

# Farmakokinetika azatioprinu v prvních týdnech léčby Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy u dětí a adolescentů

Oldřich Pozler<sup>1</sup>, Miloš Hroch<sup>2</sup>, Jan Malý<sup>1</sup>, Martin Beránek<sup>3</sup>, Blanka Černá<sup>3</sup>, Petr Dědek<sup>1</sup>, Jaroslav Chládek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dětská klinika, LF UK a FN Hradec Králové

<sup>2</sup>Farmakologický ústav, LF UK Hradec Králové

<sup>3</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN Hradec Králové

## Souhrn

Cíl studie: Popsat kinetiku dosahování ustálených koncentrací 6-thioguaninnukleotidu (6-TGN) a 6-metylmertapurinnukleotidu (6-MMPN) v erytrocytech po zahájení terapie azatioprinem (AZA) u dětí s idiopatickým střevním zánětem (ISZ).

Metodika: Portská diagnostická kritéria byla nezbytná k diagnóze ISZ. Ke stanovení 6-TGN a 6-MMPN byla použita modifikace HPLC metody, koncentrace byly stanovovány v hemolyzátu a přepočteny na  $8 \times 10^8$  erytrocytů. Pro vyšetření genotypu TPMT byla použita DNA leukocytů izolovaných z periferní krve. Amplifikace a identifikace populačně nejčastějších byla provedena pomocí real-time PCR s následnou analýzou teploty tání. Aktivita TPMT byla sledována in vitro v erytrocytech izolovaných ze vzorku venózní krve odebrané před zahájením farmakoterapie. Venózní krev byla odebrána v čase 0 před prvním podáním AZA a dále v 1., 2., 5. a 8. týdnu léčby AZA.

## Summary

**Pharmacokinetics of azathioprine during the first weeks of treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis in children and adolescents**

Objectives: Description of pharmacokinetics and time until steady-state of 6-thioguanine nucleotides (6-TGN) and 6-methylmercaptopurine nucleotides (6-MMPN) following initiation of azathioprine (AZA) treatment in paediatric inflammatory bowel disease (IBD).

Methods: Inclusion criteria were: a) age 0-19 years b) initiation of azathioprine treatment c) IBD diagnostic work-up fulfilled the Porto criteria. Thiopurinemethyltransferase (TPMT) genotype and enzyme activity was analysed from the blood sample drawn in week 0. TPMT activity was determined according to direct measurements of enzymatic formation of 6-methylmercaptopurine

Genotyp a fenotyp TPMT byl vyšetřen ze vzorku krve získaného v čase 0, 6-TGN a 6-MMPN v čase 0 a dále v 1., 2., 5. a 8. týdnu. Pomocí kompartmentového farmakokinetického modelování byl u každého subjektu odhadnut čas potřebný k dosažení ustáleného stavu a ustálená koncentrace metabolitů 6-MP v erytrocytech.

Soubor a výsledky: Studie se zúčastnilo celkem 28 nemocných s ISZ. Průměrná aktivita TPMT v souboru 28 pacientů byla 32,1 (SD 14,4) nmol  $\times$  ml<sup>-1</sup>  $\times$  h<sup>-1</sup>. Genotyp TPMT byl vyšetřen u 23/28 nemocných. Průměrné hodnoty aktivity TPMT dosáhly heterozygotů 10,8 (6,4–18,2) nmol  $\times$  ml<sup>-1</sup>  $\times$  h<sup>-1</sup> a u homozygotů 32,4 (27,9–37,6) nmol  $\times$  ml<sup>-1</sup>  $\times$  h<sup>-1</sup> ( $p < 0,0001$ ). U 18 nemocných (15 dětí s Crohnovou nemocí a 3 děti s ulcerózní kolitidou, medián věku 15,5 let) bylo možné provést odhad času potřebného k dosažení ustáleného stavu koncentrace 6-TGN. Medián času do dosažení rovnováž-

over time. Genotyping of TPMT (\*1 wild-type, \*2, \*3A, \*3B and \*3C alleles) was performed on DNA samples extracted from peripheral blood cells by real-time PCR and melting analysis. Metabolites measurements were performed in week 0, 1, 2, 5, and 8 after initiation of treatment. High performance liquid chromatography was used for 6-MMPN and 6-TGN analysis.

Results: Inclusion criteria matched 28 patients with IBD. Mean TPMT activity was 32.1 (SD 14.4) nmol  $\times$  ml<sup>-1</sup>  $\times$  h<sup>-1</sup>. TPMT genotyping was implemented in 23 patients. Mean TPMT activity reached 10.8 (6.4–18.2) nmol  $\times$  ml<sup>-1</sup>  $\times$  h<sup>-1</sup> in heterozygotes and 32.4 (27.9–37.6) nmol  $\times$  ml<sup>-1</sup>  $\times$  h<sup>-1</sup> in homozygotes ( $p < 0.0001$ ). Time until steady-state of 6-TGN was analysed in 18 children (15 Crohn's disease, 3 ulcerative colitis) aged 15.5 years. Median time time until steady-

né koncentrace (time to steady-state) 6-TGN činil 55,3 dne, průměrná koncentrace 6-TGN v erytrocytech po dosažení rovnovážné koncentrace byla 326 (SD 154) pmol/ $8 \times 10^8$  ery. Byla pozorována netěsná korelace mezi ustálenou koncentrací 6-TGN v erytrocytech a dávkou AZA přepočtenou na 1 kg tělesné hmotnosti nebo na 1 m<sup>2</sup> povrchu těla. Farmakokinetiku 6-MMPN charakterizovalo vysoké intraindividuální kolísání hodnot koncentrací v erytrocytech. Závěr: Medián času do dosažení rovnovážné koncentrace 6-TGN byl přibližně o polovinu kratší, než je klinické pozorování nástupu účinku azatioprinu. Pravidelné vyšetřování hladin 6-TGN po zahájení terapie dovolí rozlišit nemocné s rychlou a pomalou ekvilibrační účinných koncentrací.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** IDIOPATICKÝ STŘEVNÍ ZÁNĚT, AZATIOPRIN, FARMAKOKINETIKA, DĚTI

state of 6-TGN was 55.3 days, mean 6-TGN concentration after steady-state equation was 326 (SD 154) pmol/ $8 \times 10^8$  erythrocytes. We observed inconclusive correlation between erythrocytes 6-TGN steady-state concentration and the azathioprine dose per kilogram of body weight or square metre of body surface. Considerable intraindividual fluctuations of 6-MMPN levels in erythrocytes were frequent.

Conclusions: Time to steady-state of 6-TGN is approximately half as short as the clinically described delay until the complete azathioprine effect is achieved. Routine metabolite measurement enables identification of patients with fast or slow 6-TGN accumulation after initiation of azathioprine treatment.

**KEY WORDS:** INFLAMMATORY BOWEL DISEASE, AZATHIOPRINE, PHARMACOKINETICS, CHILDREN

## ÚVOD

Crohnova nemoc (CN) a ulcerózní kolitida (UC) jsou chronická zánětlivá onemocnění trávicího traktu neznámého původu. Souhrnně se označují jako nespecifické (idiopatické) střevní záněty (ISZ). Asi u třetiny pacientů začíná onemocnění v dětském věku nebo v adolescenci. Současná terapie umožňuje dosažení remise u většiny pacientů. Protože ISZ neumíme vyléčit, nemocný musí dlouhodobě (často celoživotně) užívat léky, které tlumí aktivitu onemocnění. Základem léčby nejmírnějších forem ISZ jsou deriváty kyseliny 5-aminosalicylové. U pacientů s těžší formou onemocnění, které se u dětí vyskytují mnohem častěji než u dospělých, volíme od začátku farmakoterapie kombinace léčiv. V akutní fázi se obvykle nevyhneme systémovým glukokortikosteroidům, ale protože nežádoucí účinky dlouhodobé léčby systémovými glukokortikosteroidy jsou v pediatrii neakceptovatelné, staly se základem udržovací terapie remise ISZ u dětí azatioprin (AZA) nebo 6-merkaptopurin (6-MP).

AZA je neúčinné proléčivo, které je lépe vstřebáváno ve střevě než 6-MP. Neenzymovou hydrolýzou AZA vzniká 6-MP. V paralelních metabolických cestách, které navzájem soutěží o 6-MP, jsou na jedné straně tvořeny enzymem tiopurinmetyltransferázou (TPMT) neúčinné metabolity 6-metylmerkaptopurin (6-MMP) a xantinoxidázou kyselina tiomočová a na druhé straně účinný 6-tioguanin (6-TG). Inaktivace 6-MP geneticky polymorfním enzymem TPMT je kvantitativně rozhodující pro množství 6-TG a jeho nukleotidů, které se kumulují v buňkách po opakovaném podávání AZA. Za hlavní mechanismus účinku je považována inhibice proliferace lymfocytů po inkorporaci 6-tioguaninnukleotidu do buněčných nukleových kyselin. Ke klinickému účinku přispívá rovněž finální produkt anabolické cesty (6-tioguanin trifosfátové nukleo-

tidy) podílející se na indukci apoptózy lymfocytů [26].

Předkládaná studie si klade si za cíl:

1. popsat kinetiku dosahování ustálených koncentrací 6-tioguaninnukleotidu (6-TGN) a 6-metylmerkaptopurinnukleotidu (6-MMPN) v erytrocytech po zahájení terapie AZA;
2. analyzovat vztahy mezi genotypem/fenotypem TPMT a dávkou AZA na jedné straně a ustálenými koncentracemi 6-TGN a 6-MMPN na straně druhé.

## METODIKA

Studie byla organizována jako prospektivní otevřená studie. Protokol studie schválila Etická komise Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Účast ve studii byla dobrovolná a tato skutečnost byla stvrzena podpisem Informovaného souhlasu účastníkem studie nebo zákonným zástupcem u jedinců mladších 18 let. Vstupní kritéria:

1. věk 0–19 let;
2. diagnóza: chronický nespecifický střevní zánět (ISZ) splňující „Portská diagnostická kritéria“ [12];
3. zahájení terapie azatioprinem.

### Vyšetření genotypu tiopurinmetyltransferázy

Pro vyšetření genotypu TPMT byla použita DNA leukocytů izolovaných z periferní krve. Amplifikace a identifikace populačně nejčastějších alel \*1 (wild-type alela), \*2, \*3A, \*3B a \*3C byla provedena pomocí real-time PCR s následnou analýzou teploty tání (LightCycler, verze 1.5, Roche Diagnostics, SRN). Primery [25] a Simple Probe<sup>®</sup> sondy rs1800462 (pro analýzu alely \*2), rs 1800460 (pro analýzu alely \*3B) a rs 1142345 (pro analýzu alely \*3C) byly vyrobeny v TIB MOLBIOL, Berlin, SRN. Reakční směs obsahovala 2 µl LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes, 3 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 1 µl LightSNiP Reagent Mix a 50 ng genomové DNA. Celkový objem reakční směsi byl 20 µl. Při vy-

šetření alely \*2 byly pro amplifikaci použity tyto teplotní podmínky: úvodní denaturace 95 °C 10 min a 50 cyklů PCR (95 °C 10 s – 55 °C 10 s – 72 °C 15 s). Teplotní podmínky pro vyšetření alel \*3A, \*3B, \*3C se lišily teplotou annealingu, která byla 60 °C. Následná analýza teploty tání zahrnovala denaturaci 95 °C 30 s, annealing 40 °C 2 min a postupné zvyšování teploty do 75 °C rychlostí 0,2 °C/s.

### Vyšetření fenotypu tiopurinmetyltransferázy

Aktivita TPMT byla sledována in vitro v erytrocytech izolovaných ze vzorku venózní krve odebrané před zahájením farmakoterapie. Postup vyšetření vycházel z publikací autorů Jacqz-Aigrain E et al a Medard Y et al [13,21]. Inkubační směs obsahovala 20 µl 100 mM HCl, 140 µl 67 mM fosfátového pufru (pH 7,4), 20 µl 15 mM roztoku 6-merkaptopurinu, 20 µl 1,5 mM roztoku S-adenosyl-L-metioninu a 100 µl hemolyzátu erytrocytů. Inkubace probíhala 90 min při 37 °C. V časech 30, 60 a 90 min po jejím zahájení byly odpipetovány vzorky a deproteinovány 0,8 M kyselinou chloristou. Po kvantifikaci 6-MP metodou HPLC byla aktivita TPMT odhadnuta jako směrnice závislosti koncentrace na čase. Aktivita je vyjádřena v nmol × ml<sup>-1</sup> × h<sup>-1</sup>.

### Stanovení 6-tioguaninnukleotidu a 6-metylmerkaptopurinnukleotidu v erytrocytech

Erytrocyty byly odděleny od plazmy centrifugací (10 min, 1 500 G) a dvakrát promyty studeným fyziologickým roztokem. Koncentrace 6-TGN a 6-MMPN byly stanovovány v hemolyzátu a přepočteny na stejný počet erytrocytů (8 × 10<sup>8</sup>) na základě výsledku vyšetření hematokritu a počtu erytrocytů ve stejném krevním vzorku.

Ke stanovení byla použita modifikace HPLC metody, kterou publikovali Erb et al [8]. Separace probíhala na koloně Lichrocart Purospher STAR

RP-18e (250 × 4 mm, 5 µm) zahříváné na 35 °C. Mobilní fáze měla složku A (100 mM fosfátový pufr pH 2,7) a B (100 mM fosfátový pufr pH 3,5 a metanol, 1 : 1, v : v). Binární gradient byl následující: 0–4 min lineární nárůst z 0% na 40 % B, 4–9 min 40 % B, 9–12 min 100 % B a 12–15 min 0 % B. Detekce 6-MP a 6-TG probíhala při 340 nm a 6-MMP při 304 nm.

### Design studie

Venózní krev byla získána při odběrech pro účely laboratorních vyšetření v časových intervalech, které jsou doporučovány pro sledování nežádoucích účinků AZA. První odběr v čase 0 před prvním podáním AZA a dále v 1., 2., 5. a 8. týdnu léčby AZA. Genotyp a fenotyp TPMT byl vyšetřen ze vzorku krve získaného v čase 0, 6-TGN a 6-MMPN v čase 0, 1., 2., 5. a 8. týdnu.

### Farmakokinetická a statistická analýza

Pomocí kompartmentového farmakokinetického modelování v programu GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA) byl u každého subjektu odhadnut čas potřebný k dosažení ustáleného stavu a ustálená koncentrace metabolitů 6-MP v erythrocytech. Vzhledem k relativně nízkému počtu koncentrací byl použit jednodílný model a jiné modely nebyly testovány. Čas do dosažení rovnovážné koncentrace (time to steady-state) byl odhadnut podle vzorce  $t_{90\%} = \ln [0,1/(-K)]$ , kde K je rychlostní konstanta ekvibrace, která odpovídá rychlostní konstantě eliminace jednodílného modelu. Vzhledem k rozložení hodnot byly aktivity TPMT a koncentrace metabolitů 6-MP logaritmičtě transformovány před použitím parametrických testů. K porovnání aktivit TPMT ve skupinách s různým genotypem TPMT byl použit t-test. Vztahy mezi dávkou a ustálenou koncentrací 6-TGN a mezi aktivitou TPMT a ustálenou koncentrací 6-TGN byly hodno-

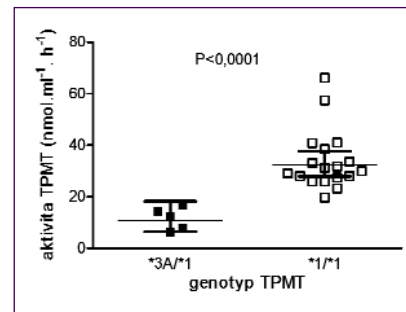
ceny Pearsonovým korelačním koeficientem.

### SOUBOR A VÝSLEDKY

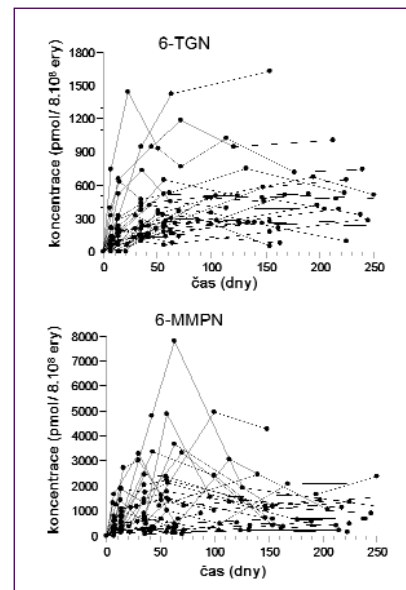
Studie se zúčastnilo celkem 28 nemocných s ISZ, u nichž byla zahajována farmakoterapie AZA. Průměrná aktivita TPMT v souboru 28 pacientů byla 32,1 (SD 14,4) nmol × ml<sup>-1</sup> × h<sup>-1</sup>. Genotyp TPMT byl vyšetřen u 23/28 nemocných. V této skupině bylo 18 homozygotů pro alelu \*1 (78,3 %) a 5 heterozygotů pro alely \*3A a \*1 (21,7 %). Frekvence zachycených alel byly následující: alela \*3A 10,9 % (5 ze 46) a alela \*1 89,1 % (41 ze 46). Průměrné hodnoty aktivity TPMT dosáhly u heterozygotů 10,8 (6,4–18,2) nmol × ml<sup>-1</sup> × h<sup>-1</sup> a u homozygotů 32,4 (27,9–37,6) nmol × ml<sup>-1</sup> × h<sup>-1</sup> (p < 0,0001) (graf 1). Individuální koncentrace 6-TGN a 6-MMPN v erythrocytech v časové ose u 28 pacientů znázorňuje graf 2.

S ohledem na aktivitu onemocnění a nežádoucí účinky AZA byla dávka léku (mg/kg tělesné hmotnosti) během prvních 2–3 týdnů obvykle postupně zvyšována. Změny průměrné dávky ukazuje graf 3. U 18 nemocných bylo možné provést odhad času potřebného k dosažení ustáleného stavu koncentrace 6-TGN, u 10 nemocných odhad znemožnily příliš časté změny dávky nebo výrazné fluktuace koncentrací.

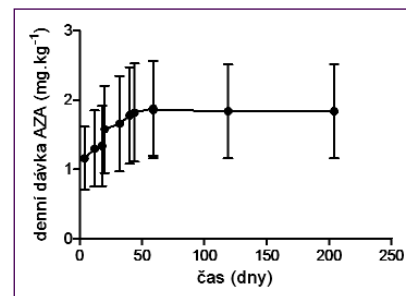
Soubor 18 dětí, u kterých byl proveden odhad času potřebného k dosažení ustáleného stavu koncentrace 6-TGN, byl dále analyzován. Charakteristika souboru je uvedena v tab. 1. U 15 dětí (7 dívek, 8 chlapců) byla stanovena diagnóza CN, u 3 (2 dívky, 1 chlapec) diagnóza UC. Lokalizace onemocnění a frekvence postižení jednotlivých částí trávicí trubice jsou uvedeny v tab. 2. Léky podávané současně s AZA jsou uvedeny v tab. 3. Medián (rozsah) doby sledování ve studii činil 154 dní (64–266 dní), iniciální dávka AZA byla 1,44 (SD 0,37) mg/kg tělesné hmotnosti.



Graf 1./Graph 1.  
Aktivita tiopurinmethyltransferázy (TPMT) u heterozygotů \*3A/\*1 a homozygotů \*1/\*1. Thiopurinmethyltransferase aktivity (TPMT) in heterozygotes \*3A/\*1 and homozygotes \*1/\*1.



Graf 2./Graph 2.  
Individuální koncentrace 6-TGN a 6-MMPN v erythrocytech v časové ose. Interindividual concentrations of 6-thioguanine nucleotides (6-TGN) and 6-methylmercaptopurine nucleotides (6-MMPN). X axis – time in days, Y axis – metabolites concentrations in pmol/8 × 10<sup>8</sup> erythrocytes.



Graf 3./Graph 3.  
Změny průměrné dávky AZA vyjádřené v mg/kg tělesné hmotnosti v časové ose. Mean dose azathioprine change. X axis – time in days, Y axis – daily dose in milligram per kilogram of body weight.

Genotyp byl určen u 15 pacientů, 12 bylo homozygotů pro alelu \*1 a 3 heterozygotů pro alely \*3A a \*1.

Tab. 4 uvádí individuální hodnoty a sumární statistické údaje pro rychlostní konstanty ustalování rovnovážné koncentrace, poločasy ustalování rovnovážné koncentrace, časy do dosažení rovnovážné koncentrace a rovnovážné koncentrace 6-TGN a 6-MMPN v erytrocytech. Medián času do dosažení rovnovážné koncentrace (time to steady-state) 6-TGN činil 55,3 dne, 25. percentil 36,7 a 75. percentil 96,5 dne. Průměrná koncentrace 6-TGN v erytrocytech po dosažení rovnovážné koncentrace byla 326 (SD 154) pmol/8 × 10<sup>8</sup> ery. Graf 4 ukazuje na příkladu dvou nemocných úspěšnost predikce naměřených koncentrací 6-TGN jednodokompartmentovým modelem.

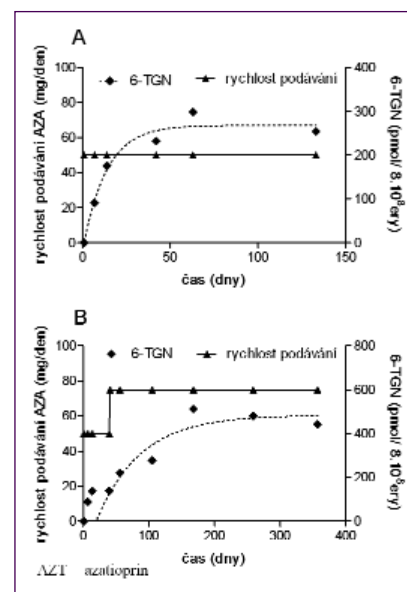
Byla pozorována netěsná korelace mezi ustálenou koncentrací 6-TGN v erytrocytech a dávkou AZA přepočtenou na 1 kg tělesné hmotnosti nebo

na 1 m<sup>2</sup> povrchu těla (graf 5). Vysoké aktivity TPMT odpovídala nízká ustálená koncentrace 6-TGN v erytrocytech a naopak. Tato negativní korelace byla statisticky významná (p < 0,01) pro koncentraci vztáženou na dávku na jeden m<sup>2</sup> tělesného povrchu (graf 6). Při přepočtu na jednotkovou dávku na jeden kg hmotnosti byl vztah na hranici významnosti (p = 0,054).

Farmakokinetiku 6-MMPN charakterizovalo vysoké intraindividuální kolísání hodnot koncentrací v erytrocytech. Kritérium shody mezi koncentracemi změřenými a predikovanými jednodokompartmentovým modelem bylo splněno u sedmi nemocných (tab. 4).

## DISKUZE

Azatioprin je používán v léčbě nespecifických střevních zánětů více než 30 let a je u dětí s ISZ povšechně považován za účinnou a bezpečnou léčbu [1,7,9]. Markowitz J et al v metodicky dobře provedené a dostatečně velké studii prokázali, že užití AZA vede k nižší expozici glukokortikosteroidů a nižší frekvenci kortikosteroid-dependence [19]. Byť jsou výsledky citované práce obecně známy, přístup k pacientům s ISZ není zdaleka tak jednoznačný. V nedávné době publikovaných retrospektivních multicentrických studiích byl AZA indikován v průběhu prvního měsíce jen u 2–5 % pacientů s nově diagnostikovanou CN



Graf 4./Graph 4.

Příklad úspěšnosti predikce naměřených koncentrací 6-tioguaninu (6-TGN) jednodokompartmentovým modelem u pacienta A s konstantní dávkou a pacienta B s měnící se dávkou azatioprinu. 6-thioguanine nucleotide concentration (6-TGN) levels single compartment model prediction in patient A with stable azathioprine (AZA) dose and in patient B with changing AZA dose. X axis – AZA dose in milligrams per day, X' axis – 6-TGN concentrations in pmol/8 × 10<sup>8</sup> erythrocytes, Y axis – time in days.

[14,24]. V USA získaly imunomodulační léky během poslední dekády velmi silnou pozici v léčbě ISZ, již pouhé stanovení diagnózy CN považuje 20 % amerických gastroenterologů za indikaci k zahájení imunomodulační léčby [20]. V západní Evropě, USA a Izraeli podávání AZA popřípadě 6-MP zvažuje při nutnosti steroidní terapie u aktivní nemoci 45 %, v případě relabující nemoci 93 % gastroenterologů [16]. U dětí s CN ve věkovém rozmezí 5–18 let léčených na Dětské klinice FN Hradec Králové v letech 1996–2006 byla při stanovení diagnózy terapie AZA zahájena u 58,3 %

Tab. 1. Vstupní charakteristika souboru. Table 1. Baseline characteristics.

Crohnova nemoc	n = 15
ulcerózní kolitida	n = 3
průměrný věk (medián věku)	14,8 (15,5) let
minimální věk	5 let
maximální věk	18 let
dívky	n = 9
chlapci	n = 9

Tab. 2. Lokalizace onemocnění při zahájení léčby./Table 2. IBD localization.

Lokalizace nemoci	n
<b>Crohnova nemoc</b>	15
izolované terminální ileum	2
izolované postižení kolon	2
ileokolická forma (terminální ileum + kolon)	8
TI a postižení GIT nad TI	1
TI a kolon a postižení GIT nad terminálním ileem	1
GIT nad TI a kolon	1
<b>Ulcerózní kolitida</b>	3
pankolitida	3

TI – terminální ileum; GIT – gastrointestinální trakt

Tab. 3. Současná medikace s AZA. Table 3. Concomitant medication.

	n
prednison, medrol	16
budesonid	1
5-ASA	15
chinolony/entizol	6

5-ASA – lék obsahující 5-aminosalicylovou kyselinu



Tab. 4. Sumární údaje o steady-state 6-TGN a 6-MMPN.

Table 4. Steady state of 6-TGN and 6-MMPN.

ID	K (den <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (dny)	t <sub>90%</sub> (dny)	C <sub>ss</sub> (pmol/8 × 10 <sup>8</sup> ery)
<b>6-TGN</b>				
1	0,06258	11,1	36,8	248
2	0,2077	3,34	11,1	581
3	0,06562	10,6	35,1	1036
4	0,01981	35,0	116	600
5	0,06282	11,0	36,7	505
6	0,04235	16,4	54,4	297
7	0,06732	10,3	34,2	270
8	0,03061	22,6	75,2	172
9	0,02544	27,2	90,5	270
10	0,05547	12,5	41,5	58,5
11	0,02313	30,0	99,5	470
12	0,0223	31,1	103	243
13	0,04893	14,2	47,1	536
14	0,02337	29,7	98,5	276
15	0,01023	67,8	225	551
16	0,1579	4,39	14,6	171
17	0,04091	16,9	56,3	339
18	0,0325	21,3	70,8	322
průměr	0,0420	16,5	54,8	326
SD	0,0219	8,6	28,6	154
medián	0,0416	16,7	55,3	310
25. percentil	0,0239	11,0	36,7	253
75. percentil	0,0628	29,1	96,5	528
<b>6-MMPN</b>				
4	0,0201	34,5	114,6	439
7	0,0722	9,6	31,9	683
8	0,139	5,0	16,6	335
11	0,132	5,3	17,4	91,5
12	0,14	5,0	16,4	2416
18	0,083	8,4	27,7	207
19	0,0325	21,3	70,8	841
průměr,	0,0720	9,6	32,0	452
SD	0,0385	5,1	17,1	294
medián	0,0830	8,4	27,7	439
25. percentil	0,0524	5,1	17,0	271
75. percentil	0,1355	15,5	51,4	762

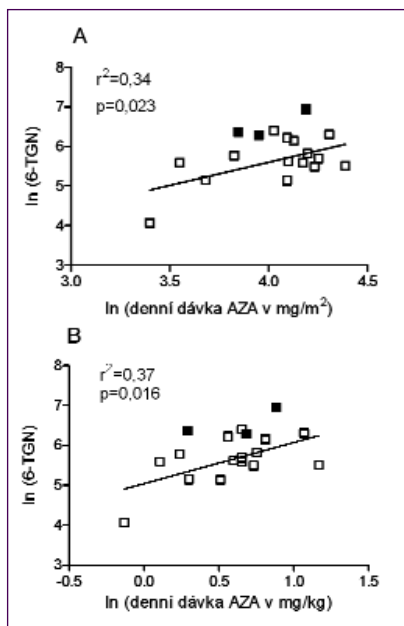
ID – identifikace pacienta; 6-TGN – 6-tioguanin; 6-MMPN – 6-metylmerkaptopurin; C<sub>ss</sub> – rovnovážné koncentrace; K – rychlostní konstanta ustalování rovnovážné koncentrace; t<sub>1/2</sub> – poločas ustalování rovnovážné koncentrace; t<sub>90%</sub> – čas do dosažení rovnovážné koncentrace, který se udává jako čas dosažení 90% rovnovážné koncentrace podle vzorce t<sub>90%</sub> = ln(0,1)/-K.

ID – patient identification; 6-TGN – 6-thioguanine nucleotides; 6-MMPN – 6-methylmerkaptopurine nucleotides; C<sub>ss</sub> – steady-state concentration; K – equilibration velocity constant; t<sub>1/2</sub> – half-time of steady-state equation (days); t<sub>90%</sub> – time to 90% steady-state equilibration (days) according to formula t<sub>90%</sub> = ln(0,1)/-K.

pacientů, do 12. týdne byla dále rozšířena na 64,6 % pacientů. Do 52. týdne byl AZA indikován u 68,8 % pacientů, o rok později (tj. 24 měsíců od stanovení diagnózy) procentuální zastoupení použití AZA dosáhlo 85,4 % [18].

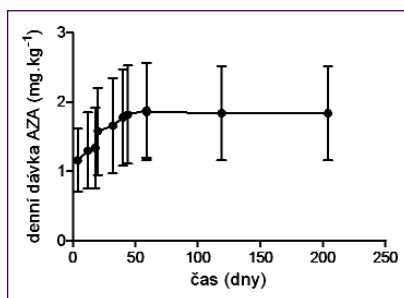
Nástup účinku azatioprinu je v klinickém pozorování oddálen od zahájení léčby. Předpokládá se, že tato prodleva odpovídá postupné kumulaci 6-TGN až do dosažení rovnovážných koncentrací, které by měly být v terapeutickém rozmezí (tj. v rozmezí účinných a netoxických koncentrací). Hlavním cílem prezentované práce bylo doložit toto klinické pozorování farmakokinetickou studií AZA. Průměrný čas potřebný k dosažení rovnovážné koncentrace (time to steady-state) 6-TGN činil 54,8 dne, 25. percentil 36,7 a 75. percentil 96,5 dne, což odpovídá 1,2–3,2 měsíce. Hyams JS et al uvádějí, že u dětí je nutné na terapeutický účinek AZA vyčkat 3–6 měsíců [11]. Námí zjištěný time to steady-state je přibližně o polovinu kratší. To by mohlo znamenat, že u některých pacientů nereagujících na terapii AZA bychom nemuseli vyčkávat se změnou léčby déle než tři měsíce. Pravidelné vyšetřování hladin 6-TGN po zahájení terapie dovolí rozlišit nemocné s rychlou a pomalou ekvilibrací účinných koncentrací. U první skupiny je možné zvyšovat dávky rychleji. Druhá skupina by hypoteticky mohla profitovat z přechodného zvýšení dávky AZA až do doby dosažení terapeutické koncentrace, po kterém by následovalo snížení dávkování, aby se koncentrace 6-TGN dále nezvyšovala. Takové postupy by musely být ověřeny v prospektivních studiích. Z dostupných literárních údajů nám není známo, že by jinými autory byla problematika farmakokinetiky AZA v souvislosti s rychlostí dosahování steady-state 6-TGN u dětí s ISZ detailně studována.

Monitorování kumulace hladin metabolitů AZA v erythrocytech může v časné fázi určit, který nemocný bude



Graf 5./Graph 5.

Korelace mezi ustálenou koncentrací 6-TGN v erythrocytech a dávkou AZA přepočtenou na 1 m<sup>2</sup> povrchu těla kg (A) a na 1 kg tělesné hmotnosti (B). Genotypy TPMT jsou odlišeny. Plné symboly představují heterozygoty pro alely \*3A a \*1 a prázdné symboly homozygoty pro \*1. Steady-state 6-thioguanine nucleotide (6-TGN) erythrocyte and azathioprine (AZA) dose correlation according to AZA dose per square meter of body surface (A) or AZA dose per kilogram of body weight (B). Thiopurinemethyltransferase genotypes are distinguished. Full markings are used for heterozygotes in alleles \*3A and \*1; empty markings are used for homozygotes \*1. X axis – AZA daily dose in mg/m<sup>2</sup> or mg/kg respectively. Y axis – 6-TGN concentration.



Graf 6./Graph 6.

Vztah mezi aktivitou TPMT v erythrocytech před zahájením podávání AZA a ustálenou koncentrací 6-TGN v erythrocytech vztahenou pro koncentraci vztahenou na dávku na jeden m<sup>2</sup> tělesného povrchu. Genotypy TPMT jsou odlišeny. Plné symboly představují heterozygoty pro alely \*3A a \*1 a prázdné symboly homozygoty pro \*1. Association between erythrocyte thiopurinemethyltransferase (TPMT) activity before azathioprine treatment initiation and 6-thioguanine nucleotides (6-TGN) steady-state in erythrocytes related to concentration per dose and square metre of body surface area. Thiopurinemethyltransferase genotypes are distinguished. Full markings are used for heterozygotes in alleles \*3A and \*1; empty markings are used for homozygotes \*1. X axis – TPMT aktivity, Y axis – 6-TGN concentration/daily azathioprine dose.

pravděpodobně rezistentní na léčbu AZA ve standardních terapeutických dávkách a u kterého můžeme očekávat příznivý efekt [6]. Zjistili jsme, že průměrná koncentrace 6-TGN v erythrocytech po dosažení rovnovážné koncentrace byla 326 (SD 154) pmol/8 × 10<sup>8</sup> erythrocytů. Hladina 6-TGN v erythrocytech > 230 pmol/8 × 10<sup>8</sup> RBC a poměr koncentrací 6-MMPN/6-TGN < 11 jsou dle některých klinických studií spojeny s vyšší pravděpodobností remise CN [2–5,15,22,23]. Zaměřili jsme se na farmakokinetiku AZA a klinickou odpověď pacientů ve vztahu k ustáleným koncentracím jsme nehodnotili. Taková studie by musela zahrnout podstatně větší počet nemocných. Koncentrace 6-MMPN vykazovaly velkou inter- i intraindividuální variabilitu, a proto jsme poměr koncentrací 6-TGN/6-MMPN ve steady-state nepočítali.

V populaci je možné nalézt tři fenotypy TPMT: jedince s vysokou aktivitou enzymu, kteří jsou nejčastější (rychlí metabolizátoři, 88 %), se střední aktivitou (intermediární metabolizátoři, 11 %) a konečně s velmi nízkou aktivitou enzymu (pomalí metabolizátoři, 0,3 %). Tyto nemocné je možné identifikovat před zahájením léčby AZA vyšetřením genotypu TPMT nebo aktivity TPMT v erythrocytech. V souboru 28 pacientů jsme našli 5 heterozygotů pro alely \*3A a \*1. Jak lze předpokládat, byly průměrné hodnoty aktivity TPMT statisticky významně nižší u heterozygotů než u homozygotů pro pro alelu \*1. U těchto pacientů byla redukována dávka AZA. U pomalých metabolizátorů (homozygoti pro alelu \*3A) se při běžných dávkách léku rychle kumulují cytotoxické 6-TGN a důsledkem je těžký útlum kostní dřeně. Homozygot pro alelu \*3A se v našem souboru nevyskytl.

Podle literárních pramenů je korelace mezi dávkou AZA a hladinou jeho metabolitů v erythrocytech netěsná [10,17,27]. To je způsobeno řadou faktorů zvyšujících farmakokinetickou

variabilitu 6-TGN a 6-MMPN, jako jsou funkční stav střeva, absorpce AZA, neenzymová biodegradace AZA, lékové interakce – např. diuretika a kyselina 5-aminosalicylová apod. I v naší studii jsme našli netěsnou korelaci mezi ustálenou koncentrací 6-TGN a dávkou AZA, ve které byla zřetelně patrná odlišnost mezi homozygoty \*1 a heterozygoty 3A/\*1. Také fenotyp TPMT, určený pomocí vyšetření aktivity enzymu v erythrocytech před léčbou, ovlivnil ustálené koncentrace 6-TGN. Podobné kvantitativní analýzy zahrnující dávku, fenotyp/genotyp TPMT a další faktory by mohly být vodítkem k tomu, jak na základě farmakokinetických odlišností rozpoznat nemocné nedodržující předepsané dávkování (non-compliance).

Velikost našeho souboru nedovolila zhodnotit, zda např. současná terapie jinými léčivy ovlivnila čas potřebný k dosažení steady-state a rovnovážné koncentrace 6-TGN.

## ZÁVĚR

Medián času do dosažení rovnovážné koncentrace 6-TGN byl přibližně o polovinu kratší, než je klinické pozorování nástupu účinku azatioprinu. Pravidelné vyšetřování hladin 6-TGN po zahájení terapie dovolí rozlišit nemocné s rychlou a pomalou ekvilibrací účinných koncentrací.

Podporováno grantem IGA MZD ČR NR/9255-3.

## Literatura/References

1. Al Hadithy AF, de Boer NK, Derijks LJ et al. Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. *Dig Liver Dis* 2005; 37(4): 282–297.
2. Cuffari C, Theoret Y, Latour S et al. 6-Mercaptopurine metabolism in Crohn's disease: correlation with efficacy and toxicity. *Gut* 1996; 39(3): 401–406.
3. Cuffari C, Hunt S, Bayless T. Utilization of erythrocyte 6-thioguanine

metabolite levels to optimise azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2001; 48(5): 642–646.

4. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 118(4): 705–713.

5. Dubinsky MC. Monitoring of AZA/6-MP treatment in children with IBD is necessary. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9(6): 386–388.

6. Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV et al. 6-mercaptopurine metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-mercaptopurine resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 904–915.

7. Dubinsky MC. Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: pharmacology, efficacy and safety. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2(9): 731–743.

8. Erb N, Haverland U, Harms DO et al. High-performance liquid chromatographic assay of metabolites of thioguanine and mercaptopurine in capillary blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 796(1): 87–94.

9. Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 2002; 50(4): 485–489.

10. Gilissen LP, Bierau J, Derijks LJ et al. The pharmacokinetic effect of discontinuation of mesalazine on mercaptopurine metabolite levels in inflammatory bowel disease patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22(7): 605–611.

11. Hyams JS. Inflammatory Bowel Disease. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB et al (eds). *Nelson Textbook of Pediatrics*. 18th ed. Philadelphia: Saunders 2007: 1575–1585.

12. IBD working group of the European society of paediatric gastroenterology, hepatology and nutrition

(ESPGHAN). Medical position paper: Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis – The Porto Criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41(1): 1–7.

13. Jacqz-Aigrain E, Bessa E, Medard Y et al. Thiopurine methyltransferase activity in a French population: h.p.l.c. assay conditions and effects of drugs and inhibitors. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 38(1): 1–8.

14. Jaspers GJ, Verkade HJ, Escher JC et al. Azathioprine maintains first remission in newly diagnosed pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(9): 831–836.

15. Kwan LY, Devlin SM, Mirocha JM et al. Thiopurine methyltransferase activity combined with 6-thioguanine metabolite levels predicts clinical response to thiopurines in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2008; 40(6): 425–432.

16. Levine A, Milo T, Buller HA et al. Consensus and controversy in the management of pediatric Crohn's disease: an international survey. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36: 464–469.

17. Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL et al. Leucopenia resulting from a drug interaction between azathioprine or 6-mercaptopurine and mesalamine, sulphasalazine, or balsalazide. *Gut* 2001; 49(5): 656–664.

18. Malý J, Pozler O, Dědek P. Kortikosteroidy a azathioprin v prvním roce léčby Crohnovy choroby. *Čes Slov Pediat* 2009; 64(6): 271–282.

19. Markowitz J, Grancher K, Kohn N et al. A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednisolone in children with newly diagnosed Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; 119(4): 895–902.

20. Markowitz J, Grancher K, Kohn N et al. Immunomodulatory therapy for pediatric inflammatory bowel disease: changing patterns of use, 1990–2000. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(4): 928–932.

21. Medard Y, Nafa S, Jacqz-Aigrain E. Thiopurine methyltransferase activity: new high-performance liquid chromatographic assay conditions. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 700(1–2): 275–277.

22. Paerregaard A, Schmiegelow K. Monitoring azathioprine metabolite levels and thiopurine methyltransferase (TPMT) activity in children with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37(3): 371–372.

23. Roblin X, Serre-Debeauvais F, Phelip JM et al. 6-thioguanine monitoring in steroid-dependent patients with inflammatory bowel diseases receiving azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21(7): 829–839.

24. Sawczenko A, Lynn R, Sandhu BK. Variations in initial assessment and management of inflammatory bowel disease across Great Britain and Ireland. *Arch Dis Child* 2003; 88(11): 990–994.

25. Schütz E, von Ahsen N, Oellerich M. Genotyping of eight thiopurine methyltransferase mutations: three-color multiplexing, „two-colour/shared” anchor, and fluorescence-quenching hybridization probe assays based on thermodynamic nearest-neighbor probe design. *Clin Chem* 2000; 46(11): 1728–1737.

26. 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(8): 1133–1145.

27. Van Os EC, Zins BJ, Sandborn WJ et al. Azathioprine pharmacokinetics after intravenous, oral, delayed release oral and rectal foam administration. *Gut* 1996; 39(1): 63–68.

Adresa pro korespondenci/

Correspondence to:

doc. MUDr. Oldřich Pozler, CSc.

Dětská klinika

LF UK a FN Hradec Králové

Sokolská 581

500 05 Hradec Králové

e-mail: pozler@lfhk.cuni.cz