

FARMAKOGENOMSKO VREDNOTENJE TIOPURINOV

PHARMACOGENOMIC EVALUATION OF THIOPURINES

AVTOR / AUTHOR:

Asist. dr. Dunja Urbančič, mag. farm.
Asist. dr. Alenka Šmid, mag. farm.
Prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za klinično biokemijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana, Slovenija*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: irena.mlinaric@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Genetska raznolikost je čudovita lastnost, ki opredeljuje vsakega posameznika, a hkrati določa tudi posameznikov odgovor na zdravljenje. Z odkrivanjem genetskih različic, ki vplivajo na učinek zdravil preko spremenjenih farmakokinetičnih ali farmakodinamskih procesov, se ukvarja farmakogenomika. Odkritje vpliva genotipa na odgovor organizma na ksenobiotike sega že v čas antične Grčije, ko je bilo znano, da zaužitje v mediteranskem svetu zelo razširjenega boba (*Vicia faba*) pri nekaterih posameznikih izzove življenje ogrožajočo hemolitično anemijo in da se stanje pojavlja v družini (1). Okoli 1500 let kasneje je bilo jasno, da je t. i. favizem posledica genetsko predisponirane oslabiljenega delovanja encima glukoza 6-fosfat dehidrogenaze (G6PD) (2), ki predstavlja tveganje tudi pri

POVZETEK

Tiopurini so predzdravila, ki jih uporabljamo pri zdravljenju akutne limfoblastne levkemije, avtoimunskih bolezni in pri preprečevanju zavrnitvenih reakcij po transplantaciji organov. Eden najpomembnejših encimov v deaktivacijski poti njihovega metabolizma je tiopurin S-metiltransferaza (TPMT). Odkritje populacijske raznolikosti v aktivnosti tega encima zaradi prisotnih genetskih polimorfizmov v njegovem genu je botrovalo vključitvi določanja le-teh v klinično prakso in še danes predstavlja enega najboljših farmakogenomskih primerov. Pacienti z genetskimi polimorfizmi ob standardnem zdravljenju s tiopurini namreč bolj verjetno razvijejo neželene učinke, saj v manjšem obsegu deaktivirajo te zdravilne učinkovine. Smernice evropskih in ameriških združenj za implementacijo farmakogenomike zato priporočajo določanje prisotnosti najpogostejših genetskih polimorfizmov *TPMT* ali aktivnosti encima pred začetkom zdravljenja. Hkrati svetujejo 30–70-odstotno znižanje standardnega odmerka tiopurinov ob prisotnem enem variantnem alelu ter zamenjavo terapije ali 90-odstotno znižanje standardnega odmerka tiopurinov v primeru dveh prisotnih variantnih alelov *TPMT*.

KLJUČNE BESEDE:

farmakogenomika, genetski polimorfizmi, tiopurin S-metiltransferaza, tiopurini, S-adenozilmetionin

ABSTRACT

Thiopurines represent an important therapeutic pillar in the therapy of acute lymphoblastic leukaemia, autoimmune disorders and in preventing transplant rejections. Their major route of deactivation is directed via thiopurine S-methyltransferase (TPMT). With the discovery of trimodal population distribution of its enzymatic activity, resulting from genetic polymorphisms present in its gene, the determination of TPMT status became one of the most successful implementations of pharmacogenomics into clinical practice. In patients treated with standard dose of thiopurines, decreased TPMT activity triggers severe side effects, due to poorer deactivation of these drugs. Guidelines from European and American consortia for implementation of pharmacogenetics advocate determination of most common genetic

polymorphisms or activity of TPMT prior to initiating thiopurine therapy. In patients heterozygous for TPMT 30–70% of target dose is recommended and substantially reduced doses or use of alternative treatment is advised in homozygous patients with deficient TPMT activity.

KEY WORDS:

genetic polymorphisms, pharmacogenomics, S-adenosylmethionine, thiopurines, thiopurine S-methyltransferase

zaužitju npr. antimalarika primakina (3). Vzporedno s to ugotovitvijo se je sredi prejšnjega stoletja prvič pojavil tudi izraz farmakogenetika, ki se je kot večina genetskih preiskav pospešeno začela razvijati ob prelomu zadnjega tisočletja (4). Tedaj so tehnike odkrivanja genetskih različic za tarčne gene na eni strani postale enostavne, na drugi strani pa je bilo moč hitro pridobiti ogromno količino podatkov z agnostičnimi vsegenomskimi metodami, ki so jih integrirale mnoge klinične raziskave. Po odkritju povezave med polimorfizmom in odgovorom na zdravlilo je bilo potrebno ta polimorfizem validirati na več populacijah, čemur je sledila implementacija v klinično prakso. Čeprav je po smernicah ameriške in evropske agencije za zdravila priporočeno farmakogenomsko testiranje za kar 7 % vseh učinkovin na trgu (4), je zaradi kompleksne narave prenosa v klinično prakso praktična uporaba farmakogenomskega pristopa pred ali med terapijo prisotna pri relativno majhnem številu zdravilnih učinkovin. Med njimi predstavlja farmakogenomika tiopurinov najboljši primer prenosa laboratorijskih in kliničnih raziskav v klinično prakso.

2 TIOPURINSKE ZDRAVILNE UČINKOVINE

Kljub hitremu napredku bioloških zdravil je vloga tiopurinov pri vzdrževanju ravnovesja imunskega sistema izrednega pomena. Bolezni in stanja, pri katerih uporabljamo tiopurine, so akutna limfoblastna levkemija, avtoimunske bolezni in preprečitve zavrnitve organa po transplantacijah. Tiopurini imajo kompleksen metabolizem in ozko terapevtsko okno, zato lahko zaradi genetskih in okoljskih razlik med posamezniki enak odmerek pri enem pacientu doseže želeni učinek, medtem ko pri drugem izzove resno neželeno reakcijo.

2.1 METABOLIZEM

Tiopurini 6-merkaptopurin (6-MP), azatioprin (AZA) in 6-tiogvanin (6-TG) so protitumorne in imunosupresivne zdravilne učinkovine, ki so kot predzdravila izpostavljeni zapletenemu metabolizmu. Ta zajema aktivacijske in deaktivacijske poti (slika 1). Pretvorba tiopurinov se začne v črevesju in jetrih, kjer je AZA podvržen delno encimski odcepitvi metilnitroioimidazola z glutation S-transferazo (GST) in tvori 6-MP. Slednji lahko vstopi v pot aktivacije, usmerjene proti nastanku citotoksičnih 6-tiogvanozinskih nukleotidov (6-TGN). Ta se začne s pripenjanjem ribozilne in fosfatne skupine na purinski del s hipoksantin fosforiboziltransferasazo (HPRT) ter nadaljuje z oksidacijsko reakcijo, katalizirano z inozin monofosfat dehidrogenazo (IMPDH), ki tudi najmočneje pogojuje hitrost pretvorbe do 6-TGN. V naslednjem koraku gvanozin monofosfat sintaza (GMPS) katalizira pretvorbo nastalega 6-tioksantozin monofosfata (6-TXMP) do 6-tiogvanozin monofosfata (6-TGMP). Sledi fosforilacija s kinazami do 6-tiogvanozin trifosfata (6-TGTP) (5), ki ji nasprotuje defosforilacija s hidrolazo nudix-15 (NUDT15) (6).

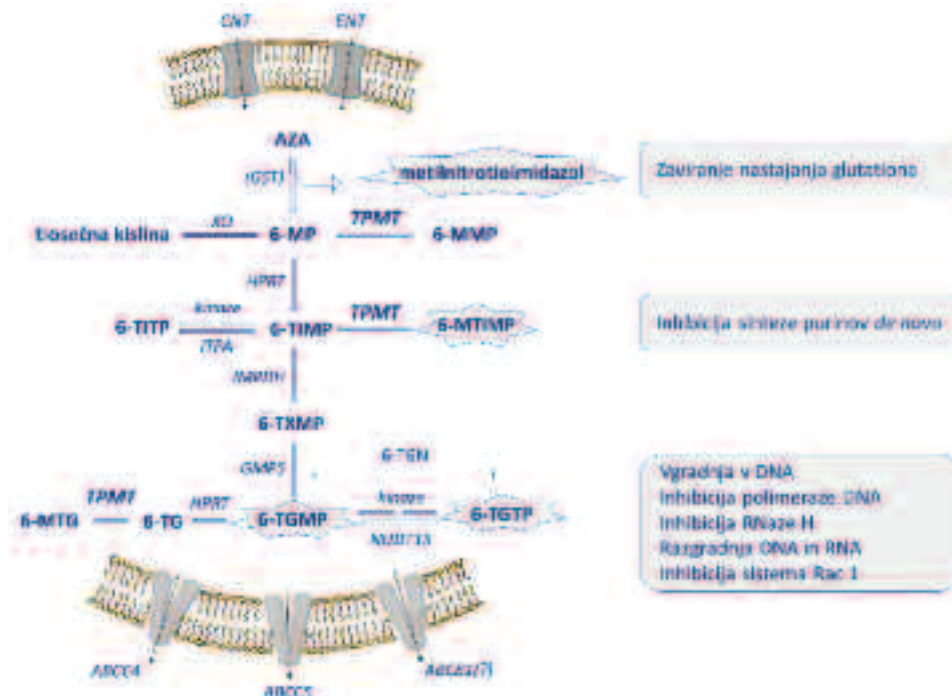
V deaktivacijski poti tiopurinov sodelujeta dva encima: tiopurin S-metiltransferaza (TPMT) in ksantin oksidaza (XO) (5). XO v jetrih pretvori med 3 % in 37 % absorbiranega 6-MP v tiosečno kislino (7). Preostanek 6-MP gre bodisi v aktivacijo ali pa ga metilira TPMT, pri čemer nastane 6-metilmerkaptopurin (6-MMP) (8). TPMT sodeluje tudi pri metilaciji nekaterih drugih presnovkov 6-MP v različnih fazah aktivacijske poti (slika 1) (5). Med drugim je udeležen pri nastanku 6-metilinozin monofosfata (6-MTIMP), ki poleg 6-TGN izkazuje farmakološke učinke (9).

Aktivacijska pot 6-TG je podobna metabolizmu 6-MP, a je manj kompleksna, saj 6-TG za razliko od 6-MP že ima gvaninsko strukturo. Do citotoksičnih 6-TGN namreč potrebuje le enostopenjsko pretvorbo s HPRT (slika 1) (5). Oksidacijska deaktivacija 6-TG s XO še ni popolnoma razjasnjena, njegovi metilirani presnovki, nastali s TPMT, pa ne izkazujejo farmakološkega delovanja (10).

2.2 MEHANIZEM DELOVANJA

Zaradi strukturne podobnosti z gvaninom je delovanje 6-TGN v celičnih procesih antagonistično purinskim nukleotidom (slika 1). 6-TGN se vključi kot gradnik v nukleinske kisline, a namesto da bi sodeloval pri sintezi, onemogoči delovanje polimeraze DNA ter s tem ustavi podvojevanje DNA, čemur sledi njena razgradnja (11).





Slika 1: Shema presnove in delovanja tiopurinskih zdravilnih učinkovin. 6-MP – 6-merkaptopurin, 6-MMP – 6-metilmerkaptopurin, 6-MTG – 6-metiltiogvanin, 6-MTIMP – 6-metiltioinozin monofosfat, 6-TG – 6-tiogvanin, 6-TGN – 6-tiogvanozinski nukleotidi, 6-TGMP – 6-tiogvanozin monofosfat, 6-TGTP – 6-tiogvanozin trifosfat, 6-TIMP – 6-tioinozin monofosfat, 6-TIPP – 6-tioinozin trifosfat, 6-TXMP – 6-tioksantozin monofosfat, ABC – prenašalec z ATP-vezavno domeno, AZA – azatioprin, ENT, CNT – nukleozidni prenašalni proteini, GMPS – gvanozin monofosfat sintaza, GST – glutation S-transferaza, HPRT – hipoksantin fosforiboziltransferaza, IMPDH – inozin monofosfat dehidrogenaza, ITPA – inozin trifosfat pirofosfohidrolaza, NUDT15 – hidrolaza nudix-15, TPMT – tiopurin S-metiltransferaza, XO – ksantin oksidaza. Prirejeno po (5).

Figure 1: Schematic presentation of thiopurine metabolism and their mode of action. 6-MP – 6-mercaptopurine, 6-MMP – 6-methylmercaptopurine, 6-MTG – 6-methylthioguanine, 6-MTIMP – methylthioinosine monophosphate, 6-TG – 6-thioguanine, 6-TGN – 6-thioguanosine nucleotides, 6-TGMP – 6-thioguanosine monophosphate, 6-TGTP – 6-thioguanosine triphosphate, 6-TIMP – 6-thioinosine monophosphate, 6-TIPP – 6-thioinosine triphosphate, 6-TXMP – 6-thioxanthosine monophosphate, ABC – ATP-binding cassette transporters, AZA – azathioprine, ENT, CNT – equilibrative and concentrative nucleoside transporters, GMPS – guanosine monophosphate synthase, GST – glutathione S-transferase, HPRT – hypoxanthine phosphoribosyltransferase, IMPDH – inosine-5-monophosphate dehydrogenase, ITPA – inosine triphosphate pyrophosphatase, NUDT15 – nudix hydrolase 15, TPMT – thiopurine S-methyltransferase, XO – xanthine oxidase. Adopted from (5).

Poleg tega neposredno zavira polimerazo in ligazo DNA kot tudi aktivnost RNaze H, kar vodi v zaustavitev prepisa genov (12). Razgradnja nukleinskih kislin sproži apoptozne mehanizme in smrt celice. Citostatične in imunosupresivne učinke tiopurinov, natančneje 6-TGTP, dosežemo tudi preko blokade od CD28 odvisne aktivacije Rac1, ki vodi limfocite T proti apoptozi (13). Zaustavitev procesov v celici povzroči tudi 6-MTIMP. Z inhibicijo fosforibozil pirofosfat amidotransferaze namreč zavre nastajanje purinov *de novo* ter s tem zniža nivo adenzin trifosfata (9). Dodaten tarčni učinek sproži tudi metilnitroioimidazol, razgradni produkt AZA. Njegov imunosupresivni učinek po-

vezujejo z zaviranjem obrambnih mehanizmov oksidativnega stresa, saj naj bi zmanjševal koncentracijo glutatona v celici (14).

2.3 UČINKOVITOST ZDRAVLJENJA IN NEŽELENI UČINKI

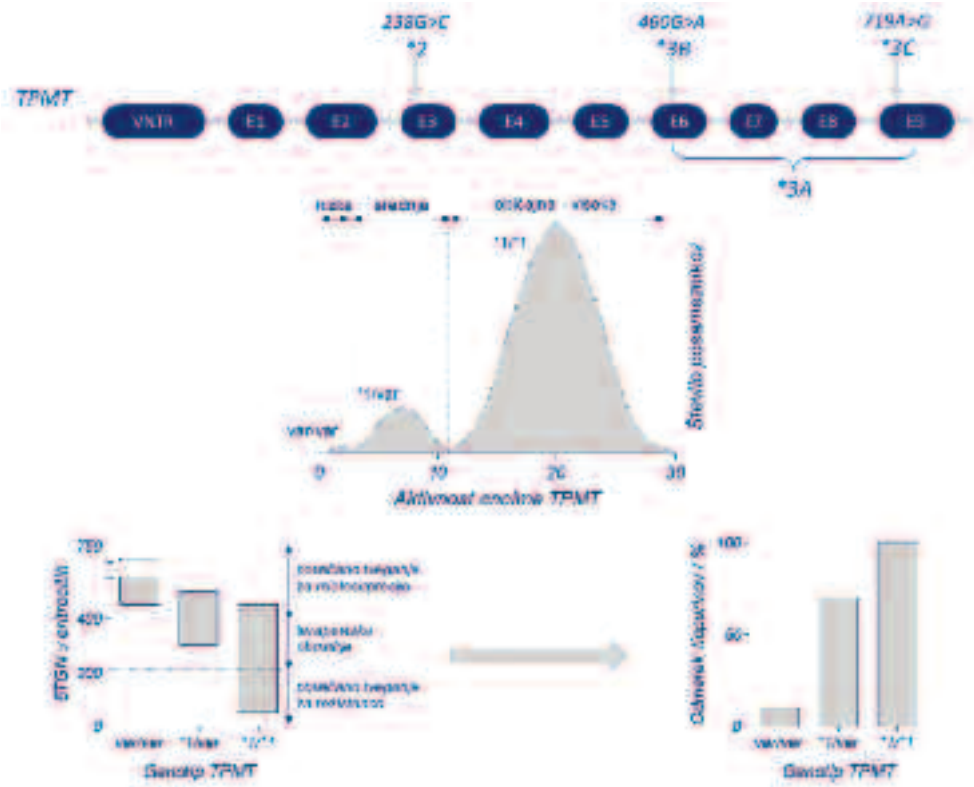
Zdravljenje s tiopurini traja od enega do več let predvsem v vzdrževalnih fazah omenjenih bolezenskih stanj z namenom podaljšanja remisije bolezni. Učinkovitost zdravljenja s tiopurini je variabilna in odvisna od vrste bolezni ter starosti pacientov. Zaradi sistematičnega pristopa pri sno-

vanju protokolov zdravljenja je na področju akutne limfoblastne levkemije učinkovitost le-tega narasla s 40 % sredi šestdesetih let 20. stoletja (15) na več kot 80 %, v pediatrični populaciji v zadnjih letih celo nad 90 % (16, 17). Na drugi strani pri vnetni črevesni bolezni nekatere raziskave poročajo o le 35-odstotni stopnji učinkovitosti zdravljenja s tiopurini (18, 19). Tudi do 60 % bolnikov opusti zdravljenje zaradi hudih neželenih učinkov ali neodzivnosti na tiopurine (20, 21).

Pri bolnikih, zdravljenih s tiopurini, so med najpogostejšimi vzroki za prekinitve terapije preobčutljivostne reakcije, akutni pankreatitis, gastrointestinalna netoleranca, mielotoksičnost, ki se odraža kot nevtropenija, hepatotoksičnost in

infekcije (22). Zaradi potencialnega mutagenega delovanja tiopurinov se pri bolnikih, ki so uspešno prestali zdravljenje, kasneje lahko pojavijo sekundarne novotvorbe, kot so limfom, nemelanomski kožni tumorji in kronična mieloidna levkemija (23-25).

V izogib neuspešnemu zdravljenju sta predvidevanje odziva pacienta na omenjene zdravilne učinkovine ter uvedba posamezniku prilagojenega pristopa zdravljenja izrednega pomena. Tak pristop zajema ugotavljanje interakcij med zdravilnimi učinkovinami, ki jih pacient sočasno prejema, upoštevanje posameznikovih metabolnih dejavnikov, ki lahko vplivajo na delovanje zdravilne učinkovine, ter poznavanje posameznikovih genetskih značilnosti.



Slika 2: Farmakogenomika TPMT. Zgoraj: Shematski prikaz gena TPMT z eksoni, njegovimi najpogostejšimi polimorfizmi in značilnim zaporedjem VNTR v promotorski regiji gena. Sredina: Graf razporeditve aktivnosti TPMT v kavkaški populaciji. Znižana aktivnost TPMT je posledica prisotnih polimorfizmov (var) v genu TPMT. Spodaj levo: Pri zdravljenju s standardnim odmerkom tiopurinov prisotnost polimorfizmov vpliva na količino proizvedenih toksičnih presnovkov 6-TGN. Spodaj desno: Zaradi povečanega tveganja za mielosupresijo zahteva prisotnost polimorfizmov ustrezno prilagoditev odmerka glede na genotip. E – ekson, TPMT – tiopurin S-metiltransferaza, var – variantni alel, VNTR – variabilno število tandemskih ponovitev, *1 – divji tip alela TPMT. Povzeto po (33).

Figure 2: Pharmacogenomics of TPMT. Above: Schematic presentation of TPMT gene, its exons, its most common genetic polymorphisms and characteristic VNTR sequence. Middle: Trimodal distribution of TPMT activity in Caucasian population. Polymorphisms in TPMT gene (var) are responsible for lower enzymatic activity. Below left: They importantly influence the levels of toxic thiopurine metabolites 6-TGN, when standard dose of thiopurines is applied. Below right: Due to higher risk for myelosuppression the thiopurine dose adjustment is required, if genetic polymorphisms are determined in patient's TPMT gene. Adopted from (33).

3 FARMAKOGENOMSKE ZNAČILNOSTI ODGOVORA NA TIOPURINE

Na akuten pojav neželenih učinkov, na neželene učinke, ki se pojavijo leta po končani terapiji, na ponovitev bolezni ter na neodzivnost terapije s tiopurini poleg same narave bolezni močno vpliva dedna predispozicija. Genetske polimorfizme uvrščamo med ključne dejavnike, ki lahko povzročijo nezadostno učinkovitost ali povečajo tveganje za pojav neželenih učinkov zdravljenja, če so različni posamezniki izpostavljeni enakemu odmerku (26). V kliničnih in translacijskih raziskavah so identificirali številne polimorfizme v genih *TPMT*, *NUDT15*, *ITPA*, *MTHFR* in *PACSN2*, ki so povezani bodisi s povečano toksičnostjo bodisi z neodzivnostjo na tiopurine (27-30). Kljub velikemu številu različnih polimorfizmov, ki v kliničnih raziskavah jasno prikazujejo genetsko odvisne razlike med posamezniki pri odgovoru na tiopurine, v klinični praksi zaenkrat najpogosteje uporabljamo le nekatere različice *TPMT*.

3.1 GENETSKE ZNAČILNOSTI GENA ZA *TPMT*

Kot citosolni encim *TPMT* katalizira reakcijo *S*-metilacije aromatskih in heteroaromatskih sulfhidrilnih spojin, pri čemer metilno skupino pri prenosu prispeva kofaktor *S*-adenozil metionin (*SAM*) (8, 31). Pri reakciji, ki predvidoma poteka po klasičnem mehanizmu S_N2 (32), nastaneta metilirani substrat in *S*-adenozil homocistein (*SAH*) (8). Zapis za protein se nahaja na kromosomu 6 z lokusom 6p22.3. Gen, dolg 34 kb, je sestavljen iz devetih eksonov, od katerih jih osem kodira protein (slika 2, zgoraj). V humanem genomu najdemo štiri psevdogene *TPMT*, ki se nahajajo na kromosomih 3, 18 in na kromosomu X.

Variabilnost zaporedja DNA v *TPMT* je pestra (34). V eksonski ali intronski regiji danes poznamo 44 različnih polimorfizmov posameznega nukleotida (*SNP*) kot tudi delecije manjših fragmentov gena (34). Poleg najpogostejših *SNP* se posamezniki med seboj razlikujemo po zapisu v promotorski regiji *TPMT*. V mestu, bogatem z baznim parom G/C, se nahaja variabilno število tandemskih ponovitev (*VNTR*), ki so evolucijsko povezani z najpogostejšimi polimorfizmi (35,36). Najpogostejši in zaradi njihovega vpliva na aktivnost encima tudi najpomembnejši polimorfizmi so *TPMT*3A*, *TPMT*3C* in *TPMT*2* (37-39). Posamezniki z omenjenimi polimorfizmi imajo v genu *TPMT* zamenjan posamezen nukleotid (slika 2, zgoraj). Ta sprememba v genskem zapisu

povzroči spremenjeno aminokislinsko zaporedje v prepisanem proteinu, kar vodi v napačno zvijanje in hitrejšo razgradnjo *TPMT* (33). Posledično se pri teh ljudeh izraža *TPMT* z nižjo aktivnostjo, ki je v primeru dvojno variantnega genotipa skoraj nezaznavna. V kavkaški populaciji ima okoli 89 % posameznikov normalno aktivnost encima, 11 % znižano in okoli 0,3 % nezaznavno (40). Aktivnost običajno odgovarja posameznikovemu genotipu (slika 2, sredina) (40). Kljub temu je razporeditev aktivnosti pri posameznikih z genotipom divjega tipa (*TPMT*1*) relativno široka, kar pomeni, da se genotip najpogostejših polimorfizmov s fenotipom ne ujema popolnoma in da obstajajo genetski ali drugi dejavniki, ki dodatno vplivajo na aktivnost *TPMT* (41).

3.2 SPREMLJANJE ZDRAVLJENJA IN PRILAGODITEV ODMERKA GLEDE NA FARMAKOGENETSKE OZNAČEVALCE

Da bi bilo zdravljenje čim varnejše in učinkovitejše, med zdravljenjem s tiopurini zdravniki obvezno rutinsko spremljajo diferencialno krvno sliko za ugotavljanje števila levkocitov ter jetrno funkcijo z analizo jetrnih encimov. Kjer je storitev na voljo, pogosto preverjajo nivo metabolitov tiopurinov v eritrocitih. Koncentracija 6-TGN v območju med 235 in 450 pmol \times (8×10^8 eritrocitov (*RBC*)⁻¹) pri bolnikih z vnetno črevesno boleznijo napoveduje uspešno zdravljenje. Višje koncentracije so povezane z večjim tveganjem za pojav neželenih učinkov (21). Močno povišani metilirani presnovki tiopurinov (> 5700 pmol \times (8×10^8 *RBC*)⁻¹) v eritrocitih nakazujejo na večje tveganje za jetrno toksičnost. Visoko razmerje med 6-MMP in 6-TGN se je izkazalo za koristno predvsem pri ugotavljanju vzrokov za neodzivnost na tiopurine in preverjanju pacientove compliance (21, 42). Odgovor posameznika na zdravljenje s tiopurini v veliki meri orisujeta prisotnost genetskih polimorfizmov in posledično znižana encimska aktivnost *TPMT*, ki z metilacijo deaktivira tiopurine (26, 43). Homozigotni posamezniki z zapisom za variantni encim *TPMT* so nezmožni metilacije tiopurinov, zato je celotna metabolna pot teh učinkovin pri njih usmerjena proti citotoksičnim 6-TGN (slika 2, spodaj levo). Posledica take genetske predispozicije so visoke količine 6-TGN v organizmu pacienta, če je le-ta zdravljen s standardnim odmerkom; to pa predstavlja povečano tveganje za nastanek življenja ogrožajoče mielosupresije (7, 44). Nekateri pacienti s heterozigotnim zapisom gena *TPMT* in s tem srednje visoko aktivnostjo *TPMT* se lahko ugodno odzovejo na zdravljenje s tiopurini brez resnejših neželenih

učinkov (45). Drugi heterozigoti zaradi višjih koncentracij 6-TGN razvijejo mielosupresijo, v kolikor odmerki tiopurinov ni znižan (7, 44). Smernice vodilnih ameriških in evropskih iniciativ za vključitev farmakogenomike v klinično prakso – Združenje za implementacijo klinične farmakogenetike (CPIC, *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*), Nizozemska delovna skupina za farmakogenetiko (DPWG, *Dutch Pharmacogenetics Working Group*) in Kanadska farmakogenomska mreža za varnost zdravil (CPNDS, *Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety*) – zato pri zdravljenju s tiopurini priporočajo preverjanje prisotnosti genetskih polimorfizmov ali aktivnosti TPMT. Na podlagi pacientovega genotipa ali fenotipa naj nato heterozigoti s srednjo aktivnostjo TPMT ob začetku zdravljenja prejmejo 30–70 % standardnega odmerka AZA ali 6-MP oziroma 30–50 % standardnega odmerka 6-TG, homozigoti z nizko ali nezaznavno aktivnostjo TPMT pa le 10 % standardnega odmerka tiopurinov ali drugo obliko zdravljenja (slika 2, spodaj desno) (46, 47). V nadaljevanju zdravljenja odmerki tiopurinov prilagodimo glede na diferencialno krvno sliko posameznika, ki odraža toksičnost ali učinkovitost zdravljenja (46,47).

Ker je povezava med genetskimi polimorfizmi v *TPMT* in izidom zdravljenja močno podprta s številnimi raziskavami, mnogi onkologi, gastroenterologi in dermatologi posežejo po testiranju statusa *TPMT* pred pričetkom zdravljenja s tiopurini. V državah, kot je Velika Britanija, je testiranje na polimorfizme *TPMT* pred zdravljenjem s tiopurini obvezno za vse bolnike z ALL (48). Pri zdravljenju gastrointestinalnih avtoimunskih bolezni z AZA ali 6-MP je ocenjen delež diagnosticiranja statusa *TPMT* pred zdravljenjem 67 % za Veliko Britanijo in 43 % za celotno svetovno populacijo (48). V nasprotju z gastroenterologi kar 94 % dermatologov posega po preverjanju genetskih različ *TPMT* (48). Povprečna stopnja genetskega testiranja pred zdravljenjem nemalignih bolezni se tako giblje med 47–94 % (46). V Sloveniji testiranje najpogostejših genetskih različ *TPMT* izvaja Laboratorij za molekularno diagnostiko, ki deluje v okviru Univerze v Ljubljani, Fakultete za farmacijo (49). Prav tako v tem laboratoriju izvajajo meritve metabolitov tiopurinov v eritrocitih za namen spremljanja zdravljenja bolnikov, ki prejemajo tiopurine.

4 SKLEP

Čeprav dandanes predpisovanje zdravil še vedno pogosto temelji na posameznikovi značilnosti, kot so starost,

masa, ledvična in jetrna funkcija, obstoječi diagnostični postopki in znanje marsikdaj slabega odgovora na zdravlilo ne morejo razložiti. Zato sta ključna iskanje in implementacija novih genetskih in metabolnih značilnosti. Majhen delež prenosa farmakogenetike v klinično prakso je bil v preteklosti posledica pomanjkanja dostopnosti podrobnih kliničnih podatkov in smernic. Zadnja leta so evropska in ameriška združenja za implementacijo farmakogenomike v klinično prakso (CPIC, CPNDS, DPWG) izdala obširnejše smernice za strukturiranje farmakogenomskih raziskav in pridobivanje ustreznih informacij o polimorfizmih in njihovem vplivu na zdravljenje, ki bi bile zadostne za validacijo in vpeljavo določanja teh polimorfizmov v klinično prakso. Tako lahko v prihodnosti pričakujemo pospešeno izvajanje kakovostno zastavljenih raziskav, ki bodo ob ustrezno razviti podpornih sistemih in izobraževanju vseh vpletenih omogočile z dokazi podprto farmakogenomsko testiranje ter s tem natančnejše in varnejše predpisovanje zdravil.

5 LITERATURA

1. Wharton HJ, Duesselmann W. Favism. *N Engl J Med.* 1947 Jun 26;236(26):974–7.
2. Szeinberg A, Sheba C, Adam A. Enzymatic Abnormality in Erythrocytes of a Population Sensitive to *Vicia faba* or Haemolytic Anaemia induced by Drugs. *Nature [Internet].* 1958;181. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19582901457>
3. Schrier SL, Kellermeyer RW, Carson PE, Ickes CE, Alving AS. The hemolytic effect of primaquine: IX. Enzymatic abnormalities in primaquine-sensitive erythrocytes. *J Lab Clin Med.* 1958 Jul 1;52(1):109–17.
4. Relling MV, Evans WE. Pharmacogenomics in the clinic. *Nature.* 2015 Oct 15;526(7573):343–50.
5. Zaza G, Cheok M, Krynetskaia N, Thorn C, Stocco G, Hebert JM, et al. Thiopurine pathway. *Pharmacogenet Genomics.* 2010 Sep;20(9):573–4.
6. Moriyama T, Nishii R, Perez-Andreu V, Yang W, Klussmann FA, Zhao X, et al. NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity. *Nat Genet.* 2016 Apr;48(4):367–73.
7. Lennard L, Van Loon JA, Lilleyman JS, Weinshilboum RM. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin Pharmacol Ther.* 1987 Jan;41(1):18–25.
8. Remy CN. Metabolism of thiopyrimidines and thiopurines. S-Methylation with S-adenosylmethionine transmethylase and catabolism in mammalian tissues. *J Biol Chem.* 1963 Mar;238:1078–84.
9. Vogt MH, Stet EH, De Abreu RA, Bökkerink JP, Lambooy LH, Trijbels FJ. The importance of methylthio-IMP for methylmercaptapurine ribonucleoside (Me-MPR) cytotoxicity in



- Molt F4 human malignant T-lymphoblasts. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Apr 30;1181(2):189–94.
10. Allan PW, Bennett LL. 6-Methylthioguanilic acid, a metabolite of 6-thioguanine. *Biochem Pharmacol*. 1971 Apr;20(4):847–52.
 11. Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol*. 1992;43(4):329–39.
 12. Fotoohi AK, Coulthard SA, Albertioni F. Thiopurines: factors influencing toxicity and response. *Biochem Pharmacol*. 2010 May 1;79(9):1211–20.
 13. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest*. 2003 Apr;111(8):1133–45.
 14. Stocco G, Pelin M, Franca R, De Iudicibus S, Cuzzoni E, Favretto D, et al. Pharmacogenetics of azathioprine in inflammatory bowel disease: A role for glutathione-S-transferase? *World J Gastroenterol WJG*. 2014 Apr 7;20(13):3534–41.
 15. Mei L, Ontiveros EP, Griffiths EA, Thompson JE, Wang ES, Wetzler M. Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. *Blood Rev*. 2015 Jul;29(4):243–9.
 16. Lennard L, Cartwright CS, Wade R, Vora A. Thiopurine dose intensity and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukaemia: the influence of thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. *Br J Haematol*. 2015 Apr;169(2):228–40.
 17. Toft N, Birgens H, Abrahamsson J, Griškevičius L, Hallböök H, Heyman M, et al. Results of NOPHO ALL2008 treatment for patients aged 1–45 years with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2018 Mar;32(3):606–15.
 18. Axelrad JE, Roy A, Lawlor G, Korelitz B, Lichtiger S. Thiopurines and inflammatory bowel disease: Current evidence and a historical perspective. *World J Gastroenterol*. 2016 Dec 14;22(46):10103–17.
 19. Izraeli S, Shochat C, Tal N, Geron I. Towards precision medicine in childhood leukemia--insights from mutationally activated cytokine receptor pathways in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett*. 2014 Sep 28;352(1):15–20.
 20. Moran GW, Dubeau M-F, Kaplan GG, Yang H, Eksteen B, Ghosh S, et al. Clinical predictors of thiopurine-related adverse events in Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2015 Jul 7;21(25):7795–804.
 21. Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, et al. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002 Apr;122(4):904–15.
 22. Goldberg R, Irving PM. Toxicity and response to thiopurines in patients with inflammatory bowel disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jul;9(7):891–900.
 23. Abbas AM, Almukhtar RM, Loftus EV, Lichtenstein GR, Khan N. Risk of melanoma and non-melanoma skin cancer in ulcerative colitis patients treated with thiopurines: a nationwide retrospective cohort. *Am J Gastroenterol*. 2014 Nov;109(11):1781–93.
 24. Kotlyar DS, Lewis JD, Beaugerie L, Tierney A, Brensinger CM, Gisbert JP, et al. Risk of lymphoma in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine and 6-mercaptopurine: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2015 May;13(5):847–858.e4; quiz e48–50.
 25. Deepak P, Stobaugh DJ. Risk of Myeloid Neoplasms in Inflammatory Bowel Disease Patients Is Linked to Exposure to Thiopurines and Not With Tumor Necrosis Factor-alpha Inhibitors. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2015 Oct;13(10):1857–8.
 26. Lennard L, Cartwright CS, Wade R, Vora A. Thiopurine methyltransferase and treatment outcome in the UK acute lymphoblastic leukaemia trial ALL2003. *Br J Haematol*. 2015 Aug;170(4):550–8.
 27. Yang S-K, Hong M, Baek J, Choi H, Zhao W, Jung Y, et al. A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. *Nat Genet*. 2014 Sep;46(9):1017–20.
 28. Smid A, Karas-Kuzelicki N, Milek M, Jazbec J, Mlinaric-Rascan I. Association of ITPA genotype with event-free survival and relapse rates in children with acute lymphoblastic leukemia undergoing maintenance therapy. *PLoS One*. 2014;9(10):e109551.
 29. Karas-Kuzelicki N, Jazbec J, Milek M, Mlinaric-Rascan I. Heterozygosity at the TPMT gene locus, augmented by mutated MTHFR gene, predisposes to 6-MP related toxicities in childhood ALL patients. *Leukemia*. 2009 May;23(5):971–4.
 30. Smid A, Karas-Kuzelicki N, Jazbec J, Mlinaric-Rascan I. PACSIN2 polymorphism is associated with thiopurine-induced hematological toxicity in children with acute lymphoblastic leukaemia undergoing maintenance therapy. *Sci Rep*. 2016 25;6:30244.
 31. Woodson LC, Ames MM, Selassie CD, Hansch C, Weinshilboum RM. Thiopurine methyltransferase. Aromatic thiol substrates and inhibition by benzoic acid derivatives. *Mol Pharmacol*. 1983 Nov;24(3):471–8.
 32. Peng Y, Feng Q, Wilk D, Adjei AA, Salavaggione OE, Weinshilboum RM, et al. Structural basis of substrate recognition in thiopurine S-methyltransferase. *Biochemistry*. 2008 Jun 10;47(23):6216–25.
 33. Krynetski E, Evans WE. Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. *Oncogene*. 2003 Oct 20;22(47):7403–13.
 34. Appell ML, Berg J, Duley J, Evans WE, Kennedy MA, Lennard L, et al. Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenet Genomics*. 2013 Apr;23(4):242–8.
 35. Krynetski EY, Fessing MY, Yates CR, Sun D, Schuetz JD, Evans WE. Promoter and Intronic Sequences of the Human Thiopurine S-Methyltransferase (TPMT) Gene Isolated from a Human Pac1 Genomic Library. *Pharm Res*. 1997 Dec 1;14(12):1672–8.
 36. Urbančič D, Šmid A, Stocco G, Decorti G, Mlinarič-Raščan I, Karas Kuželicki N. Novel motif of variable number of tandem repeats in TPMT promoter region and evolutionary association of variable number of tandem repeats with TPMT*3 alleles. *Pharmacogenomics*. 2018 Nov;19(17):1311–22.
 37. Krynetski EY, Krynetskaia NF, Yanishevski Y, Evans WE. Methylation of mercaptopurine, thioguanine, and their nucleotide metabolites by heterologously expressed human thiopurine S-methyltransferase. *Mol Pharmacol*. 1995 Jun;47(6):1141–7.
 38. Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D, et al. Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA Cell Biol*. 1996 Jan;15(1):17–30.
 39. Tai HL, Krynetski EY, Yates CR, Loennechen T, Fessing MY, Krynetskaia NF, et al. Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *Am J Hum Genet*. 1996 Apr;58(4):694–702.
 40. Milek M, Murn J, Jaksic Z, Lukac Bajalo J, Jazbec J, Mlinaric Rascan I. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: genotype to phenotype correlation in the Slovenian population. *Pharmacology*. 2006;77(3):105–14.

41. Lennard L, Cartwright CS, Wade R, Richards SM, Vora A. Thiopurine methyltransferase genotype-phenotype discordance and thiopurine active metabolite formation in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Clin Pharmacol*. 2013 Jul;76(1):125–36.
42. Gisbert JP, González-Lama Y, Maté J. Thiopurine-induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review. *Am J Gastroenterol*. 2007 Jul;102(7):1518–27.
43. Schmiegelow K, Forestier E, Kristinsson J, Söderhäll S, Vettenranta K, Weinshilboum R, et al. Thiopurine methyltransferase activity is related to the risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL-92 study. *Leukemia*. 2009 Mar;23(3):557–64.
44. Lennard L, Lileyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Lond Engl*. 1990 Jul 28;336(8709):225–9.
45. Higgs JE, Payne K, Roberts C, Newman WG. Are patients with intermediate TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? *Pharmacogenomics*. 2010 Feb;11(2):177–88.
46. Relling MV, Schwab M, Whirl-Carrillo M, Suarez-Kurtz G, Pui C-H, Stein CM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for Thiopurine Dosing Based on TPMT and NUDT15 Genotypes: 2018 Update. *Clin Pharmacol Ther*. 2019 May;105(5):1095–105.
47. Swen JJ, Nijenhuis M, Rhenen M van, Boer-Veger NJ de, Buunk A-M, Houwink EJJ, et al. Pharmacogenetic Information in Clinical Guidelines: The European Perspective. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;103(5):795–801.
48. Lennard L. Implementation of TPMT testing. *Br J Clin Pharmacol*. 2014 Apr;77(4):704–14.
49. Laboratorij za molekularno diagnostiko. [cited 2019 Jan 10]. Available from: <http://www.ffa.uni-lj.si/fakulteta/organiziranost/katedre/katedra-za-klinicno-biokemijo/laboratorij-za-molekularno-diagnostiko>

