

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Imunosupresivní terapie idiopatických střevních zánětů**

**Petra Koubíková**

zkrácená verze, v Praze 6.4.2007

Postgraduální student: **MUDr. Petra Koubíková roz. Chalupná**  
Kontakt: [p.chalupna@seznam.cz](mailto:p.chalupna@seznam.cz), mobil 777054476

**Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka**

**Téma: Imunosupresivní terapie idiopatických střevních zánětů**

**Školitel: Doc.MUDr. Milan Lukáš, CSc.**

**Pracoviště: Gastroenterologické centrum VFN  
IV. interní klinika VFN a 1.LF UK  
U nemocnice 2  
128 08 Praha 2**

Vznik disertační práce byl podpořen grantem:

**Grantový projekt IGA MZ ČR NK/7276-3,**

Téma: Klinický přínos stanovení enzymů purinového metabolismu a metabolitů 6-merkaptopurinu při terapii azathioprinem u nemocných s ulcerózní kolitidou a Crohnovou chorobou.

Hlavní řešitel: doc. MUDr. Milan Lukáš, CSc., r. 2002-2004

Spoluřešitelé: Michal Kumšta, Petra Chalupná, Martin Bortlík, Aleš Novotný, Jelena Vávrová

## Nejčastěji používané zkratky

ISZ	idiopatické střevní záněty
UC	ulcerózní kolitida
CN	Crohnova nemoc
AZA	azathioprin
CsA	cyklosporin A
MTX	metotrexát
6-MP	6-merkaptopurin
6-TG	6-thioguanin
6-MMP	6-metylmerkaptopurin
TPMT	thiopurin-methyltransferáza
KRK	kolorektálním karcinom

## TEORIE

Idiopatické střevní záněty (ISZ, anglicky nazývané Inflammatory Bowel Disease, IBD), jsou zastoupeny dvěma klinickými jednotkami- Crohnovou nemocí a ulcerózní kolitidou. Typickým znakem těchto chorob je zánět sliznice gastrointestinálního traktu postihující jeho různé části.

Crohnova nemoc (CN) je granulomatózní a transmurální zánět postihující segmentárně nebo pluri-segmentárně kteroukoliv část trávicí trubice. Jde o onemocnění ne zcela jasné etiologie a patogeneze. Choroba probíhá chronicky s obdobími zhoršení (relapsů) a zklidnění (remisí) zánětu a je medikamentózně i chirurgicky nevléčitelná.

Ulcerózní kolitida (UC), v českém písemnictví označovaná také jako idiopatická proktokolitida, je hemorhagicko-katarální zánět sliznice tlustého střeva, postihující vždy rektum a šířící se kontinuálně na různě rozsáhlou část, nebo celé tlusté střevo. Toto onemocnění také nedokážeme zcela etiologicky a patogeneticky objasnit. Průběh onemocnění je charakterizován relapsy a remisemi. Jedná se o chorobu, kterou nelze medikamentózně definitivně vyléčit, jen chirurgická léčba (proktokolektomie) vede k vyléčení pacienta.

Zhruba 10% pacientů s ISZ nelze jednoznačně zařadit ani k jedné z těchto chorob a hovoříme tedy o indeterminované kolitidě.

### Terapie idiopatických střevních zánětů

Mechanismus účinku terapie idiopatických střevních zánětů souvisí přímo s patofyziologií ISZ. Hlavními rysy je aktivace T-lymfocytů a produkce prozánětlivých cytokinů. Terapie je tedy zaměřena právě na inhibici prozánětlivé odpovědi T-lymfocytů. Tato inhibice může spočívat v potlačení proliferace lymfocytů, dále v indukci apoptózy lymfocytů a konečně v zamezení migrace lymfocytů do tkáně. Účastnit se v terapii mohou i látky zasahující na úrovni nitrobuněčných molekul (33). Po rozpoznání antigenu T-lymfocyty reagují proliferací a diferenciací v efektorové buňky, které produkují množství cytokinů a chemokinů. Velkou roli hraje IL-2 a jeho vazba na receptor (CD25), která je za fyziologických podmínek přísně regulována různými procesy zahrnujícími např. apoptózu. V rozvoji ISZ je rozhodujícím faktorem dysregulace těchto pochodů, mající za následek nekontrolovanou proliferaci T-lymfocytů. Proto tedy snížení aktivace a proliferace T-lymfocytů je jedna ze strategií léčby.

Apoptóza (programová smrt buňky) je důležitým procesem regulace imunitní odpovědi. Za fyziologických podmínek je lamina propria T-lymfocytů citlivá k apoptotickým mechanismům, u Crohnovy nemoci se tato stává rezistentní. Tohoto je využíváno při léčbě infliximabem (chimerická protilátka anti-tumor necrosis faktoru  $\alpha$ ), který indukuje apoptózu T-lymfocytů vázajících TNF-  $\alpha$  (34).

Buněčné adhezní molekuly (integriny, selektiny atd.) exprimované leukocyty a endoteliemi jsou nutným modulátorem imunitní odpovědi, poněvadž zajišťují cestování leukocytů z krve do tkání postižených zánětem. Integriny ovlivňují migraci leukocytů například interakcí s intracelulárními adhezními molekulami ICAM-1, -2. Zde je další místo biologické terapie využívající hypotézu porušené resp. zvýšené migrace leukocytů do tkání. Zkoušeny jsou např. natalizumab (monoklonální protilátka proti  $\alpha$ 4-integrinu) a ISIS-2302 (anti ICAM molekula). Studie s natalizumabem, který se zdál být účinný u aktivní Crohnovy nemoci, byly bohužel pozastaveny kvůli výskytu progresivní multifokální leukoencefalopatie (35). Molekula ISIS-2302 byla v recentní studii účinná jako lokální terapie levostranné kolitidy (36). Možným mechanismem ovlivnění zánětu je zásah na nitrobuněčné úrovni, jež má opět za cíl regulovat aktivaci T-lymfocytů. Těmito nitrobuněčnými komponentami jsou zejména MAPK (mitogen-activated kinases) a NF- $\kappa$ B, které se účastní transkripce prozánětlivých cytokinů. Inhibitorem MAPK je látka CNI-1493, která inhibuje fosforylaci komponentů některých MAPK a tím suprimuje aktivaci makrofágů a produkci cytokinů včetně TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 atd. V pilotní studii s pacienty s Crohnovou nemocí aplikace CNI-1493 umožnila signifikantní pokles aktivity onemocnění (37). NF- $\kappa$ B kontroluje množství genů zapojených do imunitní reakce. Aktivován je různými podněty, např. přítomností bakteriálních komponentů, prozánětlivými cytokiny, některými mitogeny a zpětně ovlivňuje expresi cytokinů (IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , ICAM-1 a dalších). Experimentálně bylo prokázáno, že pacienti s ISZ vykazují zvýšenou expresi NF- $\kappa$ B v epiteliích a v lamina propria makrofágů (38,39,40). Zásah na tomto místě je velmi vhodným terapeutickým momentem, který využívají např. salicyláty (41). Na modelech jsou zkoušeny i specifické oligonukleotidy proti NF- $\kappa$ B, které redukují aktivitu kolitidy u myši a u pacientů s ISZ blokují cytokinovou odezvu v lamina propria makrofágů (42).

### ***Léčiva používaná v terapii ISZ***

Základními léčivy v terapii ISZ jsou kortikosteroidy, imunosupresiva, mesalazin, a dnes i biologická léčba, zejména infliximab. Pro úplnost dodejme, že nedílnou součástí léčby ISZ jsou různé typy chirurgických výkonů. Dále se ještě uplatňuje podávání antibiotik a probiotik.

## **Imunosupresivní terapie**

Zavedení imunosupresivní terapie do léčby idiopatických střevních zánětů znamenalo velký pokrok v léčbě těchto onemocnění. Velkou výhodou imunosupresiv je nejen jejich dobrá účinnost při relativní bezpečnosti, ale též možnost snížit či zcela vysadit dávky kortikosteroidů, které do zavedení imunosupresivní terapie znamenaly hlavní léčebnou modalitu. Nevýhody zejména dlouhodobé terapie kortikosteroidy jsou všeobecně známy. V současné době mezi nejužívanější imunosupresiva patří azathioprin či 6-merkaptopurin. Dále jsou užívány metotrexát, cyklosporin A a okrajově též tacrolimus a mykofenolát.

### **1. Azathioprin, 6-merkaptopurin**

Naději pro nemocné s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou představují imunosupresivně působící léčiva ze skupiny antimetabolitů purinových basi: azathioprin (Imuran<sup>R</sup>, Glaxo Wellcome) a 6-merkaptopurin (Puri-Nethol<sup>R</sup>, Glaxo Wellcome).

#### ***Účinnost azathioprinu/6-merkaptopurinu***

Účinnost purinových antimetabolitů azathioprinu (AZA) či 6-merkaptopurinu (6-MP) byla prokázána v mnohých studiích. Významným průkopníkem v této oblasti byl Korelitz a Present, kteří publikovali data na přelomu osmdesátých a devadesátých let (46-48). Navázaly další studie povzrující efektivitu těchto látek (49,50). Na základě mnoha pozorování můžeme deklarovat obecně cca 70% účinnost AZA/6-MP v iniciální terapii ISZ. Udržovací terapie AZA/6-MP je efektivní v 95%, resp. 69%, resp. 55% při léčbě trvající 1 rok, resp. 3 roky, resp. 5 let (51). Současná terapie AZA/6-MP s kortikosteroidy působí účinněji a rychleji na dosažení remise než terapie samotnými kortikosteroidy (52,53). Studie u aktivní CN prokázala, že AZA/6-MP je prokazatelně účinnější v navození remise v porovnání s placebem (OR=3.1) (53). V udržovací terapii CN byla prokázána efektivita AZA/6-MP v porovnání s placebem. Relativní protektivní efekt byl v porovnání s placebem stanoven na 6,36 (95% CI 1,6-25,7) (54). Zdá se, že benefit přináší léčba AZA/6-MP také v prevenci pooperační recidivy CN (55-58), i když existují i kontroverzní data(59).

#### ***Farmakokinetika AZA/6-MP***

Azathioprin ani 6-merkaptopurin nemá pravděpodobně biologickou účinnost, je nutná metabolická přeměna. Ze střeva se vstřebá 16-70% podané dávky, u nemocných trpících ISZ je vstřebání spíše nižší (60). Azathioprin je prolék, který je v játrech přeměňován na 6-merkaptopurin. Vzhledem k odlišné struktuře molekuly je nutno počítat s tím, že dávka azathioprinu musí být dvojnásobná v porovnání s 6-merkaptopurinem, aby byla zajištěna stejná biologická dostupnost léku. Poločas 6-MP v plazmě je velmi krátký, cca 2hod.

V dalším metabolickém kroku je 6-MP metabolizován třemi cestami. První katabolická cesta je metylace enzymem thiopurin-S-metyltransferázou (TPMT) na 6-metyl-merkaptopurin (6-MMP); druhou katabolickou cestou je degradace molekuly xantin-oxidázou na thiouráty; třetí možností je anabolická cesta hypoxantin-guanin-fosforybosyltransferázy (HPRT), která obsahuje několik enzymatických reakcí, na jejichž konci jsou 6-thioguanin-monofosfát, 6-thioguanin-difosfát a 6-thioguanin-trifosfát, souhrnně nazývané 6-thioguaninové nukleotidy (6-TGN). Právě 6-TGN jsou odpovědné za imunomodulační účinek léku. Poločas rozpadu 6-TG v plazmě kolísá od 3 do 13 dnů (60).

### ***Enzymy metabolismu AZA/6-MP***

Ukázalo se, že intracelulární koncentrace 6-TG má vztah k aktivitě thiopurin-S-methyltransferázy (TPMT). Zajímavé je, že biologická endogenní funkce TPMT není známa. Aktivita TPMT je důležitým faktorem v metabolismu AZA/6-MP, protože zajišťuje rovnováhu mezi tvorbou 6-TG a 6-MMP. Enzym je geneticky podmíněn chromosomem 6. V polymorfismu TPMT je do dnešního dne známo 20 mutantních alel odpovědných za nedostatečnou aktivitu TPMT a dvě tzv. wild typy alel, které kódují normální aktivitu (61). Například poločas enzymu TPMT, po který je schopen degradace metabolitů, je při genotypu TPMT\*1 (wild alela) 18 hodin, kdežto při genotypu TPMT\*2/TPMT\*3 (mutantní alely) je 15 minut (62). Je zaznamenána vysoká korelace mezi genotypem TPMT a fenotypem, tj aktivitou TPMT (63). Koncentrace 6-TG intracelulárně koreluje inverzně s aktivitou TPMT. Nízká aktivita TPMT při mutaci genu pro tvorbu TPMT může vést k toxickému poškození dřeně. Proto se v objevovaly snahy zjišťovat aktivitu TPMT či provádět genotypizaci. Asi 89% bělošské populace jsou homozygoti s normálními alelami pro TPMT (TPMT<sup>H</sup>/TPMT<sup>H</sup>), v těchto případech se aktivita TPMT pohybuje od 20 nmol/hod.mgHb. U 11% nemocných lze prokázat přítomnost jedné mutantní alely s nízkou aktivitou enzymu (TPMT<sup>H</sup>/TPMT<sup>L</sup>) a vzácně u 0,3% populace je aktivita TPMT téměř nulová a obě alely jsou aberovány (TPMT<sup>L</sup>/TPMT<sup>L</sup>) (64). V těchto případech může mít podávání AZA nebo 6-MP velmi nepříznivé důsledky.

Do dnešního dne bylo provedeno množství studií zkoumajících vliv aktivity TPMT na účinnost terapie a aktivity TPMT na výskyt nežádoucích účinků. V prospektivní studii Blacka a spol. zahrnující 67 pacientů s revmatologickým onemocněním bylo 6 pacientů heterozygotů s mutantní alelou, 5 z nich muselo užívání AZA přerušit hned v průběhu prvního měsíce léčby pro leukopenii (65). V další studii zahrnující 262 ISZ pacientů TPMT genotyp s jednou mutantní alelou predikoval leukopenii s OR 6,32 v porovnání s normálním TPMT genotypem (66). V studii Reguierově bylo zařazeno 71 pacientů, pacienti s normální aktivitou TPMT

užívali běžnou dávkou AZA 2-2,5 mg/kg/den, pacienti s jednou mutantní alelou dostali poloviční dávku 1-1,5 mg/kg/den a u žádného pacienta se neobjevila leukopenie (67). Ze závěrů studií vyplývá doporučení snížit zejména počáteční dávku AZA/6-MP na 30-50% u pacientů heterozygotů (68). Pacienti homozygoti mající obě alely mutantní by neměli dostat AZA/6-MP vůbec nebo jen 10% běžné dávky (69). Aktivita TPMT je vyšší u dětí než u dospělých, u mužů než u žen a u kuřáků než u nekuřáků. Navíc se aktivita TPMT zvyšuje během léčby purinovými antimetabolity jako důsledek indukce enzymu (70). Lékové interakce zahrnují především 5-aminosalicylovou kyselinu, která je inhibitorem TPMT. Z toho tedy plyne zvýšená koncentrace 6-TG nukleotidů při současné léčbě azathioprinem/6-merkaptopurinem a 5-ASA (71). Dalšími inhibitory TPMT je kyselina acetylosalicylová (72) a furosemid (73). Poslední lékovou interakcí, kterou je nutno zmínit, je allopurinol, který inhibuje xantinoxidázu, jeden z enzymů purinového metabolismu. Proto při současném podávání allopurinolu a AZA/6-MP je potřeba dávku zredukovat cca na 30% (74).

Jak bylo zmíněno výše, je vysoká korelace mezi genotypem a fenotypem TPMT odpovídající až 98%. V praxi je tedy možno využít jak PCR techniku k určení DNA leukocytů a zjištění TPMT genotypu pacienta, tak i měření aktivity TPMT ke zjištění fenotypové variability. Druhá možnost se zdá výhodnější z důvodu zjištěného rozpětí aktivity TPMT u pacientů se stejným genotypem, způsobeného pravděpodobně možnostmi alterace aktivity TPMT např. výše zmíněnou medikací. Jedinou situací, kdy měření TPMT aktivity není relevantní, je po transfuzi krve (75).

Dalším zmíněným enzymem purinového metabolismu je hypoxantin-guanin-fosforybosiltransferáza (HPRT), o němž není mnoho známo. Deficience enzymu je narozdíl od TPMT extrémně vzácná (1 : 100 000) a klinicky se manifestuje tzv. Lesch-Nyhanovým syndromem, pro který je charakteristické sebepoškozující jednání pacientů (70).

Posledním důležitým enzymem je inosin-trifosfát-pyrofosfatáza (ITPA) katalyzující přeměnu inosin-trifosfátu na inosin-monofosfát. Enzym vykazuje polymorfismus, dvě mutantní alely jsou spojeny se sníženou aktivitou, jejíž klinický význam je diskutován. Alela C94A může být spojena s výskytem nežádoucích účinků typu flu-like symptomů, rashe a pankreatitidy nebo leukopenie (66,76).

### ***Metabolity AZA/6-MP***

Koncentrace 6-TG nukleotidů v červených krvinkách je významně spojená s navozením klinické remise. U nemocných s koncentrací 6-TG > 230 pmol/8x10<sup>8</sup> je remise onemocnění dosaženo v 90% případů v porovnání s pacienty, u kterých je koncentrace metabolitu pod touto hladinou (77,78). Účinek terapie tedy závisí na hladině metabolitu 6-TG,



ale nekoreluje s dávkou azathioprinu/6-merkaptopurinu. V subpopulaci pacientů s leukopenií byla hodnota 6-TG  $490 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  (79).

Kumulace jiného metabolitu v organismu, tzv. 6-metylmerkaptopurinu, může mít hepatotoxické důsledky. Za hranici je považována koncentrace 6-MMP v erytrocytech nad  $5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  (80). Je ovšem nutno zmínit, že závěry týkající se hladin metabolitů AZA/6-MP nebyly potvrzeny všemi studii (81-83).

### ***Farmakodynamika AZA/6-MP***

V posledních letech byly zjištěny významné poznatky ohledně mechanismus účinku léku. Jeho imunosupresivní efekt není zřejmě dán jedním unikátním mechanismem, nýbrž je způsoben více faktory. 6-TG nukleotidy jsou inkorporovány do nukleové kyseliny leukocytů jako falešné baze, které narušují vlákna DNA a vykazují tímto imunosupresivní efekt (70). Navíc 6-TG nukleotidy, zejména 6-thioguanin-trifosfát, inhibují Rac1 (=GTPáza, která hraje roli v inhibici apoptózy T-lymfocytů). 6-TGN se na Rac 1 naváže místo GTP, znemožní její aktivaci a tím indukuje apoptózu T-lymfocytů (84,85). Dalším faktorem přispívajícím k účinku AZA/6-MP jsou nejspíše i 6-MMP nukleotidy, které byly doposud spojovány zejména s hepatotoxickým účinkem (86). Pravděpodobně mají antiproliferativní efekt způsobený inhibicí purinové syntézy de novo. Molekuly thiopurinů navíc interferují s některými z endogenních molekul jako např. ATP, GTP, které mají nezastupitelnou roli v energetickém metabolismu a jako nitrobuněční messengři (87).

### ***Indikace k léčbě***

Indikací k zavedení terapie AZA/6-MP je vlekle aktivní UC či CN, kortikodependence, mimostřevní komplikace. Vedle toho lze užít tato léčiva jako součást kombinované terapie u perianálních píštělí CN a jako je profylaktická léčba po resekci střeva.

### ***Dávka AZA/6-MP a sledování pacienta***

Terapie azathioprinem se začíná dávkou 0,5-1,5 mg/kg/den a po měsíci léčby se zvyšuje na 2,0-2,5 mg/kg denně. Od počátku se týdně kontroluje KO, JT. V případě 6-MP se začíná dávkou 0,25-0,5mg/kg/den. Další monitorování KO by mělo být prováděno každých 4-6 týdnů po celou dobu podávané terapie. Významné snížení dávky léku nebo přerušení terapie je indikováno, jestliže počet leukocytů klesne pod  $3500 \times 10^9/l$  nebo počet destiček se sníží pod  $120 \times 10^9/l$ , zvyšující se hodnoty transamináz nebo cholestatických testů nad dvojnásobek normy tak, jak je o tom referováno dále v kapitole nežádoucích účinků. Monitorace jaterních testů by měla být při dlouhodobé terapii prováděna cca 4x ročně.

### ***Vedlejší účinky AZA/6-MP***

Celkově se nežádoucí účinky terapie vyskytují až u 20% pacientů (48). Můžeme je rozdělit na dva typy. Prvními jsou na dávce závislé toxické reakce, druhými na dávce nezávislé reakce na podkladě alergie a idiosynkrazie.

Nežádoucí účinky prvního typu (tzv. typ A) jsou způsobeny toxickým účinkem. Projevují se nejčastěji nesnášenlivostí (nauzea a zvracení až v 10% léčených pacientů), z hlediska bezpečnosti terapie je ale důležitější toxické působení metabolitů AZA/6-MP na kostní dřeň a játra. K projevům myelotoxicity dochází v naprosté většině v prvních třech měsících léčby, vzácně se však mohou objevit i s dlouhou latencí po mnohaměsíční nebo dokonce několikaleté léčbě. Údaje o častosti výskytu této komplikace se v literatuře různí v závislosti na hodnotě počtu leukocytů, která byla zvolena. Kolísají od 10% léčených pacientů až po 1% pacientů, vezmeme-li se v úvahu jako hranice signifikantní leukopenie až hodnota pod  $2000 \times 10^9/l$  (48,49,88). Myelotoxicita je obtížně předvídatelná, mortalita na septické komplikace je však u těchto pacientů naštěstí výjimečná. O hepatotoxickém poškození hovoříme v případě elevace jaterních testů nad normu. Tento vedlejší účinek léčby purinovými antimetabolity se vyskytuje u cca 1% pacientů (48). Častěji je asociován s mužským pohlavím. Klinicky se projevuje jako hepatocelulární či cholestatická léze. Léčbu vysazujeme při zvýšení JT více jak na dvojnásobek normy. Tato komplikace je spojována s kumulací 6-methylmerkaptopurinů.

Nežádoucí účinky druhé skupiny (tzv. typ B) se objevují krátce po nasazení terapie, většinou do 2-4 týdnů od začátku léčby. Jedná se o pankreatitidu (2%), která je považována za idiosynkrastickou reakci (48), a dále o horečku, rash a bolesti kloubů (89).

Podávání léků ze skupiny imunosupresiv může mít samozřejmě za následek riziko infekčních chorob. Pacient musí být v tomto smyslu dobře poučen a v případě výskytu infekce (týká se cca 7% pacientů) je nutné zahájit léčbu antibiotiky či antivirotiky včas. Pokud se objeví příznaky těžké infekce nebo infekce zároveň s leukopenií, pak současně s podáním antimikrobiálních látek azathioprin vysazujeme.

Některé nežádoucí účinky azathioprinu jsou způsobeny nitro-imidazolovým heterocyklem v jeho molekule. Jde hlavně o projevy intolerance ze strany trávicího ústrojí (nauzea, zvracení, bolesti břicha) a celkové projevy nesnášenlivosti - artralgie a kožní eflorescence (rash). V těchto případech je možné zkusit terapii azathioprinem převést na léčbu 6-merkaptopurinem, který neobsahuje nitro-imidazolový cyklus v molekule a může být u těchto pacientů velmi dobře tolerován.

### ***Příčiny selhání terapie AZA/6-MP***

Příčin je celá řada a vlastní resistance na terapii je spíše výjimečná. Nejčastější příčinou selhání terapie je poddávkování léku z obavy před závažnými vedlejšími účinky a dále nedostatečná compliance pacienta. Třetí příčinou je špatná indikace léčiva. Čtvrtou příčinou selhání terapie AZA/6-MP je koincidující infekce. Až na posledním místě jde o vlastní rezistenci střevního zánětu, při maximální terapii a dobré compliance ze strany pacienta. Takových nemocných je zhruba 20-30%.

Není žádný racionální důvod pro předčasné ukončení této léčby v graviditě. Ukončení terapie obecně je spojeno s vysokým rizikem relapsu idiopatického střevního zánětu. Horní hranice proto nebyla ještě určena a doporučuje se při dobré odpovědi pokračovat po 4 letech terapie (91).

### **2. 6-thioguanin**

Jak bylo uvedeno, 6-thioguanin je hlavní účinnou látkou, která zprostředkovává imunosupresivní a protizánětlivý efekt léčiva azathioprinu/6-merkaptopurinu. Proto se stala velmi lákavou představa podávat jako léčivo přímo 6-thioguanin, který byl do té doby používán v léčbě akutní lymfoblastické leukemie dětí (94,95).

#### ***Zkušenosti s podáváním 6-thioguaninu***

První klinické zkušenosti s 6-thioguaninem (Lanvis<sup>R</sup>, Glaxo Wellcome) v léčbě idiopatických střevních zánětů publikovala Dubinsky v roce 2001. Do pilotní studie bylo zařazeno celkem 10 nemocných s CN, kteří v minulosti neodpovídali na terapii azathioprinem/6-merkaptopurinem zejména z důvodů nedostatečné produkce 6-TG a nadprodukce 6-MMP. Dávka léku byla velmi rozdílná a pohybovala se od 20 mg do 100 mg denně. Léčba trvala 16 týdnů. Efektivita léčby byla hodnocena podle klinických kritérií, příznivý účinek se dostavil v průměru již po 4 týdnech léčby. U 7 z 10ti nemocných léčených 6-TG byla terapie účinná. Ačkoliv hodnoty 6-TG byly devítinásobně vyšší než u pacientů po podání azathioprinu/6-merkaptopurinu, žádný pacient neměl nežádoucí účinky. Hladiny 6-MMP byly nedekovatelné (96). Následovaly další studie. Největší soubor prezentovaný z evropských pracovišť uvedl Reinisch, který sledoval celkem 45 nemocných s chronicky aktivní formou Crohnovy nemoci. Délka podávání 6-TG byla 26 týdnů, v dávce 40 mg denně. Příznivý efekt byl zaznamenán u 28 z nich, tj. u 63% léčených. V průběhu této terapie došlo k významnému snížení hodnot CDAI z průměrné výchozí hodnoty 211 před zahájením léčby na 141 ve 14. týdnů, a konečně ve 26. týdnů terapie na hodnotu 114 (osobní sdělení). V Derijksově studii s 32 pacienty intolerujícími AZA/6-MP léčbu 6-TG tolerovalo 81% pacientů

(97). Obdobná data byla získána při sledování pacientů s alergickými reakcemi po podání AZA/6-MP (98,99). Herrlinger prezentoval studii, která v první části zkoumala navození remise onemocnění. 37 nemocných s chronicky aktivní formou Crohnovy nemoci, dávka léku 40 mg, doba léčby 24 týdnů, léčba měla dobrý efekt u 21 nemocných tj. u 57% (100). V druhé části udržovací terapie 6-thioguaninem v dávce 20-40 mg denně po dobu 26 týdnů byla u 88% léčených efektivní a udržela navozenou remisi (101).

### ***Nežádoucí účinky léčby 6-thioguaninem***

Na základě poznatků z posledních let se názory na bezpečnost terapie 6-thioguaninem od počátku tohoto století změnily, jak o tom bude ještě dále diskutováno. Příčinou je sledování vzniku nodulární regenerativní hyperplazie jater. Jde o vzácné jaterní onemocnění, které se objevuje v souvislosti s autoimunitními chorobami, hematologickými onemocněními a po transplantaci kostní dřeně. Histologicky je v pokročilých fázích přítomna nodulární formace buněk, která má za následek vaskulární abnormality až s možným vývojem portální hypertenze (102,103). O patogenezi a přirozeném průběhu tohoto onemocnění je známo málo. Hlavní vliv měla pozorování Poordada a Dubinske, kteří v souboru 125 nemocných léčených 6-TG u 30% zjistili elevaci hodnot jaterních testů, leukopenii nebo trombocytopenii. Celkem 20 nemocných se podrobilo necílené jaterní biopsii. Ve 14 případech (70% pacientů) byla histologicky potvrzena nodulární regenerativní hyperplazie (NRH), ve třech případech periportální nebo perivenulární fibróza a v šesti případech steatóza jater. Nebyla nalezena korelace mezi vznikem NRH a délkou terapie 6-TG, kumulativní dávkou léku ani koncentrací 6-TG v erytrocytech. Za nezávislé rizikové faktory pro vznik jaterního poškození při léčbě 6-TG jsou pokládány mužské pohlaví a zvýšená tvorba 6-MMP v předchozí terapii thioguaninovými deriváty (104).

### **Imunosupresivní terapie a souvislosti s KRK a lymfomem**

#### ***Rizikové faktory KRK a karcinogeneze***

Již v roce 1925 byl Crohmem a Rosenbergem popsán první případ vývoje kolorektálního karcinomu (KRK) u pacienta s ulcerózní kolitidou (121). O tři roky později Bergen z Mayo Clinic zjistil výskyt malignity tlustého střeva u 20 pacientů s ulcerózní kolitidou (122). Tyto publikace byly na počátku mnohých dalších pozorování souvislostí mezi idiopatickými střevními záněty a výskytem malignit. Zmíněná komplikace ISZ je jednou s nejzávažnějších a je příčinou úmrtí každého šestého pacienta (123).

Dnes jsou jako rizikové faktory všeobecně uznávány: a) extenzivní postižení tlustého střeva chronickým zánětem trvajícím b) více než 10 let, c) primární sklerozující cholangitida, d) KRK v rodině pacienta s ISZ(131).

I když v konečném důsledku je výskyt nádoru tlustého střeva „stejným“ onemocněním jako u pacientů, kteří nikdy střevním zánětem netrpěli, je možné zachytit několik rozdílů mezi karcinomem u pacientů s ISZ a sporadicky se vyskytujícím kolorektálním karcinomem do té doby zdravých pacientů. Pochopení souvislostí a rozdílů je nutným předpokladem prevence KRK u ISZ.

Z hlediska klinického průběhu je nejdůležitější fakt, že příznaky KRK se u pacientů s ISZ překrývají se symptomy zánětu, a proto mohou vést k pozdní diagnóze. Naopak výhodou pacientů s ISZ je pravidelná dispenzarizace u gastroenterologa včetně endoskopických kontrol, která zmenšuje riziko pozdního odhalení malignity. Další odlišností je nižší věk pacientů s karcinomem v terénu ISZ oproti sporadickému karcinomu. Rozdíly můžeme najít i v biologickém chování nádorů, které u pacientů s ISZ rostou rychleji, infiltrativně ve stěně střeva a mohou být multifokální. Častá je též absence typických adenomů. Rozdíly vyplývají z odlišné patogeneze a jsou příčinou diskutované problematiky dispenzárních programů s cílem časně diagnózy karcinomů u pacientů s ISZ (132).

Sporadický KRK vzniká následkem sekvence adenom-karcinom. Mutace APC je charakteristická pro časně fáze patogeneze a je prokazatelná v ložiscích drobných tubulárních adenomů, ztráta p53 je typická změna pozdní fáze, kdy dochází k přeměně pokročilého adenomu v karcinom. Stejně děje se uplatňují i v karcinogenezi KRK spojeného s idiopatickými střevními záněty. Ovšem v sekvenci zánět-dysplazie-karcinom, která je typická pro KRK sdružený s ISZ, se mutace a ztráta heterozygotnosti p53 objevují již zpočátku nádorové transformace. Naopak mutace APC buď chybí nebo k ní dochází až v závěru maligní transformace. Dále se má za to, že mutace *k-ras* je podmínkou polypoidního růstu ložiska. Přítomnost či nepřítomnost této mutace může být vysvětlením, proč některé dysplazie nabývají makroskopického vzhledu polypu (ALM), jiné jsou plošné (DALM) a některé jsou makroskopicky sotva prokazatelné (134, 135).

### ***Imunosupresivní léčba a chemoprevence***

V souvislosti s malignitami se o imunosupresivech hovoří spíše jako o rizikovém faktoru vývoje zejména lymfomu. V několika studiích, jejichž přehled podává tabulka, byl ale zkoumán i chemoprotektivní účinek.

Tab. Přehled provedených studií

Autor	Rok	Případy / kontroly	Relativní riziko	Chemoprevence
Connell et al	1994	23 / 243	1,11	Ne
Fraser et al	1997	36 / 1313	0,8	Ne
Lashner et al	1997	26 / 69	1,12	Ne
Matula et al	2005	54 / 261	1,06	Ne
Van Staa et al	2005	100 / 600	0,85	Ne
Rutter et al	2004	68 / 136	0,34	Ne
Velayos et al	2006	188 / 188	3,0	Ne

Nejvíce problematickým bodem studií je nedostatečná (několik dnů nebo měsíců trvající) či vůbec neuvedená doba trvání léčby azathioprinem/6-merkaptopurinem. Dalším zkreslujícím faktorem je nerovnoměrné zastoupení pacientů ve skupinách, mezi pacienty s imunosupresivní terapií je více těžkých případů průběhu ISZ. Ve studii Rutterově je patrná tendence změnšujícího se rizika vývoje KRK se zvyšující se délkou imunosupresivní terapie. Naopak ve studii Velayose imunosupresivní léčba delší než 1 rok představovala zvýšené riziko KRK. I přes uvedené kontroverzní otázky je zřejmé, že v tuto dobu nemáme žádné jasné důkazy o chemopreventivních účincích imunosupresiv (136-142).

#### ***Imunosupresivní léčba a výskyt lymfomů***

Rozsáhlý soubor pacientů (27 559 pacientů s CN, 20 120 pacientů s UC) je demonstrován na švédské populaci. Výsledkem sledování je stejný výskyt lymfomů u pacientů s ulcerózní kolitidou jako u zdravých jedinců, ale zvýšený výskyt u pacientů s Crohnovou nemocí (143). Další databázový soubor pochází z Velké Británie, kde bylo kontrolováno 6 605 CN pacientů a 10 931 UC pacientů (srovnáno s 60 506 zdravými kontrolami). Relativní riziko pro pacienty s CN bylo stanoveno na 1,39 (95% CI, 0.50-3.40) a pro pacienty s UC na 1,11 (95% CI, 0.51-2.19). Byl zaznamená pouze s Hodgkinským lymfomem a UC. Relativní riziko výskytu lymfomu u pacientů s ISZ léčených imunosupresivy bylo v této studii velmi nízké-1,27 (95% CI, 0.03-8.20) a benefit terapie převažuje riziko (144). Tvrzení podporují i sledování Connella a později Fräsera (145,137). Opačný výsledek přinesla meta-analýza Kandela z roku 2005, která podporuje tezi zvýšeného výskytu lymfomů u pacientů s Crohnovou chorobou léčených azathioprinem/6-merkaptopurinem s relativním rizikem 4,18 (95% CI, 2,07-7,51) podobně jako starší studie z roku 2000 Farella a spol., který prokázal mírné zvýšení incidence lymfomů (146).

## CÍLE

- A. Stanovení účinnosti imunosupresivní terapie azathioprinem/6-merkaptopurinem u pacientů s idiopatickými střevními záněty**
- B. Stanovení souvislosti aktivity enzymu thiopurin-metyltransferázy a účinnosti léčby azathioprinem/6-merkaptopurinem**
- C. Stanovení souvislosti aktivity enzymu thiopurin-metyltransferázy a predikce výskytu nežádoucích účinků léčby azathioprinu/6-merkaptopurinem**
- D. Stanovení souvislosti koncentrace metabolitů azathioprinu (6-thioguanin a 6-methylmerkaptopurin) s účinností terapie**
- E. Stanovení souvislosti koncentrace metabolitů azathioprinu (6-thioguanin a 6-methylmerkaptopurin) s výskytem a závažností nežádoucích účinků.**
- F. Posouzení účinnosti léčby 6-thioguaninem**
- G. Posouzení bezpečnosti léčby 6-thioguaninem**

## LABORATORNÍ METODIKA

**Isolace erytrocytů, Isolace leukocytů, Stanovení katalytické aktivity TPMT**

**Stanovení poměru produkce 6-methylmerkaptopurinu a 6-methylthioguaninu**

**Stanovení koncentrace 6-methylmerkaptopurinu a 6-methylthioguaninu pomocí HPLC**

**Výpočet katalytické aktivity thiopurin-methyltransferasy**

Katalytická aktivita TPMT se vypočte podle následujícího vzorce:

$$a = 2750 * \frac{c(6 - MMP)}{c(Hb) * t}$$

Koncentrace 6-methylmerkaptopurinu stanovená pomocí HPLC je dosazována v  $\mu\text{mol/l}$ , koncentrace hemoglobinu v hemolysátu je dosazována v  $\text{g/l}$ , doba inkubace je dosazována v hodinách, výsledná aktivita TPMT je pak vyjádřena v  $\text{nmol } 6\text{-MMP} \times \text{g}^{-1} \text{ Hb} \times \text{h}^{-1}$ .

**Výpočet poměru produkce 6-methylmerkaptopurinu a 6-methylthioguaninu**

Poměr produkce MMP k celkové produkci methylovaných derivátů thiopurinů (6-MP, 6-TG) se vypočte podle následujícího vzorce:

$$\%MMP = 100 * \frac{c(6 - MMP)}{c(6 - MMP) + c(6 - MTG)}$$
 z naměřených dal lze vypočítat i aktivitu TPMT:

$$a = 2750 * \frac{c(6 - MMP) + c(6 - MTG)}{c(Hb) * t}$$

**Stanovení hladiny metabolitů thiopurinů v erythrocytech**

**Stanovení koncentrace 6-thioguaninu a derivátu 6-methylmerkaptopurinu pomocí HPLC**

# SOUBOR PACIENTŮ, METODIKA, STATISTIKA

## *Terapie AZA/6-MP*

Indikace k zahájení léčby AZA/6-MP: trvalá aktivita choroby, kortikoresistence či kortikodependence, komplikace v podobě píštělí nebo mimostřevních projevů.

Pacienti před započatím sledování podepsali informovaný souhlas.

Zařazeno v r. 2000-04 celkem 91 pacientů, 83 dokončilo s možností hodnocení dle stanovených parametrů.

Crohnova choroba-69% pacientů, ulcerózní kolitidou-31%.

Průměrný věk 37,7 let, 41 mužů, 42 žen. Prům. doba trvání ISZ 7,5 roku.

Průměrná denní dávka AZA 2,1mg/kg/den, 6-MP 1,1mg/kg/den. Hodnocení léčby provedeno po 12 měsících.

Efekt terapie hodnocen na základě změny: a) klinické indexy aktivity nemoci (UC-Trulove-Wittsův index, CN-Crohn's disease aktivity index), b) laboratorních parametrů zánětu (leu, tromb, CRP)- kontrolováno KO týdně po dobu 1 měsíce, posléze 1x měsíčně, CRP cca 1x za 3 měsíce, c) vysazení či snížení průměrných denních dávek kortikosteroidů v mg metylprednisolonu/den.

S ohledem na možný výskyt nežádoucích účinků byli pacienti kontrolováni takto: krevní obraz viz výše, jaterní testy 1x za 3 měsíce, hodnoty pankreatické amylázy dle potřeby u pacientů s bolestmi břicha.

Leukopenie se vyskytla u 7 pacientů (8%). U 6 byly hodnoty leu mezi 3000-4000  $\times 10^9/l$ , léčba vysazena a po normalizaci KO nižší dávka. U 1 pacienta se objevila po cca 10 měsících léčby leukopenie pod 2000  $\times 10^9/l$ .

Hepatotoxicitu jsme pozorovali u 5 pacientů (6%), zvýšení JT 2x nad normu.

Aktivita TPMT byla zjištěna před začátkem léčby.

Hladina metabolitů 6-TG a 6-MMP byla zjišťována u všech pacientů po 12 měsících léčby.

U pacientů s leukopenií, hepatotoxicitou byly tyto hodnoty zjišťovány i v době výskytu nežádoucího účinku.

Aktivita TPMT byla korelována s účinností terapie a s výskytem nežádoucích účinků.

Hladiny metabolitů 6-TG a 6-MMP byly korelovány s účinností terapie a s výskytem nežádoucích účinků.

## **Terapie 6-thioguaninem**

Zahrnuto celkem 21 pacientů, 9 žen, Crohnova choroba-17 pacientů. Prům. věk pacientů 34,9 let.

Dávka 6-thioguaninu se pohybovala 40mg-60 mg denně. Prům. doba léčby 26 týdnů.

U pacientů jsme sledovali KO,FW, CRP, JT. Hladina 6-TG byla kontrolována po dobu léčby 26 týdnů minimálně 2x. U všech nemocných bylo provedeno UZ jater.

U 12 nemocných jsme provedli jaterní biopsii. Barveno hematoxylinem-eosinem, retikulín a trichrom.

Na základě takto získaných biopsických vzorků jsme se připojili k rakousko-česko-německé multicentrické studii zabývající se hepatotoxicitou 6-thioguaninu.

**Statistika:** Pro deskriptivní účely byly vypočteny standardní statistické ukazatele parametrů, a to průměr, SD, medián a minimum a maximum pro spojité ukazatele a podíl nastání jevů pro data binární a kategoriální. Při testování rozdílů mezi spojitými hodnotami byl použit párový Wilcoxon test (srovnání hodnot před léčbou a po léčbě) nebo nepárový Mann Whitney test pro srovnání hodnot mezi dvěma skupinami pacientů. Tyto neparametrické testy byly použity na základě testování normality rozložení hodnot Kolmogorov-Smirnov a Shapiro-Wilk's W testem.



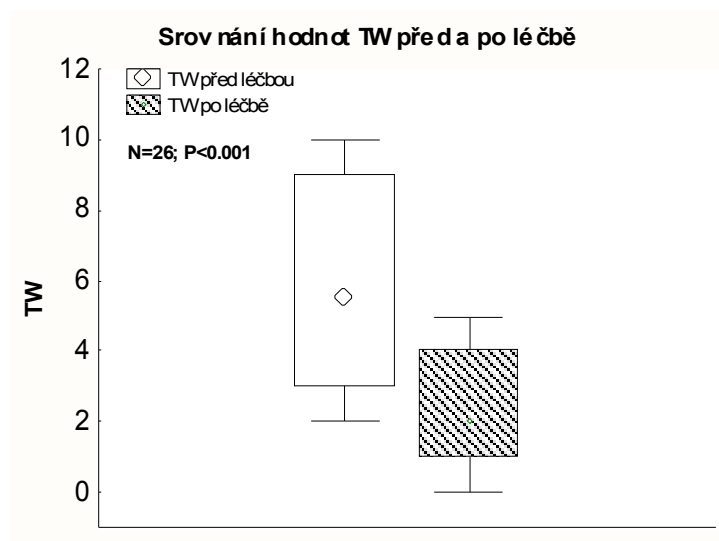
# VÝSLEDKY

## 1. Účinnost imunosupresivní terapie azathioprinem u CN a UC

### 1.1. Vliv imunosupresivní terapie na klinické indexy aktivity CN a UC

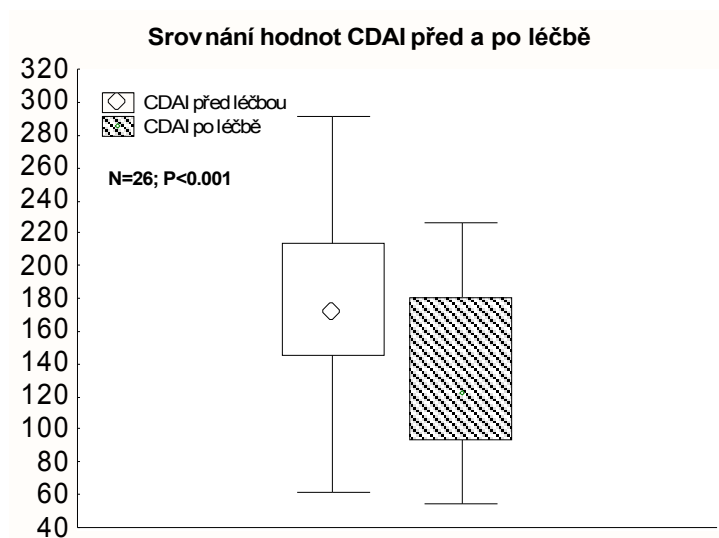
Bylo zjištěno, že Truelove-Wittsův index, kterým je hodnocena ulcerózní kolitida, poklesl statisticky významně z výchozí hodnoty 5,9 (SD±3,2) na 2,42 (SD±1,9) na konci sledování po 12 měsících ( $p<0,001$ ).

Graf 1



U nemocných s CN poklesl Crohn's disease aktivity index z původní průměrné hodnoty 175 (SD±66,4) na hodnotu 134 (SD±55,7) po 12 měsících sledování ( $p<0,001$ ).

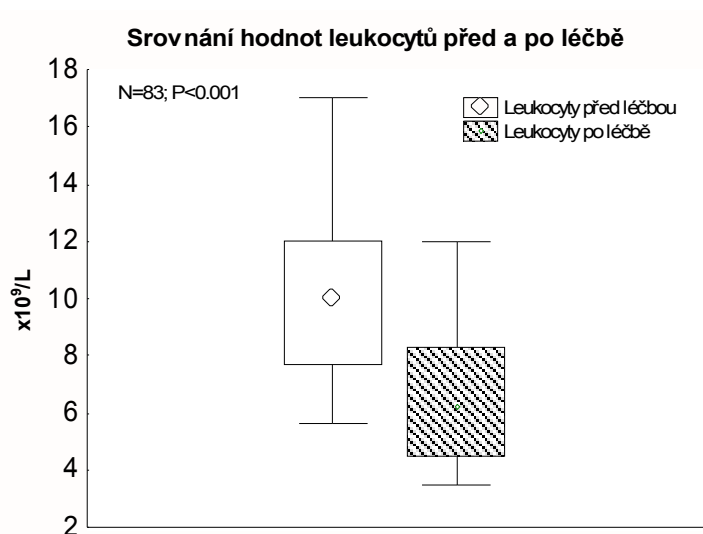
Graf 2



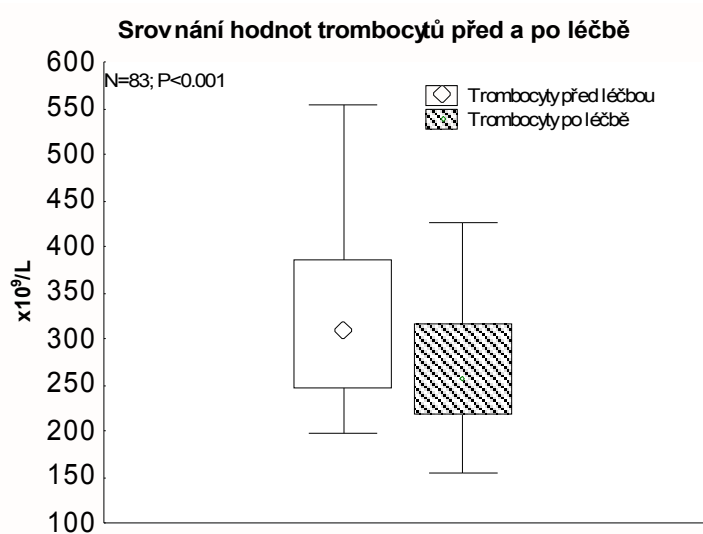
## 1.2. Vliv imunosupresivní terapie na laboratorní aktivitu CN a UC

Laboratorní markery se změnily takto: průměrný počet leukocytů poklesl z  $10,3 \times 10^9/l$  ( $SD \pm 3,46$ ) na  $6,7 \times 10^9/l$  ( $SD \pm 2,7$ ) ( $p < 0,001$ , graf 3), průměrný počet trombocytů z  $325 \times 10^9/l$  ( $SD \pm 110$ ) na  $273 \times 10^9/l$  ( $SD \pm 89$ ) ( $p < 0,001$ , graf 4) a hodnota CRP se snížila z  $25,3 \text{ mg/l}$  ( $SD \pm 38,9$ ) na  $11,3 \text{ mg/l}$  ( $SD \pm 17,5$ ) ( $p < 0,001$ , graf 5). Ve všech sledovaných parametrech došlo tedy k statisticky významnému snížení průměrných hodnot po 12 měsících sledování.

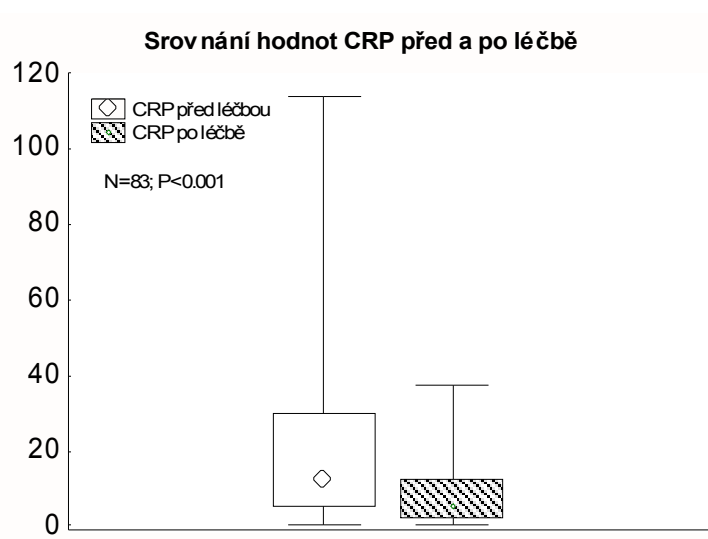
Graf 3



Graf 4



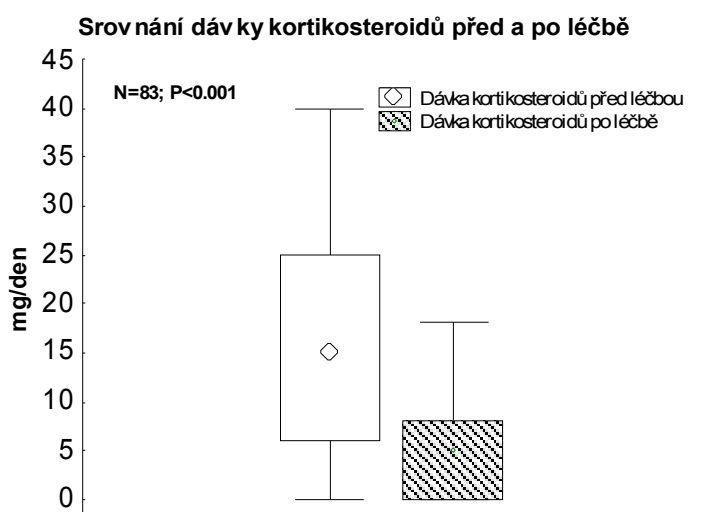
Graf 5



### 1.3. Vliv imunosupresivní terapie na snížení průměrné dávky kortikosteroidů

Průměrná denní dávka kortikosteroidů před léčbou byla 17,0 mg metylprednisolonu (SD±13,8), po léčbě klesla statisticky významně na 5,1 mg metylprednisolonu (SD±6,6) (p<0,001).

Graf 6



### 1.4. Vliv výchozí aktivity UC a CN na výsledek imunosupresivní terapie

Délka trvání choroby před zahájením terapie neovlivnila výsledek imunosupresivní léčby. Výchozí hodnoty sledovaných parametrů zánětlivé aktivity (klinické indexy aktivity,

hodnoty laboratorních parametrů a průměrná denní dávky kortikosteroidů) zjištěné před zahájením léčby neměly žádný vliv na výsledek terapie.

## **2. Vztah aktivity TPMT a účinnosti imunosupresivní terapie**

### **2.1. Průměrná aktivita TPMT**

Průměrná aktivita TPMT u sledovaných pacientů s idiopatickými střevními záněty byla  $35,0 \text{ nmol} \times \text{g Hb}^{-1} \times \text{hod}^{-1}$  ( $SD \pm 11,5$ ). Tato aktivita TPMT u pacientů s Crohnovou chorobou se nelišila od aktivity TPMT pacientů s ulcerózní kolitidou. Nebyl nalezen žádný vztah mezi aktivitou TPMT a pohlavím či věkem nemocných ( $p=0,678$ ,  $r=-0,046$ ).

V souboru 83 pacientů bylo nalezeno 8 pacientů (9,6%) se střední aktivitou TPMT, která odpovídá heterozygotní formě s jednou alelou pro nízkou aktivitu TPMT. Nenalezli jsme žádného homozygota s nízkou aktivitou TPMT.

### **2.2. Aktivita TPMT a klinické indexy aktivity CN a UC**

Snížení klinických známek aktivity obou nemocí bylo statisticky signifikantní. Pokles těchto indexů ovšem nebyl ovlivněn aktivitou TPMT před zahájením terapie (TW  $p=0,89$ , resp. CDAI  $p=0,978$ ).

### **2.3. Aktivita TPMT a změny laboratorních parametrů zánětu**

Změny těchto laboratorních parametrů v průběhu léčby byly signifikantní, ale nijak nesouvisely s aktivitou TPMT (leukocyty  $p=0,390$ , trombocyty  $p=0,974$ , CRP  $p=0,621$ ).

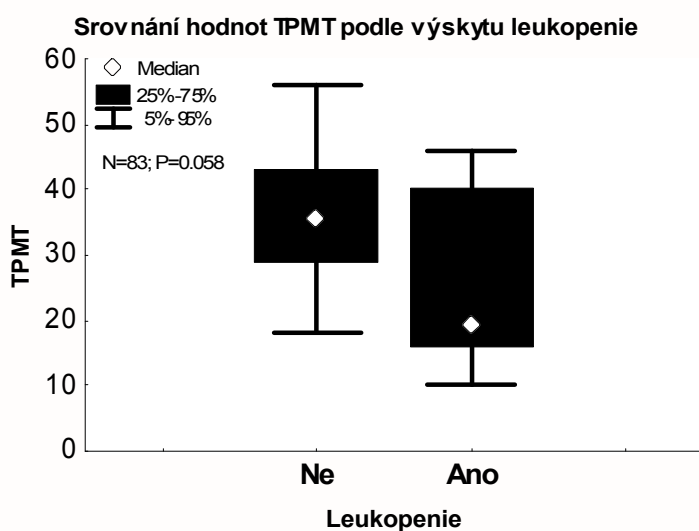
### **2.4. Aktivita TPMT a kortikoidy šetřící efekt**

Kortikoidy šetřící efekt imunosupresivní léčby nebyl ovlivněn výchozí aktivitou TPMT ( $p=0,276$ ).

## **3. Vztah aktivity TPMT a výskytu nežádoucích účinků**

U 7 pacientů se projevila leukopenie, nenalezli jsme jednoznačný signifikantní vztah mezi aktivitou TPMT a výskytem leukopenie, nicméně jistá tendence k vývoji leukopenie u pacientů s nižší aktivitou TPMT pozorována byla ( $25,9 \text{ nmol} \times \text{g Hb}^{-1} \times \text{hod}^{-1}$  vs.  $35,9 \text{ nmol} \times \text{g Hb}^{-1} \times \text{hod}^{-1}$ ,  $p=0,058$ ).

Graf 7



Nenalezli jsme vztah mezi aktivitou TPMT a vznikem hepatotoxicity ( $36,4 \text{ nmol} \times \text{g Hb}^{-1} \times \text{hod}^{-1}$  vs.  $\text{nmol} \times \text{g Hb}^{-1} \times \text{hod}^{-1}$ ,  $p=0,781$ ).

#### 4. Koncentrace metabolitů azathioprinu a účinnost terapie

##### 4.1. 6-thioguanin

Průměrná koncentrace 6-TG byla  $306,8 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ ery}$  ( $\text{SD} \pm 283,3$ ). Tato koncentrace neměla žádný vztah k pohlaví či věku pacienta ( $p=0,256$ ,  $r=-0,126$ ). Rovněž nebyla zjištěna významná korelace mezi 6-TG a aktivitou TPMT ( $p=0,133$ ), 6-TG a změnami klinických indexů aktivity (CDAI  $p=0,317$ ,  $r=-0,194$ , TW  $p=0,341$ ,  $r=-0,135$ ), 6-TG a poklesem dávky methylprednisolonu na den ( $p=0,490$ ,  $r=-0,083$ ). Co se týče hodnocení laboratorní aktivity nemoci, pak pokles hladiny CRP nebyl ovlivněn koncentrací 6-TG ( $p=0,386$ ,  $r=-0,009$ ). Ovšem změny laboratorní aktivity hodnocené pomocí krevního obrazu signifikantně negativně korelovaly s hodnotou 6-TG (leu  $p=0,018$ , tromb  $p=0,005$ ). Znamená to tedy, že se stoupající hladinou 6-thioguaninu v erytrocytech klesala hladina leukocytů a trombocytů.

##### 4.2. 6-methylmerkaptopurin

Průměrná koncentrace 6-MMP byla  $1559 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ ery}$  ( $\text{SD} \pm 2794$ ). Tato koncentrace byla významně ovlivněna extrémními hodnotami u některých pacientů, proto byl stanoven i medián, který odpovídal koncentraci  $528 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ ery}$ . Koncentrace 6-MMP neměla žádný vztah k pohlaví či věku pacienta ( $p=0,320$ ,  $r=-0,126$ ). Nebyla zjištěna žádná

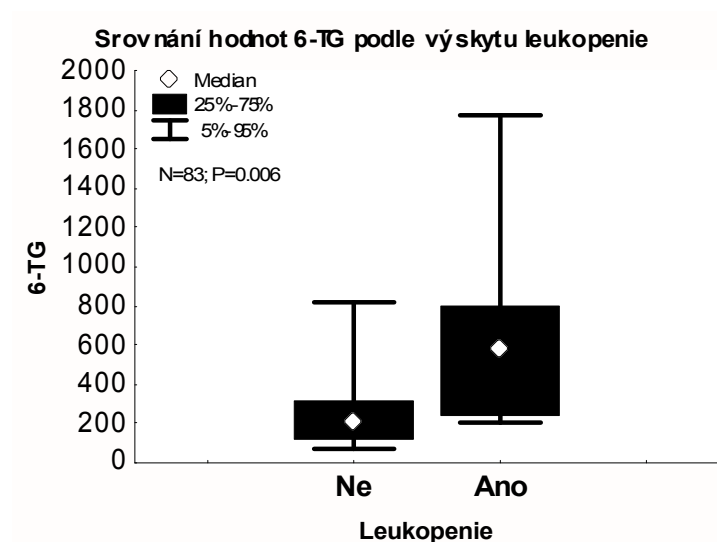
významná korelace mezi 6-MMP a ostatními veličinami hodnotícími aktivitu nemoci. Rovněž jsme nezaznamenali vztah mezi koncentrací 6-MMP a aktivitou TPMT.

## 5. Koncentrace metabolitů azathioprinu a výskyt nežádoucích účinků

### 5.1. 6-thioguanin

U sedmi pacientů se během léčby azathioprinem vyskytla leukopenie. Pokud jsme srovnali hladiny 6-thioguaninu u skupiny pacientů s leukopenií a skupiny pacientů bez leukopenie, pak jsme dospěli k závěru, že u pacientů s leukopenií byly zjištěny signifikantně vyšší hladiny 6-thioguaninu ( $656 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ ery}$   $SD \pm 539$  vs.  $275 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ ery}$   $SD \pm 229$ ,  $p=0,006$ ). Vztah mezi hladinou 6-thioguaninu a hepatotoxicitou nebyl zjištěn.

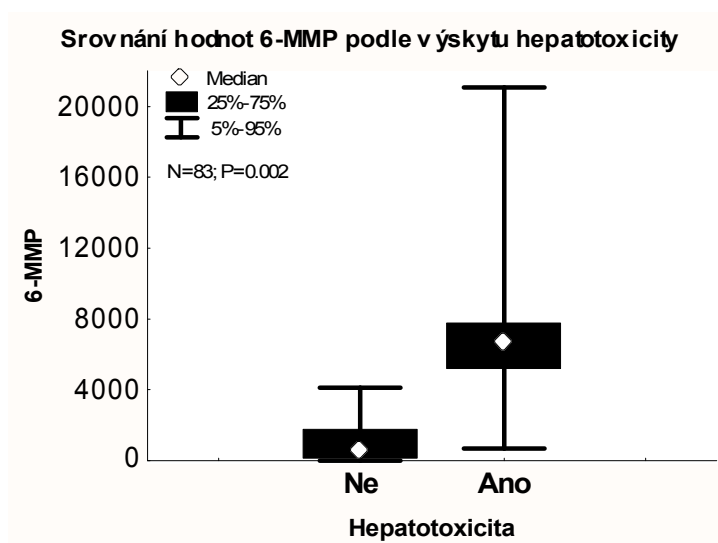
Graf 8



### 5.2. 6-methylmerkaptopurin

U pěti pacientů se během léčby vyvinuly známky hepatotoxicity. Srovnáním skupiny pacientů s hepatotoxicitou a pacientů beze změn jaterních testů jsme zjistili signifikantně vyšší hladinu 6-methylmerkaptopurinu u první skupiny pacientů ( $1171 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ ery}$   $SD \pm 1480$  vs.  $236 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ ery}$   $SD \pm 138$ ,  $p=0,002$ ). Vztah mezi hladinou 6-MMP a leukopenií nebyl zjištěn.

Graf 9



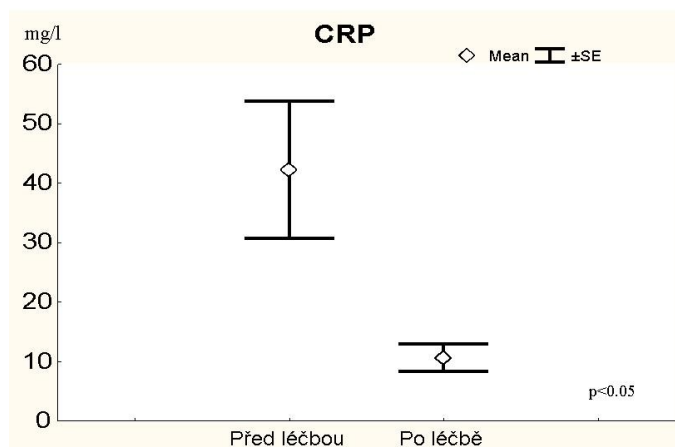
## 6. Imunosupresivní terapie 6-thioguaninem

### 6.1. Účinnost terapie

Z celkového počtu 21 pacientů, kterým byla léčba 6-thioguaninem nasazena, bylo možno hodnotit efekt terapie u 16 pacientů (13 CN, 3 UC; 8 žen, 8 mužů) průměrného věku 35,9 let. Třem pacientům musela být léčba vysazena ještě během prvního měsíce podávání pro nesnášenlivost, která se projevovala zejména nauzeou a bolestmi břicha. Jedna pacientka vyvinula leukopenii po 6 týdnech terapie, léčba jí byla rovněž vysazena dříve než bylo možno hodnotit efekt terapie. Jeden pacient byl vyřazen pro nedostatečnou compliance. U skupiny 16 pacientů byl zaznamenán na konci terapie pokles hladiny leukocytů z  $8,4 \times 10^9/l$  na  $6,8 \times 10^9/l$ , sedimentace z průměrné hodnoty 31,0 na 17,3 a C-reaktivní protein z 42,2 mg/l na 10,6 mg/l. Pokles všech těchto zánětlivých parametrů dosáhl statistické signifikance ( $p < 0,05$ )

Graf 10

### Pokles CRP během léčby



U dalšího sledovaného parametru hladiny trombocytů došlo rovněž ke snížení hodnot, a to z  $341,4 \times 10^9/l$  na  $308,6 \times 10^9/l$ , ale toto snížení nebylo statisticky signifikantní.

Klinické zlepšení udávalo devět pacientů z 13 (63%) s Crohnovou nemocí. U pacientů s ulcerózní kolitidou byla léčba úspěšná jen v jednom případě, ve zbývajících dvou případech museli pacienti podstoupit kolektomii.

U pěti pacientů ze sedmi (71%), kteří užívali systémové kortikosteroidy, mohla být dávka kortikoidů snížena či zcela vysazena.

### 6.2. Nežádoucí účinky

Jak již bylo zmíněno výše, dvěma pacientům (10%) byla léčba vysazena pro nesnášenlivost projevující se zejména horními dyspeptickými obtížemi. Dalším možným nežádoucím účinkem je toxický efekt na kostní dřeň. V našem souboru dvě pacientky (10%) vyvinuly změny v krevním obraze, v prvním případě to byla leukopenie  $1,5 \times 10^9/l$  po 6 týdnech terapie, v druhém případě se objevila závažná trombocytopenie pod  $20 \times 10^9/l$  po 14 měsících terapie, tato pacientka byla do hodnocení účinnosti zařazena.

Poslední, ale zdá se, že nejdůležitější skupinou nežádoucích účinků, mohou být hepatotoxické vlastnosti 6-thioguaninu. V souboru pacientů léčených 6-thioguaninem se objevily změny v jaterních testech celkem u 5 pacientů (31%). U jedné pacientky to byla vzrůstající hyperbilirubinemie (před počátkem terapie měla tato pacientka hodnoty bilirubinu v normě), další pacientka vyvinula změny ve všech jaterních enzimech, zbývajících tři pacienti měli různé kombinace patologických jaterních testů.



Na základě tohoto faktu jsme se rozhodli nabídnout pacientům provedení ultrasonografického vyšetření jater a případně jaterní biopsii, která by umožnila podrobnější zhodnocení poškození jaterní tkáně a zejména napomohla rozhodnout, zda je možno u jednotlivých pacientů, jež na léčbu 6-thioguaninem dobře zareagovali, bezpečně pokračovat.

### 6.3. Výsledky jaterních biopsií

Čtrnáct pacientů z celkových 16 pacientů, jež užívali 6-thioguanin dostatečně dlouhou dobu (minimálně 4 měsíce), se dostavilo na sonografické vyšetření břicha, dvanáct pacientů (75%) po podrobné informaci o průběhu jaterní biopsie souhlasilo s odběrem jaterní tkáně. Mezi těmito pacienty bylo všech pět pacientů s patologickými jaterními testy. Patologický nálezn ve smyslu zvýšené jaterní echogenity odpovídající steatóze byl popsán u 4 pacientů z pěti pacientů s elevací jaterních testů. Jednou byl nálezn steatózy popsán u pacienta s normálními jaterními testy. U pacientky, jež měla hyperbilirubinemii i elevaci všech hepatálních enzymů, sonografistka popsala i splenomegalii a hraničně širokou slezinnou žílu. Patolog popsal abnormality u pěti pacientů.

Tabulka 1

#### Výsledky JT, ultrazvuku a histologického zhodnocení vzorků jaterní tkáně 5 pacientů

	EJT	UZ	NRH	Steatoza (%)	perivenul.f.	portální f.
Ž, 56 let	+	-	-	10	+	+++
M, 34 let	+	+	-	75	++	-
Ž, 40 let	+	+	-	10	++	+
M, 46 let	+	+	-	50	++	+++
M, 41 let	-	+	-	10	+	+

Zkratky: Ž-žena, M-muž, EJT-elevace jaterních testů, UZ-ultrazvukový nálezn

NRH-nodulární regenerativní hyperplazie, f.-fibróza

Ve všech pěti sledovaných případech (31%) se jednalo o jaterní fibrózu. U tří pacientů lze fibrózu hodnotit jako lehkou, 1x jako středně těžkou a konečně 1x jako fibrózu těžkou až inkompletní cirhózu. U tohoto pacienta navíc byla přítomna velko- i malokapénková steatóza II. stupně, strádání železa II.stupně a lehká cholestáza. Jak patolog, tak ošetřující gastroenterolog u zmíněného pacienta připouštěl možný vliv abúzu alkoholu.

#### 6.4. Multicentrická rakousko-česko-německá studie

Na základě zmíněných výsledků jaterních biopsií a nových poznatků o riziku vývoje nodulární regenerativní hyperplazie (NRH) jsme se podíleli na multicentrické rakousko-česko-německé studii. Ta posuzovala toxicitu 6-thioguaninu na 45 pacientech, kterým byly odebrány biotické vzorky jater. Do této studie jsou zahrnuti kromě našich pacientů (n=11) i nemocní z univerzity ve Vídni (n=19) a v Mnichově (n=15). Většina pacientů (70%) trpěla Crohnovu chorobou, a to nejčastěji s postižením tenkého i tlustého střeva (69%). Průměrná doba léčby byla 70 týdnů (za minimum byla stanovena doba 8 týdnů). Medián kumulativní dávky 6-TG odpovídal 15,7 g, naprostá většina pacientů užívala 40 mg/den. Všichni pacienti byli před tím léčeni AZA/6-MP, průměrná doba trvání této léčby byla 11 měsíců.

Protože NRH je vzácné onemocnění, stanovení diagnózy je mnohdy obtížné. Je založené na histologickém zjištění lokální hyperplazie hepatocytů a zároveň přítomnosti atrofovaných buněk, dilataci sinusoidů, detekci retikulinových fibril. Výhodné je speciální barvení na retikulin. Histologické zhodnocení vzorků prováděli nezávisle na sobě dva zkušení patologové z Německa a z Vídně. Diagnóza NRH byla považována za jednoznačnou při shodě obou lékařů, což splňovalo 8 pacientů (17,8%) ze 45. U dalších 8 pacientů uvedl tuto diagnózu pouze jeden z patologů a u pacientů tedy nebylo možno vyloučit počínající onemocnění. Důležité je rovněž zjištění, že pacient s NRH může mít normální jaterní testy. Při porovnání skupiny pacientů bez známek NRH a skupiny NRH pacientů + suspektních NRH pacientů pouze ALT (p=0,007) a ALP (p=0,006) byly častěji zvýšeny v druhé skupině.

V souboru pacientů nebyla nalezena žádná souvislosti mezi délkou terapie (p=0,189) či kumulativní dávkou 6-thioguaninu (p=0,757) a vývojem NRH. Rovněž nebyla nalezena korelace mezi vznikem NRH a celkovou dobou trvání ISZ (p=1,0) či délkou předchozí AZA/6-MP léčby (p=0,182).

## DISKUSE

Idiopatické střevní záněty jsou v popředí zájmu gastroenterologie již mnoho let. Důvodů je několik. Jedná se o onemocnění se vzrůstající incidencí postihující zejména pacienty ve vyspělých zemích. Z hlediska věku je závažným faktem, že často onemocní lidé kolem 20. roku, což má neblahé následky na kvalitu života pacientů a jejich morbiditu. Tito pacienti jsou pak limitováni nejen denodenními symptomy chronického onemocnění, ale i nutností častých návštěv lékařů a nezřídka je nevyhnutelný chirurgický zákrok, po kterém následuje různě dlouhá rekonvalescence. Část pacientů končí jako invalidní důchodci, což má pak pro ně i finální důsledky. Proto je tedy Crohnově chorobě a ulcerózní kolitidě věnováno tolik pozornosti nejen ze strany lékařů, ale i ze strany pacientů (nové webové stránky, organizace sdružující tyto pacienty, patientské konference). Navzdory tomuto zájmu si ale idiopatické střevní záněty zachovávají mnohá tajemství. V různých obdobích byla v etiologii důležitost přikládána střídavě infekci, psychosomatické, autoimunitním procesům atd. (158). Stále nevíme, co je prvotním mechanismem spouštějícím tato onemocnění. V současné době etiopatogenezi hodnotíme jako komplexní složitý děj, na kterém se účastní genetické vlivy, imunitní systém střeva, bakteriální osídlení střeva a některé zevní faktory. Nikoliv nadarmo se říká, že jen věci, které známe dobře, dokážeme vysvětlit jednoduše.

Medikamentózní terapie Crohnovy nemoci a ulcerózní kolitidy je příčinou obav ze strany gastroenterologů a nespokojenosti či frustrace ze strany pacientů. Není proto velkým překvapením, že compliance a adherence k terapii je u těchto pacientů relativně nízká, jak již bylo popsáno v kapitole zabývající se teorií. Ve světle těchto výsledků se dostává do popředí vzájemný vztah lékař-pacient, který se zdá být pro léčbu určujícím. Je nutné znát postoj pacienta k jednotlivým léčebným postupům, získat si jeho důvěru a zároveň mu ponechat dostatečný prostor v rozhodování o způsobu terapie.

Koncem devadesátých let se zdálo, že problém velmi omezeně účinné medikamentózní terapie bude vyřešen zavedením tzv. biologické terapie. Jedná se o léky, jejichž molekuly jsou připravené genovým inženýrstvím a zasahují do prvních fází zánětlivé reakce. Předpokládalo se, že je jen otázkou času, kdy se najde nejvhodnější molekula, která nebude mít nevýhody infliximabu, prvního léku ze skupiny biologické terapie, který byl na sklonku minulého století v terapii Crohnovy nemoci použit. S postupující dobou a narůstajícími zkušenostmi s touto terapií a hlavně na základě provedených klinických studií s novými molekulami, se ukazuje, že výsledný efekt zavedení vysoce účinné a průběh nemoci modifikující terapie se spíše vzdaluje. I z tohoto důvodu je žádoucí věnovat se problematice

„starých“ léčiv ze skupiny imunosupresiv, z nichž dominující svým významem a rozsahem používání jsou purinové antimetabolity – azathioprin a 6-merkaptopurin.

### **Diskuse o azathioprinu/6-MP**

Molekula azathioprinu byla syntetizována krátce po skončení druhé světové války a v klinické medicíně se užívá od počátku padesátých let. Přestože v indikaci idiopatických střevních zánětů se ve světě užívá od 80. let a již před více než deseti lety se udávala potřeba zavedení imunosupresiv nejčastěji z důvodu trvalé aktivity choroby a kortikodependence až u poloviny pacientů s ISZ (160), přetrvávají z této terapie stále určité obavy. Důvody k rezervovanému přístupu zejména našich lékařů jsou nejspíše tři. První je obava z indukce závažných a potenciálně fatálních nežádoucích účinků. Druhý aspekt vedoucí k nedůvěře v imunosupresivní léčbu je pravděpodobně pomalý nástup příznivého účinku terapie. Třetí obava vyplývá z rizika nepříznivého působení látky na reprodukci. Všechny uvedené faktory pak vedou k tomu, že léčiva nejsou indikována u všech nemocných, u kterých by měla být. A navíc rozhodne-li se již lékař tyto látky podat, často je předepisuje z obav z nežádoucích účinků v nedostatečné dávce nebo je předčasně vysazuje.

Tyto praktické pohnutky nás vedly k systematickému sledování pacientů léčených azathioprinem nebo 6-merkaptopurinem s cílem monitorovat aktivitu klíčového enzymu thiopurin-methyltransferázy a hladinu metabolitů 6-metylmerkaptopurinu a 6-thioguaninu. Zajímalo nás, jaký je vztah mezi aktivitou enzymu a koncentrací metabolitů uvedených léčiv a výsledným klinickým efektem a vznikem nežádoucích účinků.

Relativně na velkém souboru 83 nemocných, z nichž většina byla tvořena nemocnými s komplikovaným průběhem Crohnovy nemoci, jsme se snažili v prospektivním sledování zhodnotit klinickou účinnost této terapie. Zjistili jsme, že azathioprin/6-merkaptopurin podávaný v dostatečné dávce je vysoce efektivní léčebnou modalitou. Ve shodě s klinickými indexy aktivity došlo k významnému snížení počtu leukocytů a trombocytů na konci sledování. U nemocných s vysokou aktivitou idiopatického střevního zánětu dochází pouze k hraničnímu zvýšení hodnot leukocytů. Naopak u pacientů s postižením tlustého střeva Crohnovou chorobou bývá významná elevace hodnot trombocytů spolehlivým markerem aktivity. C-reaktivní protein je nejspolehlivějším laboratorním znakem aktivity u Crohnovy nemoci. Podobně jako o leukocytů a trombocytů jsme zaznamenali výrazné a signifikantní snížení hodnot CRP při porovnání průměrných hodnot před a po jednorocní léčbě azathioprinem. Významné snížení hodnot CRP je spojeno nejen se symptomatickým zlepšením, ale je také známkou zhojení vředových lezí na sliznici trávicí trubice. Snížení

hodnot leukocytů je v klinické praxi možné využít jako příznivého znamení nastupujícího protizánětlivého účinku léčby. U pacientů, u kterých nenastane významné snížení hodnot leukocytů, nedochází obvykle ani ke klinické odpovědi na podávanou imunosupresivní terapii. Optimální je pokles leukocytů mezi  $4-5 \times 10^9/l$ , hodnoty by neměly poklesnout pod  $3,5 \times 10^9/l$  a absolutní počet lymfocytů na  $1,0 \times 10^9/l$ . Jestliže hladina leukocytů poklesne pod uvedené rozmezí, pak se mohou objevit infekční komplikace, především virové infekce. Nejzávažnější infekční komplikací je cytomegalovirová seps s multiorgánovým postižením a extrémně vysokou mortalitou, která se pohybuje přes 80%. Vedle snížení počtu leukocytů a lymfocytů je jako další prognostický faktor odpovědi na terapii azathioprinem zvýšený objem červených krvinek. Nedojde-li tedy k poklesu leukocytů ani ke vzniku makrocytózy erytrocytů, je příznivá klinická odpověď na terapii purinovými antimetabolity velmi málo pravděpodobná.

Dalším významným parametrem příznivé odpovědi na imunosupresivní terapii je snížení dávky metylprednisolonu ze 17,0 mg na 5,1 mg denně. Uvážíme-li že, závažnost nežádoucích účinků systémově účinkujících steroidů je vedle individuální citlivosti závislá především na celkové denní dávce, je prospěšnost terapie thiopuriny zcela evidentní. Dávka 17,0 mg metylprednisolonu je tak vysoká, že vede k systémovým projevům kortikoterapie s nepříznivými dopady na nejrůznější orgány. Naproti tomu dávka 5 mg denně je již pod kritickou hranicí nutnou ke vzniku závažných nežádoucích účinků.

TPMT je klíčový enzym metabolismu. Předpokládali jsme, že nemocní s nízkou aktivitou enzymu budou metabolizovat více účinné látky, což povede ke vzniku většího kvanta 6-thioguaninu s rizikem toxického efektu, ale vyšší účinností. Při korelaci aktivity TPMT a efektu imunosupresivní terapie na klinické indexy aktivity a laboratorní parametry jsme však nezjistili žádný významný vliv. Z hlediska predikce příznivé terapeutické odpovědi na podávání thiopurinů nemá tedy stanovení aktivity TPMT žádný význam.

Z hlediska predikce výskytu nežádoucích účinků při léčbě thiopuriny je zřetelný teoretický předpoklad, že monitorování aktivity TPMT by mělo odlišit skupiny pacientů s vysokým rizikem nežádoucích účinků. V našem souboru 83 nemocných jsme zaznamenali výskyt významné leukopenie u 8,5% z nich. V této skupině jsme neprokázali signifikantní vztah mezi aktivitou TPMT a výskytem leukopenie, nicméně dle předpokladu byla patrna tendence ke vzniku leukopenie u nemocných s nižší aktivitou enzymu. Stanovení genetického polymorfismu nebo aktivity TPMT před zahájením terapie je některými autory doporučováno jako nejvhodnější strategie, jak identifikovat skupiny nemocných s vyšším rizikem toxických

projevů azathioprine/6-merkaptopurinu. U nemocných s prokazatelnou heterozygotní mutací se vytváří enzym s cca 50% schopností metylace 6-MP, u nemocných s homozygotní mutací cca 10%. V těchto případech je riziko vzniku těžké leukopenie extrémně vysoké. U nemocných s časným vznikem leukopenie jde pravděpodobně mnohem častěji o geneticky podmíněnou mutaci TPMT. Naproti tomu u pacientů s pozdním vznikem leukopenie se uplatňuje spíše jiný a dosud neobjasněný mechanismus toxického účinku azathioprinu. Z výše uvedeného je zřejmé, že stanovení TPMT může snižovat, nikoliv však eliminovat riziko těžké leukopenie při terapii purinovými antimetabolity. Někteří autoři doporučují následující postup: Před zahájením terapie azathioprinem nebo 6-merkaptopurinem provést měření aktivity TPMT, a je-li hodnota v mezích normy, pak zahájit léčbu plnou dávkou. U nemocných se střední hodnotou TPMT je vhodné zahájit dávkou odpovídající 50% výchozí dávky a pak postupně dávku zvyšovat o 25 mg za 2-4 týdny do dosažení optimální dávky nebo výskytu leukopenie. U nemocných s nízkou aktivitou TPMT je lépe se terapii thiopuriny vyhnout.

Má praktický význam monitorovat aktivitu 6-thioguaninu v erytrocytech ?

Praktický přínos může mít monitorování koncentrace 6-TG v erytrocytech v následujících specifických klinických situacích. První možností využití monitorace 6-TG je stav, kdy i přes dostatečnou dávku imunosupresiv nedochází k očekávanému léčebnému efektu. Pokud zjistíme nulovou hladinu 6-TG, je to jasným důkazem, že pacient léčbu neužívá. Další možností je, že 6-TG v erytrocytech nedosahuje dostatečné koncentrace blízké se 230 pmol/8x10<sup>8</sup> ery. V tomto případě se můžeme pokusit dávku zvýšit i nad 3 mg/kg/den při monitorování hladiny 6-TG a 6-MMP v erytrocytech. Je totiž známo, že skutečná rezistence na léčbu azathioprinem je spíše vzácností a neodpovídavost na léčbu je mnohem častěji důsledkem poddávkování. Dalším potenciálním přínosem monitorování hodnot 6-thioguaninu jsou nemocní s agresivním průběhem Crohnovy nemoci po opakovaných resekcích s výsledným syndromem krátkého střeva. V této situaci je potřeba zhodnotit, dochází-li vůbec ke vstřebávání perorálně podávané látky. Třetím potenciálním využitím monitorace 6-thioguaninu v praxi je predikce výskytu závažné myelosuprese. Prokázali jsme, že u nemocných, u kterých došlo k signifikantní leukopenii, byla několikanásobně vyšší hodnota 6-TG v erytrocytech v porovnání s pacienty bez této komplikace.

Jaký je praktický význam stanovení 6-metylmerkaptopurinu ?

Vysoká koncentrace 6-MMP nám tedy signalizuje riziko vzniku toxické hepatopatie. V klinice toho využijeme např. tehdy, dojde-li k elevaci jaterních testů. Pak stanovením

hladiny 6-MMP odlišíme poškození jater z azathioprinu od jiných klinických situací, kterými mohou být hepatopatie při virové infekci, cholestáza či např. koincidující primární sklerozující cholangitida. Dále je výhodné monitorovat 6-MMP v situaci, kdy se rozhodneme zvyšovat dávku azathioprinu nad 3 mg/kg/den tak, abychom se vyhnuli jeho potenciální kumulaci a projevu hepatotoxicity.

Během doby, kdy vznikala tato práce, bylo publikováno velké množství studií zabývajících se farmakogenetikou imunosupresivně působících léků. Práce se týkaly různých polymorfních genů kódujících enzymy účastníce se metabolismu jednotlivých léků. Např. se jednalo o aktivitu metylenetetrahydrofolát-reduktázy v terapii metotrexátem, aktivitu inosin-trifosfát-pyrofosfatázy v terapii purinovými anitmetabity, polymorfismus apoptotických genů v terapii infliximabem (163). Přesto v současné době je používána v klinické praxi pouze genotypizace TPMT. Monitorování tohoto enzymu a koncentrací metabolitů thiopurinů má u nemocných s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou praktický význam. Nelze sice predikovat jednoznačnou klinickou odpověď na terapii, nicméně u nezanedbatelné podskupiny nemocných lze zabránit vzniku závažných nežádoucích účinků a sledovat adherenci pacienta k léčbě. Navíc v německé studii z roku 2004 se ukázalo, že výskyt dvou mutovaných alel pro TPMT u evropských pacientů je častější než udávaná frekvence 0,3% v opakovaně citované studii Weinshilboum a Sladka z roku 1980 (64), která byla provedena u americké populace. Zdá se, že výskyt u Evropanů je dvojnásobný, odpovídá 0,6%, tj. zhruba 1 pacient ze 160 (164).

Průběžně publikované a prezentované výsledky vedly k tomu, že v roce 2004 bylo stanovení aktivity TPMT a genotypizace TPMT Oddělením klinické biochemie VFN a I.LF UK v Praze zavedeno do rutinní klinické praxe.

### **Diskuse o terapii 6-thioguaninem**

Při hodnocení terapie 6-TG musíme vzít v potaz dvě důležitá hlediska -účinnost a bezpečnost terapie. Závěry naší studie hodnotící efekt z hlediska účinnosti terapie jsou velmi dobré. U 63% pacientů neodpovídajících na předchozí imunosupresivní terapii měla léčba efekt, který se projevil snížením klinické a laboratorní aktivity střevního zánětu. Uvážíme-li, že do souboru byli zařazeni výhradně nemocní refrakterní nebo netolerující předcházející imunosupresivní léčbu, nemocní s opakovanými chirurgickými zákroky, jsou dosažené výsledky pozoruhodné. Zdálo se, že jde o vhodnou volbu jako „ultimum refugium“ medikamentózní terapie u chronicky aktivní a agresivní formy Crohnovy nemoci, kdy pacient

je refrakterní či netoleruje terapii AZA/6-MP. Výhodou 6-thioguaninu byl i jeho rychlejší nástup klinického účinku, který v porovnání s nástupem účinku azathioprinu nebo 6-merkaptopurinu se zmenšil z 3-6 měsíců na 4 týdny. Je ovšem nutné zdůraznit, že žádná z provedených a v písemnictví publikovaných studií účinnosti 6-TG nebyla kontrolována placebem.

Výsledky našeho pozorování z hlediska bezpečnosti léčby ukazují, že u třetiny nemocných léčených 6-thioguaninem je v jaterním parenchymu prokazatelná fibróza, lokalizována v portálních prostorech i centroacinózně. Ve většině našich případů se jednalo o mírné zmnožení vaziva, u žádného našeho pacienta nebyla histologickým vyšetřením prokázána přítomnost nodulární regenerativní hyperplazie. Prokázané změny steatóza jater a centroacinózní a perivenulární fibróza jsou vyvolávány také zvýšenou konzumací alkoholu. Tento fenomén nebylo možné u dvou pacientů ze zmíněných pěti popsanych případů vyloučit. Dále si musíme uvědomit, že 20-40% nemocných s idiopatickými střevními záněty má v jaterním parenchymu podobné změny, které jsou vyvolány předcházející terapií: fibróza (metotrexát); steatóza (kortikosteroidy) nebo se mohou objevit změny v rámci mimostřevních projevů. Navíc situaci komplikuje fakt, že NRH byla vzácně referována i u pacientů užívajících AZA/6-MP (165,166), tuto léčbu měli v anamnéze všichni pacienti léčení 6-thioguaninem a před započatím léčby 6-thioguaninem nebyly jaterní biopsie prováděny. Otázkou rovněž zůstává další průběh NRH po vysazení léčby 6-thioguaninem.

Nicméně se domníváme, že naše výsledky jsou v souladu s novými údaji o hepatotoxicitě 6-thioguaninu, které se objevily během posledních let a byly již zmíněny v kapitole o teorii. Na základě poznatků o riziku vývoje NRH jsme se podíleli na multicentrické rakousko-česko-německé studii, která měla posoudit toxicitu 6-thioguaninu a zhodnotit histologické nálezy v játrech. Celkem bylo zhodnoceno 45 pacientů, u 8 pacientů (17,8%) byla diagnóza NRH jednoznačná, u dalších 8 velmi suspektní. Celkově tedy určité známky hepatotoxického poškození jater následkem léčby 6-thioguaninem byly prokázány u 36% pacientů (167). Tato studie byla počtem pacientů nejrozsáhlejší, potvrdila data z USA získaná od 20 pacientů v roce 2003 (104) a přispěla k tomu, že terapie 6-thioguaninem se nedostala mezi léčebné modalilty idiopatických střevních zánětů.



## ZÁVĚR

**A. Imunosupresivní terapie azathioprinem/6-merkaptopurinem u pacientů s idiopatickými střevními záněty hodnocená poklesem klinických indexů aktivity choroby, laboratorními parametry a kortikoidy šetřícím efektem se ukázala jako signifikantně účinná ve všech těchto sledovaných parametrech.**

**B. Aktivita TPMT nemá prediktivní význam pro posouzení účinnosti léčby azathioprinem/6-merkaptopurinem.**

**C. Aktivita TPMT nemá jednoznačný prediktivní význam pro výskyt nežádoucích účinků. U pacientů s hepatotoxicitou není žádný vztah k aktivitě TPMT. U pacientů s výskytem leukopenie byla zaznamenána tendence k vývoji leukopenie u nemocných s nižší aktivitou TPMT, tento vztah ale nedosáhl statistické signifikace.**

**D. Koncentrace 6-thioguaninu ve formovaných krevních elementech koreluje s účinností terapie vyjádřené poklesem leukocytů a trombocytů, nekoreluje s poklesem CRP, klinických indexů aktivity choroby a kortikoidy šetřícím efektem.**

**Koncentrace 6-methylmerkaptopurinu ve formovaných krevních elementech nekoreluje s účinností terapie v žádném ze sledovaných parametrů.**

**E. Koncentrace 6-thioguanin má prediktivní význam pro výskyt leukopenie, hladina 6-thioguaninu je u pacientů s leukopenií signifikantně vyšší.**

**Koncentrace 6-methylmerkaptopurinu má prediktivní význam pro výskyt hepatotoxicity, hladina 6-methylmerkaptopurinu je u pacientů s hepatotoxicitou signifikantně vyšší.**

**F. Imunosupresivní terapie 6-thioguaninem u pacientů s idiopatickými střevními záněty hodnocená poklesem klinických indexů aktivity choroby, laboratorními parametry a kortikoidy šetřícím efektem se ukázala jako signifikantně účinná ve všech těchto sledovaných parametrech.**

**E. Bezpečnost léčby 6-thioguaninem je kontroverzní a zejména s ohledem na možné poškození jater riziko nežádoucích účinků převažuje benefit této terapie.**

## SOUHRN

**Úvod:** Idiopatické střevní záněty (ISZ) jsou v popředí zájmu gastroenterologii již mnoho let. Jedná se o onemocnění s jen částečně poznanou etiopatogenezí. V léčbě jsou používána účinná imunosupresiva azathioprine (AZA) a 6-merkaptopurin (6-MP), přesto 20-35% pacientů nezaznamená efekt terapie. 10-15% pacientů má nežádoucí účinky. Metabolismus AZA/6-MP je ovlivněn enzymem thiopurin-methyltransferázou (TPMT). Protože existuje interindividuální variabilita TPMT, je snaha monitorovat aktivitu enzymu či stanovit genotyp, a tím minimalizovat výskyt nežádoucích účinků terapie. Dále je v metabolismu AZA/6-MP důležitým prvkem 6-thioguanin (6-TG). Mnoho studií analyzovalo vztah mezi hladinou 6-TG a efektivitou či toxicitou terapie. Hladina zajišťující až 90% účinnost terapie odpovídá 230-250 pmol/8x10<sup>8</sup>ery. Vysoká koncentrace je spojena s rizikem myleotoxicity. Další metabolit 6-metylmerkaptopurin (6-MMP) způsobuje hepatotoxické účinky.

Podávání přímo účinného metabolitu 6-thioguaninu bylo zkoušeno jako alternativa u pacientů s ISZ, kteří jsou rezistentní na terapii AZA/6-MP nebo ji netolerují. 6-TG je efektivní u zhruba 60% pacientů, ale je spojen s rizikem nodulární regenerativní hyperplazie.

**Cíle:** 1. Stanovení účinnosti imunosupresivní terapie AZA/6-MP u pacientů s ISZ

2. Stanovení vztahu aktivity TPMT a účinnosti léčby AZA/6-MP a aktivity TPMT a výskytu nežádoucích účinků

3. Stanovení vztahu koncentrace metabolitů AZA/6-MP (6-TG, 6-MMP) s účinností terapie a souvislosti koncentrace metabolitů a výskytu nežádoucích účinků.

4. Posouzení účinnosti a bezpečnosti léčby 6-thioguaninem

**Metody:** Do prospektivní studie jsme zařadili 91 pacientů, z nichž 86 bylo možno statisticky hodnotit (57 CN, 26 UC; prům. věk 37,7 let). Hodnocení účinnosti terapie bylo provedeno po 12 měsících, prům. denní dávka byla 2,1 mg/kg AZA, resp. 1,1 mg/kg 6-MMP. Efekt léčby byl stanoven na základě změny aktivity klinických indexů, laboratorních parametrů zánětu a dávky kortikosteroidů. Sledován byl výskyt nežádoucích účinků. Zjišťovali jsme aktivitu TPMT, hladinu 6-TG a 6-MMP.

Celkem 21 pacientů, kteří v minulosti netolerovali AZA/6-MP či měli projevy nežádoucích účinků, bylo v našem centru léčeno 6-thioguaninem. Většinou se jednalo o pacienty s Crohnovou nemocí, prům. věku 34,9 let. Prům. doba léčby 26 týdnů. S ohledem na nové poznatky o nodulární regenerativní hyperplazii (NRH) jsme provedli u 12 pacientů jaterní biopsie, které byly zahrnuty do multicentrické evropské studie zkoumající hepatotoxicitu 6-thioguaninu.

**Výsledky:** 1. Imunosupresivní terapie AZA/6-MP u pacientů s ISZ se ukázala jako signifikantně účinná ve všech sledovaných parametrech.

2. Aktivita TPMT nemá prediktivní význam pro posouzení účinnosti léčby AZA/6-MP ani pro výskyt nežádoucích účinků. U pacientů s výskytem leukopenie byla zaznamenána nižší aktivita TPMT, tento vztah ale nedosáhl statistické signifikace.

3. Koncentrace 6-TG v erythrocytech koreluje s účinností terapie vyjádřené poklesem leukocytů a trombocytů. Koncentrace 6-TG je signifikantně vyšší u pacientů s leukopenií. Koncentrace 6-MMP je signifikantně vyšší u pacientů s hepatotoxicitou.

4. Léčba 6-thioguaninem byla efektivní u 63%. U 4 pacientů došlo k elevaci JT během terapie, v histologii jsme našli u 5 pacientů jaterní fibrozu různého stupně. U žádného našeho pacienta nebyla objevena diagnóza NRH. V rámci multicentrické evropské studie, které jsme se zúčastnili, byla diagnóza NRH stanovena u 18% (8 z 45 pacientů), dalších 18% vykazovalo histologické nálezy nevylučující počínající NRH.

**Závěr:** Stanovení aktivity TPMT se stalo součástí rutinní klinické praxe. Měření hladiny metabolitů 6-TG a 6-MMP je možné využít ve speciálních případech léčby azathioprinem/6-merkaptopurinem. 6-thioguanin se pro hepatotoxické účinky nedočkal širšího využití v léčbě idiopatických střevních zánětů.

## SUMMARY

**Background:** Thioguanine derivatives, azathioprine (AZA) and 6-mercaptopurine (6-MP), have been used for many years in the treatment of inflammatory bowel disease (IBD). They represent major drugs in therapy of steroid-dependent and chronic active IBD. In 20-35% of the patients administration of AZA or 6-MP does not lead to improvement of the disease. Another limitation is the occurrence of adverse events of the therapy which can be observed in 10-15% of the patients. The metabolism of AZA/6-MP is influenced by thiopurine methyl transferase (TPMT). Since there is a significant variability in the activity of TPMP, there is an idea that monitoring the enzyme activity or the genotyping can significantly minimize the toxicity. Several studies have analysed correlation between the levels of AZA/6-MP and the efficacy or toxicity. The cut-off level corresponds to 230-250 pmol/8x10<sup>8</sup> RBC. High concentrations are linked with a risk of myelotoxicity. The occurrence of hepatotoxicity is dependent on the concentration of 6-methylmercaptopurine (6-MMP) in the erythrocytes. 6-thioguanine (6-TG) has been studied as an alternative therapy in patients with inflammatory bowel disease, who are resistant or intolerant to AZA/6-MP. The administration of 6-TG is effective in approximately 60% of patients. However, 6-TG related hepatotoxicity with high frequency of nodular regenerative hyperplasia (NRH) was described.

**Aims:** 1. To evaluate the result of azathioprine/6-mercaptopurine long-term therapy  
2. To assess the influence of TPMT activity on the results of azathioprine/ 6-mercaptopurine therapy and on adverse events  
3. To assess the influence of 6-thioguanine and 6-methylmercaptopurine metabolite levels on the result of therapy and on adverse events  
4. The efficacy and safety of 6-thioguanine therapy

**Methods:** The prospective trial comprised 91 patients with a chronically active course of the disease, 86 of them was used for evaluation (57 CD, 26 UC; mean age 37.7 years). The evaluation of the treatment was made after 12 month, the mean daily dose was 2.1 mg/kg for AZA and 1.1 mg/kg for 6-MP. Efficacy of therapy was assessed by means of clinical activity indexes, laboratory parameters of inflammation and the corticoid sparing effect. We observed frequency of adverse events. The TPMT activity, 6-TG and 6-MMP levels was measured. A total of 21 patients with Crohn's disease were treated by 6-thioguanine in our centre, mean age 34.9 years. The period of the treatment was 26 weeks. 12 of the patients underwent liver biopsy. We incorporated to European multicenter study to assess hepatotoxicity of 6-TG.

**Results:** 1. The therapy of AZA/6-MMP assessed is significant efficient.  
2. No correlation was found between the TPMT activity and long-term response AZA/6-MP treatment. Adverse events were not significantly affected by TPMT activity. However, it was observed the tendency to leucopenia by pts with low TPMT activity.  
3. The level of 6-TG corresponds with efficacy of AZA/6-MP therapy assessed by means of leukocyte and trombocyte decreased. The level of 6-TG is significant higher by the patients with leucopenia. The level of 6-MP is significant higher by the patients with hepatotoxicity.  
4. The treatment with 6-TG was efficient by 63% of treated patients. 4 patients developed abnormalities in their liver tests during the 6-TG therapy. Abnormal results of liver histology occurred in 5 cases. All were assessed as liver fibrosis of different degree. However, no case of nodular regenerative hyperplasia was found by our patients. During the multicenter European study NRH was diagnosed in 8 patients (8/45), NRH could not be excluded due to pathological findings in 8 additional patients.

**Conclusion:** Monitoring of TPMT activity is routinely used. Measurement of 6-TG and 6-MMP metabolite is possible to use in special clinic occasions. 6-thioguanin is not recommend for treatment of inflammatory bowel disease due to hepatotoxic potential.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. Lukáš M. Idiopatické střevní záněty. Nejistoty, současné znalosti a klinický přístup. Galen, 1998, 364
2. Andres PG, Friedman LS. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 1999;28:255-281
3. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12:S3-S9
4. Crohn's & Colitis Foundation of America. Live with Crohn's disease. Available at: <http://www.cdfa.org>. Accessed August 19, 2005
5. Kucharzik T, Maser Ch, Targan S. Recent understanding of IBD pathogenesis: implication for future therapies. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12:1068-1083
6. Farrell RJ, LaMont JT. Inflammatory bowel disease and environmental influences. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;1:21-39
7. Sonnenberg A. Occupational distribution of inflammatory bowel disease among German employees. *Gut*. 1990; 31:1037-40
8. Van Erpecum KJ, Smith SJ, van de Meerberg PC et al. Risk of primary sclerosing cholangitis is associated with nonsmoking behavior. *Gastroenterology*. 1996;110:1503-06
9. Satsangi J, Morecroft J, Shah NB, Nimmo E. Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. In: *Clinical Gastroenterology*, editor in Chief: GNJ Tytgat, 2003;1:3-18
10. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British population. *Lancet* 2001;357:1925-1928
11. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C et al. Mapping of susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*, 1996;379:821-823
12. Obuta Y, Bonen DK, Inohara N et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:603-606
13. Areu MT. The pathogenesis of inflammatory bowel disease: translational implications for clinicians. *Curr Gastroenterol* 2002;4:481-489
14. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucinerich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:599-603
15. Panwala C, Jones J, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for multiple drug resistance gene spontaneously develop colitis. *J Immunol*. 1998; 161:5733-5744
16. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, et al. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003;124:26-33
17. Peltekova V, Wintle R, Rubin L, et al. Functional variants of OCTN kation transporter genes are associated with Crohn's disease. *Nat Genet*. 2004; 36:471-475
18. Stoll M, Corneliusen B, Costello C, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004; 36:476-480
19. Fedorak RN. Epithelial cell signaling in response to enteric bacteria. In AGA Research Symposium-Probiotics and IBD. DDW 2002; May 19-22, San Francisco, California
20. Sartor RB. Microbial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis, and experimental intestinal inflammation. In: Kirshner JB, ed. *Inflammatory bowel disease*, 5th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1999:153-178
21. Rath HC, Schultz M, Freitag R, et al. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun*. 2001; 69:2277-2285
22. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, et al. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998;115:1405-1413
23. Prantera C, Zannoni F, Scribano M, et al. An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled clinical trial of metronidazole plus ciprofloxacin. *Am J gastroenterol* 1996;91:328-332
24. Rugeerts P, Hiele M, Geboes K, et al. Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology* 1995;108:1617-21
25. Harper P, Truelove S, Lee E, et al. Split ileostomy and ileocolostomy for Crohn's disease of the colon and ulcerative colitis: a 20 year survey. *Gut* 1983;24:106-113
26. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004;53:1617-1623
27. Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, et al. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2003;124:1202-1209
28. Marteau P, Seksik P, Shanahan F: Manipulation of the bacterial flora in inflammatory bowel disease. In: *Clinical Gastroenterology*, editor: J.F.Colombel: 2003;17:47-61
29. Greenstein RJ. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:207-514
30. Fuss IJ. Cytokine network in inflammatory bowel disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003;2:101-112
31. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:79-94
32. Sands BE. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2000;118:S68-S82.
33. Van Dieren JM, Kuipers EJ, Samson JN, et al. Revisiting the immunomodulators tacrolimus, metotrexate, and mycophenolate mofetil: their mechanism of action and role in the treatment of IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:311-327
34. Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, et al. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003;124:1774-1785
35. Van Assche G, van Ranst M, Scully R, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab treatment for Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2005;353:362-367
36. Van Deventer SJ, Volfova M, Flisiak R, et al. A phase 2 dose ranging, double-blind, placebo-controlled study of alicaforsen enema in subjects with acute exacerbation of mild to moderate left-side colitis. *Gastroenterology*. 2005;128:A74
37. Hommes D, van de Blik B, Plasse T, et al. Inhibition of stressactivated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002; 122:7-14
38. Schreiber S, Nikolajic S, Hampe J. Activation of NF- $\kappa$ B in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1998; 42:477-484
39. Rogler G, Brand K, Vogl D, et al. NF- $\kappa$ B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*. 1998;115:357-369
40. Neurath MF, Becker C, Barbutescu K. Role of NF- $\kappa$ B in immune and inflammatory response in the gut. *Gut*. 1998; 43:856-860
41. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I( $\kappa$ )B kinase- $\beta$ . *Nature*. 1998; 396:77-80
42. Neurath MF, Pettersson S, Mayer zum Buschenfelde KH, et al. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF- $\kappa$ B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med*. 1996; 2:998-1004

43. Lapidus A., Bernell O., Hellers G, et al.: Clinical course of colorectal Crohn's disease: 35-years follow-up of 507 patients. *Gastroenterology* 1998;114:1151-60
44. Eaden J. Review article: the data supporting a role for aminosalicylates in the chemoprevention of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18(suppl 2):15-21
45. Červený P, Lukáš M, Bortlík M, et al. Non-adherence k medikamentózní léčbě idiopatických střevních zánětů a její nejčastější formy. *Čes a Slov Gastroent a Hepatol* 2006; 60(5): 207-212
46. Adler DJ, Korelitz BI. The therapeutic efficacy of 6-mercaptopurine in refractory ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1990;85:717-22
47. Korelitz BI, Adler DJ, Mendelsohn RA, et al. Long-term experience with 6-mercaptopurine in the treatment of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1993;88:1198-205
48. Present DH, Meltzer SJ, Krumholz MP, et al. 6-Mercaptopurine in the management of inflammatory bowel disease: short- and long-term toxicity. *Ann Intern Med* 1989; 111:641-9
49. Pearson DC, May GR, Fick GH, et al. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn's disease. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1995; 123:132-42
50. Sanborn WJ, A review of immune modifier therapy for inflammatory bowel disease: azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporine, and methotrexate. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:423-33
51. Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 2002; 50:485-9
52. Ewe K, Press AG, Singe CC, et al. Azathioprine combined with prednisolone or monotherapy with prednisolone in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 1993;105:367-72
53. Pearson DC, May GR, Fick GH, et al: Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn's disease. A meta-analysis. *Ann Intern Med*, 1995; 123, 132-42
54. Candy S, Wright J, Gerber M, et al: A controlled double blind study of azathioprine in the management of Crohn's disease. *Gut*, 1995; 37, 674-678
55. Hanauer SB, Korelitz BI, Rutgeerts P, et al. Postoperative maintenance of Crohn's disease remission with 6-MP, mesalamine, or placebo: a 2-year trial. *Gastroenterology* 2004;127:723-9
56. Ardizzone S, Maconi G, Sampietro GM, et al. Azathioprine and mesalamine for prevention of relapse after conservative surgery for Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;127: 730-40
57. D'Haens G. Prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease. *Curr Gastroenterol Rep* 1999; 1:476-81
58. Travis S. Azathioprine for prevention of postoperative recurrence in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13:1277-9
59. Sandborn WJ, Feagan BG. The efficacy of azathioprine and 6-mercaptopurine for prevention of postoperative recurrence in patients with Crohn's disease remains uncertain. *Gastroenterology* 2004;127:990-3
60. Schwab M, Klotz U. Pharmacokinetic considerations in the treatment of inflammatory bowel disease. *Clin Pharmacokinet* 2001;40:723-51
61. Schaeffeler E, Lang T, Zanger UM, et al. High-throughput genotyping of thiopurine S-methyltransferase by denaturing HPLC. *Clin Chem* 2001;47:548-55
62. Tai HL, Krynetski EY, Scheutz EG, et al. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase encoded by mutant alleles in humans: mechanism for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:6444-9
63. Anderson J, Ansari A, Marinaki T, et al. Thiopurine methyltransferase: should it be measured before commencing thiopurine drug therapy? *Ann Clin Biochem* 2004; 41:294-302
64. Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980;32:651-62
65. Black AJ, McLeod HL, Capell HA. Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann Intern Med* 1998;129:716-8
66. Zelinkova Z, Derijks LJ, Stokkers PC, et al. Inosine triphosphate pyrophosphatase and thiopurine s-methyltransferase genotypes relationship to azathioprine induced myelosuppression. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:44-9
67. Regueiro M, Mardini H. Determination of TPMT genotype or phenotype optimizes initial dosing of azathioprine for the treatment of Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35:240-4
68. Sanborn WJ. Rational dosing of azathioprine and 6-mercaptopurine. *Gut* 2001;48:591-2
69. Kaskas BA, Louis E, Hindorf U, et al. Safe treatment of thiopurine S-methyltransferase deficient Crohn's disease patients with azathioprine. *Gut* 2003; 52:140-2
70. Lennard L. The clinical Pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 43:329-39
71. Dewit O, Vanheuverzwyn R, Desager JP, et al. Interaction between azathioprine and aminosalicylates: an in vivo study in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:79-85
72. Woodson LC, Ames MM, Selassie CD, et al. Thiopurine methyltransferase. Aromatic triol substrates and inhibition by benzoic acid derivatives. *Mol Pharmacol* 1983; 24:471-8
73. Lyssa RA, Giverhaug T, Wold HL, et al. Inhibition of human thiopurine methyltransferase by furosemid, bendroflumethiazide and trichlormethiazide. *Eur J Clin Pharmacol* 1996;49:393-6
74. Kennedy DT, Hayney MS, Lake KD. Azathioprine and allopurinol: the price of an avoidable drug interaction. *Ann Pharmacother* 1996;30:951-4
75. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, et al. Shortcoming in the diagnosis of TPMT deficiency in a patient with Crohn's disease using phenotyping only. *Gastroenterology* 2001; 121:498-9
76. Marinaki AM, Ansari A, Duley JA, et al. Averse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphate. *Pharmacogenetics*. 2004;14:181-7
77. Cuffari C, Hunt S, Bayless T. Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimise azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;48:642-6
78. Achkar JP, Stevens T, Easley K, et al. Indicators of clinical response to treatment with 6-MP or azathioprine in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10:339-45
79. Hindorf U, Lyrenas E, Nilsson A, et al. Monitoring of long-term thiopurine therapy among adults with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39:1105-12
80. Louis E, Belaiche J: Optimizing treatment with thioguanine derivatives in inflammatory bowel disease. *Clinical Gastroenterology*, edited by: J-F-Colombel, 2003;17:37-46
81. Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, et al. Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;49:665-70
82. Gupta P, Gokhale R, Kirschner BS. 6-mercaptopurine metabolite levels in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatrics Gastroenterol Nutr* 2001; 33:450-4

83. Goldenberg BA, Rawsthorne P, Bernstein CN. The utility of 6-thioguanine metabolite levels in managing patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:1744-8
84. Tiede I, Fritz G, Strand S, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* 2003;111:1133-45
85. Derijks LJJ, Gilissen LPL, Hommes DW. Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24:715-729
86. Dervieux T, Blanco JG, Krynetski EY, et al. Differing contribution of thiopurine methyltransferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells. *Cancer Res* 2001;61:5810-6
87. Lennard L. TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. *Gut* 2002; 51:143-6
88. Sandborn WJ, Tremaine WJ, Wolf DC, et al. 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; 117:527-35
89. Korelitz BI, Zlatnic J, Goel F, et al. Allergic reactions to 6-mercaptopurine during of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 1999;28:341-4
90. Francella A, Dyan A, Bodian C, et al. The safety of 6-mercaptopurine for childbearing patients with inflammatory bowel disease: a retrospective cohort study. *Gastroenterology* 2003;124:9-17
91. Egan JJ, Sandborn WJ: Clinical pharmacology in inflammatory bowel disease: optimizing current medical therapy. In: *Inflammatory bowel disease. From bench to bedside.* Edited by: Stephan R.Targan, Fergus Shanahan, Loren C.Karp, Kluwer Academic Publishers, 2003
92. Jani N, Regueiro MD: Medical therapy for ulcerative colitis. In: *Gastroenterology Clinics of North America*, 2002;31:147-166
93. Bouhnik Y, Lemann M, Mary JY, et al. Long-term follow-up of patients with Crohn's disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Lancet* 1996; 347:215-9
94. Lancaster DL, Patel N, Lennard L, et al. 6-thioguanine in children with acute lymphoblastic leukaemia: influence of food on parent drug pharmacokinetics and 6-thioguanine nucleotide concentration. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:531-9
95. Lennard L, Davies HA, Lilleyman JS. Is 6-thioguanine more appropriate than 6-mercaptopurine for children with acute lymphoblastic leukaemia? *Br J Cancer* 1993;68:186-90
96. Dubinsky MC, Hassard PV, Seidman EG, et al. An open-label pilot study using thioguanine as a therapeutic alternative in Crohn's disease patients resistant to mercaptopurine therapy. *Inflamm. Bowel Dis.* 2001; 7:181-9
97. Derijks LJ, De Jong DJ, Gilissen LP, et al. 6-thioguanine seems promising in azathioprine or 6-mercaptopurine intolerant inflammatory bowel disease patients: a short-term safety assessment. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:63-7
98. Dubinsky MC, Feldman EJ, Abreu MT, et al. Thioguanine: a potential alternate thiopurine for IBD patients allergic to 6-mercaptopurine or azathioprine. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1058-63
99. Bonaz B, Boitard J, Marteau P, et al. Thioguanine in patients with Crohn's disease intolerant or resistant to azathioprine/mercaptopurine. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:401-8
100. Herrlinger KR, Kriesel W, Schwab M, et al. 6-thioguanine-efficacy and safety in chronic active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:503-8
101. Herrlinger KR, Deibert P, Schwab M, et al. Remission maintenance by thioguanine in chronic active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1459-64
102. Naber AH, Van Haelst U, Yap SH. Nodular regenerative hyperplasia of the liver: an important cause of portal hypertension in non-cirrhotic patients. *J Hepatol* 1991; 12:94-9
103. Stromeyer FW, Ishak KG. Nodular transformation (nodular regenerative hyperplasia) of the liver. A clinicopathologic study of 30 cases. *Hum Patol* 1981;12:60-71
104. Dubinsky MC, Vasiliauskas EA, Singh H et al. 6-thioguanine can cause serious liver injury in inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology* 2003; 125:298-303
105. Genestier L, Pailot R, Qemeneur L, et al. Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology*.2000; 47:247-257
106. Johnston A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, et al. The antiinflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin Immunol.* 2005; 114:154-163
107. Egan,J.J., Sandborn,W.J.: Clinical pharmacology in inflammatory bowel disease: optimizing current medical therapy. In: *Inflammatory bowel disease. From bench to bedside.* Edited by: Stephan R.Targan, Fergus Shanahan, Loren C.Karp, Kluwer Academic Publishers, 2003.
108. Schroder O, Stein J. Low dose methotrexate in inflammatory bowel disease: current status and future directions. *Am J Gastroenterol.* 2003; 98:530-537
109. Kozarek RA, Patterson DJ, Gelfand MD, et al. Methotrexate induces clinical and histological remission in patients with refractory inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med.* 1989; 110:353-356
110. Feagan BG, Rochon J, Fedorak RN, et al. Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators. *N Engl J Med.* 1995;332:292-297
111. Arora S, Katkov W, Cooley J, et al. Methotrexate in Crohn's disease: results of randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *HepatoGastroenterology.* 1999;46:1724-1729
112. Oren R, Arber N, Odes S, et al. Methotrexate in chronic active ulcerative colitis: a double-blind, randomized, Israeli multicenter trial. *Gastroenterology.* 1996;110:1416-1421
113. D'Haens G, Lemmens L, Geboes K, et al.: Intravenous cyclosporine versus intravenous corticosteroids as single therapy for severe attacks of ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2001, 120, s.1323-1329
114. Actis GC, Bresso F, Astegiano M, et al. Safety and efficacy of azathioprine in the maintenance of ciclosporin-induced remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol. Ther* 2001; 15:1307-11
115. Domenech E, Garcia-Planella E, Bernal I, et al. Azathioprine without oral ciclosporin in the long-term maintenance of remission induced by intravenous ciclosporin in severe, steroid-refractory ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:2061-5
116. Stange EF, Modigliani R., Pena AS et al.: European trial of cyclosporine in chronic active Crohn's disease: a 12-month study. The European Study Group. *Gastroenterology*, 1995;109:774-782
117. Fellermann K, Tanko Z, Herrlinger KR, et al. Response of refractory colitis to intravenous or oral tacrolimus. *Inflamm Bowel Dis.* 2002;8:317-324
118. Sandborn WJ, Present DH, Isaacs KL, et al. Tacrolimus for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease: a randomized, placebo-controlled trial. *Gastroenterology.* 2003; 125 380-388
119. Neurath MF, Wanitschke R, Peters M, et al. Mycophenolate mofetil for treatment of active inflammatory bowel disease. Clinical and immunological studies. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 859:315-318
120. Colic M, Stojic-Vukanic Z, Pavlovic B, et al. Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2003;134:63-69
121. Crohn BB, Rosenberg H. The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis non-specific. *Am J Med Sci* 1925; 170:220-7
122. Bargen JA. Chronic ulcerative colitis associated with malignant disease. *Arch Surg* 1928;17:561-76

123. Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18 (Suppl. 2): 1-5
124. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a metaanalysis. *Gut* 2001;48:526-35
125. Palli D, Trallori G, Bagnoli S, et al. Hodgkin's disease risk is increased in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2000;119:647-53
126. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E et al. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 2001;91:854-62
127. Winter KV, Jess T, Langhaolz E, et al. Long-term risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study from Copenhagen Loutny. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:1088-95
128. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, et al. Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: results of a population-based study. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:205-11
129. Lotus EV jr. Epidemiology and risk factors for colorectal dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterol Clin N Am* 2006;35:517-531
130. Jayaram H, Satsangi J, Chapman R.W. Increased colorectal neoplasia in chronic ulcerative colitis complicated by primary sclerosing cholangitis: fact or fiction? *Gut* 2001; 48: 430-434
131. Askling J, Dickman PW, Karlen P, et al. Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2001; 120: 1356-1362
132. Bortlík M, Lukáš M. Idiomatické střevní záněty a kolorektálním karcinom-nové možnosti prevence a časné diagnostiky. *Endoskopie* 2005; 14: 53-57
133. Itzkowitz SH, Harpaz N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 1634-1648
134. Lukáš M. Idiomatické střevní záněty a kolorektální karcinom. Nové souvislosti a další perspektivy. *Čes a Slov Gastroent a Hepatol* 2006; 60(3): 113-118
135. Itzkowitz SH. Molecular biology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am* 2006; 35: 553-571
136. Connell WR, Kamm MA, Dickson M, et al. Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994;343(890B):1249-52
137. Fraser AG, Orchard TR, Robinson EM, et al. Long-term risk of malignancy after treatment of inflammatory bowel disease with azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(7):1225-32
138. Lashner BA, Provencher KS, Seidner DL et al. The effect of folic acid supplementation on the risk for cancer or dysplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997;112(1):29-32
139. Matula S, Crkot V, Itzkowitz S, et al. Chemoprevention of colorectal neoplasia in ulcerative colitis: the effect of 6-mercaptopurine. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3(10):1015-21
140. van Staa TP, Card T, Logan RF, et al. 5-aminosalicylate use and colorectal cancer risk in inflammatory bowel disease: a large epidemiological study. *Gut* 2005;54(11):1573-8
141. Rutter M, Saunders B, Wilkinson K et al. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2004;126(2):451-9
142. Velayos FS, Lotus EV jr., Jess T et al. Predictive and protective factors associate with colorectal cancer in ulcerative colitis: a case-control study. *Gastroenterology* 2006;130(7):1941-9
143. Askling J, Brandt L, Lapidus A, et al. Risk of haematopoietic cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2005;54(5):617-22
144. Lewis JD, Bilker WB, Brensinger C, et al. Inflammatory bowel disease is not associated with an increased risk of lymphoma. *Gastroenterology* 2001;121(5):1080-7
145. Connell WR, Kamm MA, Dickson M, et al. Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1994;343(890B):1249-52
146. Farell RJ, Ang Y, Kileen P, et al. Increased incidence of non-Hodgkin's lymphoma in inflammatory bowel disease patients on immunosuppressive therapy but overall risk is low. *Gut*, 2000; 47, 514-519
147. Jones M, Symmons D, Finn J, et al. Does exposure to immunosuppressive therapy increase the 10 year malignancy and mortality risks in rheumatoid arthritis? A matched cohort study. *Br J Rheumatol* 1996;35(8):738-45
148. Asten P, Barret J, Symmons D. Risk of developing certain malignancies is related to duration of immunosuppressive drug exposure in patients with rheumatic disease. *J Rheumatol* 1999;26(8):1705-14
149. Agraharkar ML, Cinclair RD, Kuo YF et al. Risk of malignancy with long-term immunosuppression in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2004;66(1):383-9
150. Weinshilboum RM, Raymond FA, Pazmino PA. Human erythrocyte thiopurine methyltransferase: radiochemical microassay and biochemical properties. *Clin Chim Acta* 1985, 323-333
151. Lennard L, Singleton HJ. High-performance liquid chromatography assay of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *J Chromatogr B* 1994; 661, 25-33
152. Kroplin T, Weyer N, Gutsche S, Iven H. Thiopurine S-methyltransferase activity in human erythrocytes: a new HPLC method using 6-thioguanine as substrate. *Eur J Clin Pharmacol* 1998; 54, 265-271
153. Micheli V, Jacomelli G, Fioravanti A, Morozzi G, Marcolongo R, Pompucci G. Thiopurine methyltransferase activity in the erythrocytes of adults and children: an HPLC-linked assay. *Clin Chim Acta* 1997; 259, 161-168
154. Anglicheau D, Sanquer S, Loriot MA, et al. Thiopurine methyltransferase activity: new conditions for reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay without extraction and genotypic-phenotypic correlation. *J Chromatogr B* 2002; 773, 119-127
155. Zander R, Werner L, Wolf UW. Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. I. Description of the method. *Clin Chim Acta* 1984; 136, 83-93
156. Wolf UW, Werner L, Zander R. Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. II. Standardisation of the method using pure chlorohaemin. *Clin Chim Acta* 1984; 136, 95-104
157. Lennard L, Singleton HJ. High-performance liquid chromatography assay of the methyl and nucleotide metabolites of 6-mercaptopurine: quantitation of red blood cell 6-thioguanine nucleotide, 6-thioinosinic acid and 6-methylmercaptopurine metabolites in a single sample. *J Chromatogr B* 1992; 583, 83-90
158. Lukáš M. Etiologie a patogeneze IBD. *Intenzivní kurz IBD, 7.-8.12.2006 Praha*
159. Zbořil V. a spol. *Kortikosteroidy v léčbě nespecifických střevních zánětů. Praha:Galén, 2001.*
160. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, et al. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut* 1994;35:360-2
161. Seddik M, Texier R, Ferrari N, et al. Thiopurine S-methyltransferase genotyping does not predict azathioprine-induced myelosuppression in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003, 124, A311
162. Liechtenstein G. Use of laboratory testing to guide 6-mercaptopurine/azathioprine therapy. *Gastroenterology* 2004; 127:1558-1564

163. Herrlinger KR, Jewell DP. Review article: interactions between genotype and response to therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24, 1403-1412
164. Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, et al. Comprehensive analysis of thiopurine-S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics* 2004;14:407-17
165. Arnott ID, Ghosh S. Portal hypertension in the presence of minimal liver damage in Crohn's disease on long-term azathioprine: possible endothelial cell injury. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:569-573
166. Daniel F, Cadranel JF, Seksik P, et al. Azathioprine-induced nodular regenerative hyperplasia (NRH) of the liver in IBD patients. *Gastroenterology* 2004; S1376 (DDW 2004)
167. Seiderer J, Zech CJ, Reinisch W, Lukas M et al. A multicenter assessment of liver toxicity by MRI and biopsy in IBD patients on 6-thioguanine. *J Hepatol* 2005;43:303-309