

Polimorfizam gena tiopurinmetiltransferaze u bolesnika s upalnom bolešću crijeva

Ladić, Agata

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:679611>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-28**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





Središnja medicinska knjižnica

Ladić, Agata (2018) *Polimorfizam gena tiopurinmetiltransferaze u bolesnika s upalnom bolešću crijeva [Polymorphism of thiopurinemethyltransferase gene in patients with the inflammatory bowel disease].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/3039>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Agata Ladić

Polimorfizam gena
tiopurinmetiltransferaze u bolesnika s
upalnom bolešću crijeva

DISERTACIJA

Zagreb, 2018.

Disertacija je izrađena u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju te u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije, Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Boris Vucelić

Ovu disertaciju posvećujem svojim roditeljima Mirjani i Nikoli, koji leptiru nikad nisu slomili krila, već su ga poslali u svijet da pronađe svoj cvijet; sestri Mariji i braći Petru i Pavlu koji su mi zajedništvom olakšali i obogatili odrastanje i naposljetku – suprugu Josipu i kćerima Klari, Katarini, Ozani i Raheli, koji me darom njihovih života svakodnevno nadahnjuju za nove životne izazove i radosti!

Zahvaljujem mentoru, profesoru Vucelić Borisu, koji mi je tijekom proteklih godina bio oslonac u svim medicinskim izazovima; docentici Čuković-Čavka Silviji, koja je hrabrim angažmanom pomogla da se realizira ova disertacija te profesoricu Božinu Nadi, koja je od samog početka ovog istraživanja s osmijehom spremno ulagala svoje vrijeme u rast zajedničkog prijateljstva.

SADRŽAJ

- popis oznaka i pokrata

1	UVOD	1
1.1	UPALNE BOLESTI CRIJEVA	1
1.2	EPIDEMIOLOGIJA UPALNIH BOLESTI CRIJEVA	1
1.3	ETIOLOGIJA I PATOGENEZA UPALNIH BOLESTI CRIJEVA	3
1.4	FENOTIPOVI UPALNIH BOLESTI CRIJEVA	7
1.4.1	<i>CROHN-OVA BOLEST</i>	7
1.4.2	<i>ULCEROZNI KOLITIS</i>	8
1.5	LIJEČENJE UPALNIH BOLESTI CRIJEVA	9
1.6	AZATIOPRIN	10
1.6.1	<i>NUSPOJAVE AZATIOPRINA</i>	17
1.6.2	<i>DOZIRANJE LIJEKA</i>	19
1.7	TIOPURIN-METILTRANSFERAZA	22
1.8	MONITORIRANJE LIJEKA	25
1.8.1	<i>OPTIMIZACIJA LIJEČENJA AZATIOPRINOM OVISNO O RAZINI METABOLITA</i>	28
2	HIPOTEZA	30
3	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	31
3.1	ZNANSTVENI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA	32
4	ISPITANICI I METODE	33
4.1	ISPITANICI	33
4.2	METODE	34
4.2.1	<i>OPREMA</i>	34
4.2.2	<i>PRIBOR</i>	34
4.2.3	<i>REAGENSI</i>	35
4.2.4	<i>IZDVAJANJE DNA</i>	35

4.2.5	GENOTIPIZACIJA TPMT.....	35
4.3	STATISTIČKA OBRADA.....	41
4.3.1	ANALIZA TPMT GENOTIPOVA	41
4.3.2	ANALIZA NUSPOJAVA AZATIOPRINA TE UTJECAJA KONKOMITANTNE TERAPIJE.....	41
5	REZULTATI	43
5.1	OSNOVNE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA	43
5.2	FREKVENCIJA TPMT GENOTIPA U BOLESNIKA S UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA I U KONTROLNOJ SKUPINI 44	
5.3	CROHNOVA BOLEST I ULCEROZNI KOLITIS	47
5.4	FREKVENCije TPMT GENOTIPOVA U HRVATSKOJ I ODABRANIM ZEMLJAMA	49
5.5	PROCIJENA UČESTALOSTI NUSPOJAVA AZATIOPRINA, OVISNO O POLIMORFIZMIMA GENA TPMT	54
5.6	ORGAN SPECIFIČNE NUSPOJAVE	56
5.6.1	JETRA.....	56
5.6.2	GUŠTERAČA.....	57
5.6.3	KOŠTANA SRŽ.....	57
5.6.4	KOŽNE I OSTALE NUSPOJAVE	58
5.7	KONKOMITANTNA TERAPIJA	59
6	RASPRAVA	61
7	ZAKLJUČAK	70
8	SAŽETAK	71
9	SUMMARY	74
10	LITERATURA.....	77
11	ŽIVOTOPIS	102

POPIS OZNAKA I POKRATA

6-MeMP – 6-metil-merkaptopurin

6-MMP – 6-metilmerkaptopurin

6-MP – 6-merkaptopurin

6-MTG – 6-metil-tiogvanin

6-TG – 6-tiogvanin

6-TGN – 6-tiogvanin nukleotid

6-tio-GTP – 6-tio-gvanozin-trifosfat

6-TK – 6-tiourična kiselina

AhR – aril hidrokarbonski receptor

AMP- *adenozin-monofosfat*

ATG16L1 – *Autophagy Related 16 Like 1 gene, engl.*

AZA - azatioprin

bcl-xL - čimbenik ekstra velikog B-staničnog limfoma (*B-cell lymphoma extra large -bcl-xL, engl.*)

C – citozin

CARD15 – *caspase recruitment domain-containing protein 15, engl.*

CD – *cluster of differentiation, engl.*

CD – Crohnova bolest (*Crohn's disease, engl*)

CD 28 – *cluster of differentiation 28, engl.*

CI – interval pouzdanosti (*confidence interval, engl.*)

DKGL – Njemačka komora za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (*Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, njem.*)

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

E.C. – *enzyme commission, engl.*

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (*ethylenediaminetetraacetic acid, engl.*)

ER - endoplazmatski retikulum

ERC – eritrociti

G – gvanin

GMP-sintetaza – gvanozin-monofosfat sintetaza

GST - glutation-S-transferaza

GTP – gvanozin-trifosfat

GWAS – asocijacijske studije s obuhvaćanjem cijelog genoma (*Genome-Wide Associated Studies, engl.*)

HGPRT – hipoksantin-gvanin fosforibozil transferaza

IBD – upalne bolesti crijeva, *Inflammatory bowel diseases, engl.*

IBDU – neklasificirana upalna bolest crijeva (*Inflammatory bowel disease unclassified, engl.*)

IEL – *engl. Intraepithelial lymphocytes*

IL-23 – interleukin 23

IL-6 – interleukin 6

IMPDH – inozin-monofosfat dehidrogenaza

ITPaza – inozin-trifosfataza

MEK – kinaza mitogenom aktivirane protein kinase (*mitogen activated protein kinase kinase – MEK, engl.*)

NF κ B – nuklearni čimbenik κ B (*nuclear factor κ B, engl.*)

NKT – *engl. Natural killer T-cells*

NOD2 - *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2, engl.*

PCR-RFLP – reakcija lančane polimeraze (*polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism, engl.*)

PDNS – de-novo sinteza purina (*purine de-novo synthesis, engl.*)

RNK – ribonukleinska kiselina

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (*single nucleotide polymorphism, engl.*)

TGMP – tiogvanin-monofosfat

TNFRS7 – član 7 receptorske superobitelji TNF- α (*TNF receptor superfamily member 7, engl.*)

TNF α – čimbenik tumorske nekroze α (*Tumor necrosis factor α , engl.*)

TPMT – tiopurin-metil transferaza

TRAIL – ligand koji inducira apoptozu, vezan uz TNF (*TNF-related apoptosis-inducing ligand, engl.*)

UC – ulcerozni colitis (*Ulcerative colitis, engl.*)

UPR – odgovor neodmotanih proteina, *Unfolded protein response, engl.*

XO – ksantin oksidaza

1 UVOD

1.1 UPALNE BOLESTI CRIJEVA

Upalne bolesti crijeva (u nastavku *IBD* prema *engl. – inflammatory bowel diseases*) su kronične, recidivirajuće, imunim mehanizmima posredovane bolesti koje zahvaćaju gastrointestinalni sustav. Etiologija ovih poremećaja do danas nije u potpunosti razjašnjena, iako recentna istraživanja na području bazičnih znanosti verificiraju nekoliko važnih promjena u crijevnim stanicama, a koje su usko povezane s razvojem *IBD*. Dva glavna fenotipa upalnih bolesti crijeva su Crohnova bolest (*CD, engl. -Crohn's disease*) i ulcerozni kolitis (*UC, engl.- ulcerative colitis*).

1.2 EPIDEMIOLOGIJA UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Incidencija i prevalencija upalnih bolesti crijeva tijekom proteklih se desetljeća značajno mijenjala. Raniji epidemiološki podaci *IBD* su opisivali kao značajku industrijaliziranih, bogatijih zemalja - poput Sjeverne Amerike, Ujedinjenog Kraljevstva i Australije, s najvećom europskom godišnjom incidencijom od 24,3 na 100 000 osoba/godinu za *UC* te 12,7 na 100 000 osoba/godinu za *CD* (1). Najveća prevalencija za *UC* je bila 505 na 100 000 osoba u Europi,

dok je za CD bila 322 na 100 000 osoba (1). Međutim, tijekom posljednja dva desetljeća studije učinjene u istočno europskim i azijskim državama potvrđuju veću incidenciju u odnosu na ranije izvještaje (2-5). Ovakav trend se pripisuje zapadnom načinu života koji uključuje povećanu konzumaciju rafiniranih šećera, masnih kiselina, "brze" hrane, žitarica i kruha uz smanjenu konzumaciju voća, povrća, vlaknatih tvari; izloženost zagađivačima zraka, uz druge moguće čimbenike poput tonzilektomije, prenatalne infekcije, uporabu oralnih kontraceptiva, kraće dojenje ili pak izbjegavanje dojenja, određena cjepiva, raširenu uporabu antibiotika, poboljšane higijenske uvjete (6). Osim navedenih prozapadnih promjena životnog stila, u zemljama istočne polutke postoji i rastući trend svjesnosti o bolesti, ali je i olakšan pristup dijagnostičkim tehnikama koje dovode do postavljanja dijagnoze.

Aktualni podaci multicentrične ECCO-EPICom studije, etablirane u svrhu uvida u razlike u incidenciji između istočnih i zapadnih europskih zemalja govore u prilog dvostruko veće stope incidencije za CD i UC u zapadnoj Europi u odnosu na istočnu, s medijanom godišnje stope incidencije od 6,5 na 100 000 osoba u Zapadnoj Europi te 3,1 u Istočnoj Europi za CD, te 10,8 za Zapadnu Europu te 4,1 za istočnu Europu u kontekstu UC-a (7).

Početak obje bolesti ima bimodalnu distribuciju, s otkrivanjem bolesti između 15. i 30. godine života u prvoj skupini bolesnika, dok se drugi vrhunac otkrivanja bolesti javlja između 60. i 80. godine (8). UC se podjednako javlja i u muškaraca i u žena, dok se CD nešto češće javlja u muškaraca, s omjerom 1,1-1,8:1 (9).

Određeni egzogeni čimbenici utječu na razvoj i tijek upalnih bolesti crijeva. Tako je utjecaj pušenja različit u UC i CD. Pušenje povećava rizik razvoja CD, ali ne i UC. Prestanak pušenja povećava rizik relapsa UC dok bolesnici s CD nešto češće pokazuju smanjenje težine bolesti

(10). Uporaba oralnih kontraceptiva također se povezuje s dvostrukim povećanjem rizika za razvoj CD, ali i blagim povišenjem rizika za UC (11).

Studije na obiteljima pokazale su da se radi o obiteljskoj bolesti u 5-10% bolesnika (9). Dio ovih bolesnika klinički se prezentira već u ranom djetinjstvu. U studijama na blizancima, 58% monozigotnih blizanaca je konkordantno za CD i 6% konkordantno za UC. Dodatni dokaz za genetsku predispoziciju dolazi iz povezanosti IBD i određenih genetskih sindroma, poput Turnerovog sindroma, Hermansky-Pudlakovog sindroma, bolesti pohranjivanja glikogena tip 1b, teške imunodeficijencije (Wiskott-Aldrichov sindrom) te kronične granulomatozne bolesti (12).

1.3 ETIOLOGIJA I PATOGENEZA UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Od prvih opisa upalnih bolesti crijeva krajem 19. i početkom 20. stoljeća (13), brojne hipoteze o etiologiji upalnih bolesti crijeva su nastojale objasniti ovu sve češću bolest; od infekcija, toksičnih tvari, psiholoških smetnji, manjka određenih nutrijenata, alergije na hranu ili polene, oštećenu vaskularnu ili limfatičku cirkulaciju ili pak oštećenje lizosoma (14-16). Danas se smatra da se bolest javlja u genetski predisponiranih individua, uslijed neprimjerenog imunološkog odgovora na endogenu mikrobiotu, uz potencijalnu autoimunu komponentu u dijela bolesnika. U ovih osoba dolazi do stanja kronične disregulacije sluzničke imune funkcije, koja je modificirana određenim čimbenicima okoliša, poput pušenja i enteropatogena (9). Zdravo crijevo sadrži veliki broj imunoloških stanica u stanju fiziološke upale, u kojem ne dolazi

do pravog imunološkog odgovora na crijevnu mikrobiotu i dijetalne antigene. U slučajevima upale u zdravih pojedinaca dolazi do razvoja upalnog procesa, no uz brzi odgovor imunog sustava.

Humano crijevo nastanjeno je s otprilike 100 trilijuna mikroba (17) koji odrađuju brojne metaboličke funkcije važne za humani organizam (18). S druge strane, imuni sustav sluznice crijeva je vrlo usko povezan s crijevnim mikrobiomom, obzirom da bez njega imuni sustav ne uspijeva sazrijeti (19), za što nam primjer daju i istraživanja provedena na laboratorijskim životinjama (20). Epidemiološke su studije u okviru tzv. "higijenske hipoteze" pokazale da bi jedna od rizičnih čimbenika za razvoj IBD mogla biti i odgođena ekspozicija enteralnim mikrobima u ranom perinatalnom razvoju (21,22). Olszak i suradnici (23) su pokazali da kolonizacija neonatalnih *germ-free* miševa (miševa bez prisustva mikroba) s konvencionalnom mikrobiotom sprečava akumulaciju invarijantnih prirodnih T ubilačkih stanica (*engl. NKT – natural killer T-cells*), te na taj način sprečava indukciju kolitisa.

Uz crijevni mikrobiom, važnu ulogu u razvoju imunog sustava crijevne sluznice ima prehrana. Radovi pokazuju da sastojci iz povrtne porodice krstašica djeluju na aril hidrokarbonski receptor (AhR) (24), koji je nepobitno povezan s intraepitelnim limocitima (*engl. IEL – intraepithelial lymphocytes*) razasutim u epitelnom sloju koji djeluju kao prva linija obrane te u saniranju sluzničkih ozljeda (25). U odsustvu liganada koji bi se vezali za AhR, IEL se više ne mogu održati, što u konačnici rezultira aktivacijom imunog sustava te sklonošću oštećenju epitela (24, 26). Nadalje, u studiji na miševima deplecija prehrambenog triptofana je značajno utjecala na crijevnu epitelnu antimikrobnu funkciju, kao i na povećanu sklonost razvoju kolitisa (27).

Poremećaji funkcije stanica koje čine intestinalni epitel (vrčaste stanice, M stanice, Panethove stanice, neuroendokrine stanice, enteroapsorptivne stanice) mogu također doprinjeti razvoju IBD (26). Panethove stanice nalaze se pri bazi kripti tankog crijeva, a zadaća im je sekrecija adenzin-monofosfata (AMP) – važnog unutarstaničnog posrednika, kao i upalnih medijatora (28). U Panethovim se stanicama ekspirira i NOD2 (*engl. Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*), važan genetički rizični čimbenik za razvoj IBD (29), što je i dokazano ranijom studijom na hrvatskim bolesnicima, gdje je mutacija NOD2/CARD15 gena pokazala povezanost s razvojem Crohnove bolesti (30). Bolesnici koji posjeduju NOD2 varijante ekspiriraju smanjene razine humanih α -defenzina 5 i 6 u Panethovim stanicama, što u konačnici dovodi do oštećene antimikrobne funkcije (31), vjerojatno u kombinaciji s dodatnim čimbenicima (26).

Osim navedenog, proces autofagije je mehanizam prepoznat kao čimbenik razvoja IBD-u. Radi se o procesu autodestruktivnog katabolizma koji obuhvaća stvaranje autofagosomne membrane oko staničnih komponenata koje će u nastavku biti uništene fuzijom s lizosomima (32). Lokus koji je povezan s procesom autofagije naziva se ATG16L1. Prema studiji Cadwella i suradnika, bolesnici koji su bili homozigotni za ATG16L1 alel, imali su značajne strukturne alteracije u sekretornom aparatu, kao i transkripcijske abnormalnosti u Panethovim stanicama (33). S druge strane, bolesnici s afunkcionalnim ATG16L1 genom, imali su pretjeranu aktivaciju inflammasoma u makrofagima, uz povećanu sekreciju proupalnih citokina IL-1 β i IL-18 (34). Smanjena funkcija ranije navedenog NOD2 rezultira oštećenjem procesa autofagije, a time i oštećenjem unutarstaničnog uništavanja bakterija (35). Time je vidljivo koliko je međuovisnosti prisutno između brojnih unutarstaničnih procesa. Vrlo blizak proces autofagiji je i tzv. odgovor neodmotanih proteina (*engl. unfolded protein response -UPR*), koji

se javlja kao odgovor na stres endoplazmatskog retikuluma (ER), odnosno kao odgovor na akumulaciju neodmotanih ili krivo smotanih proteina. Kaser i suradnici su pokazali da u slučaju delecije čimbenika vezanog za transkripciju UPR u crijevnom epitelu, dolazi do deplecije zrelih Panethovih stanica, praćeno spontanom upalom tankog crijeva u miševa, vrlo sličnom humanom IBD-u (36).

Važnu ulogu u obrani sluznice crijeva igraju i makrofagi i dendritičke stanice. Makrofagi koji su CD14⁺ (*cluster of differentiation, engl.*), doprinose zaštiti od patogena, uz istovremeno sprečavanje pretjeranog imunog odgovora (37). U dijela IBD bolesnika prisutna je populacija makrofaga koja stvara velike količine pro-upalnih citokina, kao što su IL-23, faktor tumorske nekroze i IL-6 (38). Slično intestinalnim makrofagima, određene populacije dendritičkih stanica su važne u održanju crijevne homeostaze, odnosno u potencijalnom razvoju kolitisa (39).

Jedna od novootkrivenih limfoidnih linija su urođene limfoidne stanice (40). Ove se stanice razvijaju iz zajedničke limfoidne progenitorske stanice, a ovisno o ekspresiji citokina postoje tri grupe ovih stanica (40). Sva tri tipa usko surađuju s IEL i djeluju na cijeljenje rana, međutim – poznato je i proupalno efektorsko djelovanje. Unatoč brojnosti navedenih mehanizama koji doprinose razvoju IBD, za očekivati je otkrivanje novih i brojnih drugih efektorskih puteva koji doprinose razvoju ove složene bolesti.

Dva dominantna tipa upalnih bolesti crijeva su Crohnova bolest te ulcerozni kolitis, no obzirom da prema studijama u 10-15% slučajeva nije moguće postaviti preciznu dijagnozu, (41, 42) uveden je entitet „indeterminiranog kolitisa“, koji je prema posljednjoj preporuci

radne grupe (43) najbolje koristiti u slučajevima kirurških preparata, dok je za sve ostale oblike potrebno govoriti o neklasificiranom IBD-u (IBDU) (44).

1.4 FENOTIPOVI UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

1.4.1 CROHN-OVA BOLEST

Crohnova bolest je fenotip kronične upalne bolesti crijeva koji može zahvatiti bilo koji dio probavne cijevi, uključivo orofarinks i anus. Ispitivanjem zajedničkih genetičkih varijanti različitih osoba - takozvanim asocijacijskim studijama s obuhvaćanjem cijelog genoma (*Genome-Wide Association Studies - GWAS, engl.*), do sada je identificirano 17 različitih kromosoma sa 71-im lokusom susceptibilnim za razvoj Crohnove bolesti (45). Otkriće ovih lokusa posredovalo je znanja o važnim kliničkim aspektima crijevnog imunog sustava. Crohnovu bolest karakteriziraju transmuralna zahvaćenost upalnim procesom te diskontinuirana upala s formiranjem tzv. *skip* (hrv. preskačućih) lezija. Najraniji patološki nalaz je upala crijevne kriptе, uz naknadno formiranje apscesa te povećanje limfoidnih folikula i razvijanje aftoidne ulceracije. Uz nakupljanje makrofaga, ali i drugih upalnih stanica, formiraju se granulomi bez kazeozne nekroze koji se osim u stijenci crijeva mogu vidjeti i u limfnim čvorovima, mezenteriju, peritoneumu i jetri (46). Granulomi se ne nalaze u svih bolesnika i nisu nužni za postavljanje dijagnoze (46). Bolest se često prezentira kliničkom slikom bolova u abdomenu, vrućicom, proljevastim stolicama uz prisustvo sluzi ili krvi, ili obojega te gubitkom na tjelesnoj težini. Dio bolesnika javlja se sa slikom perianalne bolesti, koju čine fisure ili fistule, a koje su nekad i inicijalna smetnja.

30-40% bolesnika s Crohnovom bolešću ima samo bolest tankog crijeva, 40-55% bolesnika ima zahvaćeno i tanko i debelo crijevo, dok 15-25% ima upalne promjene samo u debelom crijevu. U tri četvrtine bolesnika s bolešću tankog crijeva, terminalni ileum je zahvaćen u 90% bolesnika (46).

1.4.2 ULCEROZNI KOLITIS

Ulcerozni kolitis je drugi veliki fenotip upalnih bolesti crijeva, koji je obilježen upalnim zahvaćanjem rektuma uz širenje bolesti prema proksimalnim dijelovima kolona, što rezultira zahvaćanjem dijela ili cijelog kolona (pankolitis). Otprilike polovica bolesnika ima bolest ograničenu na rektum i rektosigmoidni kolon, 30-40% ima ekstenziju bolesti iznad sigmoidnog kolona, dok 20% bolesnika ima zahvaćen cijeli kolon (46). Za razliku od Crohnove bolesti i *skip* lezija, u ulceroznom kolitisu se upalno zbijanje širi kontinuirano prema proksimalnom dijelu kolona. Histološki se nalazi upala sluznice i superficijalnog podsluzničkog sloja, dok duboki slojevi nisu zahvaćeni patološkom promjenom, osim u slučaju fulminantne bolesti. Glavnu kliničku sliku čine bolesnici s proljevastim stolicama, krvarenjem *per rectum*, tenezmima, pasажom sluzi te grčevitim abdominalnim bolovima.

1.5 LIJEČENJE UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Veliki napori u liječenju IBD provode se na dvije razine – bazičnoj koja traga za novim molekulama u zbrinjavanju ovih bolesnika, kao i na kliničkoj, koja personaliziranim pristupom nastoji odrediti optimalnu terapiju.

Obzirom da se liječenje dvaju glavnih entiteta – UC i CD – provodi na različite načine, obavezno je poznavanje etiologije, patogeneze bolesti, fenotipskih karakteristika bolesnika i bolesti, mehanizma djelovanja lijekova te potencijalnih toksičnih djelovanja istih. U liječenju IBD koriste se: protuupalni lijekovi (5-aminosalicilati, kortikosteroidi), lijekovi koji modificiraju odnosno suprimiraju imunološki sustav (tiopurinski lijekovi, metotreksat, kalcineurinski inhibitori, anti-TNF lijekovi), anti-adhezijske molekule, modulatori mikrobioma (antibiotici, probiotici, prebiotici), antibiotici, suplementi, pripravci enteralne prehrane te u slučaju neuspjeha konzervativne terapije - kirurški modaliteti liječenja. Inicijalno entuzijastični pristup fekalnoj transplantaciji do danas nije donio značajne rezultate, te se i dalje očekuju rezultati velikih istraživanja o navedenoj terapiji (47).

Liječenje bolesnika s CD i UC ovisi o nekoliko čimbenika:

- a) lokalizaciji bolesti (npr. kod Crohnove bolesti ileocekalna vs kolonična lokalizacija)
- b) težini bolesti: blaga, umjerena ili teška
- c) drugim pridruženim bolestima koje mogu, ili ne moraju biti povezane s IBD.

Liječenje IBD bolesnika ovisi i o ranijem odgovoru na terapiju, kao i o toleranciji na specifičnu medicinsku terapiju. U slučajevima akutne bolesti liječenje je sekvencijalno i uključuje

primarno zbrinjavanje akutne bolesti, a potom održanje remisije. Kirurško se liječenje aktualizira u slučajevima opstruktivnih stenoza, karcinomskih ili prekanceroznih lezija, gnojnih komplikacija te bolesti refrakterne na medikamente.

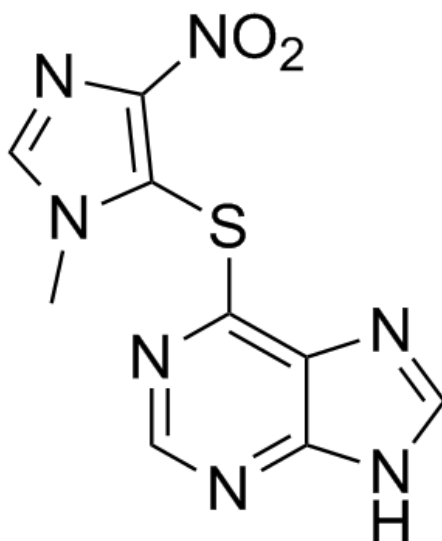
Aktualna se disertacija bavi tematikom tiopurinskih lijekova, odnosno azatioprinom koji je u Republici Hrvatskoj odobren za liječenje bolesnika s IBD, te će se u nastavku detaljnije prikazati ovaj lijek.

1.6 AZATIOPRIN

Azatioprin (AZA), uz 6-merkaptopurin (6-MP) i 6-tiogvanin (6-TG), spada u grupu tiopurinskih lijekova, koji se često koriste u liječenju kroničnih upalnih bolesti poput IBD, hematoloških malignih bolesti, reumatoloških bolesti te u transplantacijskoj medicini.

Gertrude Elion i George Hitchings sintetizirali su 1957. godine lijek pod nazivom *B.W. 57-322*, prolijevak 6-merkaptopurina, čiji je idejni cilj bio liječenje tumora (48). Vrlo brzo nakon početka uporabe, došlo se do spoznaje da ima povoljan terapijski indeks, te da 6-MP može dovesti do remisije u leukemije dječje dobi (49), odnosno duljeg preživljenja bubrežnog presatka (grafta) nakon transplantacije bubrega (50).

Azatioprin je tiopurin koji je tioeterskom vezom vezan na imidazolski prsten (Slika 1.) Radi se o blijedo žutoj krutini gorkog okusa, s točkom taljenja od 238-245°C. Netopiv je u vodi, dok je slabo topiv u lipofilnim otapalima poput kloroforma, etanola i dietiletera. Otapa se u lužnatim vodenim otopinama, gdje se hidrolizira do 6-merkaptopurina (51).



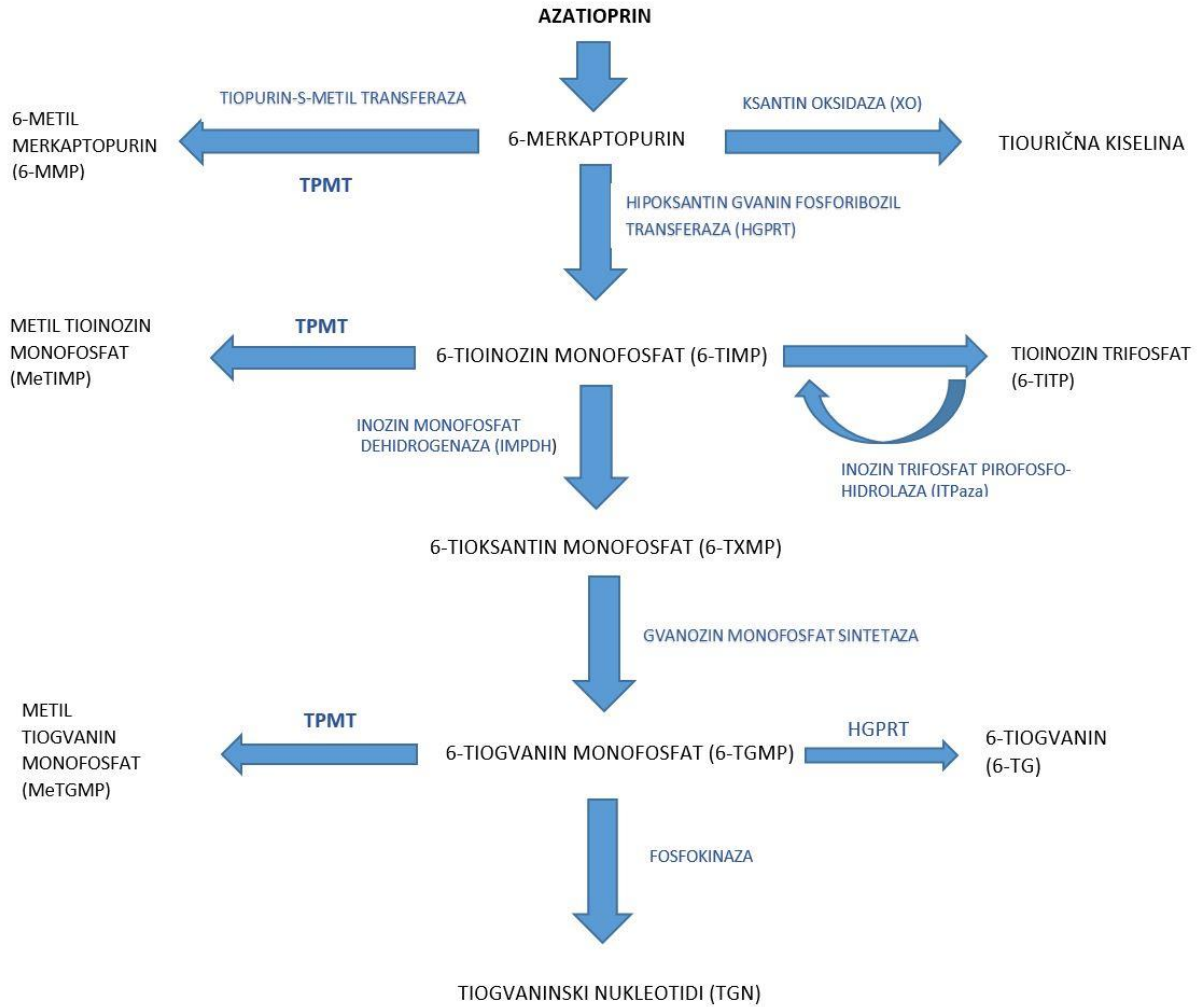
Slika 1 - Kemijska struktura azatioprina

AZA i 6-MP su purinski analozi, čije se djelovanje temelji na interferenciji sinteze endogenih purina, koji su pak esencijalna komponenta deoksiribonukleinske kiseline (DNK), ribonukleinske kiseline (RNK) te nekih koenzima (52, 53).

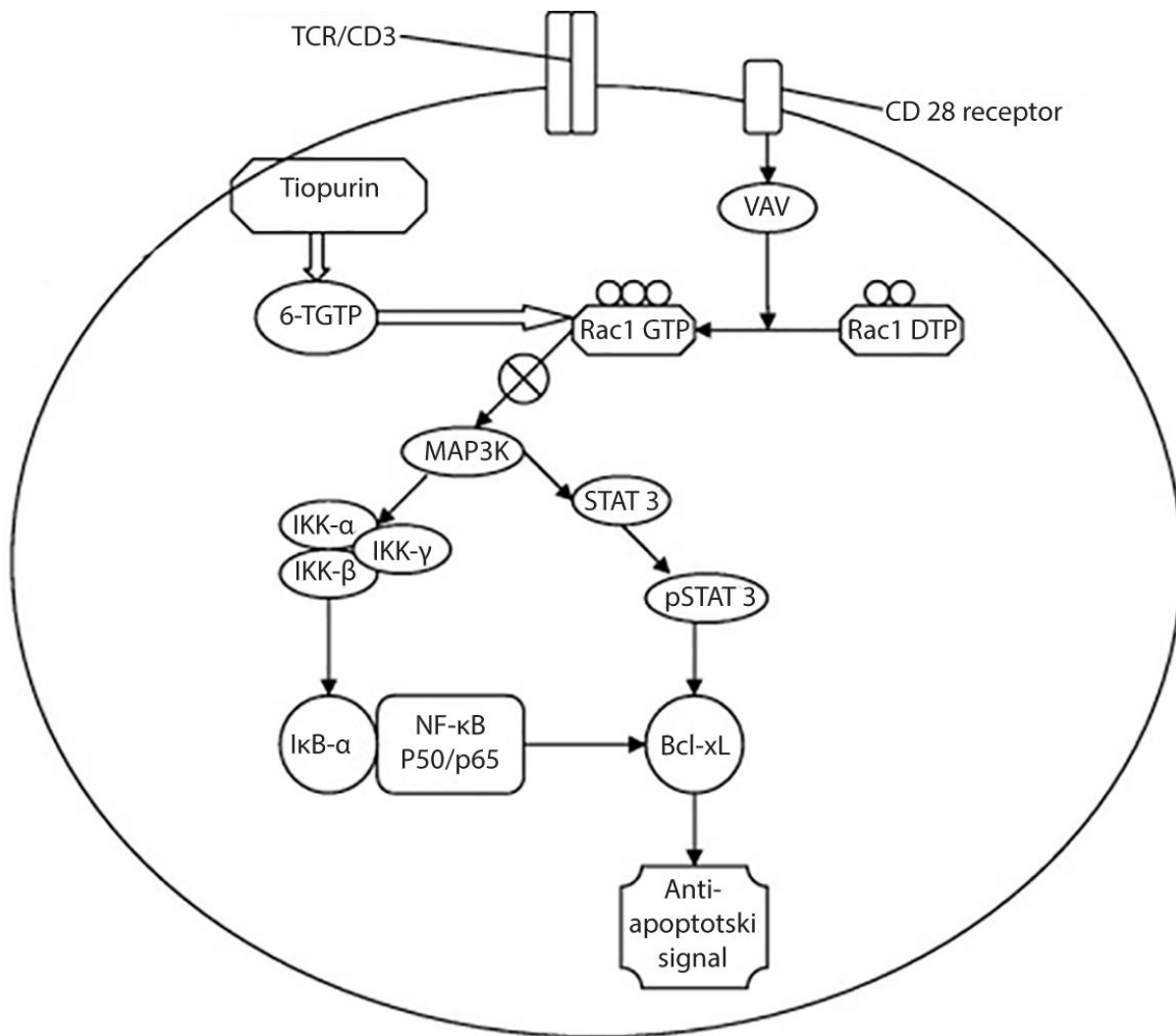
Konverzija AZA iz prolijeka u aktivan metabolit događa se u organizmu nakon oralne primjene i apsorpcije, kada se oko 90% lijeka konvertira u 6-merkaptopurin (6-MP) i metil-nitroimidazol, djelovanjem glutation-S-transferaze. 6-merkaptopurin ulazi u stanice gdje su prisutna tri kompetitivna metabolička puta (Slika 2). Ksantin- oksidaza (XO) oksidira 6-MP u inaktivni metabolit 6-tiouričnu kiselinu (6-TK); drugi put slijedi djelovanje hipoksantin gvanin fosforibozil transferaze (HGPRT), čijim djelovanjem se 6-MP konvertira u citotoksične 6-tiogvaninske nukleotidne (6-TGN) analoge, dok u trećem enzimskom ciklusu tiopurin-metiltransferaza (TPMT) inaktivira 6-MP stvaranjem 6-metilmerkaptopurina (6-MMP).

U konačnici, azatioprinski razgradni produkti se inkorporiraju u replicirajuću DNK i time zaustavljaju put sinteze purina. Ovaj biotransformacijski put je relativno specifičan za limfocite, obzirom da u njima ne postoji drugi put. Studije su pokazale da djelovanje AZA može uključivati apoptozu aktiviranih T-limfocita. Liječenje AZA-om rezultira akumulacijom 6-TGN u limfocitima. U autoimunim bolestima dolazi do aktivacije T-stanica i u tim slučajevima 6-TGN blokira ekspresije liganda koji inducira apoptozu, a vezan je uz TNF - TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, engl.*), člana 7 receptorske superobitelji TNF-a – TNFRSF7 (*TNF receptor superfamily member 7, engl.*) i α 4-integrina, konačnim efektom koji smanjuje stupanj upale (55). Ova saznanja su pokazala da azatioprin selektivno inhibira ekspresiju imunih i upalom povezanih gena u aktiviranim limfocitima. U bolesnika s IBD, T-limfociti koji se nalaze u crijevnoj lamini propriji pokazuju stupanj povećane proliferacije i reducirane apoptoze, što dovodi do akumulacije T-stanica u crijevu i dolazak polimorfonuklearnih leukocita što kulminira destrukcijom epitelnih stanica (56-58).

Tiede i suradnici (59) su 2003. godine pokazali da AZA i metaboliti djeluju na kontrolu T-stanične apoptoze modulacijom Rac1 molekule nakon kostimulacije CD 28 molekule. Blokada Rac1 aktivacije postiže se 6-tio-GTP-om koji se veže na Rac 1 umjesto GTP. Sljedno tome, AZA suprimira aktivaciju Rac1 ciljnih gena kao što su; kinaza mitogenom aktivirane protein kinaze (*mitogen-activated protein kinase kinase – MEK, engl.*), nuklearni čimbenik κ B (*nuclear factor kappa B – NF κ B, engl.*) i čimbenik ekstra velikog B-staničnog limfoma (B-cell lymphoma extra large -bcl-x_L), što dovodi do mitochondrijskog puta apoptoze (59). Time AZA konvertira kostimulatorni signal u apoptotički signal modulacijom aktivnosti Rac1 (Slika 3 - Mehanizam djelovanja tiopurinskih lijekova (modificirano prema Geary i Barclay



Slika 2 - Enzimski putevi razgradnje azatioprina u organizmu



Slika 3 - Mehanizam djelovanja tiopurinskih lijekova (modificirano prema Geary i Barclay (53))

Bioraspoloživost AZA nakon peroralne primjene iznosi 27-83%, dok 6-MP iznosi 5-37% (60, 61). Bioraspoloživost se procjenjuje mjerenjem 6-MP, jer je AZA nedetektabilna nakon peroralne primjene, obzirom da se prije jetrenog metabolizma konvertira u eritrocitima u 6-MP (62).

Obzirom da su MP i produkt razgradnje TG analozi hipoksantina i gvanina, kataliziraju se istim enzimskim procesima kao i endogeni purini, uz razliku da su MP i TG supstrati za TPMT koji katalizira MP u TG i 6-metil-merkaptopurin (6-Me-MP) i 6-metil-tiogvanin (6-Me-TG) (63, 64).

Osnovni razgradni produkt MP je tiourična kiselina (TK) putem enzima ksantin oksidaze, a koju se može detektirati u urinu nakon primjene MP (65).

Metabolizam 6-MP u tiogvanin-monofosfat (TGMP) uključuje dva enzima, inozinmonofosfat-dehidrogenazu (IMPDH) i gvanozinmonofosfat-sintetazu (GMP sintetaza). Ovo je potencijalno važno, jer intermedijarni produkt puta AZA/6-MP, tioinozinmonofosfat može djelovati kao supstrat za TPMT, dovodeći do stvaranja S-metil-tioinozin 5¹-monofosfata (6-Me-Tio-IMP). 6-Me-Tio-IMP je jak inhibitor de novo sinteze purina (*purine de-novo synthesis – PDNS, engl.*). Na inhibiciji PDNS se temelji protokol za postizanje imunosupresije i blokade proliferacije različitih tipova limfocita. Stoga se čini da se nakon oralne primjene tiopurina može postići značajna inhibicija PDNS s MeTIMP, i može doprinijeti citotoksičnoj aktivnosti AZA/6-MP (66). Mehanizam djelovanja tiopurina u IBD nije sasvim razjašnjen. 6-MP i AZA se pretvaraju u aktivne metabolite, 6-TG nukleotide (6-TGN). 6-TGN se ugrađuju u stanične nukleinske kiseline rezultirajući inhibicijom sinteze nukleotida i proteina, i konačno - inhibicijom proliferacije limfocita. U bolesnika liječenih AZA i 6-MP, TPMT određuje ravnotežu između farmakološki aktivnih 6-metil-merkaptopurina (6-MMP) i 6-TGN (66).

Pri primjeni standardnih doza AZA u osoba sa niskom aktivnosti TPMT bilježe se povišene koncentracije aktivnog metabolita 6-TGN i razvija se mijelosupresija. Kako TPMT smanjuje dostupne količine merkaptopurina za konverziju u 6-TGN, aktivnost TPMT obrnuto proporcionalno korelira sa količinom aktivnih metabolita 6-MP.

Konkomitantna terapija može promijeniti farmakokinetiku AZA ili 6-MP do klinički značajne razine te povećati rizik razvoja nuspojava. Alopurinol inhibira metabolizam prvog prolaza 6-MP putem ksantin oksidaze, što može rezultirati višekratnim povećanjem koncentracija MP

u plazmi i 6-TGN u u eritrocitima (67, 68). Konkomitantana primjena metotreksata može povisiti razinu MP i stvaranje aktivnih metabolita putem inhibicije ksantin oksidaze (69). Među lijekovima za liječenje IBD, 5-aminosalicilati dovode do inhibicije TPMT *in vitro*, a klinički značajne farmakokinetičke interakcije su zabilježene sa olsalazinom (70-72). Dodatak aminosalicilata uz AZA ili 6-MP rezultirao je povećanjem 6-TGN i značajnom leukopenijom (73). U ovoj su studiji i mesalazin i sulfasalazin izazvali blagu ili umjerenu leukopeniju. Kako su mesalazin, olsalazin i sulfasalazin relativno jaki inhibitori aktivnosti TPMT, potrebno je pažljivo praćenje krvne slike. Zabilježene su i interakcije AZA sa infliksimabom, interakcije busulfana i tiogvanina, inhibicija aktivnosti TPMT sa diureticima, te sa nesteroidnim antireumaticima.

U liječenju Crohnove bolesti, AZA je indiciran u sljedećim slučajevima (74, 75):

- u održanju umjerenog do teškog oblika CD, bilo koje lokalizacije (izuzevši slučajeve ekstenzivne bolesti)
- u održanju remisije CD kod ranog relapsa (ukoliko je prošlo manje od 3 mjeseca nakon zadnjeg relapsa) ili kod čestih relapsa (više od dva na godinu)
- u fistulizirajućem obliku CD, gdje u kombinaciji s antibioticima čini osnovu terapije (osim ako je potrebno rano uvođenje anti-TNF terapije ili kirurškog liječenja)
- u postoperativnoj prevenciji relapsa CD (osim ukoliko se radi o visoko-rizičnoj situaciji koja zahtijeva ponavljanje kirurškog zahvata, ili se pak radi o pušaču)
- u kombinaciji s anti-TNF terapijom u slučajevima teškog oblika CD

U ulceroznom kolitisu, liječenim optimalnom dozom 5-ASA, AZA je indiciran u:

- održanju remisije u steroid-ovisnom obliku UC
- održanju remisije UC s ranim relapsom koji zahtijeva steroidnu terapiju
- održanju remisije UC s čestim relapsima koja zahtijevaju steroidnu terapiju
- održanju remisije UC nakon indukcije remisije ciklosporinom, takrolimusom ili intravenskim steroidima
- akutnog ili kroničnog refrakternog *pouchitisa* (upale zdjeličnog rezervoara – *pouch*, *engl.*, kreiranog u liječenju UC)

Osim navedenih indikacija, AZA se povremeno koristi kao dodatak anti-TNF terapiji u svrhu redukcije imunogenosti koju biološki lijekovi povremeno eksprimiraju (75).

1.6.1 NUSPOJAVE AZATIOPRINA

Prema velikom nizozemskom ispitivanju, liječenje AZA i 6-MP se prekida u do 39% bolesnika zbog razvoja nuspojava (76).

Većina nuspojava lijeka se dogodi tijekom prva tri mjeseca terapije, a mogu se podijeliti u nuspojave ovisne o dozi i idiosinkratične nuspojave (77). Glavna je nuspojava lijeka mijelosupresija, koju se prati u 2-5% bjelačke populacije (78). Iako se može dogoditi u bilo kojem trenutku liječenja, u 25% slučajeva se javlja nakon godine dana liječenja (77).

Mijelosupresiju uglavnom predstavlja blaga leukopenija, s vrijednostima leukocita između 2,0 i $4,0 \times 10^9/L$, te neutropenija s apsolutnim brojem neutrofila manjim od $1,5 \times 10^9/L$. Obično je

reverzibilna ukoliko se doza lijeka smanji za 50% ili se prekine terapija (79). Mijelosupresija je usko vezana uz visoke vrijednosti 6-TGN i nisku TPMT aktivnost (80).

Nuspojave ovisne o dozi su uglavnom infektivne etiologije, no ponekad se i idiosinkratične nuspojave javljaju ovisno o dozi (74). Također, infektivne komplikacije se mogu pojaviti i u odsutnosti leukopenije, posebice ukoliko se koristi kombinacija tiopurinskih lijekova s glukokortikoidima koji mogu inducirati depleciju limfocita ovisnu o dozi (81).

Druga velika skupina nuspojava su jetrene nuspojave. One se mogu manifestirati u vidu tri sindroma – hipersenzitivnosti, idiosinkratske kolestatske reakcije i i nodularne regenerativne hiperplazije nakon višegodišnje terapije (82). Bolesnici liječeni AZA-om mogu imati blage, prolazne ili reverzibilne elevacije serumskih aminotransaminaza, što je najčešća biološka abnormalnost. Hepatotoksičnost se obično razvija rano nakon početka liječenja, s medijanom od 1,5-3 mjeseca (83). Većina bolesnika sponatno normalizira aminotransferaze unatoč nastavku terapije s AZA, dok se drugima nalazi normaliziraju po ukidanju terapije.

Najčešći idiosinkratični efekt lijeka su mučnina, povraćanje i slabost, uz druge nuspojave poput glavobolje, umora, anoreksije, gubitka na tjelesnoj težini, stomatitisa, alopecije, artralgijske, slabosti mišića i osipa – koji se mogu pojaviti u više od 10% bolesnika (74). Retrospektivne studije nisu našle povezanost između aktivnosti TPMT i gastrointestinalne intolerancije, no velike prospektivne studije su našle da je gastrointestinalna intolerancija češća u bolesnika s heterozigotnim TPMT genotipom (37 vs. 7%, $p > 0,001$) (84).

Važna idiosinkratična nuspojava lijeka je i pankreatitis, koji se može pojaviti već u prvim tjednima liječenja AZA-om (74). Često se primjećuje i blagi, asimptomatski porast serumske

amilaze, tzv. "pankreatična hiperenzinemija", no ista nije do kraja do danas razjašnjena. Ukoliko je hiperamilazemija vezana uz tipičnu kliničku sliku pankreatitisa, liječenje azatioprinom se mora prekinuti.

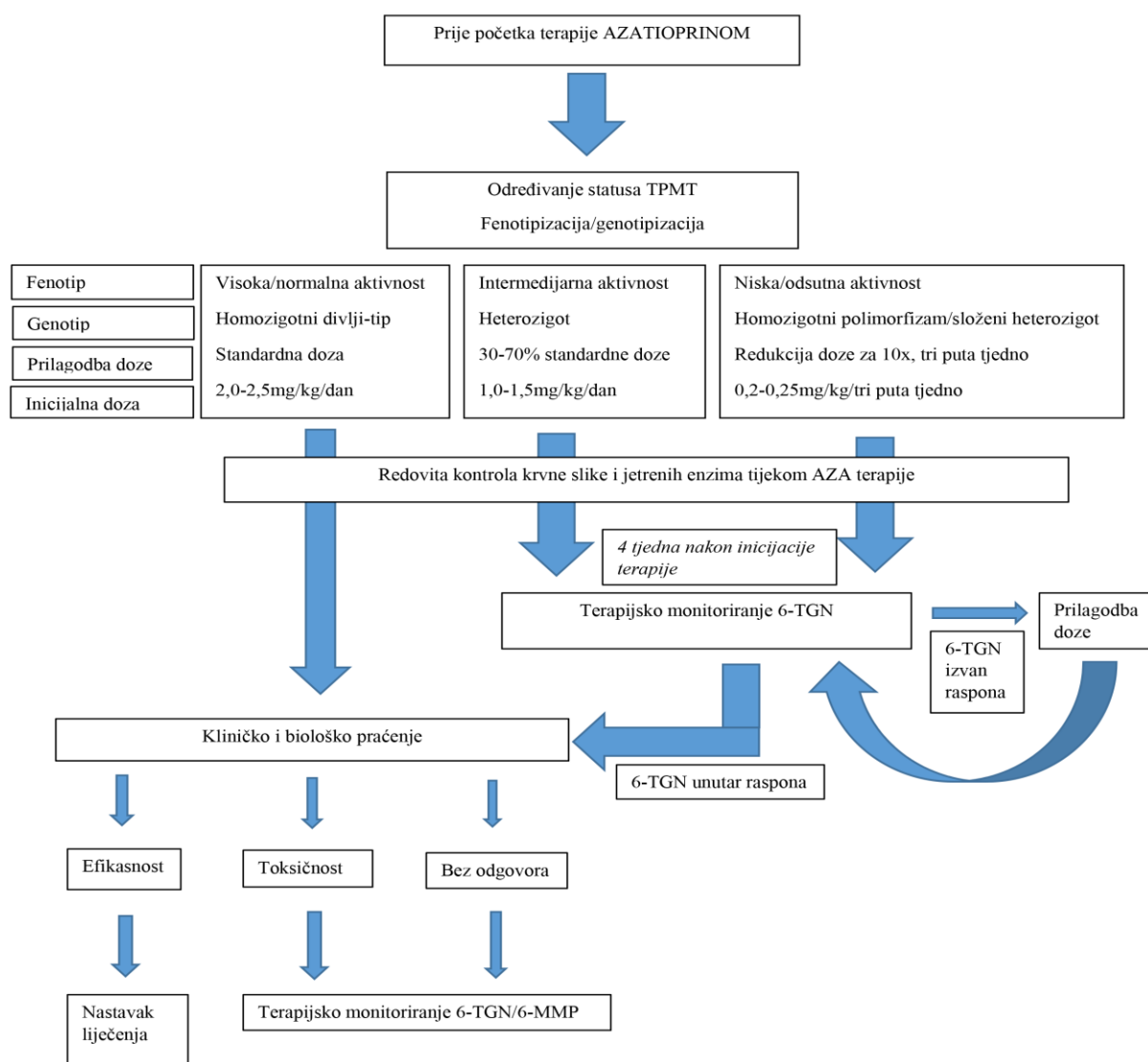
1.6.2 DOZIRANJE LIJEKA

Obzirom na mehanizam djelovanja, azatioprin spada u grupu lijekova sa sporim djelovanjem, čija klinička efikasnost ovisi o produkciji aktivnih metabolita. Meta-analizom koja je uključila četiri randomizirane, placebo kontrolirane studije bolesnika s aktivnom Crohnovom bolešću, pokazano je da odgovor organizma na djelovanje lijeka u aktivnoj Crohnovoj bolesti, prosječno nastupa nakon 17 tjedana (85).

Istraživanjima je pokazano da je najefektivnija doza azatioprina 2,0-3,0mg/kg. Postoje dva pristupa inicijaciji terapije; prvi pristup uključuje eskalaciju doze od inicijalne doze 50mg dnevno koja se povisuje po 25mg svakih tjedan do dva – sve do ciljne doze od 2,0-2,5mg/kg/dan. Drugi pristup uključuje punu dozu lijeka već prvi dan terapije. U oba je pristupa potrebno redovito monitoriranje krvne slike (81). Neposredno prije početka liječenja azatioprinom, potrebno je učiniti genotipizaciju ili fenotipizaciju TPMT-a. Ukoliko je bolesnik homozigot za divlji tip TPMT-a (više u nastavku teksta) te posjeduje visoku aktivnost enzima TPMT, lijek se može dati u punoj dozi (86). Heterozigotima za varijantni TPMT genotip, s intermedijarnom aktivnošću enzima, preporuča se započeti liječenje s 30-70% ciljne doze lijeka (npr. 1-1,5mg/kg/dan), uz titraciju do doze koja se tolerira (86). Homozigotima za varijantni TPMT genotip dozu lijeka treba drastično reducirati (10x niža doza i doziranje tri

puta tjedno umjesto dnevnog doziranja) uz prilagodbu doze azatioprina ovisno o stupnju mijesupresije, ili ako je moguće – razmisliti o drugoj terapiji (86) (slika 4).

Recentno su ipak opisani slučajevi u kojima su homozigoti za polimorfne alele TPMT-a bili liječeni AZA-om, zbog nemogućnosti davanja druge terapije. Niti jedan od opisana tri slučaja nije razvio neželjene posljedice, no uz vrlo strogi režim monitoriranja azatioprinskih metabolita i laboratorijskih nalaza (87).



Slika 4 - Terapijski algoritam u praćenju terapije azatioprinom (uređeno prema Chouchana i sur.) (82)

Recentno su otkriveni i drugi farmakogenetski čimbenici koji doprinose varijabilnosti u odgovoru na liječenje AZA. Jedan od njih je inozin trifosfataza (ITPaza), enzim široko raspostranjen u tkivima – uključujući i leukocite i eritrocite (88). U normalnim stanicama kinaza stvara inozin difosfat (IDP) i inozin trifosfat (ITP) iz inozin monofosfat (IMP), dok ITPaza konvertira ITP ponovno u IMP, kako bi očuvala stanice od potencijalno štetnih nukleotida koji se mogu inkorporirati u nukleinske kiseline (89). Kod bolesnika koji se liječe AZA-om, također postoji ovaj ciklus, gdje ITPaza hidrolizira 6-tioinozin trifosfat (6-TITP) u 6-tio-inozin monofosfat (6-TIMP). Manjak ITPaze dovodi do toksične akumulacije 6-TITP. Genetička mutacija, 94C>A, koja je identificirana u 6-7% bjelačke i afričke populacije te u do 19% azijata, je povezana s potpunim manjkom enzimatske aktivnosti (90). Značajne povezanosti između mutacija za ovaj enzim su nađene za pankreatitis, osip i simptome nalik gripi (91).

Drugi potencijalni enzim uključen u razvoj nuspojava na AZA je glutation S-transferaza (GST), citosolični enzim koji pripada u super-familiju enzima odgovornih za konjugaciju brojnih ksenobiotika (82). Određene izoforme GST su povezane s velikom katalitičkom aktivnošću, naročito spram AZA – time se došlo do spoznaje da visoka aktivnost GST u jetri, u kombinaciji s visokom dozom AZA može dovesti do deplecije glutationa i time do oštećenja stanica (92).

Još jedan enzim koji sudjeluje u ranoj detoksifikaciji azatioprina je ksantin oksidaza (XO). Radi se o ubikvitarnom citoplazmatskom enzimu koji se nalazi u tankom crijevu i jetri, te uvelike doprinosi metabolizmu prvog prolaza dijetalnih purina i tiopurina (93). Manjak XO je vrlo rijedak poremećaj, s incidencijom od otprilike 1/70 000 (94). Aktivnost ovog enzima varira od 4-10 puta između individua, što uvelike može doprinijeti kliničkom odgovoru na AZA.

Aldehid oksidaza (AOX) je enzim također uključen u rani tiopurinski metabolizam, koji katabolizira 8-hidroksilaciju AZA ili 6-MP u inaktivne sastojke (95). Prepoznati su polimorfizmi na AOX genu koji su povezani uz manjak kliničkog odgovora na AZA (96).

Polimorfizmi enzima metilen tetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) iz folatnog ciklusa mogu posredno utjecati na stvaranje SAM-a, kofaktora za TPMT, i time djelovati na aktivnost TPMT (97).

ABCC4 je nukleotidni transporter purina, eksprimiran u raznim stanicama, uključivo i u mijeloidnim progenitorskim stanicama (98). On štiti stanicu od akumulacije citotoksičnih tiopurinskih metabolita, te može utjecati na tiopurinsku rezistenciju. Polimorfizam vezan uz ovaj transporter je opisan u do 18% japanske populacije, i vezan je uz reduciranu funkciju ABCC4 (98, 99). U ovih je bolesnika značajno snižen broj leukocita povezan s povećanom koncentracijom 6-TGN.

1.7 TIOPURIN-METILTRANSFERAZA

Tiopurin- metiltransferaza (TPMT, E.C.2.1.1.67) je citoplazmatski enzim čija je funkcija katalizacija S-metilacije aromatskih i heterocikličkih sulfihidrilnih spojeva. Kodirana je TPMT genom koji se nasljeđuje autosomno kodominantnim putem; nalazi se na 6. kromosomu (6p22.3) i sadrži 10 egzona, a veličine je 27 kilobaza (100-102). Do sada su identificirana 3 alela povezana s normalnom aktivnosti TPMT (TPMT*1 i 2 tiha polimorfizma), te više od 30 varijantnih alela odgovornih za smanjenu aktivnost enzima, od kojih je posljednji detektiran

2014. godine (103). Enzimi su dobivali nazive prema vremenu otkrivanja, dok je posljednja varijanta dobila naziv TPMT*37 (103). Većina ovih alelnih varijanti sadrži polimorfizam jednog nukleotida koji dovodi do supstitucije aminokiseline, te time do novog konačnog proteinskog produkta. Najčešće alelne varijante široke geografske distribucije su: TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B te TPMT*3C (100); divlji tip enzima se označava s oznakom TPMT*1/*1. Svaka od polimorfničkih varijanti kodira TPMT protein koji se vrlo brzo proteolizira te rezultira deficitom TPMT-a (102). Navedene najpoznatije polimorfne varijante sadrže slijedeće supstitucije: TPMT*2, prva otkrivena varijanta, sadrži G>C supstituciju na 238. nukleotidu, što dovodi do zamjene rigidnog prolina u fleksibilni alaninski ostatak (104). TPMT*3A, varijanta koja je najvećom učestalošću odgovorna za smanjenu aktivnost enzima u heterozigota bijele rase, sadrži dvije nukleotidne tranzicije G460A i A719G, što dovodi do zamjena alanina u treonin, te tirozina u treonin. TPMT*3B ima samo tranziciju G460A, odnosno zamjenu alanina u treonin, dok TPMT*3C, alel koji se najviše detektira u populacijama Afrike i jugoistočne Azije, sadrži samo A719G tranziciju – zamjenu tirozina za treonin (105, 106). Prevalencija polimorfizama iznosi otprilike 10% u bjelačkoj populaciji, 2% u jugo-zapadnih azijata te 5% u kineskoj populaciji (106).

U povijesnoj studiji Weinshilbouma i suradnika (101) na 298 bolesnika, pokazano je da aktivnost TPMT-a ima trimodalnu distribuciju; približno 90% osoba ima divlji genotip s visokom aktivnošću enzima TPMT (13,5+1,86U/ml ERC), 11% nasljeđuje jedan varijantni alel niske aktivnosti i imaju intermedijarnu aktivnost enzima (7,20+1,08 U/ml ERC), dok 1 od 300 osoba ima dva varijantna alela i nisku ili nemjerljivu aktivnost enzima (107).

Unatoč trimodalnoj distribuciji, aktivnost TPMT-a varira između različitih vrijednosti, jer čak i kod bolesnika s visokom aktivnošću, oko 15% osoba ima aktivnost TPMT iznad normalnih vrijednosti, dok 1-2% ima ultra-visoku TPMT aktivnost (108). Postoje opisi osoba koje imaju divlji tip genotipa, ali i reduciranu aktivnost enzima, što daje naslutiti da uz polimorfizme TPMT postoji još nešto što određuje enzimatsku aktivnost (109, 110). Čini se da i druge abnormalnosti gena locirane na nekodirajućim sekvencama TPMT gena mijenjaju ekspresiju i/ili aktivnost TPMT (111). Aktivnost enzima može varirati i do 50 puta između individua, ovisno o statusu polimorfizama (53, 101).

Evaluacija aktivnosti TPMT bazira se na određivanju enzimске aktivnosti u crvenim krvnim stanicama, mjerenjem količine 6-MMP ili 6-metiltiogvanina (6-MTG), koji se stvaraju metilacijom 6-MP ili 6-TG (slika 2). Metilaciju omogućuje TPMT u prisustvu donora metila, što je najčešće S-adenozil-L-metionin (SAM) (112). Mjerenje enzimске aktivnosti nužno je provoditi pod konstantnim uvjetima i pod standardnim doziranjem tijekom određene faze liječenja (113). Pri tome treba imati na umu da transfuzije utječu na TPMT fenotip, te je aktivnost enzima potrebno mjeriti najmanje tri mjeseca nakon transfuzije.

Prema studiji Lindquista i suradnika (114), aktivnost TPMT mjerena prije i tijekom liječenja tiopurinima je bila jednaka, no smanjila se ekspresija TPMT gena - vjerojatno zbog inhibicije sinteze purina meTIMP-om formiranim iz tiopurina, što dovodi do smanjene količine purina dostupnih za sintezu DNK i RNK. U određivanju enzimске aktivnosti TPMT, važna je i kronološka dob, obzirom da su studije pokazale da zdravi neonatusi imaju najveću aktivnost enzima (115, 116), dok mlađa djeca imaju značajniju aktivnost u odnosu na stariju, kao i starija

u odnosu na adultnu dob (117). Prema Klemetsdal, važnu ulogu ima i spol, s većom aktivnošću enzima u muškaraca (118).

Ukoliko je aktivnost TPMT-a niska, dolazi do veće konverzije 6-MP u 6-TGN putem HGPRT enzimskog puta (slika 2). Iako su tiogvaninski nukleotidi dominantno aktivni metaboliti, u većoj koncentraciji mogu djelovati mijelotoksično. Ukoliko je pak aktivnost TPMT-a visoka, dolazi do povećanog stvaranja 6-MMP produkata, što dovodi do smanjene efikasnosti lijeka (53). Stoga je u organizmu važna homeostaza svih enzimskih procesa. U koštanoj je srži ravnoteža između aktivacije i inaktivacije 6-MP glavna odrednica imunosupresije i antiproliferacijskog djelovanja.

Upravo ove varijacije u nasljeđivanju aktivnosti enzima doprinose razvoju individualne osjetljivosti na tiopurinske lijekove, odnosno razvoju nuspojava.

1.8 MONITORIRANJE LIJEKA

Važno kliničko sredstvo u monitoriranju suradljivosti bolesnika u liječenju je mjerenje koncentracija 6-TGN ili 6-MMP u eritrocitima tekućom kromatografijom (119). Upravo su razine metabolita 6-TGN pokazale snažnu inverznu korelaciju s aktivnošću bolesti u adolescentnih bolesnika s CD (120). Prema ovoj je studiji veliki raspon eritrocitnih 6-TGN koncentracija bio povezan s kliničkim odgovorom na terapiju, dok su bolesnici s 6-TGN koncentracijama većim od $250\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ERC}$ uglavnom bili asimptomatski. Manjak kliničkog odgovora je bio jasno povezan s niskim eritrocitnim koncentracijama 6-TGN. S druge

strane, eritrocitne koncentracije 6-MMP nisu pokazale povezanost s kliničkim odgovorom na terapiju.

Smjernice američkog gastroenterološkog društva (AGA – American Gastroenterological Association, *engl.*), kao i Europskog društva za Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis (ECCO – European Crohn and Colitis Organisation, *engl.*) savjetuju rutinsko TPMT testiranje, bilo enzimске aktivnosti ili genotipa, u praćenju doziranja tiopurina. Rutinsko pak laboratorijsko monitoriranje, uključivo kompletnu krvnu sliku mora se provoditi neovisno o rezultatima TPMT testiranja (121, 122). Tri randomizirane kontrolirane studije uspoređivale su testiranje TPMT prije uvođenja tiopurina u terapiju u odnosu na empirijsko doziranje ovisno o tjelesnoj težini (123-125). Studijama se pokazalo da je rizik od nuspojava ukoliko se ne ispituje TPMT aktivnost/genotip prije uvođenja tiopurina u terapiju minimalan, no postoji značajan rizik od teških nuspojava u 0,3% bolesnika koji imaju homozigotni genotip ili imaju nisku/odsutnu enzimsku aktivnost. Iako ovaj rizik može biti smanjen rutinskom kontrolom krvne slike, u kliničkoj praksi se provodi suboptimalno (122). Stoga je bitno provoditi rutinsko laboratorijsko monitoriranje krvne slike i jetrenih enzima nakon uvođenja tiopurina, neovisno o rezultatima TPMT testiranja – prvih mjesec dana jednom tjedno, tijekom drugog mjeseca jednom u dva tjedna i potom jednom mjesečno u nastavku terapije.

U adultnih bolesnika s aktivnim IBD, ili koji su razvili nuspojave za koje se smatra da su posljedica tiopurinske terapije, AGA sugerira mjerenje reaktivnih tiopurinskih metabolita u titriranju terapije. Prema algoritmu, ukoliko je koncentracija 6-TGN niska ($<230\text{pmol}/8 \times 10^8$ ERC), doza se mora optimizirati. Ukoliko je koncentracija 6-TGN kod ovih bolesnika adekvatna, potrebno je promijeniti terapiju. Ciljne vrijednosti 6-TGN metabolita su između 230 i

450pmol/8 x10⁸ , u slučajevima monoterapije ovim lijekom. Međutim, nije potpuno jasno vrijedi li ova ciljna koncentracija tiopurina i u slučajevima kada se lijek koristi uz anti-TNF lijekove (122).

Kod odraslih bolesnika u stabilnoj fazi IBD, AGA ne savjetuje rutinsko monitoriranje tiopurinskih metabolita, obzirom da studije vođene na ovim bolesnicima nisu našle statistički značajnih razlika u stopi postizanja kliničke remisije ili značajnih nuspojava kod rutinskog monitoriranja tiopurinskih metabolita u odnosu na standardno doziranje (126, 127).

Koristan pristup u kliničkoj praksi je praćenje hematoloških markera u smislu surogatnih markera za provjeru terapijskog uspjeha tiopurina. Ova strategija uključuje monitoriranje promjena u prosječnom korpuskularnom volumenu eritrocita (MCV) ili u indukciji leukopenije. Prospektivne opservacijske studije su pokazale da MCV>101fL pouzdano isključuje niske terapijske razine 6-TGN (128).

Dio bolesnika metabolizira tiopurine primarno u smjeru 6MMP, što je zapravo vjerojatno čimbenik neuspjeha tiopurinske terapije (manjka efikasnosti ili razvoja nuspojava) u dijela IBD bolesnika. Vrijednosti 6MMP >5700pmol/8x10⁸ ERC su povezane s hepatotoksičnošću, međutim ova korelacija nije univerzalna, te bolesnici mogu razviti idiosinkratičnu reakciju unatoč normalnim razinama 6MMP (129).

Već je ranije navedeno da je u kliničkoj praksi vrlo česta uporaba azatioprina u kombinaciji s aminosalicilatima. Brojne su studije pokazale da aminosalicilati djeluju na povišenje doze 6TGN u većine bolesnika, iako nije u potpunosti jasno ima li ovaj utjecaj određenu kliničku važnost (128). Treba li mijenjati dozu azatioprina u slučaju dvojnog liječenja navedenom

terapijom, vrlo vjerojatno ovisi i o genetskim karakteristikama određene populacije, što potvrđuje recentna studija koja je našla utjecaj polimorfizma N-acetil transferaze na razinu 6TGN u bolesnika liječenih tiopurinima, a time i utjecaj na toksičnost i efikasnost ovih lijekova (130).

Moguć je i utjecaj kombinirane terapije azatioprina i anti-TNF lijekova na razinu 6TGN, međutim studije nisu potpuno jasne u zaključku o potrebi smanjivanja doze azatioprina u konačnom cilju smanjivanja razine 6TGN.

1.8.1 OPTIMIZACIJA LIJEČENJA AZATIOPRINOM OVISNO O RAZINI METABOLITA

Jedan od glavnih neuspjeha tiopurinske terapije je već ranije naveden – osobe koje primarno stvaraju 6MMP umjesto 6TGN. Radi se o tzv. *shunterima*. Eskalacija doze kako bi se postigle terapijske razine 6TGN može dovesti do visokih razina 6MMP. Povećani je odnos 6MMP/6TGN povezan s lošim terapijskim odgovorom i nuspojavama poput glavobolje, opće slabosti, mijalgije i hepatotoksičnosti (128). Shih i suradnici (131) su u studiji iz 2012.godine pokazali da podjela dnevne doze azatioprina kod intolerantnih bolesnika s visokim razinama 6MMP može dovesti do značajne redukcije razine 6MMP, dok su vrijednosti 6TGN iznad terapijske razine; time dolazi do rezolucije 6MMP-povezanih nuspojava. Ova studija ukazuje na činjenicu da strategija podijeljenje doze može dovesti do promjena u metaboličkom profilu, ali može opstati i kao alternativni pristup u ovoj grupi bolesnika. Međutim, i dalje je potrebno strogo monitoriranje metabolita, kako bi se izbjegla toksičnost ili hipodoziranje tiopurinima (131).

Drugi alternativni pristup kod osoba s primarno 6MMP metabolizmom je dodavanje alopurinola u terapiju, obzirom da lijek doprinosi povećanju koncentracije 6TGN i smanjenju serumske koncentracije toksičnih 6MMP metabolita (128). Točan mehanizam kojim alopurinol djeluje na ovu metaboličku promjenu nije u potpunosti jasan, iako direktna inhibicija XO može rezultirati promjenom u smjeru metabolizma HGFRT, odnosno do povećanja serumskih razina 6TGN, ili pak drugim putem u smjeru inhibicije TPMT kroz stvaranje 6-tioksantina.

Klasična kombinacija azatioprina uz alopurinol uključuje redukciju doze azatioprina za najmanje 50% te uvođenje 100mg alopurinola, iako su se i manje doze pokazale korisnima i sigurnima (132). Međutim, i dalje je potrebno strogo monitoriranje hematoloških parametara na tjednoj bazi tijekom prvog mjeseca terapije, a potom svaki drugi tjedan tijekom drugog mjeseca terapije.

Febuxostat je novi XO inhibitor koji se pokazao korisnim u prevenciji hipermetilacije i stvaranju 6TGN metabolita, no optimalna doza lijeka još nije utvrđena (133).

U konačnici, u svih je opcija potrebno redovito monitoriranje krvne slike, prema shemi jednom tjedno prva četiri tjedna terapije, potom jednom u dva tjedna tijekom drugog mjeseca terapije i potom jednom mjesečno.

2 HIPOTEZA

Istraživanje je započeto pod pretpostavkom da liječenje azatioprinom pokazuje značajnu interindividualnu varijabilnost u učinkovitosti i razvoju nuspojava. Polimorfizam gena koji kodira metabolički enzim tiopurin-metiltransferazu predstavlja značajan rizični čimbenik za nastanak nuspojava tiopurinskih lijekova.

3 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

S obzirom na dosadašnja istraživanja i poznate učestalosti polimorfizama gena tiopurin-metiltransferaze u određenim populacijama, te zbog nedostatka podataka za hrvatsku populaciju, cilj ovog istraživanja bio je odrediti učestalosti najčešćih polimorfizama ovog gena: TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B te TPMT*3C u bolesnika s upalnim bolestima crijeva, te u hrvatskoj zdravoj populaciji.

Drugi cilj bio je ispitati ulogu polimorfničkih oblika TPMT u nastanku nuspojava azatioprina primijenjenih u liječenju bolesnika s IBD.

Zaključno, specifični ciljevi istraživanja jesu:

1. Odrediti učestalost polimorfizama TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B i TPMT*3C u hrvatskoj populaciji zdravih ispitanika, te u bolesnika s upalnim bolestima crijeva
2. Odrediti učestalost polimorfizama prema glavnim fenotipovima upalnih bolesti crijeva – Crohnovoj bolesti te ulceroznom kolitisu
3. Usporediti učestalost polimorfizama u hrvatskoj populaciji u odnosu na druge svjetske, do sada ispitane populacije
4. Procijeniti učestalost nuspojava u bolesnika na terapiji azatioprinom uz korelaciju s polimorfizmima gena TPMT
5. Procijeniti važnost polimorfizama TPMT za učinke azatioprina u konkomitantnoj terapiji s aminosalicilatima i kortikosteroidima

3.1 ZNANSTVENI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

Kako do sada u Hrvatskoj nije određivana učestalost polimorfizama gena TPMT u populaciji bolesnika s upalnim bolestima crijeva, ovo ispitivanje bi moglo ukazati na ulogu farmakogenetičkog testiranja TPMT u svrhu predviđanja rizika od razvoja nuspojava uz terapiju azatioprinom. Ovo će istraživanje doprinijeti i spoznajama o dometima interakcija azatioprina uz lijekove koji se koriste u liječenju upalnih bolesti crijeva, u ovisnosti o polimorfizmima gena TPMT.

4 ISPITANICI I METODE

4.1 ISPITANICI

Istraživanje je provedeno u razdoblju 2005.-2014. godine u Klinici za unutarnje bolesti, Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju, i Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije, Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

U prvi dio istraživanja je uključeno ukupno 685 ispitanika, od kojih su 459 bolesnici koji boluju od upalnih bolesti crijeva, dok je 226 zdravih dobrovoljaca. U skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva, 338 osoba su bolesnici s Crohnovom bolešću, dok 121 osoba boluje od ulceroznog kolitisa. U istraživanje nisu uključeni bolesnici s neklasificiranim oblikom upalne bolesti crijeva.

U drugom su dijelu istraživanja uključeni bolesnici s upalnim bolestima crijeva. Svim su bolesnicima obrađeni anamnestički podatci, od početka uzimanja imunosupresivne terapije azatioprinom do njegova ukidanja zbog prekida djelotvornosti, razvoja nuspojava ili do prestanka potrebe za uzimanjem istog.

Podatci su se obrađivali retrospektivno i prospektivno. Retrospektivno su se podatci analizirali iz dostupnih povijesti bolesti, a prospektivno su se parametri određivali kod novodijagnosticiranih bolesnika s IBD. Analizirali smo hematološke parametre (broj eritrocita, leukocita i trombocita), nalaze jetrenih enzima te enzima gušterače. Osim toga, analizirali su se i anamnestički podatci o subjektivnim tegobama po uzimanju ispitivane terapije azatioprinom.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC Zagreb kao i od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svi ispitanici upoznati su sa protokolom i svrhom istraživanja, a prije uključivanja potpisali su informirani pristanak. Istraživanje je provedeno u skladu s etičkim načelima i Deklaracijom iz Helsinkija iz 2000. godine.

4.2 METODE

Svim je ispitanicima uzeto 5 ml pune krvi s etilendiamin tetraoctenom kiselinom (EDTA) kao antikoagulansom. Izdvajanje DNK provedeno je metodom izoliranja prema Milleru (90).

4.2.1 OPREMA

- Aparat za brzo izdvajanje DNA KingFisher (Thermo Scientific, Njemačka)
- Aparat za umnažanje DNA u stvarnom vremenu ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD)
- Centrifuge (Eppendorf, Njemačka)
- Tresilice (Koetterman, Njemačka)
- Hladnjak (Gorenje, Slovenija)
- Kupelj (Koetterman, Njemačka)

4.2.2 PRIBOR

- Epruvete za male količine uzorka, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL (Eppendorf, Njemačka)

- Automatske pipete 1-100 μ L (Eppendorf, Njemačka)
- Nastavci za automatske pipete 1-100 μ L (Eppendorf, Njemačka)

4.2.3 REAGENSI

- Kit za brzo izdvajanje DNA (*BioSprint 15 DNA Blood Kit*: proteaza, puferi AL, AW1, AW2, AE, suspenzija MagAttract) (Qiagen, Njemačka)
- Gotovi kitovi za analizu polimorfizama TPMT- *TaqMan[®] SNP Genotyping Assay* (Applied Biosystems, CA, SAD)
- *TaqMan[®] Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Ca, SAD)

4.2.4 IZDVAJANJE DNA

- Izdvajanje DNA iz 5 ml pune krvi s Na-EDTA antikoagulansom provedeno je s kitom za izdvajanje DNA (Qiagen, Njemačka), prema uputama proizvođača, na aparatu KingFisher (Njemačka).

4.2.5 GENOTIPIZACIJA TPMT

TaqMan[®] metoda PCR u stvarnom vremenu

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 reagens TaqMan® SNP Genotyping Assay ID C_12091552_30, C_30634116_20; 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.

Načelo metode:

Korišteni su reagensi TaqMan® SNP Genotyping Assay, koji sadrže specifične početnice i TaqMan® fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe. Za detekciju se koristi fluorescentni signal koji nastaje zbog 5' nukleazne aktivnosti Taq DNA polimeraze. Fluorescentni signal se detektira CCD kamerom (engl. charge – coupled device) i analizira pomoću računalnog programa 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems, SAD). Analizom alelne diskriminacije koja koristi par fluorescentno obilježenih detektora VIC® i FAM® (jedan detektor se poklapa s divljim tipom alela, a drugi s varijantnim alelom) ispituje se radi li se o homozigotu za divlji tip alela, heterozigotu ili homozigotu za mutirani alel. Sastojci pojedinačnih reakcijskih smjesa za genotipizaciju su prikazani u tablici 1, a uvjeti PCR reakcije u tablici 2. Slike 5, 6 i 7 prikazuju analizu alelne diskriminacije za svaki polimorfizam pojedinačno na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR System.

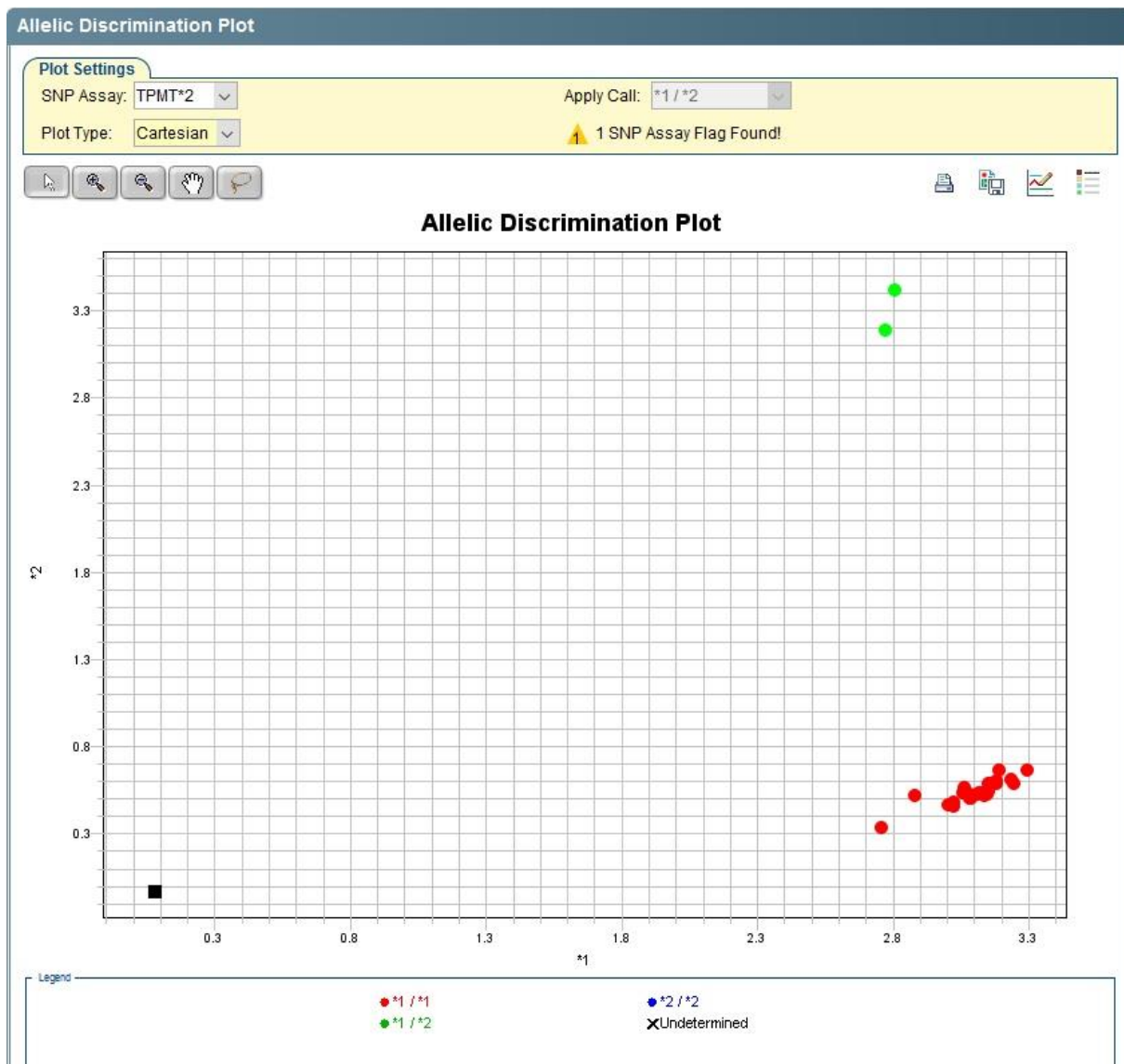
Tablica 1 - Sastojci pojedinačne reakcijske smjese za genotipizaciju TaqMan® metodom

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (µL)	Konc. u reakcijskoj smjesi
<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix</i>	12,5	1x
<i>TaqMan® SNP Assay Mix *</i>	1,25	1x
DNA razrjeđenje	11,25	1-20 ng
Ukupni volumen reakcijske smjese	25	

*Za analizu svakog polimorfizma koristi se odovarajući *TaqMan® SNP Assay*

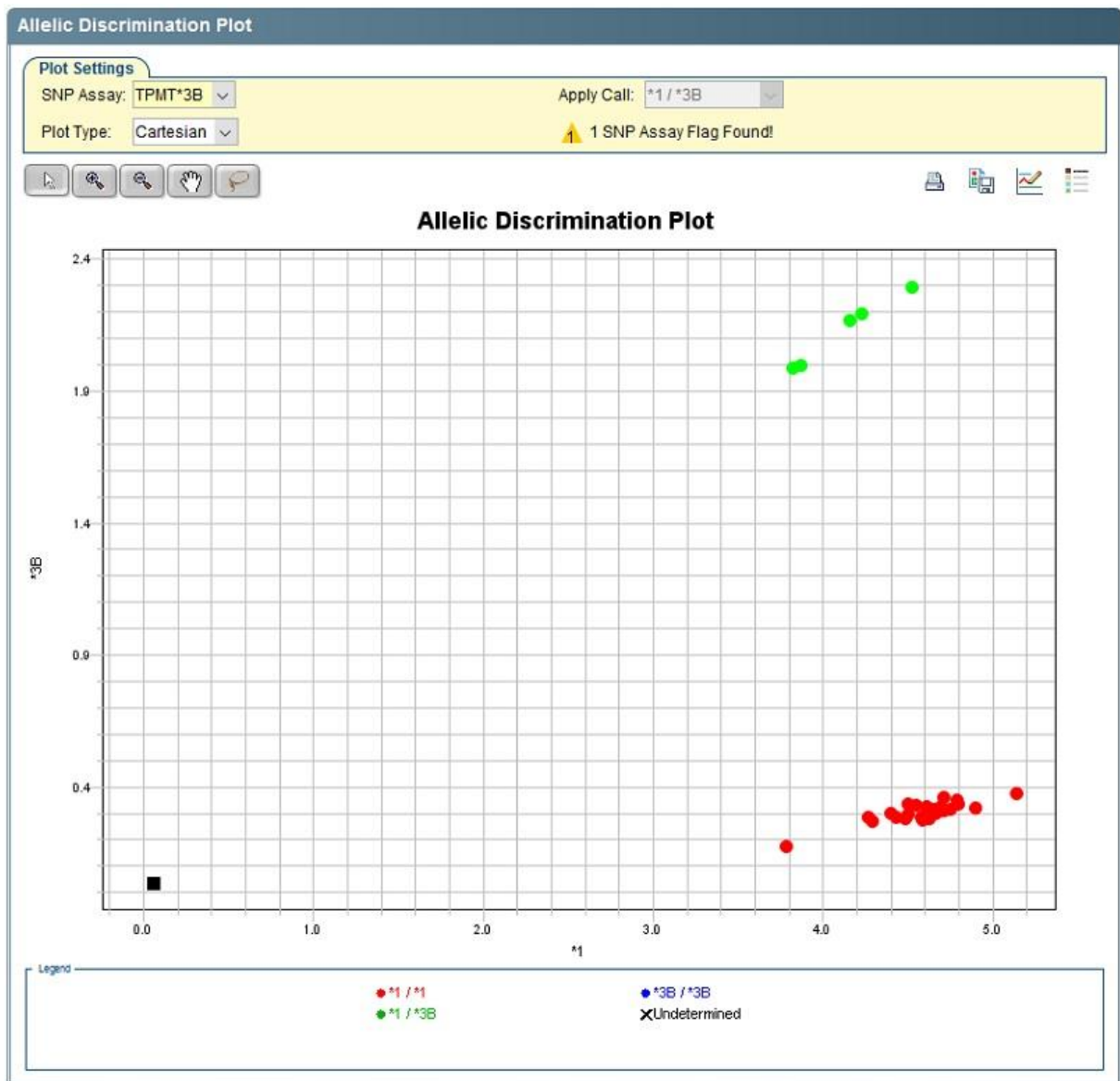
Tablica 2 - Uvjeti PCR reakcije na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR System

Pre-PCR	INICIJACIJA	PCR (50 ciklusa)		Post-PCR
temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje
60 °C / 60 s	50 °C / 2 min 95 °C / 10 min	92 °C / 15 s	60 °C / 60 s	60 °C / 60 s



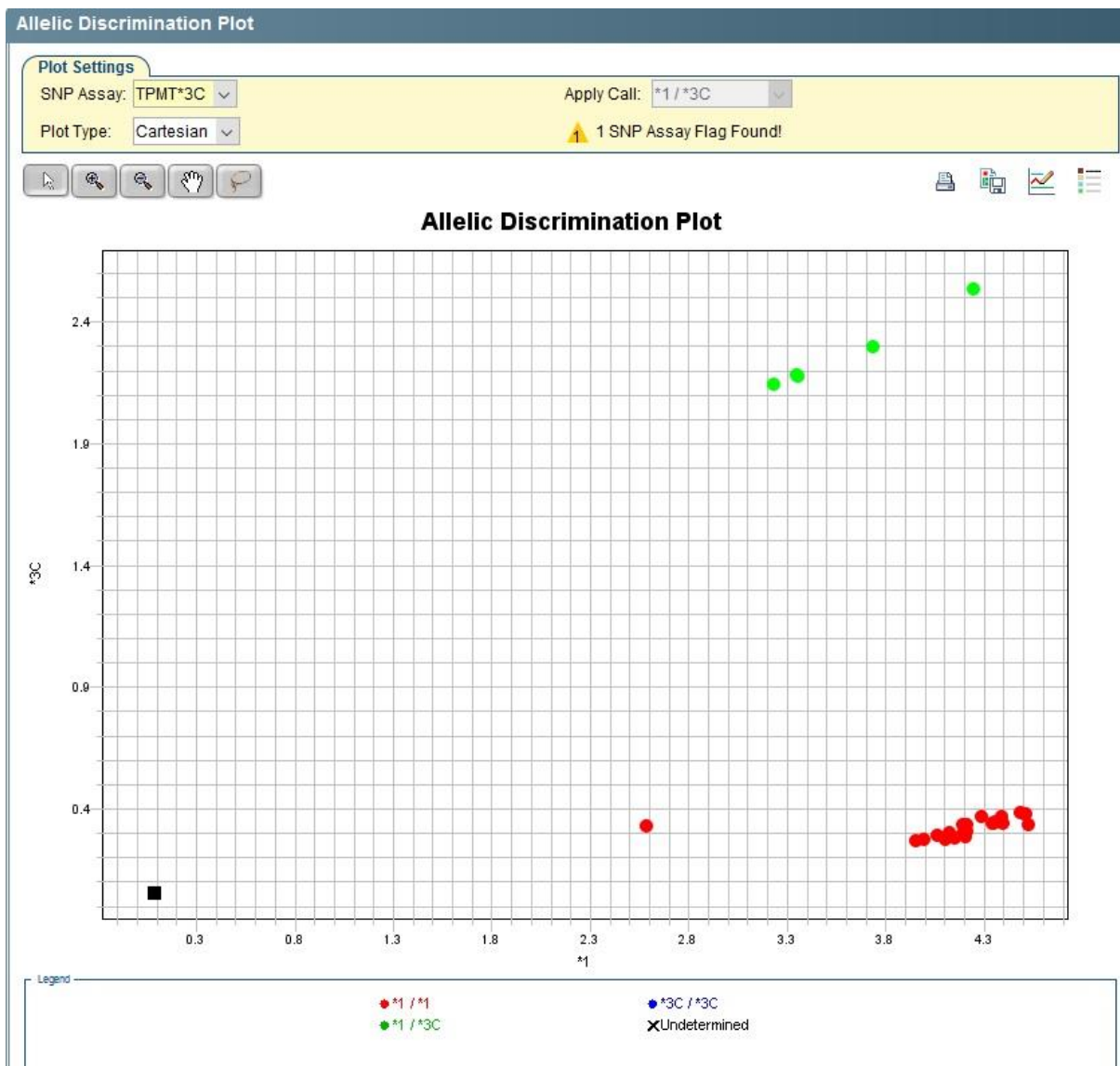
Slika 5 - Analiza alelne diskriminacije polimorfizma TPMT*2, metodom TaqMan®

Tumačenje: crvene točkice - homozigot divlji tip *1/*1; zelene točkice - heterozigot *1/*2



Slika 6 - Analiza alelne diskriminacije polimorfizma TPMT*3B, metodom TaqMan®

Tumačenje: crvene točkice - homozigot divlji tip *1/*1; zelene točkice - heterozigot *1/*3B



Slika 7 - Analiza alelne diskriminacije polimorfizma TPMT*3C, metodom TaqMan®

Tumačenje: crvene točkice - homozigot divlji tip *1/*1; zelene točkice - heterozigot *1/*3C

4.3 STATISTIČKA OBRADA

Za sve analizirane varijable učinjena je deskriptivna statistička obrada.

4.3.1 ANALIZA TPMT GENOTIPOVA

Razlike u frekvenciji TPMT genotipova između skupina analizirane su χ^2 testom. U slučajevima malih očekivanih frekvencija (manjih od 5), korišten je Fisherov egzaktni test. Frekvencija svakog genotipa izražena je s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (*engl. CI – confidence interval*). Razina značajnosti od $p=0.05$ je smatrana statistički značajnom. U prvom dijelu istraživanja korišten je statistički paket SPSS 17.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Test odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže učinjen je korištenjem metode Markovog lanca (134), implementirano u verziju Arlequin 3.5.1.2. (135)

4.3.2 ANALIZA NUSPOJAVA AZATIOPRINA TE UTJECAJA KONKOMITANTNE TERAPIJE

U drugom dijelu istraživanja promatrana je uporaba azatioprina, nuspojave istog te uporaba konkomitantne terapije (aminosalicilati, kortikosteroidi, anti-TNF α), korištenjem medicinske dokumentacije bolesnika.

Po uvidu u sve dostupne nalaze, učinjena je statistička deskriptivna obrada podataka, analiza razvijenih nuspojava po organima u odnosu na najčešće polimorfne alele gena TPMT, te analiza nuspojava u ovisnosti o konkomitantnoj terapiji i navedenim polimorfizmima.

U analizi je korišten statistički paket "R" (136). Statistička značajnost je postavljena na $p < 0,05$.

Upalne bolesti crijeva su definirane prema standardnim kriterijima (137).

5 REZULTATI

5.1 OSNOVNE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

U studiju je uključeno 685 ispitanika. Najveći broj ispitanika boluje od Crohnove bolesti (tablica 3).

Tablica 3 - Sudionici studije ovisno o dijagnozi

	N	(%)
Crohnova bolest	338	(49,3)
Ulcerozni colitis	121	(17,7)
Kontrolna grupa	226	(33,0)
Ukupno	685	(100,0)

U skupini bolesnika s Crohnovom bolesti, registriran je veći broj osoba muškog spola, za razliku od ulceroznog kolitisa gdje ima više osoba ženskog spola. U skupini zdravih dobrovoljaca prevladavaju osobe ženskog spola (tablica 4).

Tablica 4 - Sudionici prema dijagnozi i spolu

	Ženski spol		Muški spol		Ukupno	
	N	(%)	n	(%)	n	(%)
Crohnova bolest	165	(48,82)	173	(51,18)	338	(100,00)
Ulcerozni kolitis	67	(55,37)	54	(44,63)	121	(100,00)
Kontrolna grupa	136	(60,18)	90	(39,82)	226	(100,00)

5.2 FREKVENCIJA TPMT GENOTIPA U BOLESNIKA S UPALNIM BOLESTIMA CRIJEVA I U KONTROLNOJ SKUPINI

Ispitivanjem frekvencije TPMT genotipova nije ustanovljeno značajnije odstupanje od očekivanih Hardy-Weinbergovih proporcija ni u kontrolnoj skupini ($p > 0,999$), niti u skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva ($p > 0,999$) (tablica 5).

Tablica 5 - Frekvencija TPMT genotipova u bolesnika s upalnim bolestima crijeva (IBD) i u kontrolnoj skupini

Genotipovi	IBD			Kontrolna skupina			p; veličina efekta
	N	%	(95% CI)	n	%	(95% CI)	
TPMT*1/*1	434	94,55	(92,48-96,63)	213	94,25	(91,21-97,28)	0,870
Varijantni tip							
TPMT*1/*2	4	0,87	(0,02-1,72)	0	0,0	-	0,308
TPMT*1/*3A	14	3,05	(1,48-4,62)	13	5,75	(2,72-8,79)	0,087
TPMT*1/*3C	7	1,53	(0,40-2,65)	0	0,0	-	0,102
Ukupno	25	5,45	(3,37-7,52)	13	5,75	(2,72-8,79)	0,870
Ukupno genotipovi	459	100,0		226	100,0		

KRATICE: 95% CI = 95% interval pouzdanosti za proporcije; p = dvosmjerni (engl. two-tailed) stupanj statističke značajnosti; rezultati χ^2 testa ili Fisherovog egzaktnog testa u slučajevima malih očekivanih frekvencija (<5; TPMT*1/*2 and TPMT*1/*3C); veličina efekta = standardizirana mjera veličine efekta dana za statistički značajne rezultate.

Niti jedan od ispitanika nije homozigot za ispitivane varijantne genotipove.

U obje je skupine podjednako veliki broj ispitanika homozigotan za divlji tip alela (TPMT*1/*1) - razlika u prevalenciji homozigota za divlji tip alela između skupine zdravih dobrovoljaca i bolesnika s upalnim bolestima crijeva nije statistički značajna ($\chi^2=0,03$; $df=1$; $p=0.870$).

Genotip TPMT*1/*2 i genotip TPMT*1/*3C nisu nađeni niti u jednog ispitanika u kontrolnoj skupini, za razliku od skupine bolesnika.

Najčešći varijantni genotip u obje skupine je TPMT*1/*3A, no nije nađena statistički značajna razlika između skupina (tablica 5). U tablici 6 su prikazane frekvencije ispitivanih alela.

Varijantni genotip TPMT*1/*3B nije nađen niti u jednoj skupini.

Tablica 6 - Frekvencija TPMT alela u bolesnika s upalnim bolestima crijeva (IBD) i u kontrolnoj skupini

Aleli	IBD			Kontrolna skupina			p; veličina efekta
	n	%	(95% CI)	n	%	(95% CI)	
TPMT*1	893	97,28	(96,22- 98,33)	439	97,12	(95,58- 98,66)	0,871
Varijantni tip							
TPMT*2	4	0,44	(0,01-0,86)	0	0,0	-	0,309
TPMT*3A	14	1,53	(0,73-2,32)	13	2,88	(1,34-4,42)	0,091
TPMT*3C	7	0,76	(0,20-1,33)	0	0,0	-	0,103
Ukupno	25	2,72	(1,67-3,78)	13	2,88	(1,34-4,42)	
Ukupno alela	918	100,0		452	100,0		

KRATICE: 95% CI = 95% interval pouzdanosti za proporcije; p = dvosmjerni (engl. two-tailed) stupanj statističke značajnosti; rezultati χ^2 testa ili Fisherovog egzaktnog testa u slučajevima malih očekivanih frekvencija (<5; TPMT*1/*2 and TPMT*1/*3C); veličina efekta = standardizirana mjera veličine efekta dana za statistički značajne rezultate.

5.3 CROHNOVA BOLEST I ULCEROZNI KOLITIS

Analizom varijantnih genotipova u bolesnika s Crohnovom bolesti i u kontrolnoj skupini, nađena je statistički značajna razlika u prevalenciji genotipa TPMT*1/*3C, s većom učestalošću u bolesnika s Crohnovom bolesti. Nije nađena razlika za druge ispitivane genotipove (tablica 7).

Tablica 7 - Frekvencija TPMT genotipova u bolesnika s CD i u kontrolnoj skupini

Genotipovi	CD			Kontrolna skupina			p; veličina efekta
	n	%	(95% CI)	n	%	(95% CI)	
TPMT*1/*1	315	93,20	(90,51-95,88)	213	94,25	(91,21-97,28)	0,616
Varijantni tip							
TPMT*1/*2	4	1,18	(0,03-2,34)	0	0,0	-	0,153
TPMT*1/*3A	12	3,55	(1,58-5,52)	13	5,75	(2,72-8,79)	0,213
TPMT*1/*3C	7	2,07	(0,55-3,59)	0	0,0	-	0,046; 0,09
Ukupno	23	6,80	(4,12-9,49)	13	5,75	(2,72-8,79)	0,616
Genotipovi ukupno	338	100,0		226	100,0		

KRATICE: 95% CI = 95% interval pouzdanosti za proporcije; p = dvosmjerni (engl. two-tailed) stupanj statističke značajnosti; rezultati χ^2 testa ili Fisherovog egzaktnog testa u slučajevima malih očekivanih frekvencija (<5; TPMT*1/*2 and TPMT*1/*3C); veličina efekta = standardizirana mjera veličine efekta dana za statistički značajne rezultate

Niti jedan ispitanik u kontrolnoj skupini i u skupini bolesnika s ulceroznim kolitisom nema ni TPMT*1/*2, niti TPMT*1/*3C genotip. Razlika u prevalenciji ostalih genotipova nije statistički značajna (tablica 8).

Tablica 8 - Frekvencija TPMT genotipova u UC bolesnika i u kontrolnoj skupini

Genotipovi	UC			Kontrolna skupina			p; veličina efekta
	n	%	(95% CI)	n	%	(95% CI)	
TPMT*1/*1	119	98,35	(96,08-100,0)	213	94,25	(91,21-97,28)	0,074
Varijantni tip							
TPMT*1/*2	0	0,0	-	0	0,0	-	
TPMT*1/*3A	2	1,65	(0,0-3,92)	13	5,75	(2,72-8,79)	0,074
TPMT*1/*3C	0	0,0	-	0	0,0	-	
Ukupno	2	1,65	(0,0-3,92)	13	5,75	(2,72-8,79)	0,074
Genotipovi ukupno	121	100,0		226	100,0		

KRATICE: 95% CI = 95% interval pouzdanosti za proporcije; p = dvosmjerni (engl. two-tailed) stupanj statističke pouzdanosti; rezultati χ^2 testa; veličina efekta= standardizirana mjera efekta veličine dana za statistički značajne rezultate

Varijantni genotipovi su statistički značajno češći u bolesnika s Crohnovom bolesti, u odnosu na bolesnike s ulceroznim kolitisom (tablica 9).

Tablica 9 - Frekvencija TPMT genotipova u bolesnika s CD i UC

Genotipovi	CD			UC			p; veličina efekta
	n	%	(95% CI)	n	%	(95% CI)	
TPMT*1/*1	315	93,20	(90,51-95,88)	119	98,35	(96,08-100,0)	0,032; 0,10
Varijantni tip							
TPMT*1/*2	4	1,18	(0,03-2,34)	0	0,0	-	0,577
TPMT*1/*3A	12	3,55	(1,58-5,52)	2	1,65	(0,0-3,92)	0,373
TPMT*1/*3C	7	2,07	(0,55-3,59)	0	0,0	-	0,198
Ukupno	23	6,80	(4,12-9,49)	2	1,65	(0,0-3,92)	0,032; 0,10
Genotipovi ukupno	338	100,0		121	100,0		

KRATICE: 95% CI = 95% interval pouzdanosti za proporcije; p = dvosmjerni (engl. two-tailed) stupanj statističke značajnosti; rezultati χ^2 testa ili Fisherovog egzaktnog testa u slučajevima malih očekivanih frekvencija (<5; TPMT*1/*2, TPMT*1/*3A i TPMT*1/*3C); veličina efekta = standardizirana mjera veličine efekta dana za statistički značajne rezultate

5.4 FREKVENCIJE TPMT GENOTIPOVA U HRVATSKOJ I ODABRANIM ZEMLJAMA

Posljednjih tridesetak godina učinjene su brojne epidemiološke analize frekvencije varijantnih TPMT genotipova diljem svijeta, a s konačnim ciljem određivanja adekvatnog doziranja lijekova koje metabolizira ovaj enzim te uvida u populacijsku distribuciju genotipova. U Hrvatskoj je populaciji najprevalentniji varijantni genotip TPMT*1/*3A (tablica 10).

Tablica 10 - Frekvencija TPMT genotipova u ukupnom hrvatskom populacijskom uzorku (n=685)

Genotipovi	n	%	(95% CI)
TPMT*1/*1	647	94.45	(92.74-96.17)
Varijantni tip			
TPMT*1/*2	4	0.58	(0.01-1.15)
TPMT*1/*3A	27	3.94	(2.48-5.40)
TPMT*1/*3C	7	1.02	(0.27-1.78)
Ukupno	38	5.55	(3.83-7.26)
Genotipovi ukupno	685	100.00	

KRATICA: 95% CI = 95% interval pouzdanosti za proporcije

U nastavku smo analizirali prevalenciju varijantnih alela u Hrvatskoj u odnosu na druge zemlje u kojima je ranije također učinjena analiza varijantnih alela gena za tiopurin-metiltransferazu.

Statistički značajne razlike u prevalenciji varijantnih alela u odnosu na hrvatsku populaciju nađene su za sljedeće alele, odnosno zemlje i sumarno su prikazane u tablici 11:

- 1) TPMT*3A, Kina (138).
- 2) TPMT*3A, Japan; statistički značajna razlika nađena je i za ukupni broj varijantnih alela (139)
- 3) TPMT*3A, Švedska - u ovom je slučaju TPMT*3A prevalentniji u Švedskoj, u odnosu na Hrvatsku. Statistički značajna razlika detektirana je i u frekvenciji ukupnih varijantnih alela, s većom prevalencijom u Švedskoj (140).

- 4) TPMT*3A, Velika Britanija – TPMT*3A je također prevalentniji u Velikoj Britaniji, uz statistički značajno više ukupnog broja varijantnih alela u odnosu na Hrvatsku (141).
- 5) TPMT*3A, TPMT*3C, Gana. TPMT*3A nije nađen niti u jednog ispitanika u Gani , dok je TPMT*3C nađen u statistički značajno više ispitanika u Gani. Također, ukupni broj varijantnih alela je statistički značajno prevalentniji u Gani (141)
- 6) TPMT*2, Brazil – uz navedeni genotip i ukupni je broj varijantnih alela statistički značajno prevalentniji u Brazilu (142)
- 7) TPMT*3A, Njemačka. U Njemačkoj je TPMT*3A značajno prevalentniji, jednako kao i broj ukupnih varijantnih alela (143) (143).
- 8) TPMT*3A, Egipat. U Hrvatskoj je značajno veća učestalost ovog varijantnog genotipa. (144).
- 9) TPMT*3C, SAD – afroamerički uzorak. TPMT*3C, kao i ukupni broj varijantnih alela, su značajno prevalentniji u afroamerikanaca u odnosu na hrvatsku populaciju. Također, značajna razlika je nađena i u prevalenciji varijantnog alela - TPMT*X, koji je nađen u afroameričkoj populaciji (145), dok u Hrvatskoj ovaj alel nije detektiran.
- 10) Italija – za talijansku je populaciju nađena statistički značajna razlika u ukupnom broju varijantnih alela, u odnosu na hrvatsku populaciju (103).
- 11) TPMT*3A, Slovenija. U Sloveniji su ukupni broj varijantnih alela i TPMT*3A statistički značajno prevalentniji u odnosu na hrvatsku populaciju (147).
- 12) TPMT*2, Turska – ovaj je alel u Turskoj nađen sa statistički većom značajnošću u odnosu na Hrvatsku (148).

Statistička značajnost nije nađena u odnosu na Poljsku (149), Argentinu (150), Francusku (151), Kolumbiju (152), američku bjelačku populaciju (153) i Srbiju (154).

Tablica 11 - Sumarni prikaz usporedbi frekvencije TPMT alela u uzorcima hrvatske populacije i ostalih ispitivanih zemalja, uz prikaz metoda genotipiziranja

Populacija	N	% varijantnih alela	TPMT*1 (p)	TPMT*2 (p)	TPMT*3A (p)	TPMT*3C (p)	METODA	Referenca
Hrvatska	1370	2.77	97.23	0.29	1.97	0.51	Realtime PCR	155
Poljska	716	3.21	96.79 (0.572)	0.4 (0.697)	2.7 (0.313)	0.14 (0.277)	PCR-RFLP ^a AS-PCR ^b	149
Slovenija	388	4.9	95.1 (0.037)	0.0 (0.582)	4.1 (0.015)	0.5 (>0.999)	PCR-RFLP Realtime PCR za TPMT*2	147
Italija	206	5.34	94.66 (0.048)	0.49 (0.504)	3.88 (0.121)	0.97 (0.333)	PCR-RFLP AS-PCR	146
Srbija	400	4.0	96.0 (0.210)	0.2 (>0.999)	3.2 (0.130)	0.0 (0.361)	PCR-RFLP	154
Francuska	936	4.2	95.8 (0.067)	0.7 (0.134)	3.0 (0.115)	0.4 (>0.999)	PCR-reverzni dot blot	151
Švedska	1600	4.38	95.63 (0.020)	0.06 (0.188)	3.75 (0.004)	0.44 (0.771)	Pirosekven ciranje	140
Velika Britanija	398	5.03	94.72 (0.014)	0.5 (0.622)	4.52 (0.004)	0.25 (0.692)	PCR-RFLP	141
Njemačka	2428	5.0	95.0 (0.001)	0.2 (0.731)	4.4 (<0.001)	0.4 (0.660)	PCR sekvencir anje	143
Kina	450	1.33	98.67 (0.084)	0 (0.578)	0 (0.003)	1.33 (0.100)	PCR-RFLP AS-PCR	138
Japan	384	0.8	99.2 (0.022)	0 (0.582)	0 (0.006)	0.8 (0.464)	PCR-RFLP AS-PCR	139

SAD (bijelci)	564	3.7	96.3(0.270)	0.2 (>0.999)	3.2 (0.106)	0.2 (0.450)	PCR-RFLP	153
SAD (Afro-Amerikanci)	496	4.6	95.4 (0.046)	0.4 (0.660)	0.8 (0.082)	2.4 (<0.001)	PCR-RFLP AS-PCR	145
Kolumbija	280	3.93	96.07 (0.300)	0.36 (>0.999)	3.57 (0.099)	0 (0.610)	PCR-RFLP AS-PCR	152
Brazil	408	4.9	95.1 (0.034)	2.2 (<0.001)	1.5 (0.511)	1.0 (0.288)	PCR-RFLP AS-PCR	142
Argentina	294	4.1	95.9 (0.233)	0.7 (0.287)	3.1 (0.244)	0 (0.614)	PCR-RFLP AS-PCR	150
Turska	296	4.39	95.61	2.03	1.01	1.35	PCR-RFLP	148
Egipat	400	1.5	98.5 (0.150)	0.0 (0.580)	0.3 (0.015)	1.3 (0.157)	AS-PCR za TPMT*2 AS-RealtimePCR za *3C PCR RFLP za *3A	144
Gana	434	7.6	92.4 (<0.001)	0 (0.578)	0.0 (0.003)	7.6 (<0.001)	PCR-RFLP	141

*statistička značajnost $p < 0.05$; p predstavlja značajnost u razlici distribucije polimorfnih alela u usporedbi s hrvatskom populacijom; ^a PCR-RFLP – reakcija lančane polimeraze – polimorfizama dužine restrikcijskih fragmenata; ^b AS-PCR – alel specifični PCR

5.5 PROCJENA UČESTALOSTI NUSPOJAVA AZATIOPRINA, OVISNO O POLIMORFIZMIMA GENA TPMT

Od 451 bolesnika kojem je učinjena analiza polimorfizama TPMT gena, 263 bolesnika su dobivala azatioprin u terapiji. Raspodjela polimorfizama gena u ovisnosti o statusu terapije azatioprinom je navedena u tablici 12. Od 263 bolesnika pod terapijom, 192 (73%) su bolesnici s Crohnovom bolešću, dok je 71 (27%) s ulceroznim kolitisom (tablica 13).

Tablica 12 - Raspodjela polimorfizama gena prema statusu terapije azatioprinom

TPMT genotip	Broj bolesnika bez terapije azatioprinom (%)	Broj bolesnika uz terapiju azatioprinom (%)
TPMT*1/*1	173 (38,4)	257 (57)
TPMT*1/*2	1 (0,2)	1 (0,2)
TPMT*1/*3A	11 (2,4)	4 (0,8)
TPMT*1/*3C	3 (0,7)	1 (0,2)
UKUPNO	188 (41,7)	263 (58,3)

Tablica 13 - Raspodjela bolesnika pod terapijom azatioprinom prema dijagnozi

Dijagnoza	broj ispitanika (%)
Crohnova bolest	192 (73)
Ulcerozni kolitis	71 (27)
Ukupno	263 (100)

Veliki dio bolesnika nije razvio nuspojave azatioprina, što je vidljivo u tablici 14. Najveći broj nuspojava zabilježen je u bolesnika s divljim TPMT genotipom.

Tablica 14 - Broj bolesnika s razvijenim nuspojavama na azatioprin u odnosu na genotip

Genotip	Nuspojave - (%)	Nuspojave + (%)
TPMT*1/*1	197 (74,9)	60 (22,8)
TPMT*1/*2	1 (0,4)	0
TPMT*1/*3A	0	4 (1,5)
TPMT*1/*3C	1 (0,4)	0
UKUPNO	199 (75,7)	64 (24,3)

5.6 ORGAN SPECIFIČNE NUSPOJAVE

Ranijim studijama pokazano je da se najveći dio nuspojava na azatioprin odnosi na jetru, koštanu srž, gušteraču i kožu. Analizu smo dalje podijelili na organ-specifične nuspojave.

5.6.1 JETRA

Opisane manifestacije jetrenih nuspojava u dostupnoj literaturi najčešće se opisuju ili u okviru difuznih lezija jetre, akutnog hepatitisa ili okluzije jetrenih vena. U našoj bolesničkoj populaciji većim su dijelom zabilježene ozljede u smislu difuzne jetrene lezije te akutnog hepatitisa, dok nije zabilježen niti jedan slučaj okluzije hepatalnih vena (tablica 15). Predominantan broj bolesnika koji su razvili jetrene nuspojave su bolesnici s divljim tipom gena. U tablici 15 je prikazan broj bolesnika s jetrenim nuspojavama, u odnosu na genotip TPMT.

Tablica 15 - Raspodjela jetrenih nuspojava ovisno o genotipu

TPMT genotip	Difuzna jetrena lezija N (%)	Akutni hepatitis N (%)
TPMT*1/*1	14 (60,1)	7 (30,4)
TPMT*1/*2	0	0
TPMT*1/*3A	1 (4,3)	1 (4,3)
TPMT*1/*3C	0	0
UKUPNO	15 (65,2)	8(34,8)

Kratika: N – broj ispitanika; %- u odnosu na ukupan broj hepatalnih nuspojava

5.6.2 GUŠTERAČA

Nuspojave s afekcijom gušterače podijelili smo na upalu gušterače – pankreatitis te hiperamilazemiju. Od 64 bolesnika s nuspojavama, 8 ih je razvilo pankreatitis (12,5%), dok je jedan bolesnik razvio hiperamilazemiju (1,5%). Podatci su prikazani u tablici 16. Svi bolesnici s afekcijom gušterače su divljeg TPMT genotipa.

Tablica 16 - Raspodjela nuspojave s afekcijom gušterače, ovisno o genotipu

TPMT genotip	Akutni pankreatitis N (%)	Hiperamilazemija N (%)
TPMT*1/*1	8 (88,9)	1 (11,1)
TPMT*1/*2	0	0
TPMT*1/*3A	0	0
TPMT*1/*3C	0	0
UKUPNO	8 (88,9)	1 (11,1)

Kratika: N – broj ispitanika; % - u odnosu na ukupan broj pankreatičnih nuspojave

5.6.3 KOŠTANA SRŽ

Nuspojava koja se vrlo često susreće u liječenju azatioprinom je oštećenje koštane srži, u smislu utjecaja na produkciju progenitornih stanica koštane srži. Kod liječenja azatioprina zabilježili smo nuspojave u smislu trombocitopenije, leukopenije, anemije te pancitopenije. U

tablici 17 prikazan je odnos nuspojava u ovisnosti o genotipu TPMT. Najčešća prezentacija afekcije koštane srži u hrvatskoj populaciji je trombocitopenija; potom leukopenija, pancitopenija i anemija.

Tablica 17 - Raspodjela nuspojava s afekcijom koštane srži, ovisno o genotipu

TPMT genotip	Trombocitopenija N (%)	Leukopenija N(%)	Anemija N(%)	Pancitopenija N(%)
TPMT*1/*1	13(36,1)	12(33,3)	3(8,3)	5(13,9)
TPMT*1/*2	0	0	0	0
TPMT*1/*3A	1(2,8)	0	0	2(5,5)
TPMT*1/*3C	0	0	0	0
UKUPNO	14(38,8)	12(33,3)	3(8,3)	7(19,4)

Kratice: N – broj ispitanika; %- u odnosu na ukupan broj mijelotoksičnih nuspojava

5.6.4 KOŽNE I OSTALE NUSPOJAVE

Nespecifične gastrointestinalne smetnje imalo je 16 (6,1%) bolesnika, dok je 12 (4,6%) bolesnika razvilo jednu od sljedećih nuspojava: dermatitis, smetnje vida, febrilitet, kožnu alergijsku reakciju, osip ili preosjetljivost. Većina bolesnika s ovim nuspojavama su divljeg TPMT genotipa, dok je samo jedan bolesnik TPMT*3A genotipa.

5.7 KONKOMITANTNA TERAPIJA

U liječenju upalnih bolesti crijeva, vrlo se često koristi nekoliko linija terapije. Analizirali smo utjecaj konkomitantne terapije na razvoj nuspojava azatioprina. Od konkomitantne terapije izdvojili smo lijekove koji se najčešće daju uz azatioprin, a to su aminosalicilati, kortikosteroidi te anti-TNF.

Od 64 bolesnika koji su razvili nuspojavu na azatioprin, 43 (67,2%) su uzimala aminosalicilate, 13 (20,3%) ih je uzimalo kortikosteroide, dok je 1(1,6%) bolesnik uzimao anti-TNF u konkomitantnoj terapiji.

U regresijskoj analizi analizirali smo utjecaj genotipa, spola, dijagnoze te konkomitantne terapije (aminosalicilati, kortikosteroidi, anti-TNF) na razvoj nuspojava izazvanih azatioprinom.

Od ispitivanih je varijabli genotip TPMT pokazao statistički značajnu povezanost s razvojem nuspojava ($p=0,0376$) (tablica 18); post-hoc analizom je jedino TPMT*3A pokazao statistički značajnu povezanost s razvojem nuspojava ($p=0,00036$) (tablica 19).

Tablica 18 - Regresijska analiza utjecaja varijabli na razvoj nuspojava

	SE	z-vrijednost	p-vrijednost
TPMT genotip	0.45	2.1	0.0376
Dijagnoza	0.32	1.4	0.15
Spol	0.3	-0.2	0.86
Aminosalicilati	0.3	-0.1	0.91
Kortikosteroidi	0.4	1.3	0.18
Anti-TNF	1.1	0.4	0.67

Kratika: SE-standardna greška (*standard error, engl.*)

Tablica 19 - Post-hoc analiza utjecaja polimorfizama TPMT na razvoj nuspojava

	SE	t-vrijednost	p-vrijednost
TPMT*2	0.4	-0.6	0.58
TPMT*3A	0.2	3.6	0.00036
TPMT*3C	0.4	-0.6	0.58

Kratika: SE – standardna greška (*standard error, engl.*)

S obzirom na statističku značajnost povezanosti genotipa TPMT*3A s ukupnim brojem nuspojava, dodatnom smo analizom našli da je povezanost ovog varijantnog genotipa statistički značajna samo za razvoj mijelotoksičnosti ($p=0,0003$), za razliku od ostalih nuspojava ($p=0,17$ za razvoj hepatotoksičnosti te $p=0,71$ za razvoj pankreatične toksičnosti).

6 RASPRAVA

Rezultati prvog dijela istraživanja pokazuju da je u hrvatskoj populaciji najčešći varijantni alel TPMT gena varijanta TPMT*3A (1,97%). Ranije istraživanje provedeno na hrvatskoj populaciji se podudara s našim rezultatom, iako je u aktualnom istraživanju nešto manja frekvencija ovog alela (156). Detaljnom analizom TPMT alela u hrvatskoj populaciji, pokazale su se određene razlike u odnosu na susjedne zemlje – poput Slovenije, ili drugih bjelačkih populacija. Ova se razlika može pripisati i korištenim metodama genotipiziranja. U ranijim su se istraživanjima koristile PCR-RFLP (*engl. polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) metode, koje su se kasnijim istraživanjima pokazale manje točnim u odnosu na “Real-time” PCR metodu koja se koristila u ovom istraživanju. Tako se primjerice rezultati za hrvatski i slovenski uzorak ne razlikuju za TPMT*2 varijantni alel, obzirom da je Real-time PCR korišten u obje zemlje, no razlikuju se kod drugih alela gdje su metode bile različite (147). Obzirom da je naš laboratorij uključen u shemu vanjske kontrole (DKGL, Njemačka) za tipiziranje TPMT gena, vjerujemo da su podatci dobiveni ovim istraživanjem u potpunosti validni.

S obzirom na nalaz prevalencije varijantnih alela gena TPMT, te usporedbom s vrijednostima objavljenima za druge populacije, od interesa nam je bilo staviti Hrvatsku u povijesni kontekst, zbog čega je učinjena detaljna usporedba s ostalim državama koje su proučavale raspodjelu polimorfizama u okviru svojih populacija. Činjenica je da je u povijesti dolazilo do značajnih migracija, a time i do značajnog utjecaja na miješanje gena.

Prema Wiiku i suradnicima, prethodnici Europljana su prije 50 000 godina živjeli u sjeverno-istočnoj Africi, u okviru jednog klana (157). Oko 20 000 godina kasnije, prve grupe Homo sapiensa su došle na Europsko tlo, u području između Urala i Kaspijskog mora (157). 5000 godina kasnije prvi su se ljudi naselili na Iberskom poluotoku, dok je istovremeno novi klan došao u područje Balkana kroz Anatoliju. Za ovu se skupinu stanovnika smatra da su donijeli važan genetički materijal za naše pretke (158). Nakon ovih, prvih dolazaka, populacije su diljem Euroazije doživjele i preživjele Posljednje Ledeno doba, što je uvelike utjecalo na teritorij koji je mogao biti nastanjen živim bićima. Time su preci Europljana bili prisiljeni preživjeti u okviru četiri velikih utočišta lociranih u Ukrajini, Iberiji, Balkanu i moguće Sibiru (158). Ove su izolirane lokacije u tom trenutku smanjile i minimizirale proces miješanja gena i formirale različite genetičke okvire u smislu frekvencija alela i pojave eventualnih novih mutacija (158). Wiik je zaključio da su Hrvati uglavnom došli iz područja Ukrajine te dio iz Iberskog poluotoka (157). Novija pak istraživanja daju prednost dolaska Hrvata iz određenog mjesta u Zapadnoj Aziji, moguće putem Libanona (159,160).

Genetička analiza moderne hrvatske populacije govori u prilog vrlo velikog genetičkog miješanja (158). Od dolaska Hrvata u 7.stoljeću i prvih naseobi na Jadranskoj obali, Hrvati su zbog svog geografski zanimljivog položaja često bili izloženi napadima susjednih, ali i udaljenih carstava. Najveće bitke događale su se za vrijeme Osmanskog carstva tijekom ranog modernog doba , kad je hrvatska bila suočena s brojnim bitkama i služila kao granično područje prema Europi. Sve ove bitke i takozvani "mali ratovi" su oslabili Hrvatsku i smanjili teritorij. Ovakve su prilike potencirale imigraciju tijekom idućih stoljeća, odnosno dovele do miješanja s ostalim populacijama. Potomci hrvatskih imigranata u današnje vrijeme žive većinom u Sjevernoj i Južnoj Americi te Australiji. Tijekom proteklih stoljeća nije bilo

značajnijih migracija u Afriku, odnosno miješanja s afričkim populacijama, vjerojatno zbog prirodne barijere pustinje te vrlo visokih temperatura i skromnijih ekonomskih prilika u afričkim zemljama. Stoga je razumljivo da je TPMT*3A najprevalentniji alel u Hrvatskoj, baš kao i u ostalim bjelačkim populacijama, koje uvelike nastanjuju navedene kontinente.

Uzevši u obzir slavensko podrijetlo Hrvata, za primijetiti je da od ostalih ispitanih slavenskih naroda koji su učinili analize TPMT gena (Slovenija, Poljska, Srbija), jedino je nađena statistički značajna razlika u ukupnom broju polimorfizama u odnosu na slovensku populaciju, odnosno statistički značajno više polimorfizama TPMT*3A polimorfizama. Upitna je točnost metode genotipizacije.

Studije učinjene na genu za TPMT, pokazale su značajnu interetničku raznolikost u distribuciji TPMT varijantnih alela. Međutim, čini se da je TPMT*3C ancestralni varijantni alel, obzirom da se radi o najčešćoj varijanti u svim populacijama. Prema Ameway i suradnicima, ovaj je polimorfni alel verificiran u 100% afričkih subjekata (141). Iz evolucijskih studija smatra se da je najčešći alel koji se nađe u svim populacija ancestralni alel. Nove mutacije i rekombinacije potom rezultiraju drugim genotipovima. Obzirom da je TPMT*3C, odnosno A719G mutacija prisutna i u bijelaca i u Afrikanaca, kao i u jugozapadnih azijata te Kineza, daje podršku vjerovanju da se radi o ancestralnom alelu (141). Svi ostali varijantni aleli su vjerojatno stečeni kasnije.

Osim analize raspodjele TPMT gena, drugi rezultat koji je iznjedrila ova studija govori u prilog činjenici da bolesnici koji pate od Crohnove bolesti imaju veću proporciju varijantnih alela u odnosu na bolesnike s ulceroznim kolitisom. Frekvencija varijantnih alela u UC grupi je 1,65% nasuprot 6,80% u MC grupi. Potencijalni razlog ovoj činjenici je znatno veći (gotovo dvostruki)

broj bolesnika s Crohnovom bolesti. Također, studija je provedena u tercijarnom referentnom centru gdje se liječi znatno više bolesnika s ekstenzivnom Crohnovom bolesti. Ruski su znanstvenici učinili slično istraživanje polimorfizama TPMT gena na bolesnicima koji su bolovali od maligne bolesti te u kontrolnoj skupini. U istraživanju su pokazali da su nositelji varijantnih alela statistički znatno češći u skupini s malignomima (7,4%) u odnosu na kontrolnu skupinu (4,0%, $p=0,0199$) (161). Obje ove studije daju naslutiti da potencijalno varijantni aleli na određeni način "slabe" genetičku konstrukciju osobe, no za bilo kakve zaključke u tom smislu aktualno nema dovoljno dokaza.

Azatioprin, kao i ostali tiopurinski lijekovi posjeduje vrlo uski terapijski indeks. Dok je prema brojnim ranijim istraživanjima najpoznatiji rizični čimbenik za razvoj nuspojava na azatioprin upravo polimorfizam gena TPMT, novija istraživanja ipak daju naslutiti da moguće i drugi uzroci utječu na razvoj nuspojava. U našoj studiji je pokazano da je čak 22,8% osoba s divljim tipom gena razvilo nuspojave, u odnosu na samo 1,5% osoba s varijantnim alelom.

Najčešće opisivana nuspojava terapije azatioprinom je mijelotoksičnost koja se najčešće prezentira leukopenijom, te u manjoj mjeri trombocitopenijom (119). U našoj je studiji nešto češće zabilježena trombocitopenija u odnosu na leukopeniju.

Pretpostavlja se da je kumulativna incidencija leukopenije, kao najčešće opisivane mijelotoksične nuspojave inducirane tiopurinima 7% (162). Prema Broekmanu i suradnicima, leukopenija se javlja u 6,5% bolesnika koji nemaju varijantni TPMT genotip (163). Potencijalni uzrok leukopenije moguć je i radi niskog bazalnog broja leukocita, kao što je opisano u slučajevima kemoterapijom i ganciklovirom inducirane leukopenije (164, 165). U slučajevima

kada je TPMT genotip nepoznat, svi slučajevi leukopenije u prvom tromjesečju se moraju smatrati potencijalno induciranim polimorfizmom TPMT gena (163).

Prema Hindorfu i suradnicima se mijelotoksičnost javlja uglavnom u kasnijim mjesecima vjerojatno zbog niza čimbenika poput eskalacije doze lijeka, virusnih infekcija, promjenjive intestinalne apsorpcije, kao i moguće slabije suradljivosti bolesnika u uzimanju terapije (166).

Coenen i suradnici su u recentnoj randomiziranoj kontroliranoj studiji nazvanoj TOPIC (Thiopurine response Optimization by Pharmacogenetic testing in Inflammatory bowel disease Clinics) ispitivali koliko je smanjenje incidencije hematoloških nuspojava kod osoba kojima je učinjena genotipizacija TPMT prije uvođenja tiopurina u terapiju uz personalizirano doziranje lijeka u ovisnosti o genotipu (167). Studija nije dokazala statistički značajnu razliku rizika za razvoj hematoloških nuspojava u grupi kojoj je učinjeno predterapijsko testiranje TPMT, u odnosu na grupu kojoj testiranje nije učinjeno. Također nije nađena razlika u terapijskoj efikasnosti lijeka u ove dvije grupe. Iako, post hoc analiza je pokazala da je probir na varijante TPMT gena značajno smanjio rizik hematoloških nuspojava u skupini bolesnika koje su imale genetsku varijantu.

Recentna je pak španjolska studija GWAS-studijom pokazala da postoje potencijalni drugi geni odgovorni za razvoj supresije koštane srži u IBD bolesnika (168). U njihovoj su kohorti od 15 bolesnika s razvijenom mijelotoksičnošću, samo tri bila heterozigotna za varijantne alele TPMT; nije bilo niti jednog homozigota. Iako se inicijalnom opservacijom pokazala statistička značajnost u povezanosti razvoja mijelotoksičnosti i heterozigotnosti za varijantni alel TPMT, u replikacijskim je studijama ova povezanost nestala. Time je potvrđeno da postoje drugi čimbenici odgovorni za razvoj mijelotoksičnosti, moguće i više nego varijantni genotipovi

TPMT. Autori smatraju da su IL6ST i FSLT5 potencijalni kandidatni geni involvirani u do sad nepoznate metaboličke puteve vezane uz razvoj mijelotoksičnosti, no potrebne su konfirmacijske studije koje će pokazati jesu li vezani primarno uz patogenezu IBD, ili su ipak vezani uz toksičnost tiopurina.

Zanimljiva je činjenica da je mijelosupresija značajno češća u azijskih IBD bolesnika u odnosu na bolesnike Zapadne polutke (31,0-56,4% vs.2,0-16,7%) (166, 169-171). Mehanizam koji dovodi do ove razlike nije u potpunosti jasan, što potvrđuje da osim TPMT geni poput ITPA i ABCC4 utječu na razvoj nuspojava (98, 99). Zbog ovog se azijskim bolesnicima preporuča uzimanje manjih doza AZA (0.6–1.2 mg/kg/day) (172). Ban i suradnici su pokazali da je polimorfizam gena ABCC4/MRP4 (supstitucija G2269AA) relativno česta u Japanu, što upućuje na činjenicu da je povećana osjetljivost dijela japanskih bolesnika na tiopurine moguće posljedica veće frekvencije polimorfizma ovog gena (173). Broj leukocita u njihovoj IBD kohorti s varijantnim MRP4 genom, bio je značajno niži u odnosu na bolesnike s divljim genotipom. Također, koncentracija 6-TGN u eritrocitima je bila značajno viša u bolesnika s varijantnim genotipom MRP4, što sugerira da se radi o smanjenoj funkciji MRP4 u bolesnika s varijantnim genotipom.

Uz navedenu ne-alergijsku reakciju koštane srži, vrlo često se kao toksična manifestacija liječenja azatioprinom viđa i oštećenje jetre. Geary i suradnici (53) su našli veliku stopu abnormalnosti jetrenih enzima u odnosu na druge populacije. Često upravo promjene u jetrenim enzimima vode do ukidanja lijeka iz terapije, čak u 8,8% bolesnika s IBD koji započinju ovu terapiju (174). U našoj populaciji veći dio nuspojava je vezan upravo uz oštećenje jetre, odnosno elevaciju jetrenih enzima. Cuffari (175) je još 1996.godine pokazao da je povećana

koncentracija 6-metilmerkaptopurina jedan od čimbenika povećanog rizika od hepatitisa kao nuspojave lijeka, a što su potvrdile i kasnije studije. Kader i suradnici (176) su pak pokazali da je nekoliko njihovih bolesnika razvilo hepatotoksičnost uz visoku aktivnost TPMT enzima. Prema nekim autorima nusprodukt konverzije azatioprina u merkaptopurin je nitroimidazolni derivat, koji je mogući uzrok neželjenih reakcija (177). Tijekom liječenja azatioprinom, preporuča se redovito monitoriranje jetrenih enzima, uz deeskalaciju doze ili pak potpuno ukidanje lijeka u slučaju značajne elevacije jetrenih enzima.

2016. godine je njemačka grupa kliničara koji se bave IBD-om, promatrala incidenciju i težinu pankreatitisa u 510 bolesnika (178). 7,5% ih je razvilo akutni pankreatitis, od kojih je 43% hospitalizirano zbog težine kliničke slike pankreatitisa. Niti jedan bolesnik nije umro, niti jedan nije zahtijevao kirurško zbrinjavanje ili drugu interventnu metodu liječenja. Svi ovi bolesnici bili su zbrinuti na konzervativni način, bez ikakvih rezidualnih defekata. U našem je istraživanju 8 bolesnika imalo upalu gušterače, bez posljedica, što je sukladno rezultatima njemačkog istraživanja. Mogući dodatni čimbenici za razvoj pankreatitisa su pušenje i konzumacija alkohola, no u ovom istraživanju ovi čimbenici nisu razmatrani. Njemački autori sugeriraju da značajna lipazemija sugerira potencijalno lošiju prognozu akutnog pankreatitisa i veću vjerojatnost hospitalizacije. Međutim, ovaj marker nije u našem radu u potpunosti primjenjiv, obzirom da je zbog financijske jednostavnosti ipak znatno češće koristi mjerenje amilaze u serumu kao markera akutnog pankreatitisa. Također, zanimljivo je da je u njemačkoj studiji klinički tijek akutnog pankreatitisa induciranog azatioprinom bio jednak i u hospitaliziranih i ne-hospitaliziranih bolesnika. Sama patogeneza pankreatitisa nije u potpunosti jasna, no moguće je da se radi o alergijskoj reakciji. Ovaj će se mehanizam još zasigurno proučavati, obzirom da prema istraživanjima prednizolon ima anti-alergijski učinak, te da može

prevenirati razvoj autoimunog pankreatitisa, a time i potencijalno nastanak akutnog pankreatitisa tijekom liječenja azatioprinom (178).

Iako je TPMT ključni enzim u metabolizmu azatioprina, čija aktivnost, odnosno inaktivnost može posredovati u imunosupresiju i citotoksičnost, aktivnost enzima ne određuju samo navedeni polimorfizmi, nego na nju potencijalno djeluju i drugi lijekovi koji se koriste u liječenju upalnih bolesti crijeva. Osim navedenog, inter-individualnoj varijabilnosti u kliničkom odgovoru na azatioprin mogu pridonijeti i težina i kronicitet bolesti, komorbiditeti, trajanje primjene lijeka, suradljivost u uzimanju terapije, te uzimanje lijekova koji interferiraju s azatioprinom (179). Kako se u liječenju upalnih bolesti crijeva često koristi više linija terapije, važno je imati na umu da istodobna primjena drugih lijekova može potencijalno utjecati na aktivnost TPMT.

Lijekovi iz skupine aminosalicilata – sulfasalazin, 5-aminosalicilatna kiselina, balsalazid, olsalazin su svi potentni inhibitori TPMT aktivnosti u studijama *in-vitro*, a među njima je sulfasalazin bio najpotentniji inhibitor aktivnosti TPMT (70). Ukoliko se sulfasalazin daje peroralnim putem, u tankom se crijevu absorbira između 15 i 30%, što odgovara serumskim koncentracijama od 25-50 μM , a što je blizu vrijednostima za inhibiciju TPMT (70).

U davnoj studiji iz 1980.godine (180), merkaptopurin je bio izostavljen u 10% bolesnika radi razvoja neželjenih reakcija, dok je kod više od polovice tih bolesnika u terapiju bio uključen i sulfasalazin. Nasuprot tome, Dubinsky i suradnici (181) su u studiji ispitali 48 bolesnika koji su paralelno uz merkaptopurin uzimali konkomitantnu mesalazinsku terapiju, međutim čini se da isti nisu utjecali na TPMT aktivnost. Lowry i suradnici su pak uspoređivali razinu tiogvaninskih nukleotida u bolesnika s Crohnovom bolešću, prije i poslije administracije

aminosalicilata. Našli su povećanu razinu TGN u bolesnika koji su primali i mesalamin i balsalazid i sulfalazin (73). Koadministracijom ovih lijekova u bolesnika s Crohnovom bolešću došlo je značajnog povećanja frekvencije klinički važne leukopenije, s brojem leukocita manjim od $3,5 \times 10^9$ /l. Prema istom autoru, bolesnici koji su primali terapiju mesalaminom, sulfasalazinom ili olsalazinom su imali značajno manje srednje vrijednosti leukocita u odnosu na bolesnike koji nisu uzimali aminosalicilate. Međutim, dodatni čimbenik koji treba uzeti u obzir kod leukopenije je sposobnost osoba da metabolizira aminosalicilate acetilacijom (73). Upravo oslabljena sposobnost acetilacije i tzv. spori acetilatorski status, može doprinijeti mijelosupresiji koja se viđa kod sulfasalazina.

U našoj studiji nije potvrđen utjecaj konkomitantne terapije na razvoj toksičnih nuspojava azatioprina. Dodatno, regresijskom analizom utjecaja konkomitantne terapije i polimorfizama gena, pokazalo se da je jedino varijantni tip TPMT*3A sa statističkom značajnošću povezan uz razvoj nuspojava azatioprina.

Svi navedeni podaci sugeriraju da razvoj nuspojava azatioprina ne ovisi samo o ispitivanom TPMT polimorfizmu, već da su u razvoju nuspojava vjerojatno važni i drugi sastojci lijeka, odnosno drugi enzimi čija se aktivnosti nije istraživala u ovoj studiji.

U kliničkom je radu važno znati, da unatoč tome što testiranje genotipa TPMT može predvidjeti rizik od nuspojava, poglavito mijelosupresije, ono ne može zamijeniti monitoriranje kompletne krvne slike tijekom liječenja tiopurinskim lijekovima. Također, genotipiziranje otkriva određeni broj polimorfizama, što znači da ne može biti zlatni standard u otkrivanju aktivnosti enzima TPMT.

7 ZAKLJUČAK

1. U bolesnika s upalnim bolestima crijeva, najprevalentniji polimorfizam gena TPMT je TPMT*3A. Iza njega slijede TPMT*2 i TPMT*3C varijante. U skupni hrvatskih zdravih dobrovoljaca jedini otkriveni polimorfni alel je TPMT*3A. TPMT*3B varijanta nije nađena niti u jednoj skupini.
2. Podanalizom grupa bolesnika s Crohnovom bolešću i ulceroznim kolitisom, sa statističkom je značajnošću nađena razlika u prevalenciji genotipa TPMT*1/*3C genotipa. Varijantni genotipovi su statistički značajno češći u bolesnika s Crohnovom bolesti
3. Statistički značajne razlike u učestalosti polimorfizmima dokazane su u odnosu na sljedeće zemlje: Kina, Japan, Švedska, Velika Britanija, Gana, Brazil, Njemačku, Egipat, afro-američku populaciju Sjedinjenih Američkih Država i Sloveniju
4. Difuzna jetrena lezija je najčešća manifestacija jetrenih nuspojava. Akutni pankreatitis je zabilježen samo u bolesnika s divljim genotipom TPMT. Trombocitopenija je najčešća manifestacija afekcije koštane srži
5. Konkomitantna terapija nije utjecala na razvoj azatioprinskih nuspojava
6. U razvoju nuspojava na azatioprin, jedino je za genotip TPMT*3A dokazana statistički značajna povezanost

8 SAŽETAK

Tiopurin-metiltransferaza (TPMT) je enzim koji sudjeluje u razgradnji tiopurinskih lijekova. Do sada je opisano 37 varijanti ovog enzima. Radi se o polimorfizmima koji nastaju zamjenom određenih aminokiselina u genu TPMT, a čiji produkt je enzim reducirane aktivnosti. Divlji genotip se označava kraticom TPMT*1/*1, dok su ostali varijantni oblici dobivali nazive prema slijedu otkrivanja, s posljednjom varijantom otkrivenom 2014.godine, naziva TPMT*37. Najčešći varijantni aleli ovog gena su: TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B i TPMT*3C. Bolesnicima s heterozigotnom konstelacijom ovog enzima potrebno je reducirati dozu tiopurinskih lijekova, dok se homozigotima ili lijek ne treba davati, ili je dozu potrebno smanjiti 10 puta u odnosu na dozu lijeka kod divljeg genotipa i trajno monitorirati krvne parametre.

Prema ranim istraživanjima ovog enzima, varijantna homozigotnost prisutna je u 1/300 osoba, no kasnije su populacijske studije pokazale da je odnos različit za bjelačke, azijske i crnačke populacije.

Prvi je cilj ove studije bio istražiti raspodjelu najčešćih polimorfizama u populaciji hrvatskih bolesnika s upalnim bolestima crijeva (IBD prema *engl.inflammatory bowel disease*) te u hrvatskih zdravih dobrovoljaca. U istraživanje je uključeno 685 ispitanika, od kojih je 459 IBD bolesnika (338 bolesnika s Crohnovom bolešću te 221 s ulceroznim kolitisom) te 226 zdravih dobrovoljaca. 94,55% IBD bolesnika i 94,25% zdravih dobrovoljaca su homozigoti za divlji tip alela (TPMT*1/*1). U IBD bolesnika su nađeni TPMT*1/*2 (0,87% bolesnika) i TPMT*1/*3C (1,53%), za razliku od zdravih dobrovoljaca u kojih ovaj genotip nije nađen. TPMT*1/TPMT*3A genotip je nađen u 3,05% IBD bolesnika te u 5,75% zdravih dobrovoljaca. TPMT*1/*3B i varijantni homozigoti nisu nađeni niti u jednoj skupini.

Sa statističkom smo značajnošću našli veću učestalost varijantnih genotipova u bolesnika s Crohnovom bolešću u odnosu na grupu s ulceroznim kolitisom ($p=0,032$).

Usporedili smo rezultate hrvatske populacije s drugim populacijama za koje su do trenutka pisanja disertacije objavljeni rezultati. Našli smo da je ukupna prevalencija varijantnih genotipova u našoj populaciji niža u odnosu na druge bjelačke populacije.

U Hrvatskoj je za liječenje upalnih bolesti crijeva od tiopurinskih lijekova registriran azatioprin. Kod osoba s varijantnim genotipom TPMT i reduciranom aktivnošću enzima, moguć je razvoj značajnih nuspojava, od kojih je najčešća mijelotoksičnost. Također, prepoznat je i mogući utjecaj konkomitantne terapije u liječenju IBD, kao dodatni negativni čimbenik u razvoju nuspojava na ovaj lijek.

Drugi je cilj bio ispitati utjecaj varijantnih genotipova TPMT na razvoj najčešćih nuspojava azatioprina (mijelotoksičnosti, hepatotoksičnosti te pankreasne toksičnosti) te utjecaj konkomitantne terapije azatioprinu na razvoj navedenih nuspojava.

Od 263 bolesnika koji su liječeni azatioprinom, 64 su razvila nuspojave (24%). Najveći broj nuspojava je mijelotoksične naravi, od kojih je u našoj populaciji nešto češća trombocitopenija, potom slijedi leukopenija. Najčešća manifestacije hepatotoksičnosti je difuzna jetrena lezija, dok je kod afekcije gušterače najčešće zabilježen akutni pankreatitis. Najveći dio nuspojava je zabilježen u bolesnika s divljim genotipom TPMT.

Od konkomitantne terapije analizirali smo lijekove koji se najčešće daju uz azatioprin - aminosalicilate, kortikosteroide te anti-TNF. Niti jedan lijek nije imao utjecaja na razvoj nuspojava azatioprinu.

Statističkom smo obradom utvrdili da između spola, dijagnoze, konkomitantne terapije i genotipa TPMT, jedino genotip TPMT ima utjecaja na razvoj nuspojava ($p=0,0038$); post-hoc analizom utvrđeno je da je TPMT*1/*3A statistički značajno vezan uz razvoj nuspojava.

9 SUMMARY

POLYMORPHISM OF THIOPURINEMETHYLTRANSFERASE GENE IN PATIENTS WITH THE INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Ladić Agata, 2018.

Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) is an enzyme that converts thiopurine drugs into inactive metabolites. 37 variant TPMT-encoding alleles have been discovered so far.

These variants produce enzyme with reduced enzymatic activity. Wild-type enzyme is denoted TPMT*1/*1, while variants were given numbers successively as they were discovered. The latest variant, TPMT*37, was discovered in 2014. The most common variant alleles of TPMT gene are: TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B and TPMT*3C. Patients who are heterozygous for the enzyme, should have a thiopurine drug dose reduction, while homozygous patients should either stay free of this drug, or should have up to 10x drug dose reduction. Furthermore, blood parameters should be checked regularly.

According to early studies of this enzyme, variant homozygosity is present in 1/300 persons; however – further population studies have revealed different ratios in Caucasian, Asiatic and African population.

The first aim of this study was to investigate frequencies of the most common variant alleles in Croatian inflammatory bowel disease (IBD) patients and in healthy individuals. 685

participants are included, out of whom 459 are IBD patients (338 Crohn's disease patients and 221 ulcerative colitis patients) and 226 are healthy volunteers. 94.55% IBD of patients and 94.25% of healthy volunteers have homozygous wild-type enzyme (TPMT*1/*1).

TPMT*1/*2 and TPMT*1/*3C are present in 0.87% and 1.53% IBD patients, respectively; these variants are not present in healthy volunteers. TPMT*1/*3A is present in 3.05% IBD patients and 5.75% healthy volunteers. TPMT*3B allele is not found in any group.

Variant genotypes are statistically significantly more common in Crohn's disease than in ulcerative colitis subgroup ($p=0.032$).

We also compared frequencies of variant TPMT alleles in our population to selected countries which had had results published earlier. We found the overall frequency of variant alleles in our population statistically nonsignificantly lower when compared with other populations of Caucasian origin.

Azathioprine is a thiopurine drug registered in IBD treatment in Croatia. Patients who have variant TPMT genotype, i.e. reduced enzyme activity, possibly develop severe adverse effects. The most common azathioprine adverse effect is myelotoxicity. Additionally, concomitant therapy possibly influences adverse effects occurrence.

Regarding aforementioned, the other aim of the study was to investigate a relationship between the most common TPMT polymorphisms, AZA adverse effects and concomitant therapy that is regularly applied in IBD. Out of 263 patients treated with AZA, 64 have developed adverse effects (24%). The most common adverse effects is myelotoxicity, with thrombocytopenia slightly more prevalent than leukopenia. The most common toxic hepatic

manifestation is diffuse liver lesion, while pancreatic toxicity usually presents with acute pancreatitis.

The majority of adverse effects occurs in patients with wild-type genotype.

Statistical analysis shows that only TPMT genotype influences adverse effects occurrence ($p=0.0038$), notably TPMT*3A variant ($p=0.0036$). There is no influence of concomitant therapy – either aminosalicylate, corticosteroid or anti-TNF – on AZA-related toxicity.

10 LITERATURA

1. Yulan Y, Zhi P, Weichang C, Songwen J, Chunli Z. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8:22529-22542.
2. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM i sur. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012; 142: 46–54.e42.
3. Lakatos PL, Fischer S, Lakatos L. Is the epidemiology of inflammatory bowel disease changing in Eastern Europe? *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 870–2.
4. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z i sur. Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977–2001. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 404–9
5. Vucelić B, Korać B, Sentić M i sur. Epidemiology of Crohn's disease in Zagreb, Yugoslavia: a ten-year prospective study. *Int J Epidemiol* 1991; 20:216–220.
6. Siew CNg. Changing Epidemiology and Future Challenges of Inflammatory Bowel Disease in Asia. *Intest Res* 2010; 8(1):1-8.
7. Burisch J, Pedersen N, Čuković-Čavka S i sur. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EPICom inception cohort. *Gut* 2014; 63:588-97.

8. Johnston RD, Logan RF. What is the peak age for onset of IBD? *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14 Suppl 2:S4-5.
9. Friedman S, Blumberg RS. Inflammatory bowel diseases. U: Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J, ur. *Harrison's principles of internal medicine*. 18. Izd. McGraw Hill; 2012, str. 2477-2501.
10. Rosenfeld G, Bressler B. The truth about cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2012; 107:1407-8.
11. Khalil H, Higuchi LM, Ananthakrishnan AN i sur. Oral contraceptives, reproductive factors and risk of inflammatory bowel disease. *Gut* 2013; 62: 1153–1159.
12. Uhlig HH. Monogenic diseases associated with intestinal inflammation: implications for the understanding of inflammatory bowel disease. *Gut* 2013; 62:1795–1805.
13. Phillips S. A Discussion on Ulcerative Colitis. *Proc R Soc Med* 1909; 2: 88-90.
14. Bassler A. The etiology and treatment of chronic ulcerative colitis (non-specific). *Am J Dig Dis* 1949; 16: 275-285.
15. De Dombal FT. Ulcerative colitis: definition, historical background, aetiology, diagnosis, naturel history and local complications. *Postgrad Med J* 1968; 44: 684-692.
16. Kirsner JB. Historical review: the historical basis of the idiopathic inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1995; 1: 2-26.

17. Ley Re, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124:837-48.
18. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486:207-14.
19. Gordon HA. Morphological and physiological characterization of germfree life. *Ann N Y Acad Sci* 1959; 78:208-20.
20. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E i sur. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009; 31:677-89.
21. Lopez-Serrano P, Perez-Calle JL, Perez-Fernandez MT i sur. Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45:1464-71.
22. Bresciani M, Parisi C, Menghi G, Bonini S. The hygiene hypothesis: does it function worldwide? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:147–51.
23. Olszak T, An D, Zeissig S i sur. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 2012; 336:489-93.
24. Li Y, Innocentin S, Withers DR i sur. Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. *Cell* 2011; 147:629-40.

25. Carding SR, Kyes S; Jenkinson E *et al*. Developmentally regulated fetal thymic and extrathymic T-cell receptor gamma delta gene expression. *Genes Dev* 1990; 4:1304-15.
26. Cader MZ, Kaser A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut* 2013; 62:1653-1664.
27. Hashimoto T, Perlot T, Rehman A *et al*. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature* 2012; 487:104-8.
28. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9:356-68.
29. Lala S, Ogura Y, Osborne C *et al*. Crohn's disease: NOD2 gene: a role for Paneth cells. *Gastroenterology* 2003; 125:47-57.
30. Cukovic-Cavka S, Vermeire S, Hrstic I *et al*. NOD2/CARD15 mutations in Croatian patients with Crohn's disease: prevalence and genotype-phenotype relationship. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18:895-9.
31. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E *et al*. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:18129-34.
32. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 147:259-63.
33. Cadwell K, Liu JY, Brown SL *et al*. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16L1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008; 456:259-63.

34. Saitoh T, Fujita N, Jank MH i sur. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 2008; 456:264-8.
35. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M i sur. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 2010; 11:55-62.
36. Kaser A, Lee AH, Franke A i sur. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 2008; 134:743-56.
37. Denning TL, Wang YC, Patel SR i sur. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 2007; 8:1086-94.
38. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S i sur. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest* 2008; 118:2269-80.
39. Hammer GE, Turer EE, Taylor KE i sur. Expression of A20 by dendritic cells preserves immune homeostasis and prevents colitis and spondyloarthritis. *Nat Immunol* 2011; 12:1184-93.
40. Spits H, Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:647-75.

41. Hawk WA, Turnbull RB. Primary ulcerative disease of the colon. *Gastroenterology* 1966; 51:802– 805.
42. Glotzer DJ, Gardner RC, Goldman H i sur. Comparative features and course of ulcerative colitis and granulomatous colitis. *N Engl J Med* 1970; 282:582–58
43. Silverberg M, Satsangi J, Ahmad T i sur. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a working party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19(Suppl A):1A–32A.
44. Geboes K, Colombel JF, Greenstein A i sur. Indeterminate Colitis: A Review of the Concept —What’s in a Name? The Pathology Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel Diseases, *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14:850 – 851.
45. Franke A, McGovern DP, Barrett JC i sur. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn’s disease susceptibility loci. *Nat Genet* 2010; 42: 1118–25.
46. Vucelić B. Upalne bolesti crijeva. U: Vucelić B. i sur., ur. *Gastroenterologija i hepatologija*, Zagreb: Medicinska naklada, 2002, str. 723-760.
47. Moayyedi P, Surette P, Wolfe M i sur. A randomized, placebo controlled trial of fecal microbiota therapy in active ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2014; 146 (Supplement 1): S – 159.

48. Elion GB, Callahan SW, Hitchings GH, Rundles RW. The metabolism of 2-amino-6-(1-methyl-4-nitro-5-imidazolyl) thiopurine (B.W. 57-323) in man. *Cancer chemotherapy reports*. 1960. Part 1. 8: 47–52.
49. Elion GB. The George Hitchings and Gertrude Elion Lecture. The pharmacology of azathioprine. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 685:400–407.
50. Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, Wilson RE, Dammin GJ. Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N Engl J Med* 1963; 268:1315–1323.
51. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/azathioprine#section=Top>
52. Teml A, Schaeffeler E, Herrlinger KR, Klotz U, Schwab M. Thiopurine treatment in inflammatory bowel disease: clinical pharmacology and implication of pharmacogenetically guided dosing. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46(3):187-208.
53. Geary RB, Barclay ML. Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20(8):1149-57.
54. Maltzman JS; Koretzky GA. Azathioprine: old drug, new actions. *J Clin Invest* 2003; 111:1122–1124.
55. Thomas CW, Myhre GM, Tschumper R i sur. Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312(2):537–545.

56. Boirivant M, Marini M, Di Felice G i sur. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* 1992; 116:557– 565.
57. Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology* 1993; 78:127–131.
58. Plevy SE, Landers CJ, Prehn J i sur. A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 1997; 159:6276–6282.
59. 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; 111:1133–1145.
60. Chabner BA, Ryan DP, Paz-Ares L, Garcia-Carbonero R, Calabresi P. Antineoplastic agents. U: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gillman A, ur. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 10.izdanje. New York: McGrawHill, 2001, str.1389-1459.
61. Sandborn WJ, Tremaine WJ, Wolf DC i sur. Lack of effect of intravenous administration on time to respond to azathioprine for steroid-treated Crohn's disease. North American Azathioprine Study Group. *Gastroenterology* 1999; 117:527–535.
62. Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64:753–767.

63. Elion GB. Symposium on immunosuppressive drugs. Biochemistry and pharmacology of purine analogues. *Fed Proc* 1967; 26:898–904
64. Weinshilboum RM, Raymond FA, Pazmino PA. Human erythrocyte thiopurine methyltransferase: radiochemical microassay and biochemical properties. *Clin Chim Acta* 1978; 85:323–333.
65. Hamilton L, Elion GB. The fate of 6-mercaptopurine in man. *Ann N Y Acad Sci* 1954; 60:304–314.
66. Haglund S, Taipalensuu J, Peterson C, Almer S. IMPDH activity in thiopurine-treated patients with inflammatory bowel disease – relation to TPMT activity and metabolite concentrations. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 65: 69–77.
67. Berns A, Rubinfeld S, Rymzo WT Jr, Calabro JJ. Hazard of combining allopurinol and thiopurine. *N Engl J Med* 1972; 286:730–731
68. Zimm S, Collins JM, O’Neill D, Chabner BA, Poplack DG. Inhibition of first-pass metabolism in cancer chemotherapy: interaction of 6-mercaptopurine and allopurinol. *Clin Pharmacol Ther* 1983; 34:810–817.
69. Balis FM, Holcenberg JS, Zimm S i sur. The effect of methotrexate on the bioavailability of oral 6-mercaptopurine. *Clin Pharmacol Ther* 1987; 41:384–387.

70. Szumlanski C, Weinshilboum RM, Sulfasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: Possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine. *Br J Clin Pharmacol* 1995; 39:456–9.
71. Lowry P, Szumlanski CL, Weinshilboum RM i sur. Balsalazide and azathioprine or 6-mercaptopurine: Evidence for a potentially serious drug interaction. *Gastroenterology* 1999; 116:1505–6.
72. Lewis LD, Benin A, Szumlanski CL i sur. Olsalazine and 6-mercaptopurine-related bone marrow suppression: a possible drug-drug interaction. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62:464–75.
73. Lowry P, Franklin CL, Weaver AL i sur. Leucopenia resulting from a drug interaction between azathioprine or 6-mercaptopurine and mesalamine, sulphasalazine, or balsalazide. *Gut* 2001; 49:656–64.
74. Frei P, Biedermann L, Haagen Nielsen O, Rogler G. Use of thiopurines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 1040–1048.
75. Harbord M, Eliakim R, Bettenworth D i sur. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management. *J Crohns Colitis* 2017; 11: 769–784.
76. Jharap B, Seinen ML, de Boer NK i sur. Therapy in inflammatory bowel disease patients: analyses of two 8-year intercept cohorts. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16:1541-9.

77. Hindorf U, Lindqvist M, Hildebrand H, Fagerberg U, Almer S. Adverse events leading to modification of therapy in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24:331-42.
78. Connell WR, Kamm MA, Dickson M, Balkwill AM, Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994; 343:1249-52.
79. Connell WR, Kamm MA; Ritchie JK, Lennard-Jones JE. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut* 1993; 34:1081-5.
80. Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Lorient MA, Roblin X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35:15-36.
81. Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremaine W. American Gastroenterological Association Institute medical position statement on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006; 130:935–939.
82. Chouchana, Vernier-Massouille G, Cosnes J i sur. Nodular regenerative hyperplasia in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine. *Gut* 2007; 56:1404–1409.
83. Bastida G, Nos P, Aguas M i sur. Incidence, risk factors and clinical course of thiopurine induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22:775-82.

84. Ansari A, Arenas M, Greenfield SM i sur. Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28:973-83.
85. Pearson DC, May GR, Fik GH, Sutherland LR. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1995; 123:132-42.
86. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing. *Clin Pharm Therapeutics* 2011; 89:387-391.
87. Kaskas BA, Louis E, Hindorf U i sur. Safe treatment of thiopurine S-methyltransferase deficient Crohn's disease patients with azathioprine. *Gut* 2003; 52:140-142.
88. Lin S, McLennan AG, Ying K i sur. Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the itpa gene. *J Biol Chem* 2001; 276:18695-701.
89. Holmes SL, Turner BM, Hirschhorn K. Human inosine triphosphatase: catalytic properties and population studies. *Clin Chim Acta* 1979; 97:143-53.
90. Sumi S, Marinaki AM, Arenas M i sur. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. *Hum Genet* 2002; 111: 360-7.

91. Marinaki AM, Ansari A, Duley JA i sur. Adverse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase). *Pharmacogenetics* 2004; 14: 181-7.
92. Eklund BI, Moberg M, Bergquist J, Mannervik B. Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. *Mol Pharmacol* 2006; 70:747-54.
93. Huh K, Yamamoto I, Gohda E, Iwata H. Tissue distribution and characteristics of xanthine oxidase and allopurinol oxidizing enzyme. *Jpn J Pharmacol* 1976; 26:719-24.
94. Ansari A, Aslam Z, De Sica A i sur. Influence of xanthine oxidase on thiopurine metabolism in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28:749-57.
95. Krenitsky TA, Neil SM, Elion GB, Hitchings GH. A comparison of the specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Arch Biochem Biophys* 1972; 150:585-99.
96. Smith MA, Marinaki AM, Arenas M i sur. Novel pharmacogenetic markers for treatment outcome in azathioprine-treated inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30:375-84.
97. Schwan B, Rozen R. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. *Am J Pharmacogenomics* 2001; 1:189-201.
98. Krishnamurthy P, Schwab M, Takenaka K i sur. Transporter-mediated protection against thiopurine-induced hematopoietic toxicity. *Cancer Res* 2008; 68:4983-9.

99. Ban H, Andoh A, Imaeda H i sur. The multidrug-resistance protein 4 polymorphism is a new actor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2010; 45:1014-21.
100. Weinshilboum R. Thiopurine pharmacogenetics: clinical and molecular studies of thiopurine methyltransferase. *Drug Metab Dispos* 2001; 29:601-5.
101. Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980; 32:651-62.
102. Otterness DM, Szumlanski CL, Wood TC, Weinshilboum RM. 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
103. Roberts RL, Wallace MC, Drake JM, Stamp LK. Identification of a novel thiopurine S-methyltransferase allele (TPMT*37). *Pharmacogenet Genomics* 2014; 24:320-3.
104. Krynetski EY, Schuetz JD, Galpin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:949–953.
105. Krynetski E, Evans WE. Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. *Oncogene* 2003; 22:7403-7413

106. 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 86.
107. Krynetski EY, Tai HL, Yates CR i sur. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase: clinical importance and molecular mechanisms. *Pharmacogenetics* 1996; 6:279-90.
108. Ansari A, Hassan C, Duley J i sur. Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:1743-50.
109. Spire-Vayron de la Moureyre C, Debuysere H, Mastain B i sur. Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Br J Pharmacol* 1998; 125:879-87.
110. Lindqvist M, Skoglund K, Karlgren A i sur. Explaining TPMT genotype/phenotype discrepancy by haplotyping of TPMT*3A and identification of a novel sequence variant, TPMT*23. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17:891-5.
111. Vucetich JP, Weinshilboum RM, Price RA. Segregation analysis of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *Genet Epidemiol* 1995; 12:1-11.
112. 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.

113. Loit E, Tricco AC, Tsouros, Sears M, Ansari MT, Booth RA. Pre-analytic and analytic sources of variations in thiopurine methyltransferase activity measurement in patients prescribed thiopurine-based drugs: A systematic review. *Clin Biochem* 2011; 44:751–757.
114. Lindqvist M, Hindorf U, Almer S i sur. No induction of thiopurine methyltransferase during thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. *Nucl Nucleotide Nucl Acids* 2006; 25:1033-7.
115. Lennard L. Implementation of TPMT testing. *Br J Clin Pharmacol* 2014; 77:704-714.
116. McLeod HL, Krynetski EY, Wilimas JA, Evans WE. Higher activity of polymorphic thiopurine S-Methyltransferase in erythrocytes from neonates compared to adults. *Pharmacogenetics* 1995; 5:281-6.
117. 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; 10:1753–1765.
118. Klemetsdal B, Wist E, Aarbakke J. Gender difference in red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *Scand J Clin Lab Invest* 1993; 53:747-9.
119. Dervieux T, Meyer G, Barham R i sur. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of erythrocyte thiopurine nucleotides and effects of thiopurine methyltransferase gene variants on these metabolites in patients receiving azathioprine/6-mercaptopurine therapy. *Clin Chem* 2005; 51: 2074–84.

120. Roblin X, Chevaux JB, Sparrow M, Peyrin-Biroulet L. Use of thiopurine testing in the management of inflammatory bowel diseases in clinical practice: a worldwide survey of experts. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 2480-7.
121. Gomollón F, Dignass A, Annese V i sur. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis* 2017; 11:3-25.
122. Feuerstein JD, Nguyen G, Kupfer SS i sur. Therapeutic Drug Monitoring in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2017; 153:827-834.
123. Coenen MJH, De Jong DJ, Van Marrewijk C i sur. Identification of patients with variants in TPMT and dose reduction reduces hematologic events during thiopurine treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2015; 149:907-917.
124. 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; 12:815-826.
125. Sayani FA, Prosser C, Bailey RJ i sur. Thiopurine methyltransferase enzyme activity determination before treatment of inflammatory bowel disease with azathioprine: effect on cost and adverse events. *Can J Gastroenterol* 2005; 19:147-151.
126. Reinshagen M, Schütz E, Armstrong VW i sur. 6-thioguanine nucleotide-adapted azathioprine therapy does not lead to higher remission rates than standard therapy in chronic

active Crohn's disease: results from a randomized, controlled, open trial. *Clin Chem* 2007; 53:1306-1314.

127. Van Asseldonk DP, Sanderson J, de Boer NKH i sur. Difficulties and possibilities with thioprine therapy in inflammatory bowel disease – proceedings of the first Thiopurine Task Force meeting. *Digest Liver Dis* 2011; 43:270-276.

128. González-Lama Y, Gisbert JP. Monitoring thiopurine metabolites in inflammatory bowel disease. *Front Gastroenterol* 2016; 7:301-307.

129. Gisbert JP, González-Lama Y, Maté J. Thiopurine-induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:1518-27.

130. Stocco G, Cuzzoni E; De Iudicibus S i sur. Thiopurine metabolites variations during co-treatment with aminosalicylates for inflammatory bowel disease: effect of N-acetyl transferase polymorphisms. *World J Gastroenterol* 2015; 21:3571-8.

131. Shih DQ, Nguyen M, Zheng L i sur. Split-dose administration of thiopurine drugs: a novel and effective strategy for managing preferential 6-MMP metabolism. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36:449-58.

132. Curkovic I, Rentsch KM, Frei P i sur. Low allopurinol doses are sufficient to optimize azathioprine therapy in inflammatory bowel disease patients with inadequate thiopurine metabolite concentrations. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69:1521-31.

133. Doré M, Frenette Aj, Mansour AM i sur. Febuxostat as a novel option to optimize thiopurines' metabolism in patients with inadequate metabolite levels. *Ann Pharmacother* 2014; 48:648-51.
134. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48:361-72
135. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 2010; 10:564-7.
136. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013. URL <http://www.R-project.org/>.
137. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel J-F. The Montreal classification of inflammatory bowel disease. *Gut* 2006; 55: 749–753.
138. Zhang IP, Guan YY, Wu IH, Jiang WQ, Huang M. Genetic polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase of healthy Han Chinese. *Az' Zheng (Chinese Journal of Cancer)* 2003; 22:385-8.
139. Hiratsuka M, Inoue T, Omori F, Agatsuma Y, Mizugaki M. Genetic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism in a Japanese population. *Mutat Res* 2000; 448:91-5.
140. Haglund S, Lindquist M, Almer S, Peterson C, Taipalensuu J. Pyrosequencing of TPMT alleles in a general Swedish population and in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 2004; 50:288-95.

141. Ameway MM, Collie-Duguid ES, Powrie RH, Adjei-Ofori D, McLeod HL. Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Hum Mol Genet* 1999; 8(2):367-70.
142. Boson WL, Romano-Silva MA, Correa H, Falcão RP, Teixeira-Vidigal PV, De Marco L. Thiopurine methyltransferase polymorphism in a Brazilian population. *Pharmacogenomics J* 2003; 3:178-82
143. Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D i sur. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics* 2004; 14:407.
144. Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K i sur. Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 55:560-9.
145. Hon Y, Fessing MY, Pui C-H, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE. Polymorphism of the thiopurine S-methyltransferase gene in African-Americans. *Hum Mol Genet* 1999; 8:371-376.
146. Rossi AM, Bianchi M, Guarnieri C, Barale R, Pacifici GM. Genotype-phenotype correlation for thiopurine-methyltransferase in healthy Italian subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 57:51-4.
147. Milek M, Murn J, Jaksic Z, Lukac Bajalo J, Jazbec J, Mlinaric Rascan I. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: genotype to phenotype correlation in the Slovenian population. *Pharmacology* 2006; 77:105-14.

148. Sayitoglu MA, Yildiz I, Hatirnaz O, Ozbek U. Common cytochrome p4503A (CYP3A4 and CYP3A5) and thiopurine S-methyltransferase (TPMT) polymorphisms in Turkish population. *Turk J Med Sci* 2006; 36:11-5.
149. Kurzawski M, Gawronska-Szklarz B, Drozdik M. Frequency distribution of thiopurine S-methyltransferase alleles in a Polish population. *Ther Drug Monit* 2004; 26:541-5.
150. Larovere LE, de Kremer RD, Lambooy LH, De Abreu RA. Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase in Argentina. *Ann Clin Biochem* 2003; 40:388-93.
151. Ganiere-Monteil C, Medard Y, Lejus C, Bruneau B, Pineau A, Fenneteau O i sur. Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; 60:89-96.
152. Isaza C, Henao J, Lopez AM, Cacabelos R. Allelic variants of the thiopurine methyltransferase (TPMT) gene in the Colombian population. *Method Find Exp Clin Pharmacol* 2003; 25:423-9.
153. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH i sur. Molecular diagnosis of thiopurine Smethyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med* 1997; 126:608-14.
154. Dokmanovic L, Urosevic J, Janic D i sur. Analysis of thiopurine S-methyltransferase polymorphism in the population of Serbia and Montenegro and mercaptopurine therapy tolerance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ther Drug Monit* 2006; 28:800-6.

155. Ladić A, Božina N, Borzan V, Brinar M, Vucelić B, Čuković-Čavka S. An epidemiological study of thiopurine-methyltransferase variants in a Croatian inflammatory bowel disease patient cohort. *Acta Clin Croat* 2016; 55:16-22.
156. 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; 353-353.
157. Wiik K. Where did European man come from? *J Gen Genealogy* 2008; 4:35-85.
158. Primorac D, Marjanović D, Rudan P, Villems R, Underhill PA. Croatian genetic heritage: Y-chromosome story. *Croat Med J* 2011; 52:225-34.
159. Myres NM, Rootsi S, Lin AA i sur. A major Y-chromosome haplogroup R1b Holocene era founder effect in Central and Western Europe. *Eur J Hum Genet* 2011; 19:95-101.
160. Underhill PA, Myres NM, Rootsi S i sur. Separating the post-Glacial coancestry of European and Asian Y chromosomes within haplogroup R1a. *Eur J Hum Genet* 2009; 18:479-84.
161. Samochatova EV, Chupova NV, Rudneva A i sur. TPMT genetic variations in populations of the Russian Federation. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52:203-8.
162. Gisbert JP, Gomollon F. Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. *Am J Gastroenterol* 2008; 103:1783-1800.

163. Broekman MMTJ, Coenen MJH, Wanten GJ. Risk factors for thiopurine-induced myelosuppression and infections in inflammatory bowel disease patients with a normal TPMT genotype. *Aliment Pharmacol Ther* 2017; 46:953–963.
164. Kwon WA, Oh TH, Lee JW, Park SC. Predictive factors for neutropenia after docetaxel-based systemic chemotherapy in Korean patients with castration-resistant prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15:3443-3446.
165. Venton G, Crocchiolo R, Furst S i sur. Risk factors of Ganciclovir related neutropenia after allogeneic stem cell transplantation: a retrospective monocentre study on 547 patients. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:160-166
166. Hindorf U, Lindqvist M, Peterson C i sur. Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. *Gut* 2006; 55:1423-31.
167. 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; 149:907–917.
168. Zabala W, Cruz R, Barreiro-de Acosta M i sur. New genetic associations in thiopurine-related bone marrow toxicity among inflammatory bowel disease patients. *Pharmacogenomics* 2013;14, 631–640.
169. Kim JH, Cheon JH, Hong SS i sur. Influences of thiopurine methyltransferase genotype and activity on thiopurine-induced leukopenia in Korean patients with inflammatory bowel disease: a retrospective cohort study. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44:e242-8.

170. Lee HJ, Yang SK, Kim KJ i sur. The safety and efficacy of azathioprine and 6-mercaptopurine in the treatment of Korean patients with Crohn's disease. *Intest Res* 2009; 7:22-31.
171. Gisbert JP, Niño P, Rodrigo L, Cara C, Guijarro LG. Thiopurine methyltransferase (TPMT) activity and adverse effects of azathioprine in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 394 patients. *Am J Gastroenterol* 2006; 101:2769-76.
172. Hibi T, Naganuma M, Kitahora T, Kinjyo F, Shimoyama T. Low dose azathioprine is effective and safe for maintenance of remission in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 2003; 38:740–6.
173. Ban H, Andoh A, Imaeda H i sur. The multidrug-resistance protein 4 polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2010; 45:1014–1021.
174. Pearson DC; May GR, Fick G, Sutherland LR. Azathioprine for maintaining remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev* 2000; CD000067.
175. Cuffari C, Theoret Y, Latour S, Seidman G. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* 1996; 39:401-6.
176. Kader HA; Wenner WJ, Telega GW, Maller ES, Baldassano RN. Normal Thiopurine mehtyltransferase levels do not eliminate mercaptopurine or azathioprine toxicity in children with inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2000; 30:409-13.

177. McGovern DP, Shobowale-Bakre EM, Duley J, Travis SP. Early azathioprine intolerance in IBD patients is imidazole-related and independent of thiopurine methyltransferase (TPMT) activity (Abstract). *Gastroenterology* 2001; 118:A890.

178. Teich N, Mohl W, Bokemeyer B i sur. Azathioprine-induced Acute Pancreatitis in Patients with Inflammatory Bowel Diseases - A Prospective Study on Incidence and Severity. *J Crohns Colitis* 2016; 10: 61–68.

179. Konidari A, Matari WE. Use of thiopurines in inflammatory bowel disease: safety issues. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2014; 6; 5(2): 63-76.

180. Present DH, Korelitz BI, Wisch N i sur. Treatment of Crohn's disease with 6-mercaptopurine: a long-term randomized double blind study. *N Engl J* 1980; 302:981-7.

181. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY i sur. Pharmacogenetics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122:904-15.

11 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1977.godine u Zagrebu, gdje sam završila prirodoslovno-matematičku gimnaziju i srednju glazbenu školu. Nakon gimnazije odlazim u Englesku na godinu dana, kako bih usavršila svoje znanje engleskog jezika. Po povratku započinjem studij medicine na Sveučilištu u Zagrebu, koji s izvrsnim uspjehom završavam 2002.godine. Specijalizaciju interne medicine završavam 2014.godine, s mjestom zaposlenja na Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju. 2014. godine odlazim na kraću edukaciju o funkcijskoj dijagnostici gastrointestinalnih poremećaja u Sveučilišnu bolnicu u Leuvenu, Belgija. Od tada mi funkcijska dijagnostika postaje svakodnevica, te paralelno s ostalom gastroenterološkom problematikom počinjem s radom u ambulanti za funkcijske gastrointestinalne poremećaje. Također, započinjem rad i s punoljetnim bolesnicima s cističnom fibrozom.

2017. godine sudjelujem u TANDEM projektu Europskog društva za neurogastromotilitet, koji zbližava mlade kliničare i znanstvenike iz domene neurogastroenterologije.

Sudjelujem i u ostalim međunarodnim projektima iz područja endoskopije te gastroenterološko-neuroloških poremećaja.

Autor sam i koautor 11 stručno-znanstvenih članaka, od kojih se 6 citira u Current Contentsu.

Slobodno vrijeme provodim u krugu svoje šesteročlane obitelji, te se bavim glazbom - od njenog nastajanja pa sve do izvedbe.