

Prospectief multicentrisch farmacokinetisch onderzoek

Invloed van mesalazine op het thiopurinemetabolisme bij patiënten met inflammatoire darmziekten

D.R. Wong^{a*}, N.K.H. de Boer^b, B. Jharap^b, P. de Graaf^c, A.A. van Bodegraven^b, C.J.J. Mulder^b, L.G.J.B. Engels^d en P.M. Hooymans^a

^a Klinische Farmacie, Maaslandziekenhuis, Sittard.

^b Gastro-enterologie en Hepatologie, VU medisch centrum, Amsterdam.

^c Klinische farmacie, VU medisch centrum, Amsterdam.

^d Gastro-enterologie en Hepatologie, Maaslandziekenhuis, Sittard.

* Correspondentie: d.wong@orbisconcern.nl.

Kernpunten

- Mesalazine beïnvloedt het metabolisme van azathioprine en mercaptopurine dosisafhankelijk, leidend tot een stijging van de actieve 6-thioguaninenucleotiden.
- Patiënten met inflammatoire darmziekten die niet of niet goed reageren op thiopurinemonotherapie, kunnen baat hebben bij combinatietherapie met mesalazine door toename van de actieve thiopurinemetabolieten.
- Gelijktijdig gebruik van mesalazine en thiopurines geeft een licht verhoogde kans op myelodepressie, zodat extra voorzichtigheid geboden is.
- Mesalazine beïnvloedt de activiteit van thiopurine-S-methyltransferase niet; het farmacologische mechanisme dat aan deze interactie ten grondslag ligt, is nog niet opgehelderd.

De immunosuppressieve thiopurines, azathioprine en mercaptopurine, worden toegepast bij de behandeling van matig-ernstige inflammatoire darmziekten [1]. De effectiviteit wordt toegeschreven aan de actieve metabolieten van azathioprine en mercaptopurine: de 6-thioguaninenucleotiden (6-TGN). Een 6-TGN-concentratie $>235 \text{ pmol}/8 \cdot 10^8$ rode bloedcellen is geassocieerd met een goede therapeutische respons, terwijl een 6-TGN-concentratie $>500 \text{ pmol}/8 \cdot 10^8$ rode bloedcellen geassocieerd is met een verhoogde kans op myelodepressie [2-4].

In figuur 1 is het metabolisme van de thiopurines beschreven. Het enzym thiopurine-S-methyltransferase (TPMT) speelt hierin een belangrijke rol. Een hoge activiteit van TPMT leidt tot een hoge concentratie hepatotoxische 6-methylmercaptopurineribonucleotiden (6-MMPR). Dientengevolge leidt een hoge activiteit van TPMT tevens tot lagere concentraties van de actieve 6-TGN en daarmee tot een verminderde immunosuppressieve werking. Concentraties 6-MMPR $>5700 \text{ pmol}/8 \cdot 10^8$ rode bloedcellen zijn geassocieerd met een verhoogde kans op hepatotoxiciteit [2-4].

Mesalazine wordt eveneens veelvuldig voorgeschreven voor de behandeling van inflammatoire darmziekten (colitis ulcerosa, ziekte van Crohn en *indeterminate colitis*) [5, 6]. Verschillende studies toonden aan dat mesalazine het thiopurinemetabolisme

Abstract

Influence of mesalazine on thiopurine metabolism in inflammatory bowel disease patients. Prospective multicenter pharmacokinetic study

Objective

To determine the influence of mesalazine (5-ASA) on thiopurine metabolism in inflammatory bowel disease (IBD) patients.

Design

A prospective multicenter pharmacokinetic study of two different mesalazine dosages was performed in IBD patients using azathioprine (AZA) or mercaptopurine (6-MP).

Methods

IBD patients on stable maintenance therapy (AZA or 6-MP for at least 8 weeks) with normal laboratory parameters were included in our study. Patients received consecutively per protocol two different dosages of mesalazine (2 g/day and 4 g/day). Laboratory parameters and levels of 6-thioguanine nucleotides (6-TGN), 6-methylmercaptopurine ribonucleotides (6-MMPR), 5-ASA and N-acetyl-5-mesalazine (N-Ac-5-ASA) were determined before initiation and after 4, 8, 12 weeks. Adverse events were recorded.

Results

26 IBD patients were included. 4 weeks use of 2 g/day mesalazine, followed by a 4 week period of 4 g/day mesalazine, led to statistically significant increases (40% and 70%, respectively) in the mean 6-TGN levels. The rise of the active 6-TGN metabolite levels correlated with the mesalazine dosage, but not with mesalazine and N-Ac-5-ASA serum levels. 6-TGN levels significantly increased in a mesalazine dose-dependent manner; mesalazine had no significant influence on the hepatotoxic 6-MMPR metabolite levels during the entire study. 2 patients developed a temporary leucopenia.

Conclusion

IBD patients who are unresponsive or refractory to standard thiopurine therapy, may benefit from the co-administration of mesalazine, due to an increase in 6-TGN metabolites.

PW Wetenschappelijk Platform. 2008;2(3):62-65

beïnvloedt, waarbij de 6-TGN-concentratie toeneemt [7-11]. Om de invloed van mesalazine en zijn metabolieten op het thiopurinemetabolisme te onderzoeken, werd bij patiënten met inflammatoire darmziekten met een vaste onderhoudsdosering azathioprine of mercaptopurine het effect bestudeerd van twee verschillende mesalazinedoseringen op de concentratie van de thiopurinemetabolieten. Tevens werd de veiligheid van gelijktijdig gebruik van mesalazine en azathioprine/mercaptopurine geëvalueerd.

Methoden

Onderzoekspopulatie

Patiënten met inflammatoire darmziekten met een vaste onderhoudsdosering azathioprine of mercaptopurine kwamen in aanmerking voor deelname aan het onderzoek. De inclusiecriteria waren een leeftijd tussen 18 en 70 jaar, *informed consent*, diagnose van ziekte van Crohn of colitis ulcerosa ten minste zes maanden geleden, gebruik van een vaste dosering azathioprine of mercaptopurine gedurende ten minste vier weken, normale nier- en leverfunctie, ziekte in remissie (Harvey Bradshaw Index-score ≤ 4 voor de ziekte van Crohn of de aangepaste Truelove-Witts Index-score ≤ 4 voor colitis ulcerosa). Exlusiecriteria waren beenmergdepressie, aanwezigheid van een actieve infectie, anemie, duodenale ziekte van Crohn waarvan bekend is dat het absorberende darmoppervlak significant is aangedaan, dunnedarmresectie waardoor het absorberende darmoppervlak significant is aangedaan, bekende overgevoeligheid en/of intolerantie voor mesalazinederivaten, gebruik van mesalazinederivaten binnen dertig dagen voorafgaand aan inclusie, gebruik van specifieke interfererende comedicatie (allopurinol, mycofenolaat, ACE-remmers en/of furosemide), zwangerschap, mogelijke zwangerschap of lactatie binnen zes maanden voor of na aanvang van het onderzoek.

De patiënten werden geïnccludeerd tijdens het bezoek aan de polikliniek Maag-Darm-Leverziekten van het VU medisch centrum te Amsterdam en het Maaslandziekenhuis te Sittard. De demografische gegevens werden verzameld voor deelname aan de studie. Ook de ziekteactiviteit werd bepaald voor deelname aan de studie.

Onderzoeksoepzet

In dit prospectieve, multicentrische, farmacokinetisch onderzoek volgden de patiënten naast de gebruikelijke onderhoudsbehandeling met azathioprine/mercaptopurine, achtereenvolgens drie doseerregimes met mesalazine van vier weken: 2 g mesalazine per dag, 4 g mesalazine per dag en geen mesalazine. Het mesalazinepreparaat Pentasa-microgranules werd gebruikt als studiemedicatie.

Aan het begin en aan het eind van elk regime (week 0, 4, 8, 12) werd de concentratie van mesalazine en zijn belangrijkste metabooliet (Ac-5-ASA), de 6-TGN- en de 6-MMPR-metaboliëten in de erythrocyten gemeten, evenals de hematologische en biochemische parameters ten behoeve van de veiligheid.

De medisch-ethische toetsingscommissie van het VU medisch centrum te Amsterdam verleende goedkeuring voor de uitvoering van het onderzoek en de medisch-ethische toetsingscommissie van het Maaslandziekenhuis te Sittard voor de lokale uitvoerbaarheid aldaar. Alle patiënten tekenden een schriftelijke toestemmingsverklaring (*informed consent*).

Als onderzoeksuitkomsten werden de concentraties bepaald van de metaboliëten van azathioprine en mercaptopurine, 6-TGN en 6-MMPR in rode bloedcellen, de serumconcentratie van mesalazine en Ac-5-ASA en de eventueel opgetreden toxiciteit.

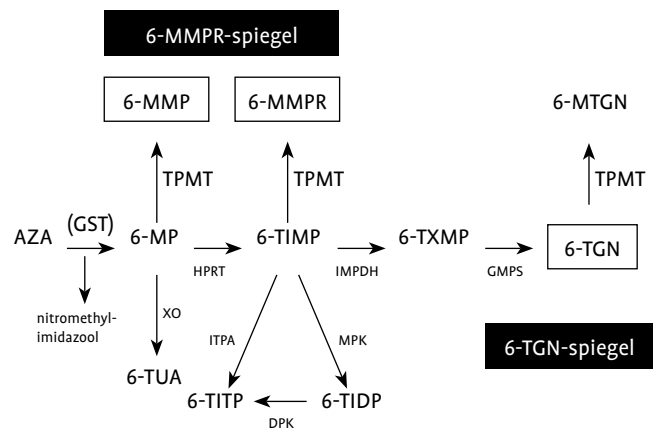
Statistische analyse

De gegevens zijn uitgedrukt als gemiddelde met standaarddeviatie (SD).

SPSS voor Windows versie 11.0 is gebruikt voor de statistische

Figuur 1

Vereenvoudigde weergave van het thiopurinemetabolisme



Azathioprine (AZA) wordt in de darmen en de lever omgezet in 6-mercaptopurine (6-MP), gekatalyseerd door glutathion-S-transferase (GST). Xanthineoxidase (XO) katalyseert 6-MP tot 6-thiourinezuur (6-TUA). Thiopurine-S-methyltransferase (TPMT) methyleert 6-MP tot 6-methylmercaptopurine (6-MMP). Via hypoxanthinefosforibosyltransferase (HPRT) wordt 6-MP geconverteerd tot 6-thio-inosinemonofosfaat (6-TIMP). Via twee andere enzymatische stappen, onder invloed van inosinemonofosfaatdehydrogenase (IMPDH) en guaninemonofosfaatsynthetase (GMPS), worden de actieve (cytotoxische) 6-thioguaninenucleotiden (6-TGN) gevormd, bestaande uit 6-thioguaninemonofosfaat (6-TGMP), 6-thioguaninedifosfaat (6-TGDP) en 6-thioguaninetrifosfaat (6-TGTP). 6-TIMP kan ook worden gemethyleerd door TPMT, wat leidt tot de 6-methylmercaptopurineribonucleotiden (6-MMPR) (bestaande uit 6-methylthio-inosinemonofosfaat, 6-methylthio-inosinedifosfaat en 6-methylthio-inosinetrifosfaat). In een cyclus kan 6-TIMP gefosforyleerd worden tot 6-thio-inosinedifosfaat (6-TIDP) en vervolgens tot 6-thio-inosinetrifosfaat (6-TITP) en uiteindelijk weer terug naar 6-TIMP via inosinetrifosfaatpyrofosfatase (ITPA).

hoge TPMT-activiteit	> hoge 6-MMP- en 6-MMPR-concentraties > lage concentratie van actieve 6-TGN
lage TPMT-activiteit	> lage 6-MMP- en 6-MMPR-concentraties > hoge concentratie van actieve 6-TGN

analyse. Een *mixed model*-analyse is gebruikt voor het aantonen van een significant verschil in thiopurinemetaboolietconcentratie op de vier meetmomenten en voor de correlatie met de serumconcentratie van mesalazine en Ac-5-ASA.

De correlaties tussen parameters zijn – indien vereist – bepaald door gebruik te maken van de Pearson's- of de Spearman's-test. p-waarden $< 0,05$ worden als significant beschouwd.

Tabel 1

Patiëntkarakteristieken (cohort van 26 patiënten na inclusie)

Geslacht

• man	11
• vrouw	15
Leeftijd (jaren)	42 (SD 25)
Body mass index	21,8 (SD 3,7)
Ziekte duur (jaren)	11 (SD 10)

Aard van de ziekte

• ziekte van Crohn	18
• colitis ulcerosa	7
• <i>indeterminate colitis</i>	1
Truelove-Witts-index (n = 8) (mediaan)	0 (range 0-1)
Harvey-Bradshaw-index (n = 18) (mediaan)	1 (range 0-4)
Aard ziekte van Crohn (n = 18)	

• inflammatoir	14
• stenose	2
• fistelziekte	3

Therapie

• azathioprine	20
• mercaptopurine	6

Dagdos

• azathioprine	151 mg (SD 38)
• mercaptopurine	63 mg (SD 21)

Dosering per kg lichaamsgewicht (gemiddelde)

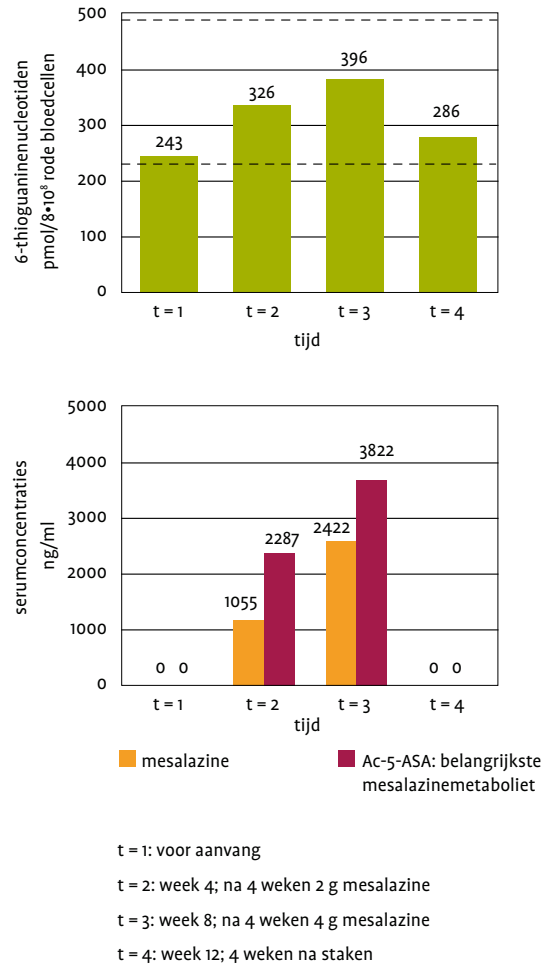
• azathioprine	2,00 mg/kg (SD 0,34)
• mercaptopurine	0,85 mg/kg (SD 0,53)

Duur thiopurinegebruik (maanden) 46 (SD 32) (gemiddelde)

Creatinineconcentratie in serum ($\mu\text{mol/l}$) 88 (SD 11)

Figuur 2

Gemiddelde concentraties 6-thioguaninenucleotiden en mesalazine/Ac-5-ASA tijdens mesalazinegebruik

**Resultaten**

In de periode september 2005 tot juli 2006 zijn 29 patiënten geïncludeerd. 3 patiënten zijn geëxcludeerd; 2 patiënten hielden zich niet aan het protocol en 1 patiënt ondervond bijwerkingen vóór starten met mesalazine. Totaal namen 26 patiënten deel aan het onderzoek. De patiëntkarakteristieken staan weergegeven in tabel 1. Bij gelijktijdig gebruik van mesalazine nam de 6-TGN-concentratie significant toe. In figuur 2 zijn het verloop van de 6-TGN-concentratie en van de mesalazine/Ac-5-ASA-concentratie tegen de mesalazinedosering weergegeven.

Na vier weken gebruik van 2 g mesalazine per dag nam de 6-TGN-concentratie toe met 40% (t = 2).

Na vier weken gebruik van 4 g mesalazine nam bij alle patiënten de gemiddelde 6-TGN-concentratie toe met 70% (t = 3).

Vier weken na staken met mesalazine (t = 4) nam de 6-TGN-concentratie af met 28%.

De toename van de 6-TGN-concentratie was alleen gecorreleerd met de mesalazinedosering.

Gedurende de verschillende doseerregimes van mesalazine veranderde de 6-MMPR-concentratie niet significant. De 6-TGN- en de 6-MMPR-concentraties correleerden niet met de absolute thiopurinedosering of met de relatieve dosering per kg lichaamsgewicht. De aantallen leukocyten en trombocyten veranderden niet significant tijdens de verschillende mesalazinedoseringen. Bij 2 patiënten (8%) trad tijdelijk myelodepressie op bij gelijktijdig gebruik van mesalazine, die zonder interventie weer verdween. Tijdens de hele studie trad geen hepato-, pancreatico-, of nefrotoxiciteit op.

Beschouwing

In dit prospectieve, farmacokinetisch onderzoek is voor het eerst aangetoond dat bij gelijktijdig gebruik van mesalazine en thiopurines de concentratie van de actieve 6-TGN-metabolieten significant toeneemt en dat de mate van toename afhankelijk is van de mesalazinedosering.

Een eerdere in-vitrostudie toonde een remming van TPMT aan door mesalazine [8]. In onze studie had toevoeging van mesalazine echter

geen invloed op de hepatotoxische 6-MMPR-concentraties, wat impliceert dat de in-vivoactiviteit van het methylerende enzym TPMT niet wordt beïnvloed bij een therapeutische mesalazinedosering. Deze bevinding is in overeenstemming met de resultaten van een recente prospectieve studie [12].

Het thiopurinemetabolisme resulteert in diverse metabolieten. De belangrijkste metabolieten, 6-TGN en 6-MMPR, zijn in ons onderzoek gemeten. Op basis van onze gegevens is het mechanisme van de interactie dan ook niet te verklaren. Een plausibele verklaring zou kunnen zijn dat mesalazine en/of Ac-5-ASA specifieke *multidrug-resistant transporters* remmen, waardoor mogelijk de efflux van de 6-TGN afneemt. Dit leidt tot een stijging van de intracellulaire 6-TGN-concentratie bij gelijkblijvende 6-MMPR-concentratie.

Van belang is op te merken dat in ons onderzoek is gebruikgemaakt van mesalazine met verlengde afgifte (Pentasa-microgranules), waardoor de resultaten mogelijk niet (volledig) zijn te extrapoleren naar mesalazinepreparaten met een ander afgifteprofiel dan wel een andere toedieningsvorm.

Leukopenie ten gevolge van thiopurinemonotherapie komt voor bij 2-5% van de patiënten [13]. In onze studie zijn bij 8% van de patiënten (n = 2) tekenen van myelotoxiciteit waargenomen tijdens combinatietherapie van mesalazine en thiopurines. Deze resultaten komen overeen met de incidentie van leukopenie (10%) die is genoemd in een studie van Lowry e.a. [11]. Opvallend is dat de 6-TGN-concentratie op het moment van optreden van de leukopenie bij beide patiënten binnen de therapeutische breedte lag (235-490 pmol/8•10⁸ rode bloedcellen). Myelodepressie is echter ook een zeldzame bijwerking van mesalazine zelf [14], combinatie met andere myelotoxische stoffen zou kunnen leiden tot een additief toxisch effect. Onze resultaten benadrukken dat bij gelijktijdig gebruik van mesalazine en thiopurines adequate hematologische controle essentieel is.

Deze farmacokinetische interactie heeft ook belangrijke therapeutische implicaties voor de behandeling van inflammatoire darmziekten. Aangezien hogere 6-TGN-concentraties geassocieerd zijn met een toename van een klinische respons [15], kunnen patiënten die refractair zijn of niet goed reageren op thiopurinemonotherapie baat hebben bij combinatietherapie met mesalazine. Hoewel de opzet van onze studie niet geschikt is om de therapeutische effectiviteit te evalueren, lijkt de toevoeging van mesalazine zinvol bij patiënten met inflammatoire darmziekten met inadequate 6-TGN-concentraties (<235 pmol/8•10⁸ rode bloedcellen), ondanks gangbare therapeutische doseringen azathioprine en mercaptopurine.

Concluderend: gelijktijdig gebruik van mesalazine en thiopurines leidt tot verschuiving van het thiopurinemetabolisme naar de actieve 6-TGN. Toevoeging van mesalazine leidt tot een dosisafhankelijke toename in 6-TGN-concentratie, waarbij de concentratie van hepatotoxische 6-MMPR onveranderd blijft. Het mechanisme achter deze interactie is onduidelijk.

Patiënten met inflammatoire darmziekten die niet reageren of refractair zijn op thiopurinemonotherapie, kunnen als gevolg van een toename van de actieve 6-TGN-metabolieten baat hebben bij een combinatie met mesalazine. Gelijktijdig gebruik leidt echter tot een licht verhoogde kans op myelodepressie, waardoor extra voorzichtigheid is geboden.

De auteurs bedanken René Vos, Jean Cilissen, Jean-Pierre Bollen, Miet Fiddelaers, Mariëlle Maas, en Milevis Reitsma-Emanuel voor hun inzet bij de uitvoering van het onderzoek en de bepaling van de thiopurinemetabolieten- en mesalazineconcentraties in het bloed.

De auteurs bedanken Frank Rijmen (statisticus, destijds afdeling Epidemiologie en Statistiek, VU Medisch Centrum, Amsterdam) voor het uitvoeren van de statistische analyses van de resultaten van de studie.

De uitvoering van het onderzoek werd voor een deel gefinancierd door Ferring Pharmaceuticals (Hoofddorp) door middel van het ter beschikking stellen van studiemedicatie (Pentasa microgranules sachets 1 g) en een gift ten behoeve van het meten van klinisch chemische parameters.

Dit artikel is gebaseerd op de registratielezing van D.R. Wong.

LITERATUUR

- 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;37:282-97.
- 2 Neurath MF, Kiesslich R, Teichgraber U, et al. 6-thioguanosine diphosphate and triphosphate levels in red blood cells and response to azathioprine therapy in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3(10):1007-14.
- 3 Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2000;118:705-13.
- 4 Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, et al. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002;122:904-15.
- 5 Van Bodegraven AA, Mulder CJ. Indications for 5-aminosalicylate in inflammatory bowel disease: is the body of evidence complete? *World J Gastroenterol.* 2006;12(38):6115-23.
- 6 Sutherland L, Roth D, Beck P, et al. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(4):CD000544.
- 7 Gilissen LPL, Bierau J, Derijks LJJ, et al. The pharmacokinetic effect of discontinuation of mesalazine on mercaptopurine metabolite levels in inflammatory bowel disease patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22:605-11.
- 8 Szumlanski CL, Weinsilboum RM. Sulphasalazine inhibition of thiopurine methyltransferase: possible mechanism for interaction with 6-mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin Pharmacol.* 1995;39:456-9.
- 9 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.
- 10 Lewis LD, Benin A, Szumlanski CL, et al. Olsalazine and 6-mercaptopurine-related bone marrow suppression: a possible drug-drug interaction. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;62:464-75.
- 11 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;49:656-64.
- 12 Dilger K, Schaefer E, Lukas M, et al. Monitoring of thiopurine methyltransferase activity in postsurgical patients with Crohn's disease during 1 year of treatment with azathioprine or mesalazine. *Ther Drug Monit.* 2007;29(1):1-5.
- 13 Derijks LJJ, Gilissen LPL, Hooymans PM, et al. Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease; *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24(5):715-29.
- 14 Pentasa granulaat met verlengde afgifte (mesalazine) [1B tekst]. Hoofddorp: Ferring Pharmaceuticals; 2006.
- 15 Osterman MT, Kundu R, Lichtenstein GR, et al. Association of 6-thioguanine nucleotide levels and inflammatory bowel disease activity: a meta-analysis. *Gastroenterology.* 2006;130:1047-53.