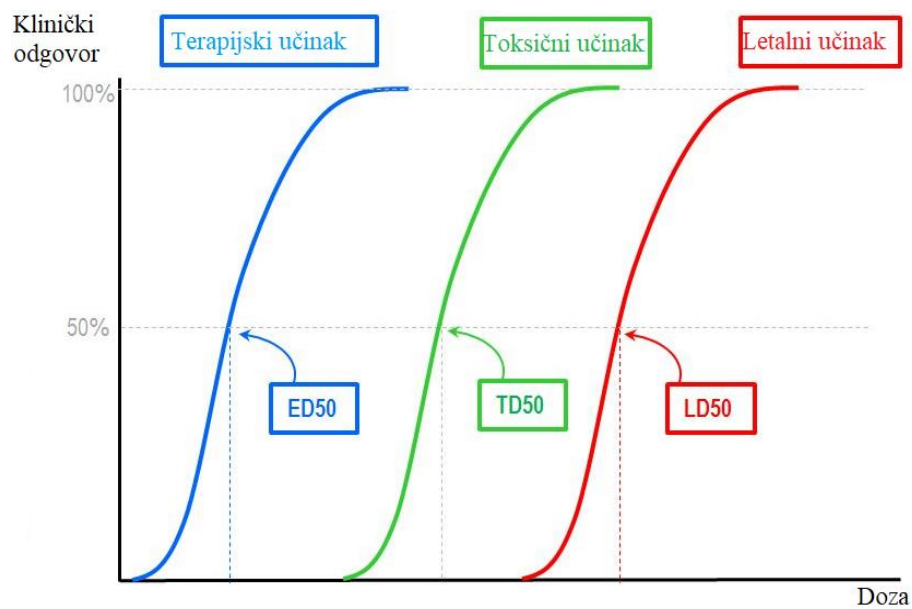
### 1.3. Terapijsko praćenje lijekova

U kliničkoj praksi se zbog varijabilnosti odgovora na farmakoterapiju stavlja naglasak na individualizaciju terapije koja podrazumijeva prilagodbu terapije potrebama pojedinog bolesnika prema čimbenicima koji najviše mogu utjecati na klinički odgovor. Varijabilnost može biti farmakokinetička koja nastaje zbog razlika u apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i eliminaciji, odnosno farmakodinamička koja je posljedica genetskih i imunskih razlika. Pridonosi joj i dob, trudnoća, interakcije lijekova, genetika, etnička pripadnost, bolesti i sl. Individualizacija terapije je posebno važna kod rizičnih bolesnika kao što su djeca, trudnice, osobe starije životne dobi i one s bubrežnom i/ili jetrenom insuficijencijom te kod lijekova uske terapijske širine i onih koji izazivaju ozbiljne nuspojave čak i u terapijskim koncentracijama.

Terapijsko praćenje lijekova (*engl. therapeutic drug monitoring - TDM*) provodi se u kliničkoj praksi od 1970.godine u svrhu individualizacije terapije. TDM podrazumijeva određivanje koncentracije lijeka odnosno njegovih metabolita u biološkim tekućinama s ciljem optimizacije terapije za pojedinog bolesnika. Koristi se kad postoji korelacija između primijenjene doze lijeka i koncentracije u krvi, odnosno terapijskog učinka i/ili nuspojava i koncentracije lijeka u biološkom materijalu (Slika 3.) Provodi se na početku terapije ili nakon promjene doze lijeka, a omogućuje određivanje optimalnog režima doziranja koje ovisi o dobi bolesnika, tjelesnoj težini, funkciji organa i ostalim lijekovima u terapiji. TDM je značajno kod lijekova uske terapijske širine (npr. digoksin), onih s varijabilnom farmakokinetikom, značajnim nuspojavama te kada se teško postižu ciljane koncentracije lijeka. Terapijsko praćenje lijekova indicirano je kad odgovor na terapiju nije jasan, ne postoje jednostavno mjerljivi učinci lijeka, su simptomi trovanja slični simptomima osnovne bolesti, se želi otkriti razlog neuspješnosti terapije (subdoziranost, adherencija, slaba djelotvornost lijeka) ili kad se očekuje promjena uobičajene farmakokinetike lijeka (Bačić-Vrca, 2019). Preporuča se kod nekih antibiotika, antiepileptika, antimetabolita, imunosupresiva, teofilina, različitih lijekova za kardiovaskularne bolesti i antidepresiva.

Kod provođenja TDM potrebno je odabrati odgovarajući uzorak iz biološkog materijala, odrediti točno vrijeme uzorkovanja, razviti i validirati metodu određivanja koncentracije u biološkom materijalu, poznavati farmakokinetičke parametre lijeka i odrediti laboratorijske parametre bolesnika. Osim navedenih čimbenika, kod interpretacije rezultata potrebno je voditi

računa o čimbenicima koji mogu utjecati na rezultate kao što su dob, vrsta i težina bolesti, kliničko stanje koje može promijeniti vezanje lijeka na proteine plazme, prisutnost farmakološki aktivnih metabolita i mogućih farmakokinetičkih interakcija s ostalom terapijom.



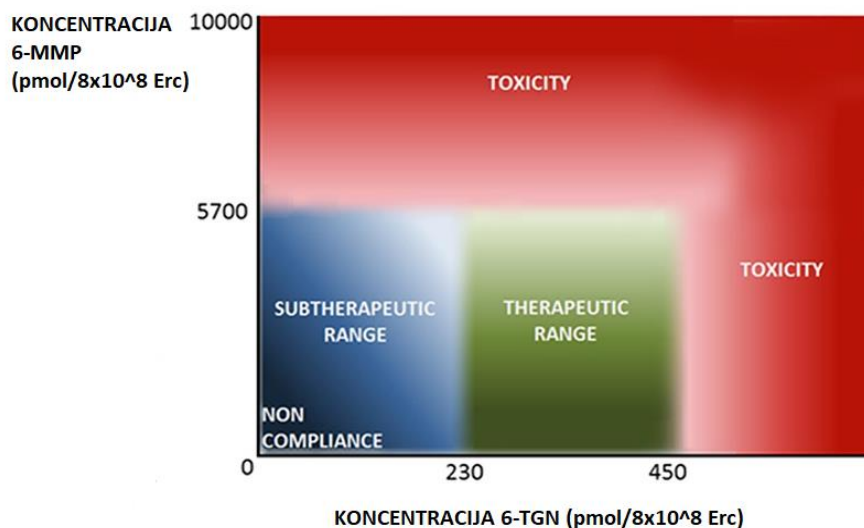
**Slika 3.** Odnos doze lijeka i kliničkog odgovora (prilagođeno prema Lowe i sur., 2012)

### 1.3.1. Terapijsko praćenje metabolita tiopurina

Mjerenje koncentracija metabolita tiopurina, odnosno 6-TGN i 6-MMP u eritrocitima pokazalo se korisnim 4-6 tjedana nakon početka terapije, odnosno nakon postizanja stanja dinamičke ravnoteže (*engl. steady-state*) tj. kada je brzina unosa jednaka brzini gubitka lijeka. Stanje dinamičke ravnoteže obično se postiže nakon 5 vremena polueliminacije ( $t_{1/2}$ ), pod uvjetom da je doza ostala nepromijenjena.

Meta-analizama dobiven je terapijski raspon za metabolit 6-TGN od 235 do 450 pmol/  $8 \times 10^8$  eritrocita, a on podrazumijeva raspon između najniže i najviše učinkovite koncentracije lijeka koja ne izaziva toksične učinke. S druge strane, rizik leukopenije raste proporcionalno koncentracijama većim od 450 pmol/  $8 \times 10^8$  eritrocita. Koncentracije 6-MMP veće od 5700 pmol/  $8 \times 10^8$  eritrocita vrlo vjerojatno će izazvati hepatotoksične učinke (Slika 4.). Kod 15 do 20% bolesnika kao posljedica hipermetilacije javlja se omjer koncentracija 6-MMP/6-TGN veći od 11, a povezuje se s neodgovarajućim kliničkim odgovorom. U takvim slučajevima postoji opcija uvođenja alopurinola, inhibitora ksantin-oksidadze u terapiju kako bi se poboljšala bioraspodjeljivost 6-MP i smanjila razgradnja u tiouričnu kiselinu (Warner i sur., 2016)

Terapijskim praćenjem metabolita tiopurina kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva određuje se optimalni režim doziranja koji će osigurati odgovarajući klinički odgovor i minimalizirati neželjene učinke.



**Slika 4.** Odnos koncentracije metabolita tiopurina i kliničkog odgovora (prilagođeno prema Simsek i sur., 2017)

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Upalne bolesti crijeva karakterizirane su izmjeničnim fazama relapsa i remisije bolesti, a svrha liječenja je postizanje dugotrajne remisije.

Najčešće korišteni tiopurini, azatioprin i 6-merkapotpurin su imunosupresivni lijekovi koje koristi oko 60% bolesnika s upalnim bolestima crijeva jer su dokazano učinkoviti u održavanju remisije. Jedna trećina bolesnika mora prekinuti terapiju zbog neželjenih učinaka; leukopenije koju izazivaju povišene koncentracije 6-tiogvaninskih nukleotida (6-TGN), pankreatitisa, gastrične intolerancije i hepatotoksičnosti zbog visokih koncentracija 6-metil -merkaptopurina (6-MMP). Mogući izvor varijabilnosti u odgovoru na terapiju tiopurinima su genetski polimorfizmi koji uzrokuju promijenjenu enzimatsku aktivnost tiopurin-S -metiltransferaze (TPMT) što može rezultirati neodgovarajućim kliničkim odgovorom i pojavom nuspojava.

Terapijsko praćenje metabolita tiopurina omogućava predviđanje kliničkog odgovora, pojave neželjenih učinaka i otkrivanje neadherencije bolesnika što pridonosi pronalasku optimalnog režima doziranja ili potrebi za prekidom terapije.

Ciljevi rada su :

- odrediti koncentraciju metabolita tiopurina, 6-TG i 6-MMP u krvi bolesnika s upalnim bolestima crijeva u stanju dinamičke ravnoteže HPLC metodom
- izračunati metilacijski indeks iz dobivenih koncentracija
- utvrditi ovisnost koncentracija metabolita prije i nakon ujednačavanja prema dozi o dobi ispitanika
- procijeniti koncentracije metabolita prema terapijskom rasponu i indeksu metilacije.

Usporedbom i statističkom obradom dobivenih koncentracija metabolita u eritrocitima i koncentracija ujednačenih prema dnevnoj dozi, zaključuje se o prikladnosti terapije i eventualnoj potrebi za korekcijom u svrhu dobrobiti pojedinog bolesnika.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Uzorci**

U svrhu ispitivanja korištena je puna krv 100 bolesnika na terapiji tiopurinima uzorkovana u epruvete s antikoagulansom (EDTA). Kontrolni uzorci, kao i kalibratori izrađeni su iz početnih otopina matičnica 6-MMP i 6-TG dobivenih otapanjem standarda 6 -metilmerkaptopurina (Sigma), odnosno 6-tiogvanina (Sigma).

##### **3.1.2. Oprema**

Za analizu je korišten HPLC-2 Prominence SHIMAZDU sustav koji sadrži:

- 2 pumpe (LC-20AD)
- otplinjavač (DGU-20A<sub>3</sub>)
- autoinjektor (SIL-20AC<sub>HT</sub>)
- pećnicu (CTO-20AC)
- spektrofotometrijski detektor s diodnim nizom (SPD-M20A)
- kontrolnu jedinicu (CBM-20A)

##### **3.1.3. Kemikalije**

- 6-tiogvanin (Sigma)
- 6-metilmerkaptopurin (Sigma)
- pročišćena voda (HPLC čistoće < 0,060 μS/cm)
- kalijev dihidrogen fosfat (20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 2,25) - pufer
- ortofosforna kiselina (85%) za podešavanje pufera
- ditiotreitrol (DTT; Sigma)
- metanol
- natrijev hidroksid (1M NaOH)
- acetonitril
- fiziološka otopina (0,9% NaCl)

- perklorna kislina (70%)

#### **3.1.4. Laboratorijski pribor**

- plastične epruvete
- vorteks (IKA Genius 3)
- analitička vaga
- odmjerne tikvice, staklene čaše
- pH-metar
- celulozni filter papir s porama 0,45 $\mu$ m (Milipore)
- tamna boca
- hladna komora
- avtomatske pipete (Eppendorf)
- staklene pipete i propipeta
- vodoravna tresilica PROMAX 1020 (Helidolph)
- centrifuga (Hettich zentrifugen Rotofix 32)
- digestor i sustav za uparavanje
- plastične kapaljke
- eppendorf epruvete
- hladnjak
- vodena kupelj pri 100°C (Memmert)
- staklene epruvete s navojem
- vialice (bočice za injektiranje)



## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Obrada uzoraka**

Krv se uzorkuje u epruvete s antikoagulansom (EDTA) bolesnicima koji su na terapiji tiopurinima najmanje 4 tjedna kako bi se u organizmu postiglo stanje dinamičke ravnoteže. Neposredno nakon uzorkovanja epruvete s uzorcima stave se u smjesu vode i leda. Nakon dostave uzoraka u laboratorij napravi se kompletna krvna slika na hematološkom analizatoru. Na epruvetama se označi razina do koje su napunjene krvlju te se uzorci pune krvi centrifugiraju 5 minuta na 3500 okretaja/min. Nakon prvotnog centrifugiranja, ukloni se plazma (gornji sloj), doda se 3 mL fiziološke otopine (0,9% NaCl) za ispiranje eritrocita, lagano se promiješa i ponovno centrifugira 5 minuta na 3500 okretaja/min. Zatim se pažljivo ukloni supernatant i sloj leukocita, epruvete se lagano promiješaju, doda se 3 mL fiziološke otopine i centrifugira pri istim uvjetima. Ponovno se ukloni supernatant, a ako zaostane sloj leukocita, suspenzija se kratko vorteksira. Epruvete se nadopune pročišćenom vodom, ohlađenom u smjesi vode i leda, do oznake do koje su bile napunjene krvlju u svrhu liziranja eritrocita te se vorteksiraju. Zatim se sadržaj prebaci u eppendorfice koje se potom centrifugiraju 5 minuta na 10 000 okretaja/min. Dobiveni supernatanti pojedinog uzorka pomiješaju se u plastičnoj epruveti od 5 mL, vorteksiraju i alikvotiraju u dvije prethodno označene eppendorfice. Tako pripremljeni lizat eritrocita potreban za daljnju analizu zamrzne se na -20°C sve do analize.

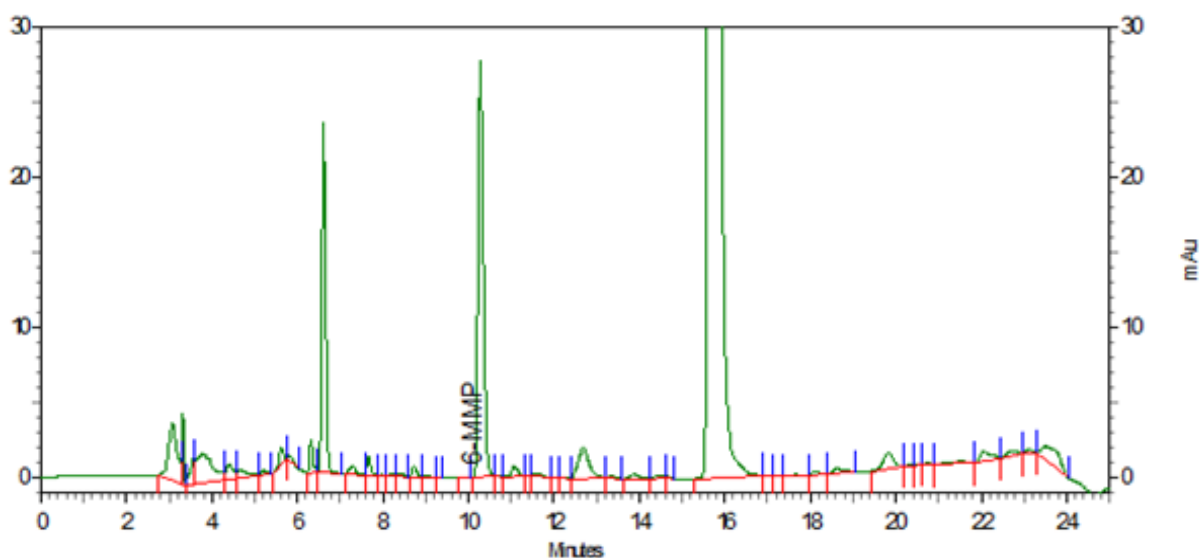
### **3.2.2. Ekstrakcija uzoraka**

U obilježene eppendorf epruvete od 1,5 mL doda se 500 µL lizata eritrocita (uzorka/ kontrolnog uzorka/ kalibratora), 50 µL 0,5M ditionitrola (dobivenog otapanjem 0,077 g u 1 mL vode) koji štiti tiolne skupine od oksidacije tijekom procesa deproteinizacije i 100 µL 70% perklorne kiseline koja služi za deproteinizaciju. Epruvete se kratko vorteksiraju i stave u hladnjak na -20°C. Nakon hlađenja se vorteksiraju oko 1 minutu sve dok se čestice taloga ne razdvoje i centrifugiraju 10 minuta na 10 000 okretaja/min. Dobiveni supernatant pojedinog uzorka prebaci se u staklenu epruvetu s navojem koja se potom zatvori čepom. Uzorci se griju 45 minuta na vodenoj kupelji prethodno zagrijanoj na 100°C prilikom čega 6-MMP i 6-metilinozin nukleotidi prelaze u derivat 4-amino-5-(metil) tiokarbonil imidazol (AMTCI) koji se kasnije mjeri te 6-TGN u 6-TG. Nakon toga se ohlade u ledenoj kupelji (voda i led).

Zatim se kratko vorteksiraju, prebace u eppendorf epruvete od 1,5 mL i centrifugiraju 5 minuta na 10 000 okretaja/min. Naposljetku se 200  $\mu$ L dobivenog supernatanta otpipetira u vialu s insertom.

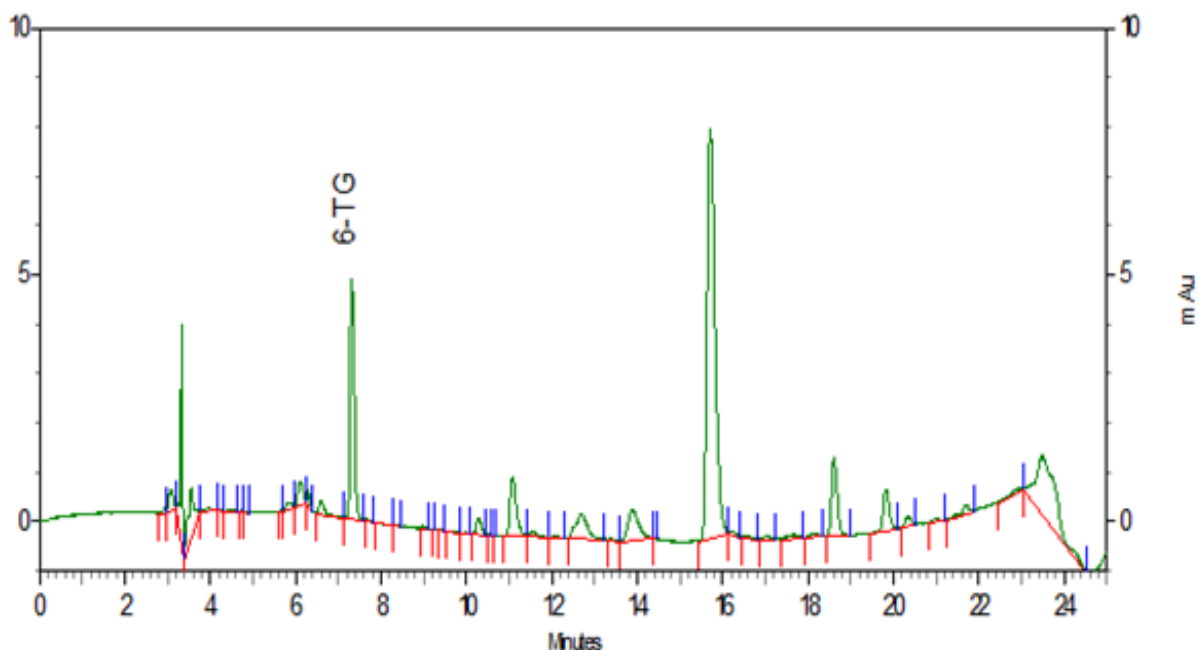
### 3.2.3. Kromatografski uvjeti

- analitička kolona Xbridge C18 5  $\mu$ m, dimenzija 4,6 x 200 mm, grijana u pećnici na 25°C
- pumpa A (20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 2,25), pumpa B (acetonitril : metanol = 3 : 1)
- program gradijentnog protoka mobilne faze (0,9 mL/min): početno pumpa B 0%, a pumpa A 100%, zatim pumpa B 30% linearno kroz 20 min pa 5 minuta pumpa B 0%, ukupno vrijeme analize 25 minuta
- detektor s nizom fotodioda tijekom mjerenja snima spektar u UV području; valna duljina za mjerenje 6-MMP je na 303 nm, a za 6-TG 342 nm
- vrijeme zadržavanja 6-MMP je 10,4 min, a 6-TG 7,4 min
- autoinjektor: volumen injiciranja uzorka je 20  $\mu$ L



Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Units
6-MMP	10,283	235850	15,517	$\mu\text{mol/L}$

**Slika 5.** Kromatogram dobiven analizom uzorka bolesnika na 303 nm, čija izračunata koncentracija 6-MMP u odnosu na broj eritrocita iznosi 2887 pmol/ $8 \times 10^8$  Erc



Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Units
6-TG	7,317	32857	2,414	$\mu\text{mol/L}$

**Slika 6.** Kromatogram dobiven analizom uzorka bolesnika na 342 nm, čija izračunata koncentracija 6-TG u odnosu na broj eritrocita iznosi  $449 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Erc}$

### 3.2.4. Priprema mobilne faze

Pomoću menzure prenese se 150mL acetonitrila i 50 mL metanola u tamnu bocu kako bi se dobila smjesa volumnog omjera 3:1. Pufer za mobilnu fazu izradi se otapanjem 2,72 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u 600 mL vode HPLC čistoće. pH pufera podese se pomoću pH-metra i 85% ortofosforne kiseline na 2,25. Nakon toga prelije se u odmjernu tikvicu od 1 L koja se zatim nadopuni do oznake. Dobivena otopina filtrira se kroz celulozni filter 0,45  $\mu\text{m}$  (Milipore), prelije u tamnu bocu i pohrani na  $+4^\circ\text{C}$  u hladnu komoru.

### 3.2.5. Priprema kontrolnih uzoraka i kalibratora

Matičnica 6-MMP izradi se otapanjem 0,01g 6-metilmerkaptopurina (Sigma) u metanolu u odmjerne tikvici od 10 mL i nadopunom do oznake. Matičnica 6-TG napravi se otapanjem 0,01 g 6-tiogvanina (Sigma) u prethodno pripravljenom 1M NaOH u odmjerne tikvici od 10 mL i nadopunom do oznake. Otopina 1M NaOH dobije se miješanjem 1,2 mL 50% NaOH i 14,4 mL vode HPLC čistoće u čaši. Kontrolni uzorci i kalibratori pripreme se dodatkom čistih otopljenih tvari, 6-TG i 6-MMP, u lizat eritrocita bolesnika koji nisu na terapiji tiopurinima. Izrade se u plastičnim epruvetama od 5 mL razrjeđivanjem ishodnih matičnica 6-TG i 6-MMP koncentracije 1 g/L vodom HPLC čistoće i kratkim vorteksiranjem. Dobiveni su kontrolni uzorci koncentracija 5; 0,5 i 0,25  $\mu\text{g/mL}$  te kalibratori koncentracija 5; 2,5; 1,0; 0,5 i 0,25  $\mu\text{g/mL}$ . Prilikom ekstrakcije uzoraka bolesnika na terapiji istovremeno se ekstrahiraju i kontrolni uzorci s dodanim standardom (čisti 6-MMP i 6-TG) tzv. „spajkani“ uzorci.

### 3.3. Statističke metode

Računalni programi MedCalc i Microsoft Excel 2013 korišteni su za statističku obradu podataka. Za procjenu normalne raspodjele podataka korišten je D'Agostino-Pearsonov test koji zahtijeva minimalno 8 uzoraka za analizu, a provjerava koliko se dobivene vrijednosti razlikuju od očekivanih kod normalne, odnosno Gaussove raspodjele. U svakom testu normalne raspodjele kreće se od nulhipoteze da podaci slijede Gaussovu raspodjelu koja se odbacuje ili zadržava ovisno o dobivenoj P vrijednosti. Ako je P vrijednost dovoljno malog iznosa ( $< 0,0001$ ) odbacuje se nulhipoteza i smatra se da podaci ne slijede normalnu distribuciju. Za grafički prikaz rezultata korišten je dijagram rasipanja (*engl.* scatter plot). Metoda linearne regresije korištena je za analizu ovisnosti koncentracija metabolita tiopurina o dobi ispitanika.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Klinički i demografski podaci ispitanih bolesnika

Ispitano je 100 bolesnika s upalnim bolestima crijeva čija je dob, primijenjene doze tiopurina te postignute koncentracije metabolita, 6-metilmerkaptopurina i 6-tiogvanina, navedena u Tablici 2.

**Tablica 2.** Dob ispitanika, primijenjene doze tiopurina i koncentracije 6-MMP te 6-TG

<b>N=100</b>	<b>DOB (godine)</b>	<b>DOZA (mg)</b>	<b>6-MMP (pmol/8x10<sup>8</sup> Erc)</b>	<b>6-TG (pmol/8x10<sup>8</sup> Erc)</b>
Minimum	11	50,00	0,00	21,00
Maksimum	65	200,00	13 188,00	653,00
Medijan	40	125,00	916,50	197,00
95 CI		125,00 - 150,00	610,13 - 1246,68	167,72 - 227,38
Percentil 5		75,00	45,50	28,50
Percentil 95		200,00	4755,50	548,50

N – broj uzoraka

Ispitanici su mlađe životne dobi koja se kreće u rasponu od 11 do 65 godina, a medijan vrijednosti iznosi 40 godina. Dnevne doze tiopurina razlikuju se među bolesnicima; najniža primijenjena doza je 50 mg, dok najviša iznosi 200 mg. Koncentracije metabolita tiopurina izražene su u pikomolima po  $8 \times 10^8$  eritrocita. Izmjerene koncentracije 6-MMP kreću se u rasponu od 0 do 13 188 pmol/ $8 \times 10^8$  Erc; dok je medijan koncentracije 916,5 pmol/ $8 \times 10^8$  Erc (95 CI 610,13 – 1246,68). Najniža izmjerena koncentracija 6-TG iznosi 21 pmol/ $8 \times 10^8$  Erc, a najviša 653 pmol/ $8 \times 10^8$  Erc. Medijan koncentracije 6-TG je 197 pmol/ $8 \times 10^8$  Erc (95 CI 167,72 – 227,38).

U Tablici 3. prikazani su omjeri koncentracija metabolita tiopurina kao i omjeri koncentracije metabolita i doze lijeka. Izmjerene koncentracije 6-MMP i 6-TG ( $\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ Erc}$ ) kod bolesnika podijeljene su s dnevnom dozom lijeka (mg) kako bi se koncentracija ujednačila prema dozi ( $\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ Erc}/\text{mg}$ ). Izračunat je i omjer koncentracija 6-MMP/6-TG jer njegov iznos može negativno korelirati s kliničkim odgovorom; omjer veći od 11 povezuje se s pojavom hipermetilacije i neodgovarajućeg kliničkog odgovora.

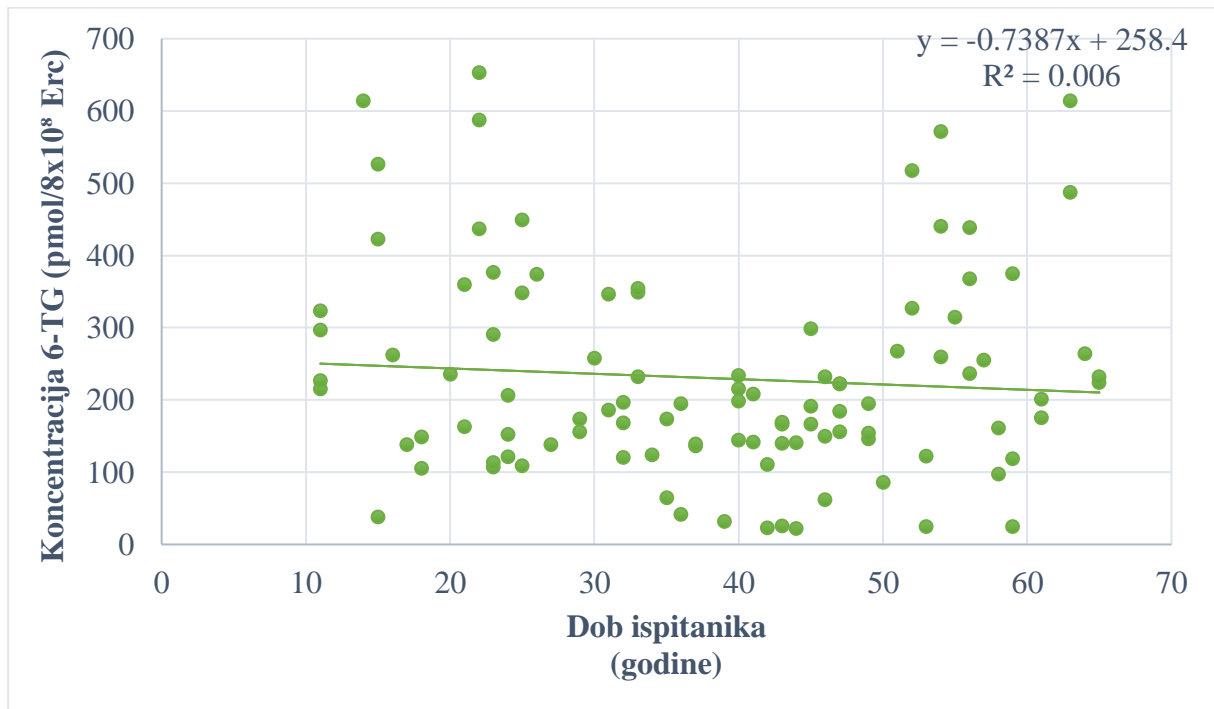
**Tablica 3.** Omjeri koncentracija 6-MMP/6-TG te koncentracija metabolita i doze

	<b>6-MMP/6-TG</b>	<b>6-MMP/DOZA</b> ( $\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ Erc}/\text{mg}$ )	<b>6-TG/DOZA</b> ( $\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ Erc}/\text{mg}$ )
N (broj uzoraka)	100	100	100
Minimum	0,00	0,00	0,12
Maksimum	97,11	65,94	13,05
Medijan	4,97	6,35	1,39
95 CI	3,27 - 6,04	5,01 - 10,16	1,12 - 1,90
Percentil 5	0,35	0,41	0,21
Percentil 95	29,59	34,37	6,00

Najniži zabilježen omjer metabolita tiopurina (6-MMP/6-TG) je 0,00 dok je najveći 97,11, a medijan vrijednosti omjera iznosi 4,97. Omjer metabolita 6-MMP i doze kreće se u rasponu od 0,00 do 65,94 s vrijednosti medijana od 6,35, dok je omjer metabolita 6-TG i doze u rasponu od 0,12 do 13,05 s vrijednosti medijana od 1,39.

#### 4.1.1. Koncentracije 6-MMP i 6-TG i dob ispitanika

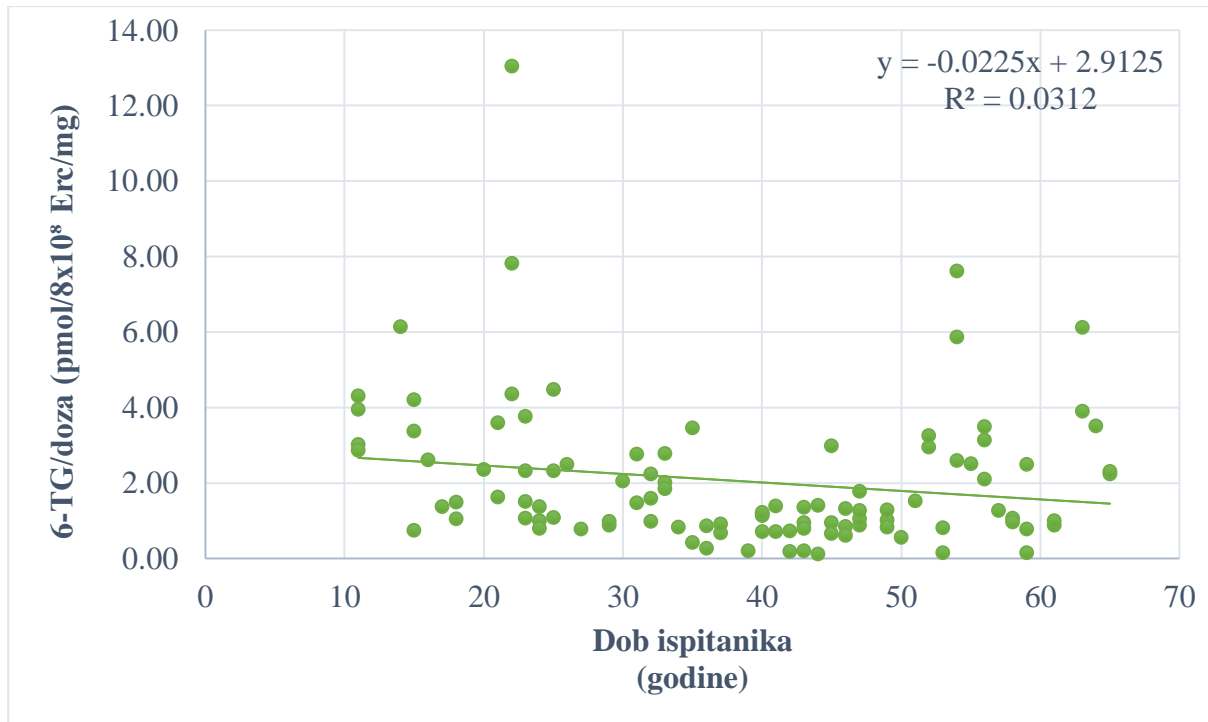
Za procjenu utjecaja dobi ispitanika na primijenjenu terapiju ispitana je ovisnost koncentracija metabolita tiopurina o dobi. Ovisnost izmjerenih koncentracija aktivnog metabolita 6-TG u eritrocitima o dobi ispitanika prikazana je na Slici 7.



**Slika 7.** Ovisnost izmjerenih koncentracija 6-TG o dobi ispitanika

Metodom linearne regresije utvrđen je odnos izmjerenih koncentracija 6-TG i dobi bolesnika. Dijagram rasipanja pokazuje da nema linearne ovisnosti tih dviju varijabli, kao i koeficijent korelacije ( $R^2=0,006$ ) koji iznosi  $r=0,077$ . Koeficijent korelacije pokazatelj je reprezentativnosti regresijskog modela; što mu je vrijednost bliža 1, to postoji veća ovisnost varijabli.

Ovisnost izmjerenih koncentracija aktivnog metabolita 6-TG u eritrocitima ujednačenih prema propisanoj dozi i dobi ispitanika prikazana je na Slici 8.

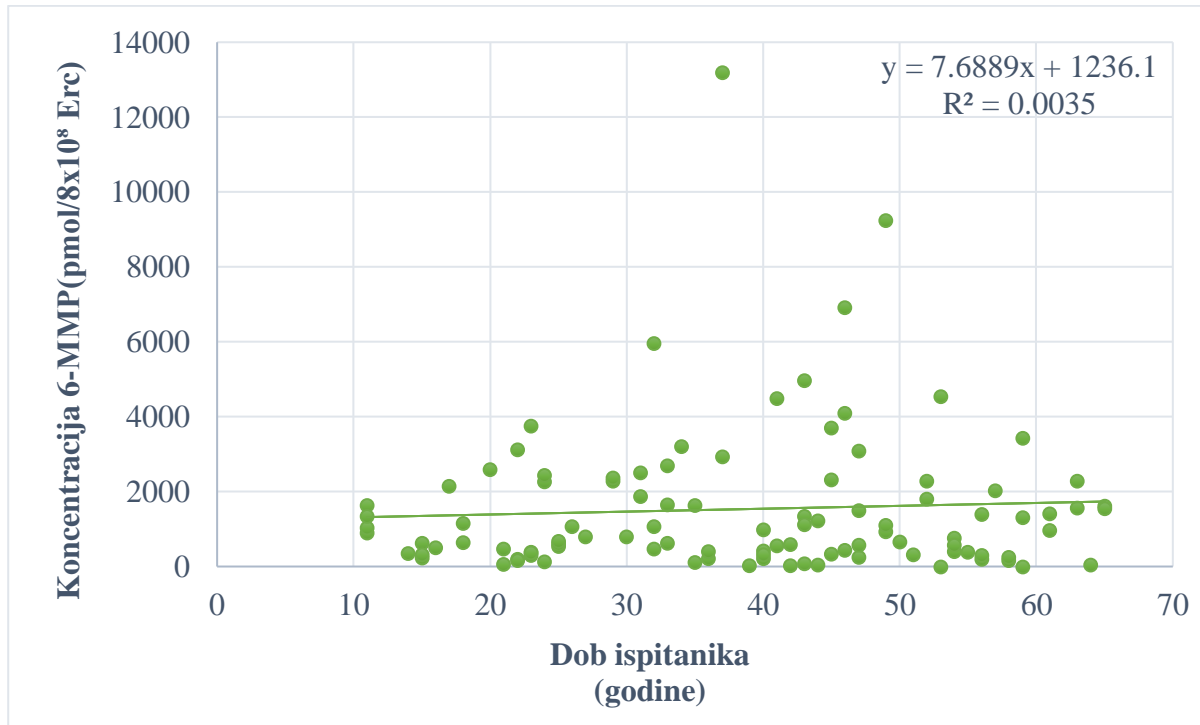


**Slika 8.** Ovisnost koncentracija 6-TG ujednačenih prema dozi o dobi ispitanika

Na grafičkom prikazu (Slika 8.) ovisnosti koncentracija 6-TG ujednačenih prema dnevnoj dozi tiopurina o dobi ispitanika uočava se manje rasipanje koncentracija nakon ujednačavanja u odnosu na same koncentracije, što potvrđuje i koeficijent korelacije ( $r=0,177$ ,  $R^2 = 0,0312$ ) koji je nešto viši u odnosu na vrijednost bez ujednačavanja prema dozi. Iz grafa je vidljivo da se vrijednosti koncentracija 6-TG prije i nakon ujednačavanja prema dozi blago snižavaju porastom životne dobi.



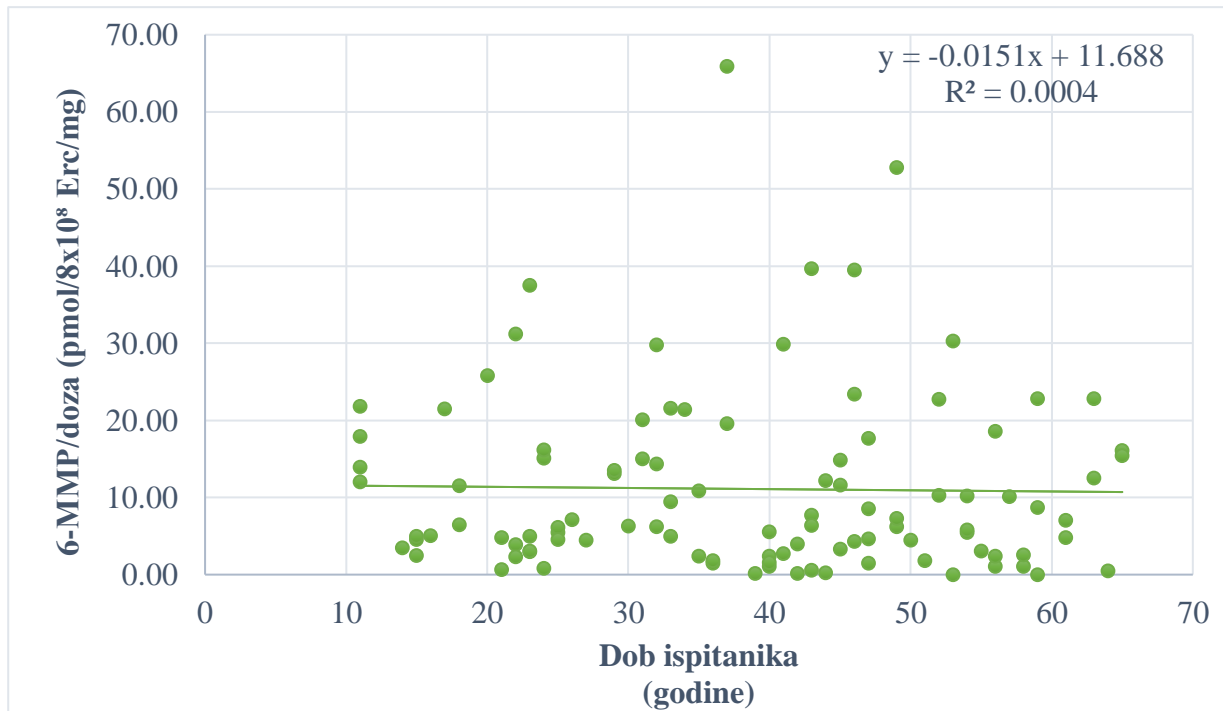
Na Slici 9. prikazana je linearna regresija ovisnosti koncentracija metabolita 6-MMP o dobi ispitanika.



**Slika 9.** Ovisnost izmjerenih koncentracija 6-MMP o dobi ispitanika

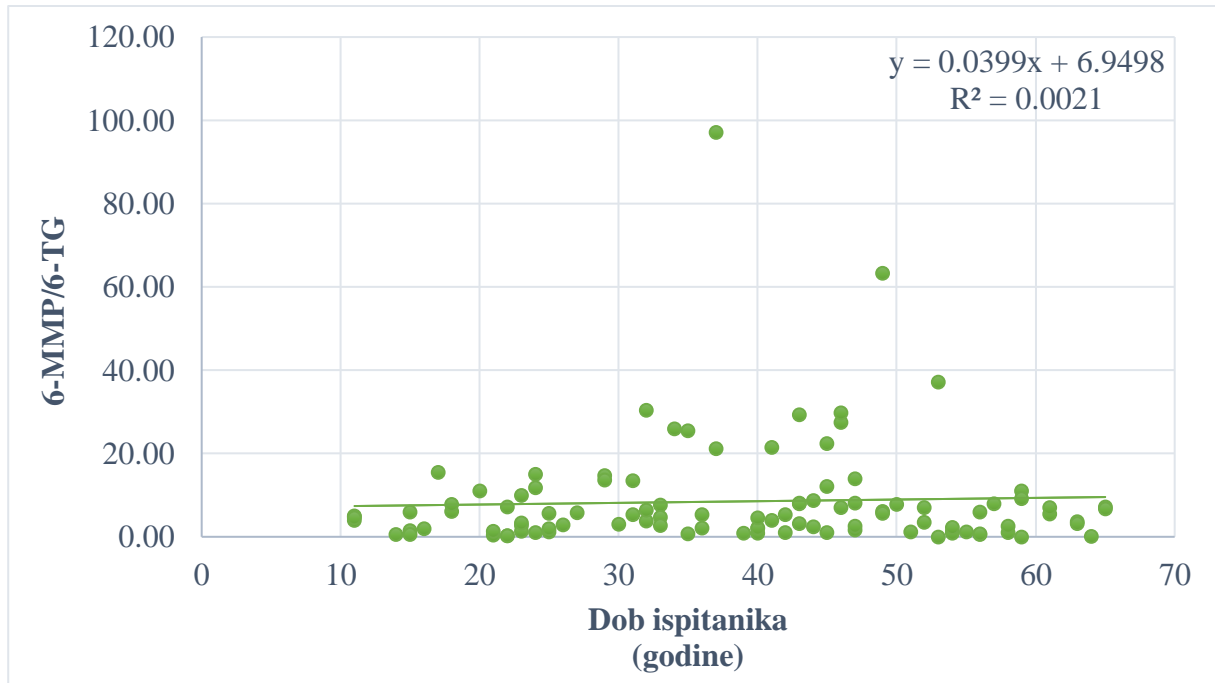
Niska vrijednost koeficijenta korelacije ( $R^2 = 0,0035$ ) iz kojeg proizlazi  $r=0,059$  ukazuje da ne postoji linearna ovisnost tih varijabli. Na grafičkom prikazu uočava se da su kod osoba različite životne dobi izmjerene približno jednake koncentracije, što pokazuje da dob ne utječe na koncentraciju 6-MMP.

Odnos koncentracija 6-MMP ujednačenih prema dnevnoj dozi tiopurina i dobi ispitanika prikazan je na Slici 10. i sličan je odnosu koncentracija 6-MMP i dobi ispitanika. Linearne ovisnosti između dobi i koncentracija 6-MMP ujednačenih prema dozi nema, što potvrđuje i koeficijent korelacije koji iznosi  $r = 0,02$ .



**Slika 10.** Ovisnost koncentracija 6-MMP ujednačenih prema dozi o dobi ispitanika

Na Slici 11. prikazan je odnos omjera koncentracija metabolita tiopurina, 6-MMP/6-TG s dobi ispitanika.

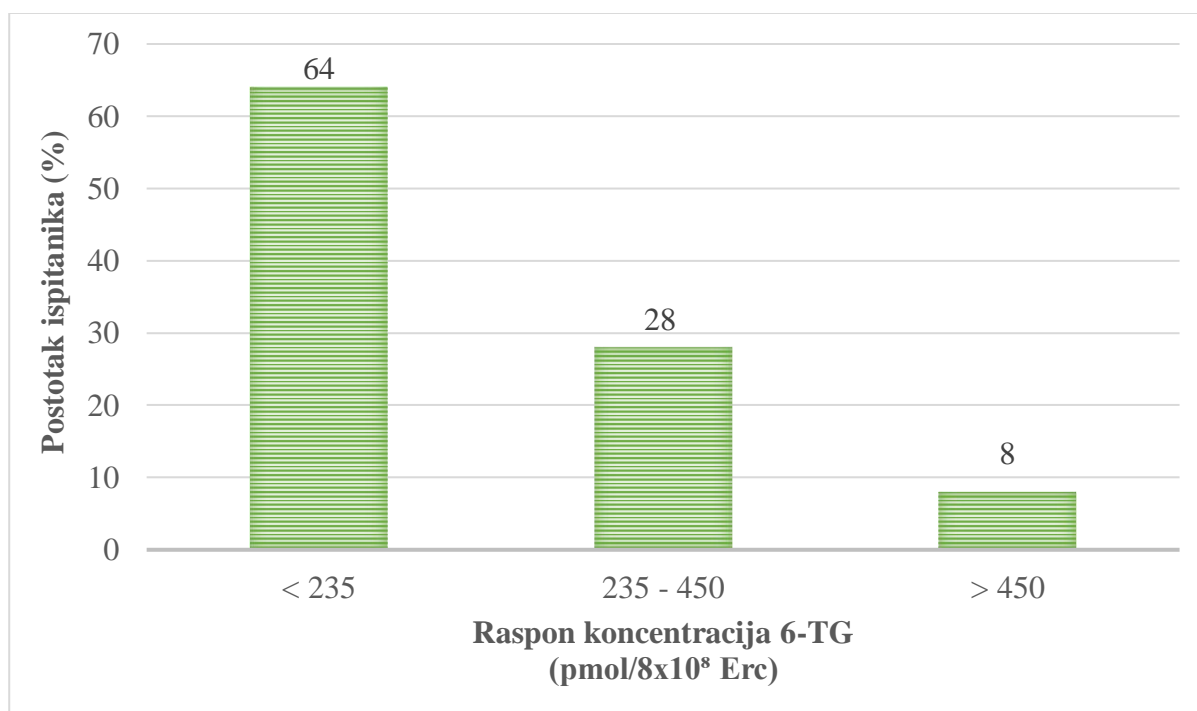


**Slika 11.** Ovisnost omjera 6-MMP/6-TG o dobi ispitanika

Slične vrijednosti omjera koncentracija metabolita 6-MMP/6-TG zabilježene su kod osoba različite životne dobi, kao što su i različiti omjeri zabilježeni kod osoba slične starosti. Koeficijent korelacije ( $r=0,046$ ,  $R^2=0,002$ ) također ukazuje da nema linearne ovisnosti omjera koncentracija 6-MMP/6-TG i dobi.

#### 4.1.2. Raspodjela koncentracija metabolita tiopurina prema terapijskom intervalu

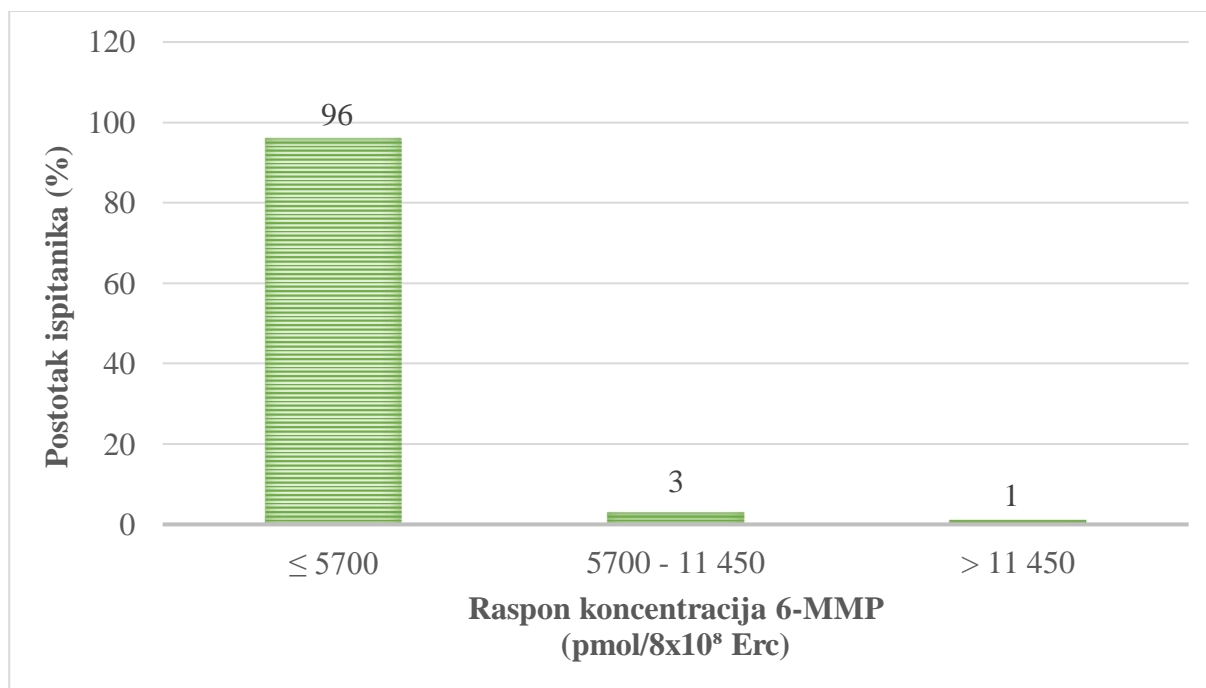
a) Terapijski interval koncentracija 6-TG prema literaturi (Warner i sur.,2016) iznosi 235 do 450 pmol/8x10<sup>8</sup> Erc. Vrijednosti ispod donje granice povezuju se s neodgovarajućim kliničkim odgovorom, a vrijednosti koncentracija iznad gornje granice, odnosno > 450 pmol/8x10<sup>8</sup> Erc povezuju se s povećanim rizikom pojave leukopenije (smanjen broj leukocita). Na Slici 12. prikazan je udio bolesnika prema terapijskom intervalu koncentracija 6-TG.



**Slika 12.** Podjela bolesnika u odnosu na terapijski interval koncentracija 6-TG

Kod 28% bolesnika postignute su koncentracije unutar terapijskog intervala, kod 64% bolesnika koncentracije su niže od očekivanih, a kod 8% su više.

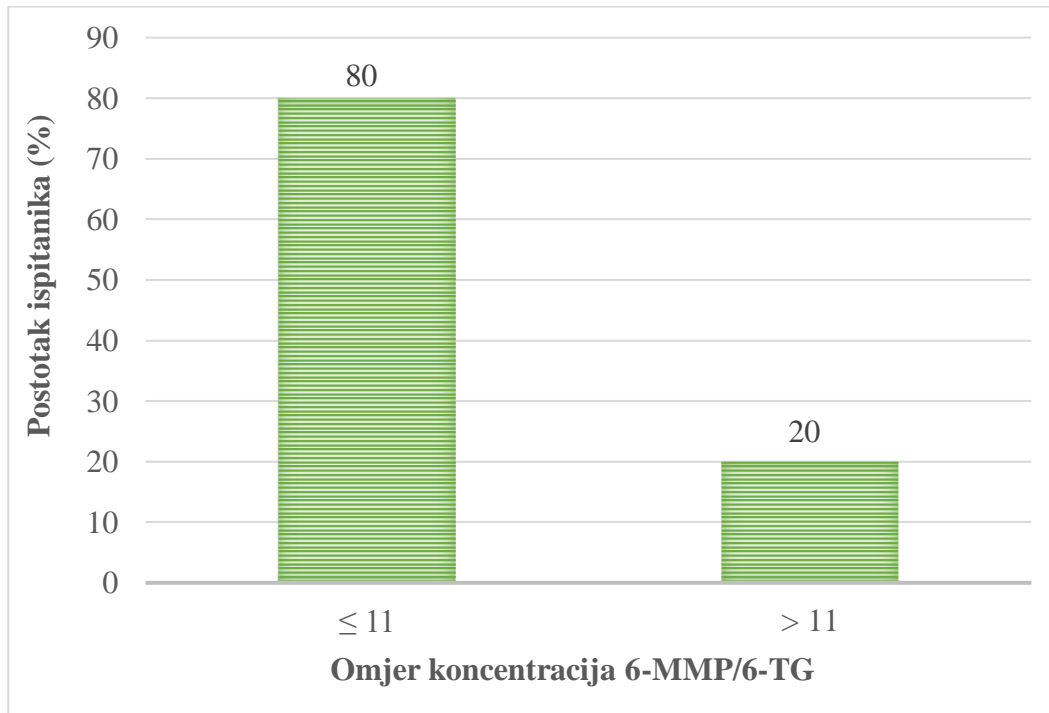
b) Očekivane koncentracije inaktivnog metabolita 6-MMP manje su ili jednake 5700 pmol/8x10<sup>8</sup> Erc. Koncentracije više od 5700 pmol/8x10<sup>8</sup> Erc povezuju se s pojavom hepatotoksičnosti, a smatra se da postoji povećan rizik nastanka mijelosupresije (smanjena aktivnosti koštane srži) kod koncentracija > 11 450 pmol/8x10<sup>8</sup> Erc. Slika 13. prikazuje udio bolesnika prema terapijskim vrijednostima koncentracija 6-MMP.



**Slika 13.** Podjela bolesnika u odnosu na terapijski interval koncentracija 6-MMP

Kod 96% bolesnika postignute su očekivane koncentracije, kod 4% bolesnika koncentracije su više od 5700 pmol/8x10<sup>8</sup> Erc, a kod jedne osobe, odnosno 1%, izmjerene koncentracije više su od 11 450 pmol/8x10<sup>8</sup> Erc.

c) Terapijski interval omjera koncentracija 6-MMP/6-TG nije strogo definiran, ali trebao bi biti niži od 11 jer se omjeri viši od 11 povezuju s hipermetilacijom i neodgovarajućim kliničkim odgovorom. Na Slici 14. prikazana je podjela ispitanika prema očekivanim vrijednostima omjera koncentracija metabolita tiopurina.



**Slika 14.** Podjela bolesnika prema očekivanim vrijednostima omjera koncentracija 6-MMP/6-TG

Kod 80% bolesnika omjer koncentracija je manji ili jednak 11, a kod 20% je veći od 11.

## 5. RASPRAVA

Lijekovi koji se najviše propisuju u terapiji upalnih bolesti crijeva su tiopurini i to proliječkovi azatioprin i 6-merkaptopurin. U organizmu se nizom reakcija aktiviraju u 6-tiogvaninske nukleotide (6-TGN) koji su zaslužni za terapijski učinak, ali isto tako podložni su reakcijama inaktivacije u najznačajnije inaktivne metabolite 6-metilmerkaptopurin (6-MMP) i 6-tiouričnu kiselinu. Reakcija inaktivacije tiopurina, S-metilacija, katalizirana je tiopurin-S - metiltransferazom (TPMT) koja je podložna genetskim polimorfizmima. Kod smanjene aktivnosti enzima povećan je nastanak citotoksičnih 6-TGN i rizik od leukopenije, dok povećana aktivnost enzima uzrokuje pretjerano stvaranje 6-MMP koji je u višim koncentracijama potencijalno hepatotoksičan. Zbog genetskih polimorfizama TPMT, varijabilne farmakokinetike i ostalih čimbenika, može doći do pojave neželjenih učinaka, kao i neodgovarajućeg kliničkog odgovora na terapiju tiopurinima.

Terapijsko praćenje (TDM), odnosno određivanje koncentracije lijeka i/ili njegovih metabolita u biološkim tekućinama s ciljem optimizacije terapije, provodi se ako postoji korelacija između terapijskog učinka i/ili nuspojava i koncentracije lijeka u biološkom uzorku. Za tiopurinske lijekove dokazana je korelacija koncentracija metabolita lijeka i kliničkog odgovora. TDM metabolita tiopurina, 6-MMP i 6-TG, omogućava predviđanje pojave neželjenih učinaka, kliničkog odgovora i otkrivanja nesuradljivosti bolesnika što pridonosi određivanju optimalnog režima doziranja ili potrebi za ukidanjem terapije.

U provedeno ispitivanje uključeno je 100 ispitanika s dijagnosticiranim upalnim bolestima crijeva koji su na terapiji tiopurinima najmanje 4-6 tjedana zbog postizanja ravnotežnog stanja u eritrocitima. Ispitanici se međusobno razlikuju po dobi, primijenjenoj dnevnoj dozi tiopurina te postignutim koncentracijama metabolita u eritrocitima. Bolesnici su mlađe do srednje životne dobi jer su tiopurinski lijekovi prva linija u liječenju težih slučajeva upalnih bolesti crijeva. Najmlađi bolesnik ima 11 godina, najstariji 65 godina, a srednja životna dob (medijan) iznosi 40 godina. Doze tiopurinskih lijekova propisuju se prvenstveno prema težini bolesti, ali i prema tjelesnoj težini. Dnevne doze tiopurina razlikuju se među ispitanicima; kreću se u intervalu od 50 do 200 mg. Izmjerene koncentracije 6-MMP iznose od 0 do 13 188 pmol/8x10<sup>8</sup> Erc s medijanom od 916,5 pmol/8x10<sup>8</sup> Erc.

Vrijednosti koncentracija 6-TG kreću se od 21 do 653 pmol/8x10<sup>8</sup> Erc s medijanom od 197 pmol/8x10<sup>8</sup> Erc. Obzirom na razlike u dozama i tjelesnu težinu bolesnika može se očekivati različita raspodjela lijeka u organizmu. Zbog razlike primijenjenih doza ispitanicima, izmjerene koncentracije metabolita tiopurina u eritrocitima ujednačene su prema dnevnoj dozi. Također, radi procjene metilacijskog indeksa, a nema puno saznanja o čimbenicima koji na njega utječu, određen je i omjer koncentracija metabolita tiopurina 6-MMP/6-TG. Dokazano je da je omjer metabolita veći od 11 povezan s hipermetilacijom i kod takvih bolesnika je terapijsko praćenje iznimno važno zbog sprječavanja hepatotoksičnosti.

### **5.1. Koncentracije 6-MMP i 6-TG ovisno o dobi pacijenata**

Metodom linearne regresije analizirana je ovisnost izmjerenih koncentracija metabolita o dobi ispitanika. Obzirom da su bolesnici uzimali različite doze tiopurina, analiziran je i odnos koncentracija metabolita ujednačenih prema dnevnoj dozi lijeka i dobi.

Statističkom analizom izmjerenih koncentracija 6-TG i dobi ispitanika dobiven je koeficijent korelacije ( $R^2=0,006$ ,  $r=0,077$ ) što ukazuje da nema linearne ovisnosti između dobi ispitanika i koncentracije 6-TG. Također, obzirom da su približno jednake koncentracije 6-TG izmjerene kod osoba različite životne dobi, potrebno je isključiti i druge čimbenike koji mogu utjecati na koncentraciju, a to je primarno doza jer su bolesnici uzimali različite doze tiopurina. Poželjno bi bilo isključiti i utjecaj tjelesne težine/visine na raspodjelu lijeka u organizmu. Od navedenih čimbenika dostupna je bila samo doza lijeka pa je napravljena analiza nakon ujednačavanja koncentracija prema dozi.

Dobiven je vrlo sličan odnos koncentracija 6-TG ujednačenih prema dozi i dobi ispitanika; nema linearne ovisnosti među parametrima ( $R^2=0,0312$ ,  $r=0,178$ ), a time ni značajnog utjecaja starosti bolesnika na vrijednosti koncentracija 6-TG u krvi. Na grafičkom prikazu može se uočiti blagi pad vrijednosti 6-TG porastom životne dobi, što je nakon ujednačavanja prema dozi još jasnije jer je smanjeno rasipanje podataka.

Poznato je da se starenjem mijenja farmakokinetika lijeka; zbog promjene udjela masnog tkiva mijenja se raspodjela lijeka, a osim toga na koncentraciju u krvi jako utječe i brzina izlučivanja. Obzirom da se kod osoba starije životne dobi funkcija jetre i bubrega blago smanjuje, potrebno



je o tome voditi brigu kod doziranja lijekova, posebice kod onih koji se pretežito izlučuju bubregom. Tiopurini imaju nešto drugačiju farmakokinetiku jer se ulaskom u cirkulaciju nakupljaju u eritrocitima pa je potrebno više vremena u odnosu na druge lijekove za postizanje ravnotežne koncentracije lijeka. Kod tiopurina se terapijski prate koncentracije metabolita u stanicama pa raspodjela i izlučivanje izravno ne utječu na farmakološki aktivnu koncentraciju u stanicama.

Za drugi, inaktivni metabolit, 6-MMP, također nije dobivena linearna ovisnost koncentracija o dobi ispitanika; što potvrđuje koeficijent korelacije koji iznosi  $r=0,187$  ( $R^2=0,035$ ). Kod bolesnika iste životne dobi izmjerene su različite koncentracije. Analizom koncentracija 6 - MMP ujednačenih prema dnevnoj dozi lijeka i starosti bolesnika uočeno je da nema linearne ovisnosti podataka, ni utjecaja dobi na koncentraciju 6-MMP.

Regresijskom analizom omjera koncentracija metabolita tiopurina, 6-MMP/6-TG i dobi ispitanika dokazano je odsustvo linearnosti i utjecaja životne dobi na omjer koncentracija navedenih metabolita.

## **5.2. Raspodjela ispitanika prema terapijskim koncentracijama**

Meta-analizom iz 2014.godine utvrđen je terapijski interval koncentracija aktivnog metabolita 6-TGN od 235 do 450 pmol/8x10<sup>8</sup> Erc koji se povezuje s odgovarajućim kliničkim odgovorom (Warner i sur., 2016). Obzirom na terapijski interval, bolesnici su svrstani u 3 skupine prema koncentracijama 6-TG u eritrocitima izmjerenim u stanju ravnoteže. U prvoj skupini s koncentracijama nižim od 235 pmol/8x10<sup>8</sup> Erc nalazi se 64% bolesnika, u drugoj skupini s koncentracijama unutar referentnog intervala je 28% bolesnika, dok su kod 8% osoba postignute koncentracije više od 450 pmol/8x10<sup>8</sup> Erc. Iako su primijenjene doze utvrđene prema indeksu tjelesne mase, kod manje od 1/3 bolesnika postignute su očekivane terapijske koncentracije aktivnog metabolita i analogno tome ovi bolesnici trebali bi postići dobar klinički odgovor i remisiju bolesti. Kod više od polovine bolesnika koncentracije 6-TG niže su od očekivanih, kod nekih čak do 11 puta, što dovodi u pitanje postizanje terapijskog učinka. Niske koncentracije 6-TG moguća su posljedica subdoziranosti, genetskog polimorfizma, odnosno povećane aktivnosti tiopurin-S-metiltransferaze čime je povećana pretvorba lijeka u inaktivni

6-MMP, kao i smanjene bioraspoloživosti te također neadherencije bolesnika. Prema smjernicama je potrebno prije početka terapije učiniti genotipizaciju TPMT, koja ima prednost nad fenotipizacijom, kako bi se prilagodila doza ovisno o genotipu i kako bi terapija bila što učinkovitija. Ukoliko je bolesnik homozigot za divlji tip TPMT s visokom aktivnošću enzima, propisuje se preporučena početna doza. Heterozigotima za varijantni TPMT genotip s intermedijarnom aktivnošću enzima, preporuča se započeti liječenje s 30-70% ciljane doze lijeka uz titraciju do doze koja se tolerira (Ladić, 2018). Nakon postizanja ravnotežne koncentracije, što je oko 4 tjedna nakon početka terapije, poželjno je izmjeriti koncentracije aktivnih metabolita tiopurina, posebice ako se primijete štetni učinci ili nezadovoljavajuć klinički odgovor. Izmjerene koncentracije aktivnih metabolita potrebno je usporediti s kliničkim odgovorom i interpretirati zajedno s ostalim parametrima. Ukoliko je potrebno, optimizira se doziranje i potiče suradljivost bolesnika. Alternativni pristup temelji se na uvođenju alopurinola, inhibitora ksantin-oksidadaze, u terapiju zbog smanjenja pretvorbe u inaktivnu 6-tiouričnu kiselinu i povećanja bioraspoloživosti merkaptopurina. Koncentracije više od gornje granice terapijskog intervala povezuju se s pojavom leukopenije, a moguć uzrok je smanjena aktivnost TPMT. Prema literaturi kod 1,3% do 12,6% osoba razvije se leukopenija iako 50-75% njih ima normalnu aktivnost TPMT. Ispitivanje je pokazalo da su postignute koncentracije 6-TG kod 8% bolesnika više od očekivanih, što odgovara literaturi.

Koncentracije inaktivnog 6-MMP više od  $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Erc}$  povezuju se s povećanim rizikom od pojave hepatotoksičnosti. Kod 96% ispitanika koncentracije su niže od te kritične vrijednosti, dok su kod njih 4% ušle u hepatotoksično područje što odgovara literaturnim podacima o učestalosti hepatotoksičnih učinaka. U gotovo svim slučajevima povišene vrijednosti 6-MMP bile su udružene s nekim od drugih pokazatelja oštećenja jetre, kao što su povišeni jetreni enzimi ili oštećenje vidljivo na nekoj od slikovnih metoda. Kod nekih bolesnika s koncentracijama 6-MMP višim od  $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Erc}$ , zabilježene su subterapijske koncentracije 6-TG što pridonosi slabom kliničkom odgovoru. Smatra se da koncentracije 6-MMP više od  $11\,450 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Erc}$  uzrokuju pojavu mijelosupresije. Kod jednog ispitanika izmjerene su mijelotoksične koncentracije. Povećane koncentracije 6-MMP mogu biti posljedica genetskog polimorfizma TPMT sa povećanom aktivnosti, a mogu rezultirati neodgovarajućim kliničkim odgovorom jer je smanjeno nastajanje aktivnog 6-TG, kao i povećanim intenzitetom neželjenih učinaka. U slučaju povišenih koncentracija 6-MMP,

prelazi se na nisku dozu tiopurina u kombinaciji sa 100 mg alopurinola, dok se kod pojave hepatotoksičnosti lijek ukida sve do normalizacije parametara jetrene funkcije.

Prema literaturi, kod 15-20% bolesnika pojavljuje se hipermetilacija koja se očituje u omjeru 6-MMP/6-TG većem od 11. U našoj studiji omjer viši od 11 zabilježen je kod 20% bolesnika, što odgovara literaturnim podacima, a najviša zabilježena vrijednost omjera 6-MMP/6-TG je 97,11. Hipermetilacija može doprinijeti nuspojavama i izostanku ili neodgovarajućem terapijskom učinku. U slučaju hipermetilacije sa subterapijskim koncentracijama 6-TGN, preporuča se dijeljenje doze ili prelazak na nisku dozu tiopurina u kombinaciji s alopurinolom od 100 mg. U studiji s 20 ispitanika dijeljenje doze rezultiralo je smanjenjem povišenih koncentracija 6-MMP bez učinka na razinu 6-TGN (Shih i sur., 2012).

## 6. ZAKLJUČAK

U radu je ispitan utjecaj dobi na koncentracije metabolita tiopurina, 6-MMP i 6-TG, u eritrocitima 100 bolesnika s dijagnosticiranim upalnim bolestima crijeva te odnos koncentracija i referentnih vrijednosti. Iz dobivenih rezultata zaključuje se:

- Ne postoji linearna ovisnost koncentracija 6-MMP, 6-TG o dobi ispitanika; kao ni ovisnost omjera koncentracija 6-MMP/6-TG o dobi
- Kod 64% ispitanika koncentracije 6-TG su ispod terapijskih vrijednosti što je najčešće povezano s lošim odgovorom na terapiju; samo 28% bolesnika ima koncentraciju unutar terapijskog intervala, a 8% bolesnika ima vrijednosti iznad terapijskih pa se mogu očekivati štetni učinci
- 4% bolesnika ima koncentracije inaktivnog 6-MMP u toksičnom području što svakako zahtijeva korekciju doze, dodatnu obradu genetskog polimorfizma TPMT i drugih enzima koji sudjeluju u metabolizmu
- Omjer 6-MMP/6-TG kod 20% ispitanika ukazuje na hipermetilaciju koja se povezuje s toksičnim učincima i neodgovarajućim kliničkim odgovorom pa je potrebno dodatno korigiranje terapije.

Iz navedenih rezultata utvrđuje se da životna dob bolesnika ne utječe na vrijednost koncentracija metabolita tiopurina u eritrocitima. Kod koncentracija 6-TG i 6-MMP izvan terapijskog intervala potrebno je uvesti promjene u režimu doziranja kako bi se optimizirala terapija i smanjili toksični učinci. Kako je kod većine bolesnika učinjena genotipizacija TPMT prije uvođenja terapije tiopurinima i prema njoj je određena optimalna doza kako bi se spriječilo postizanje subterapijskih koncentracija 6-TG, odnosno toksičnih koncentracija 6-MMP, poželjno je učiniti genotipizaciju drugih enzima kojima je dokazan učinak na metabolizam tiopurina ili titrirati dozu u kombinaciji s alopurinolom.

Obzirom na prirodu bolesti u kojoj je farmakološki učinak vidljiv tek u kasnijoj fazi i naše rezultate koji ukazuju da su terapijske vrijednosti 6-TG izmjerene kod manje od 1/3 bolesnika, ukazuje se potreba za terapijskim praćenjem metabolita tiopurina kod svih bolesnika te bi trebala postati rutinska metoda koja bi liječnicima bila dobar alat za upravljanje farmakoterapijom, a bolesniku osigurala farmakoterapiju s minimalnim neželjenim učincima.

## 7. LITERATURA

1. Azathioprine, 2020, <https://www.drugbank.ca>, pristupljeno 2.5.2020.
2. Azathioprine, 2019, <https://www.drugs.com>, pristupljeno 19.3.2020.
3. Bach-Rojecky L. Lijekovi kod upalnih bolesti crijeva, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2018.
4. Bačić-Vrca V. Individualizacija terapije. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2019
5. Bär Florian, Sina C, Fellermann K. Thiopurines in inflammatory bowel disease revisited. *World of Gastroenterology*, 2013, 19, 1699-1706
6. Crohnova bolest, 2014., <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr>, pristupljeno 18.3. 2020.
7. Derijks LJ, Gilissen LP, Hooymans Pm, Hommes DW. Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2006, 24, 715-729
8. Duvnjak M, Bilić A, Baršić N, Tomašić V, Stojšavljević S. Klasični lijekovi koji se upotrebljavaju u liječenju upalnih bolesti crijeva. *Acta Med Croatica*, 2013, 67, 111-124
9. Ha F, Khalil h. Crohn's disease: a clinical update. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 2015, 8, 352-359
10. Hovde Ø, A Moum B. Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: Results from observational studies. *World Journal of Gastroenterology*, 2012, 18, 1723–1731
11. Ladić A. Polimorfizam gena tiopurinmetiltransferaze u bolesnika s upalnom bolešću crijeva, 2018, 22-24

12. Lowe ES, Lertora JJJ. Principles of Clinical Pharmacology. U: Dose-Effect and Concentration-Effect Analysis. Atkinson AJJ, Huang SM, Merkey SP, Lertora JJJ, urednici, 2012, str. 343-356
13. Mercaptopurine, 2020, <https://www.drugbank.ca>, pristupljeno 2.5.2020.
14. Mohan H. Textbook of Pathology. U: The Gastrointestinal Tract. Mohan P, Mohan T, Mohan S, urednici, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, New Delhi, 2010, str.565-569
15. Mulder DJ, Noble AJ, Justinich CJ, Duffin JM. A tale of two diseases: the history of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2014, 8, 341-348
16. Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2008, 64, 753-767
17. Sažetak opisa svojstava lijeka – Imuran, 2019., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 5.5.2020.
18. Shih DQ, Nguyen M, Zheng L, Ibanez P, Mei L, Kwan LY, Bradford K, Ting C, Targan SR, Vasiliauskas EA. Split-dose administration of thiopurine drugs: a novel and effective strategy for managing preferential 6-MMP metabolism. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2012, 36, 449-458
19. Simsek M, Meijer B, Mulder CJJ, Van Bodegraven AA, De Boer NKH. Analytical Pitfalls of Therapeutic Drug Monitoring of Thiopurines in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *The Drug Monitoring*, 2017, 39, 584-588
20. Ulcerozni kolitis, 2014., <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr>, pristupljeno 18.3. 2020.
21. Upalne bolesti crijeva, 2014., <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr>, pristupljeno 9.3.2020.

22. Warner B, Johnston E, Arenas-Hernandez M, Marinaki A, Irving P, Sanderson J. A practical guide to thiopurine prescribing and monitoring in IBD. *Frontline Gastroenterology* 2016, 9, 10-15
23. Xaluprine, 2019., <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 5.5. 2020.

## 8. Sažetak

Tiopurini su imunosupresivni lijekovi korišteni u terapiji upalnih bolesti crijeva. Biotransformiraju se u inaktivne metabolite od kojih je najznačajniji 6-metilmerkaptopurin (6-MMP) te u aktivni citotoksični metabolit 6-tiogvaninski nukleotid (6-TGN) koji djeluje protuupalno. Enzim koji katalizira nastanak 6-MMP je tiopurin-S-metiltransferaza (TMPT), podložna genetskim polimorfizmima koji utječu na enzimatsku aktivnost. Osim genetskih polimorfizama TPMT, na koncentraciju 6-MMP i 6-TG utječu farmakokinetički i okolišni čimbenici. Cilj rada je odrediti koncentraciju metabolita tiopurina u krvi bolesnika s upalnim bolestima crijeva u stanju dinamičke ravnoteže, izračunati metilacijski indeks iz dobivenih koncentracija, utvrditi ovisnost koncentracija metabolita prije i nakon ujednačavanja prema dozi o dobi te procijeniti koncentracije metabolita prema terapijskom rasponu i indeksu metilacije. Koncentracije 6-TG i 6-MMP određene su HPLC metodom. U ispitivanje je uključeno 100 bolesnika s upalnim bolestima crijeva koji su na terapiji tiopurinima, starosti od 11 do najviše navršениh 65 godina. Regresijskom analizom utvrđeno je da ne postoji linearna ovisnost koncentracija metabolita tiopurina o dobi ispitanika. Zaključeno je da dob ne utječe na vrijednosti koncentracija metabolita u eritrocitima. Kod samo 1/3 bolesnika postignute su očekivane koncentracije aktivnog metabolita, 6-TG. S ciljem optimizacije režima doziranja i minimaliziranja nuspojava, terapijsko praćenje tiopurina trebalo bi biti rutinska metoda.



## Summary

Thiopurines are immunosuppressive drugs used in the treatment of inflammatory bowel disease. They are metabolized into inactive metabolites, the most important of which is 6-methylmercaptopurine (6-MMP) and into the active cytotoxic metabolite 6-thioguanine nucleotide (6-TGN) which has an anti-inflammatory effect. The enzyme that catalyzes the formation of 6-MMP is thiopurine-S-methyltransferase (TMPT), susceptible to genetic polymorphisms that affect enzymatic activity. In addition to TPMT genetic polymorphisms, 6-MMP and 6-TG concentrations are influenced by pharmacokinetic and environmental factors. The aim of this study was to determine the concentration of thiopurine metabolites in the blood of patients with inflammatory bowel disease at steady state, to calculate the methylation index from the obtained concentrations, to determine the dependence of metabolite concentrations before and after dose adjustment, to evaluate metabolite concentrations according to therapeutic range and methylation index. Concentrations of thiopurine metabolites were determined by HPLC method. The study included 100 patients with inflammatory bowel disease who were on thiopurine therapy, aged 11 to a maximum of 65 years. Regression analysis showed that there is no linear dependence of thiopurine metabolite concentrations on the age of the subjects. It was concluded that age did not affect the values of metabolite concentrations in erythrocytes. In only 1/3 of patients, the expected concentrations of the active metabolite, 6-TG, were achieved. In order to optimize the dosing regimen and minimize side effects, therapeutic monitoring of thiopurine should be a routine method.

## 9. Prilozi

### 9.1. Popis kratica

5-ASA	5-aminosalicilna kiselina
6-MMP	6-metilmerkaptopurin
6-MMPR	6-metilmerkaptopurin ribonukleotid
6-MP	6-merkaptopurin
6-TG	6-tiogvanin
6-TGN	6-tiogvaninski nukleotid
6-TGTP	6-tiogvanin trifosfat
6-TIMP	6-tioinozin monofosfat
AMTCI	4-amino-5-metil-tiokarbonil imidazol
AZA	azatioprin
CB	Chronova bolest
GMPS	gvanozin-monofosfat-sintetaza
GTP	gvanozin-trifosfat
HPLC	high performance liquid chromatography – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HPRT	hipoksantin-fosforiboziltransferaza
IBD	engl. inflammatory bowel disease - upalna bolest crijeva
IL	interleukin
IMPDH	inozin-monofosfat-dehidrogenaza
INF- $\gamma$	interferon gama
PPAR- $\gamma$	gama receptor za aktivaciju proliferacije peroksisoma
TDM	engl. therapeutic drug monitoring - terapijsko praćenje lijekova
TNF- $\alpha$	tumor nekrotski faktor alfa
TPMT	tiopurin-S-metiltransferaza
UK	ulcerozni kolitis
XO	ksantin-oksidaza

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Toksikologija  
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### TERAPIJSKO PRAĆENJE METABOLITA TIOPURINA U BOLESNIKA S UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA

Iva Ćurić

#### SAŽETAK

Tiopurini su imunosupresivni lijekovi korišteni u terapiji upalnih bolesti crijeva. Biotransformiraju se u inaktivne metabolite od kojih je najznačajniji 6-metilmerkaptopurin (6-MMP) te u aktivni citotoksični metabolit 6-tiogvaninski nukleotid (6-TGN) koji djeluje protuupalno. Enzim koji katalizira nastanak 6-MMP je tiopurin-S-metiltransferaza (TMPT), podložna genetskim polimorfizmima koji utječu na enzimatsku aktivnost. Osim genetskih polimorfizama TPMT, na koncentraciju 6-MMP i 6-TG utječu farmakokinetički i okolišni čimbenici. Cilj rada je odrediti koncentraciju metabolita tiopurina u krvi bolesnika s upalnim bolestima crijeva u stanju dinamičke ravnoteže, izračunati metilacijski indeks iz dobivenih koncentracija, utvrditi ovisnost koncentracija metabolita prije i nakon ujednačavanja prema dozi o dobi te procijeniti koncentracije metabolita prema terapijskom rasponu i indeksu metilacije. Koncentracije 6-TG i 6-MMP određene su HPLC metodom. U ispitivanje je uključeno 100 bolesnika s upalnim bolestima crijeva koji su na terapiji tiopurinima, starosti od 11 do najviše navršениh 65 godina. Regresijskom analizom utvrđeno je da ne postoji linearna ovisnost koncentracija metabolita tiopurina o dobi ispitanika. Zaključeno je da dob ne utječe na vrijednosti koncentracija metabolita u eritrocitima. Kod samo 1/3 bolesnika postignute su očekivane koncentracije aktivnog metabolita, 6-TG. S ciljem optimizacije režima doziranja i minimaliziranja nuspojava, terapijsko praćenje tiopurina trebalo bi biti rutinska metoda.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 46 stranica, 14 grafičkih prikaza, 3 tablica i 22 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Tiopurini, Upalne bolesti crijeva, Terapijsko praćenje, TMPT, 6-MMP, 6-TG

Mentor: **Dr. sc. Mila Lovrić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Mila Lovrić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Toxicology  
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

# THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF THIOPURINE METABOLITES IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Iva Ćurić

## SUMMARY

Thiopurines are immunosuppressive drugs used in the treatment of inflammatory bowel disease. They are metabolized into inactive metabolites, the most important of which is 6-methylmercaptopurine (6-MMP) and into the active cytotoxic metabolite 6-thioguanine nucleotide (6-TGN) which has an anti-inflammatory effect. The enzyme that catalyzes the formation of 6-MMP is thiopurine-S-methyltransferase (TMPT), susceptible to genetic polymorphisms that affect enzymatic activity. In addition to TPMT genetic polymorphisms, 6-MMP and 6-TG concentrations are influenced by pharmacokinetic and environmental factors. The aim of this study was to determine the concentration of thiopurine metabolites in the blood of patients with inflammatory bowel disease at steady state, to calculate the methylation index from the obtained concentrations, to determine the dependence of metabolite concentrations before and after dose adjustment, to evaluate metabolite concentrations according to therapeutic range and methylation index. Concentrations of thiopurine metabolites were determined by HPLC method. The study included 100 patients with inflammatory bowel disease who were on thiopurine therapy, aged 11 to a maximum of 65 years. Regression analysis showed that there is no linear dependence of thiopurine metabolite concentrations on the age of the subjects. It was concluded that age did not affect the values of metabolite concentrations in erythrocytes. In only 1/3 of patients, the expected concentrations of the active metabolite, 6-TG, were achieved. In order to optimize the dosing regimen and minimize side effects, therapeutic monitoring of thiopurine should be a routine method.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 46 pages, 14 figures, 3 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Thiopurines, Inflammatory bowel disease, Therapeutic drug monitoring, TMPT, 6-MMP, 6-TG

Mentor: **Mila Lovrić, Ph.D.** /Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Mila Lovrić, Ph.D.** /Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** /Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D.** /Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.