

FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis
UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609



3

II • 2020



FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA je vedecký časopis vydávaný Univerzitou veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika. Časopis je vydávaný štvrťročne s príspevkami v slovenskom, českom alebo anglickom jazyku s abstraktom v angličtine.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA is a scientific journal issued by the University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, the Slovak Republic. The journal is published quarterly with articles in English, or Slovak or Czech with English abstracts.

Šéfredaktorka/Editor-in-Chief:

Výkonná redaktorka/Deputy/Managing Editor:

Redakčná rada/Editorial Board:

Jana Mojžišová

Zita Faixová

Abu-Darwish, M. S. (Shoubak, Jordan), Boknik, P. (Münster, Germany), Castejon, A. M. (Fort Lauderdale, Florida, USA), Csöllei, J. (Brno, Czech Republic), Deelman, L. E. (Groningen, Netherlands), Devinyak, O. (Uzhhorod, Ukraine, El Naggat, El M. B. A. (Damanhour, Egypt), Getova, D. (Plovdiv, Bulgaria), Kyselovič, J. (Bratislava, Slovak Republic), Leddy, J. J. (Ottawa, Canada), Mojžiš, J. (Košice, Slovak Republic), Mučaji, P. (Bratislava, Slovak Republic), Opatrilová, R. (Brno, Czech Republic), Pirník, Z. (Košice, Slovak Republic), Pistl, J. (Košice, Slovak Republic), Şekeroğlu, N., (Turkey, Kilis), Šimůnek, T. (Hradec Králové, Czech Republic), Zitterl, K. (Vienna, Austria)

Vydavateľ/Publisher:

© Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2019

Adresa redakcie/Editor Address:

Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, e-mail: folia.pharma@uvlf.sk

Technická redaktorka/Technical Editor:

Holečková, Z., tel.: +421 917 729 873, e-mail: zuzana.holeckova@uvlf.sk

Grafická úprava/graphic design:

Báštiová, I.

ISSN: 2585-9609

EVČ: EV 5741/18

IČO: 00 397 474

On-line verzia časopisu sa nachádza na web sídle Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach:
<http://www.uvlf.sk/univerzitne-casopisy/folia-pharmaceutica-cassoviensia-vytlacky>.

September 2020

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

VYDÁVA
UNIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE V KOŠICIACH
SLOVAKIA



FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA
II., 3, 2020

PUBLISHED BY
THE UNIVERSITY OF VETERINARY MEDICINE AND PHARMACY IN KOŠICE
2020



EDITORIÁL

Milé čitateľky a čitatelia,

Po tom, čo sa v júni zrušili takmer všetky opatrenia a otvorili sa hranice, nastal opäť nárast nových prípadov na ochorenie COVID-19. Preto s príchodom septembra sa v súvislosti s pandémiou koronavírusu obnovili opatrenia, ktoré platili od marca.

Termín epidémia/pandémia sa nepoužívajú len v spojitosti so šírením infekčných chorôb. V roku 2010 v USA sa objavil termín „epidémia opiátov“, kedy sa zaznamenal zvýšený nárast počtu úmrtí a hospitalizácií v dôsledku užívania opiátov. World Health Organization (WHO) zaviedla pojem „globezita“ ako dôsledok nárastu počtu ľudí s obezitou a nadhmotnosťou. Obezita je spojená s kardiovaskulárnymi, nádorovými chorobami, s cukrovkou 2. typu a ďalšími závažnými chronickými ochoreniami.

Verím, že si so záujmom prečítate všetky články, ktoré sme pre Vás pripravili do tretieho čísla.

V najnovšom čísle vedeckého časopisu *Folia Pharmaceutica Cassoviensia* sa dočítate o odpovedi buniek hematoencefalickej bariéry počas meningokokovej neuroinfekcie, o možnosti farmakoterapie zlyhávajúceho srdca a o klinickom význame liekových interakcií u pacientov s hypertenziou. V ďalších článkoch sa autori venujú preparatívnej chromatografii oligosacharidov hyaluronanu testovaných na cytotoxicitu, imunologickým aspektom reumatoidnej artritídy - štúdia slovenských pacientov s pokročilou formou ochorenia a liečených biologickou liečbou a stanoveniu syntetických sladidiel vo farmaceutických produktoch. V posledných článkoch nájdete bližšie informácie o adherencii pacientov k liečbe reumatoidnej artritídy, o hypertyreóze v gravidite a jej vplyve na dieťa a o retrospektívnej analýze terapie u pacientok s HER2 pozitívnym karcinómom prsníka. V tomto vydaní sa nachádza aj kazuistika s názvom Treatment options for acute lymphoblastic leukemia in children and related risks: a case report.

Prajem Vám príjemné čítanie,

prof. MVDr. Zita Faixová, PhD.
výkonná redaktorka



EDITORIAL

Dear readers,

After the time in June, when almost all safety measures were abolished, an increase in new cases of COVID-19 infection occurred again. Therefore, in early September, in the context of the coronavirus pandemics, the safety measures valid since March were restored.

The term epidemic/pandemic can be used not only in connection with the spread of infectious diseases. In 2010, the term „opioid epidemic“ appeared in the USA due to higher increase of number of deaths and hospitalizations as a result of opiate use. The World Health Organization (WHO) introduced the term „globesity“ due to the increased number of people with obesity and overweight. Obesity is associated with cardiovascular diseases, cancer, type 2 diabetes mellitus and other serious chronic diseases.

I believe you will read all the articles we prepared for the 3rd issue with interest. In the latest issue of *Folia Pharmaceutica Cassoviensia* scientific journal you can read about the response of blood-brain barrier cells during meningococcal neuroinfection, the possibilities of heart failure pharmacotherapy or the clinical importance of drug interactions in patients with hypertension. In the following articles the authors deal with preparative chromatography of hyaluronic oligosaccharides tested on cytotoxicity, the immunological aspects of rheumatoid arthritis – study of the Slovak patients with the advanced disease and treated with biological treatment, and the determination of synthetic sweeteners in pharmaceutical products. In the last couple of articles you can find closer information on adherence of patients to the therapy of rheumatoid arthritis, hypothyroidism in pregnancy and its impact on the child or the retrospective analysis of the therapy of HER2-positive breast cancer patients. In this issue we also present the case study titled „Treatment options for acute lymphoblastic leukemia in children and related risks: a case report.“

I wish you a pleasant reading,

Prof. Zita FAIXOVÁ, DVM, PhD.
Managing Editor

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, II., 3, 2020

O B S A H

Mochnáčová, Evelína; Mertinková, Patrícia; Kulkarni, Amod; Bhide, Katarína; Tkáčová, Zuzana; Hruškovcová, Jana; Bhide, Ramesh Mangesh:	
ODPOVEĎ BUNIEK HEMATOENCEFALICKEJ BARIÉRY POČAS MENINGOKOKOVEJ NEUROINFEKCIE ANALYSIS OF INFLUENCE OF ANTIPARKINSONIAN DRUGS ON IMPULSE CONTROL DISORDERS MEASURED BY PATIENT'S SELF-EVALUATION METHOD.....	7
Sučik, Monika; Faixová, Dominika; Gažová, Andrea; Kyselovič, Ján:	
MOŽNOSTI FARMAKOTERAPIE ZLYHÁVAJÚCEHO SRDCA POSSIBILITIES OF HEART FAILURE PHARMACOTHERAPY	18
Hodorová, Ingrida; Sukeľ, Ondrej; Marcinčáková, Dana:	
KLINICKÝ VÝZNAM LIEKOVÝCH INTERAKCIÍ U PACIENTOV S HYPERTENZIOU THE CLINICAL IMPORTANCE OF DRUG INTERACTIONS IN PATIENTS WITH HYPERTENSION.....	27
Brečková, Dominika; Harvanová, Jarmila:	
PREPARATÍVNA CHROMATOGRFIA OLIGOSACHARIDOV HYALURONANU TESTOVANÝCH NA CYTOTOXICITU PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY OF HYALURONAN OLIGOSACCHARIDES TESTED ON CYTOTOXICITY.....	34
Kováč, Jozef; Mudroňová, Dagmar; Macejová, Želmíra; Danko, Jakub:	
IMUNOLOGICKÉ ASPEKTY REUMATOIDNEJ ARTRITÍDY – ŠTÚDIA SLOVENSKÝCH PACIENTOV S POKROČILOU FORMOU OCHORENIA A LIEČENÝCH BIOLOGICKOU LIEČBOU IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF RHEUMATOID ARTHRITIS – STUDY OF SLOVAK PATIENTS WITH ADVANCED DISEASE AND TREATED BY BIOLOGICAL TREATMENT.....	41
Černáková, Lenka; Kudličková, Zuzana; Hudák, Alexander:	
STANOVENIE SYNTETICKÝCH SLADIDIEL VO FARMACEUTICKÝCH PRODUKTOCH DETERMINATION OF SYNTHETIC SWEETENERS IN PHARMACEUTICAL PRODUCTS.....	49
Rozman Antolíkova, Natália:	
TREATMENT OPTIONS FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN CHILDREN AND RELATED RISKS: A CASE REPORT.....	58
Zummerová, Andrea; Kolesárová, Mária:	
ADHERENCIA PACIENTOV K LIEČBE REUMATOIDNEJ ARTRITÍDY ADHERENCE OF PATIENTS TO THE THERAPY OF RHEUMATOID ARTHRITIS.....	69
Kostová, Lenka; Piešová, Elena:	
HYPOTYREÓZA V GRAVIDITE A JEJ VPLYV NA DIEŤA HYPOTHYROIDISM IN PREGNANCY AND ITS IMPACT ON THE CHILD	79
Zigová, Martina; Vasková, Michaela:	
RETROSPEKTÍVNA ANALÝZA TERAPIE U PACIENTOK S HER2 POZITÍVNYM KARCINÓMOM PRSNÍKA RETROSPECTIVE ANALYSIS OF THERAPY OF HER2 POSITIVE BREASTS CANCER PATIENTS	90
Pokyny pre autorov.....	101



ODPOVEĎ BUNIEK HEMATOENCEFALICKEJ BARIÉRY POČAS MENINGOKOKO- VEJ NEUROINFEKCIE

THE RESPONSE OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER CELLS DURING MENINGOCOCCAL NEUROINFECTION

Mochnáčová, Evelína¹; Mertinková, Patrícia¹; Kulkarni, Amod^{1,2};
Bhide, Katarína¹; Tkáčová, Zuzana¹; Hruškovcová, Jana¹; Bhide, Ramesh Mangesh^{1,2}

¹Laboratórium biomedicínskej mikrobiológie a imunológie UVLF
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

²Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied
Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava
Slovenská republika

evelinakanova31@gmail.com

ABSTRAKT

Hematoencefalická bariéra (HEB) zohráva nezastupiteľnú úlohu v ochrane centrálnej nervovej sústavy (CNS) pred patogénmi a toxínmi cirkulujúcimi v krvi. Porušenie tejto bariéry a infiltrácia patogénu do CNS vedie k neurozápalu a degradačným procesom, ktoré často vyústia k ireverzibilnému poškodeniu mozgu. Jedným z klinických prejavov neurozápalu je meningitída, ktorá vedie k aktivácii signálnych dráh v infikovaných bunkách. Tento článok uvádza poznatky o dráhach aktivovaných v HEB počas meningokokovej neuroinfekcie. Oboznámenie sa s javmi prebiehajúcimi na molekulovej úrovni je nevyhnutné pre vývoj efektívnych liečiv proti bakteriálnym neuroinfekciám.

Kľúčové slová: astrocyty; β -arrestin; endotelové bunky; hematoencefalická bariéra; mikroglie; *Neisseria meningitidis*; neuroinfekcia.

ABSTRACT

The blood-brain barrier (BBB) plays an important role in the protection of central nervous system (CNS) against pathogens and toxins circulating in blood. A breach in the BBB leads to the neuroinfection and the development of destructive processes and formation of irreparable damage in the CNS. One of the clinical manifestations of neuroinflammation is meningitis, which leads to several downstream molecular processes. This paper summarizes information on pathways activated in the BBB in response to the *Neisseria*

meningitidis. The knowledge of these molecular events is extremely essential for development of effective therapeutics.

Key words: astrocytes; β -arrestin; blood-brain barrier; endothelial cells; microglia; *Neisseria meningitidis*; neuroinfection.

ÚVOD

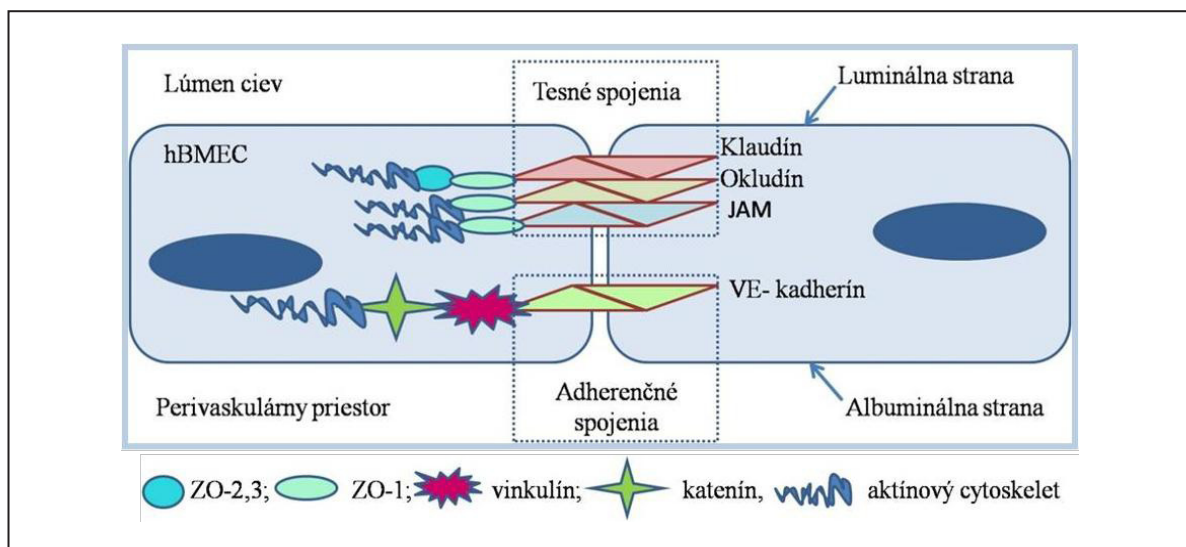
Neisseria meningitidis je anaeróbny Gram-negatívny diplokok, schopný invadovať do centrálnej nervovej sústavy (CNS) a vyvolať závažnú meningokokovú infekciu. V súčasnosti je infekcia *N. meningitidis* jednou z celosvetovo najčastejších príčin morbidita a mortality ľudí v rámci bakteriálnych meningeálnych ochorení (Halperin a kol., 2012). Poškodenie tkaniva vyvolané ako samotnou infekciou, tak aj vplyvom buniek imunitného systému, (neurozápalu) môže u pacientov po prekonaní ochorenia viesť k celoživotným následkom. Už v počiatočných štádiách neuroinfekcie je pozorované zvýšenie hladiny prozápalových cytokínov, akými sú IL-6 a TNF- α . Tieto signálne molekuly majú okrem iného aj nepriaznivý vplyv na CNS a vedú k jej poškodeniu, a práve preto bola CNS dlhé obdobie považovaná za „bezbrannú obeť“ imunitného systému. V súčasnosti prebieha snaha o objasnenie molekulových mechanizmov prebiehajúcich v CNS počas neuroinfekcie ako zo strany patogénu, tak aj hostiteľa.

Hematoencefalická bariéra

Jednou zo základných podmienok pre vyvolanie meningokokovej neuroinfekcie je schopnosť patogénu prekonať HEB. HEB, označovaná aj pojmom „neurovaskulárna jednotka“, je dynamické, interaktívne a regulačné tkanivo, ktoré zabezpečuje komunikáciu medzi CNS a krvou (Banks, 2015). Táto štruktúrna a funkčná bariéra poskytuje ochranu CNS pred mikroorganizmami a rôznymi toxínmi cirkulujúcimi v krvi, akými sú endogénne metabolity,

xenobiotiká, ale aj rôzne exogénne látky. HEB u ľudí sa skladá zo štyroch komponentov, a to z mozgových endotelových buniek (hBMECs – human brain microvascular endothelial cells), pericytov, astrocytov a z bazálnej membrány. Vaskulárnu časť tejto bariéry tvoria hBMECs spolu s pericytmi, ktoré obklopuje bazálna membrána. Bazálna membrána HEB pozostáva z dvoch vrstiev. Jedna vrstva tesne prilieha na endotel ciev, zatiaľ čo druhá je spojená s parenchýmom. Obidve vrstvy sú navzájom vo veľmi blízkom kontakte, pričom miestami môžu až splývať. Na takto vytvorenú denznú membránu nasadajú výbežky astrocytov (tzv. *astrocyte end-feet*^{b)}) tvoriace kontakt astrocytov s hBMEC. Súčasťou bazálnej membrány sú taktiež aj proteázy. Príkladom sú matrix metaloproteinázy^{b)} (MMP), ktoré majú účasť pri transmigrácii leukocytov, respektíve patogénov cez bariéru (Geurts a kol., 2012). hBMECs vykazujú určité špecifiká, čím sa podstatne líšia od bežných endotelových buniek. hBMECs nie sú fenestrované a na povrchu prezentujú vysoko funkčnú sieť intramembránových proteínových vlákien tvoriacich tzv. aderenčné a tesné spojenia (adherence and tight junctions), spoločne zvané ako spojovací komplex (JC – junctional complex) (viď obr. 1). Tento komplex zabezpečuje homeostázu CNS tým, že bráni prechodu makromolekúl medzi luminálnou a albuminálnou stranou hBMECs. Na tvorbe tesného spojenia sa podieľajú predovšetkým tri hlavné transmembránové skupiny proteínov: okludíny, kladíny a skupina JAM^{e)} (junctional adhesion molecules). Tieto transmembránové proteíny navzájom interagujú v paracelulárnom priestore homofilickým spôsobom^{c)}, zatiaľ čo ich intracelulárne domény sú spojené s cytoplazmatickými proteínmi, ako sú napr. proteíny zonula occludens^{d)} (ZO) 1 – 3. Na uvedené cytoplazmatické proteíny je napojený celulárny aktínový cytoskelet (AC). Interendoteliálny spojovací komplex zahŕňa taktiež aderenčné spojenia, lokalizované na bazolaterálnej strane hBMEC, ktorých funkcia spočíva v stabilizácii tesných spojení. Hlavným komponentom aderenčných spojení je VE-kadherin^{e)} (vascular endothelial cadherin),

Obr. 1: Schématické znázornenie spojovacieho komplexu



Spojovací komplex pozostáva z tesných a adherenčných spojení. Tesné spojenia sú tvorené spojením kladínu, okludínu a JAM homofilickým spôsobom, a sú pomocou ZO-1-3 prepojené s aktívnym cytoskeletom bunky. VE-kadherín má účasť na tvorbe adherenčných spojení, na ktoré sa napájajú linkery vinkulín a katenín. Prerušenie týchto spojení vedie k narušeniu integrity HEB.

Zdroj: Join-Lambert a kol., 2010

ktorý je spojený s AC prostredníctvom katenínov a vinkulínov) (catenins, vinculins) (Join-Lambert a kol., 2010; Combes a kol., 2012).

Molekulové procesy prebiehajúce počas neuroinfekcie

Spôsoby prechodu meningokoka cez HEB

Patogény dokážu interagovať s receptormi nachádzajúcimi sa na povrchu mozgových endotelových buniek prostredníctvom proteínových ligandov. Takáto interakcia bola popísaná v prípade *N. meningitidis*, ale aj iných patogénov (Bencurova a kol., 2011; Jimenez-Munguia a kol., 2018; Kanova a kol., 2018). V našej predchádzajúcej štúdii sme identifikovali 41 proteínov *N. meningitidis* schopných interagovať s hBMECs, medzi ktorými boli proteíny ako MafA, NadA, porín B, skupiny adhezínov a lipoproteínov, a iné (Kanova a kol., 2018). V procese neuroinflammácie nastávajú zmeny ako funkčné, tak aj štruktúrne. Príkladom takýchto procesov je zvýšená produkcia chemokínov a expresia adhezívnych molekúl, čo má za následok prechod leukocytov z krvného riečiska cez HEB a ich akumuláciu v

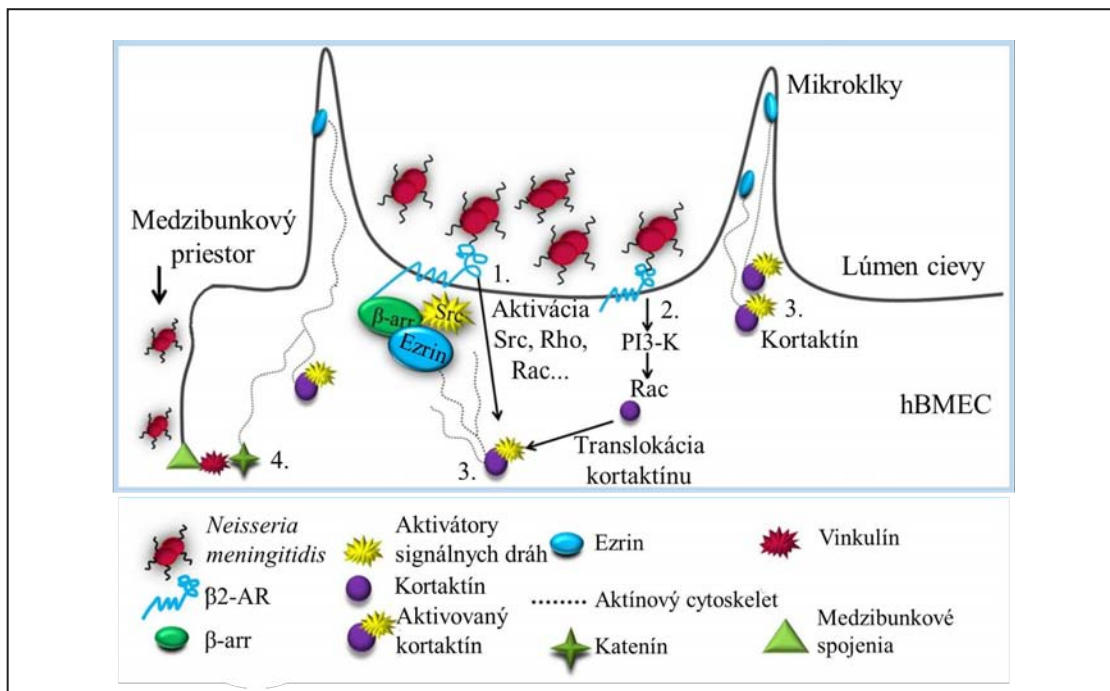
perivaskulárnom priestore postkapilárnych venúl (Raine a kol., 1990; Engelhardt a Ransohoff, 2005). Predpokladá sa, že *N. meningitidis* dokáže tento spôsob vstupu efektívne využiť v počiatkových štádiách tak, že mimikuje leukocyty a tým využíva vstupnú bránu leukocytov pre svoj prospech (Doulet a kol., 2006). *N. meningitidis* ako extracelulárny patogén je odolná voči fagocytóze, resp. voči účinku komplementu vďaka prítomnosti rôznych faktorov virulencie. Jedným z významných faktorov virulencie je polysacharidová kapsula nachádzajúca sa nad vonkajšou membránou baktérie. Kapsula dáva *N. meningitidis* možnosť transmisie a kolonizácie hostiteľského epitelu, poskytuje ochranu voči desikácii, opsonizácii, ale aj už spomenutej fagocytóze a komplementom sprostredkovanej smrti patogénu (Frosch a kol., 1989).

Spojenie patogénu s receptorom/mi hostiteľskej bunky aktivuje v týchto bunkách rôzne signálne kaskády, ktoré vedú k prechodu baktérie do CNS. Príkladom je interakcia meningokokového ligandu typu IV pilin (tfp) s receptormi endotelových buniek (Virji a kol., 1991; Nassif a kol., 1994). Na začiatku *N. meningitidis* vyvoláva pleiotropické signálne javy

v endotelových bunkách, vďaka ktorým meningokoky dokážu odolávať vplyvom prúdu krvi v cievach a tým získavajú čas potrebný na uchytenie sa na cievny endotel. *In vitro* bolo dokázané, že enkapsulované meningokoky vytvárajú na spodku bakteriálnej kolónie špecifický šesťhranný molekulárny komplex podobný komôrke včelieho platu, tzv. kortikálny plak (cortical plaque). Tento plak pozostáva zo zhukov Opa (opacity associated) receptorov, transmembránových signálnych proteínov, aktínových mikrofilamentov a ezrinu. Kortikálne plaky slúžia početným signálnym funkciám, ktoré následne umožňujú prepuknutie bakteriálnej neuroinfekcie. Tvorba takýchto plakov vyúsťuje k obídniu molekulárnych linkerov (ezrin a moesin^g), adhezívne molekuly a membránové receptory) a následne k lokalizovanej polymerizácii kortikálneho aktínu. Následkom týchto pochodov je formácia štruktúr podobných mikrokľom na cytoplazmatickej membráne, ktoré prenikajú pomedzi baktérie. Takýmto spôsobom dokážu baktérie odolávať účinkom prúdu krvi, ktorý za fyziologických okolností znemožňuje prichytenie patogénov k endotelovým bunkám ciev a následne sú takto prichytené baktérie schopné kolonizácie cievneho endotelu (Eugene a kol., 2002; Mikaty a kol., 2009). Bakteriálne indukované zmeny v cytoskelete hostiteľských buniek vedú k aktivácii ďalších početných signálnych molekúl, ako napríklad k aktivácií Src kinázy^h), GTPázyⁱ) Rho^j), Cdc a Rac, ďalej nastáva aktivácia kortaktínu^k) sprostredkovaná PI3-kinázou a spustenie kináz aktivovaných mitogénom (Coureuil a kol., 2010). Na molekulárnom základe tvorby kortikálnych plakov sa podieľa ubikvitárne sa vyskytujúca molekula β -arrestin (β -arr), prvotne popísaná ako regulátor GPCR^l) (G protein-coupled receptors). β -arr sa taktiež podieľa na aktivite viacerých signálnych dráh vyvolaných *N. meningitidis* ako tzv. adaptorový proteín, čo znamená, že vystupuje ako prídavný proteín k hlavnému proteínu účinkujúcemu v signálnej dráhe. Jeho funkciou počas invázie buniek meningokokom je aktivácia Src kinázy pod agonizmom obsadenými receptormi (Luttrell a kol., 1999). Ďalej β -arr účinkuje ako podporná molekula pre

GPCR-sprostredkovanú aktiváciu MAP-kináz ERK1/2^m) do cytoplazmatických kompartmentov, a ako podpora pre aktiváciu polymerizácie kortikálneho aktínu (DeFea a kol., 2000; Luttrell a kol., 2001; Scott a kol., 2006). Aktivácia VEGF (Vascular endothelial growth factor) nastávajúca počas endocytózy fosfo-VE-kadherínu do klatrinom obalených vezikúl za účasti β -arr podporuje rozrušenie adhezívnych spojení, čo vedie k zvýšeniu vaskulárnej permeability (Gavard a Gutkind, 2006). *In vitro* bolo dokázané, že kolónie *N. meningitidis* lokalizované na povrchu hBMEC podporujú prechod β -arr do ich vnútornej časti plazmatickej membrány. Pre nasledujúce signálne dráhy podmienené *N. meningitidis* je β -arr translokovaný pod kolóniami podpornou platformou. Jedným z receptorov, ktorý je expresovaný na povrchu hBMEC línií je beta-2 adrenoreceptor (β 2-AR) patriaci do skupiny GPCR. β 2-AR sa zúčastňuje v procese tvorby kortikálnych plakov (viď obr. 2) a zároveň je dôležitým činiteľom umožňujúcim prechod baktérií skrz vrstvu buniek. Fyziologickou funkciou tohto receptora je jeho schopnosť odpovedať na cirkulujúce katecholamíny v krvi a tým kontrolovať vaskulárnu homeostázu a kontrolu signálov prostredníctvom heterotrimerického G_s proteínu a β -arr (DeWire a kol., 2007). Aktiváciou β 2-AR a β -arr situovaných naspodku meningokokových mikrokolónií je možné spustiť rôzne signálne kaskády, akými sú napríklad indukcia akumulácie cholesterolu, fosfatidylinozitol-4,5-difosfátu, ezrin-radix-moesin^g) (ERM) proteínov, sarkoma (Src) tyrozín kinázy, ktoré sú ďalej schopné ovplyvňovať iné receptory a s membránou spojené proteíny nachádzajúce sa pod mikrokolóniami (Coureuil a kol., 2014). Výsledným efektom týchto spomenutých aktivovaných dráh je modifikácia cytoskeletu bunky a formácia už vyššie spomenutých štruktúr podobných mikrokľom na cytoplazmatickej membráne (Mikaty a kol., 2009; Coureuil a kol., 2010). Pomocou týchto štruktúr sa *N. meningitidis* zhlučuje vo vnútri novovznikajúcej intracelulárnej vakuoly, a takto prechádza cez mozgovú endotelovú bunku do CNS. Na druhej strane, počas adhézie

Obr. 2: Schematické znázornenie signálnych dráh aktivovaných *N. meningitidis*



1) Adherencia *N. meningitidis* sprostredkovaná interakciou typu IV pilin a neznámeho receptora na BMEC. Následkom tejto interakcie je aktivácia povrchového receptora $\beta 2$ -AR na povrchu hBMEC a molekuly β -arr, čo vedie k organizácii špecifického molekulového komplexu na povrchu hBMEC zvaného kortikálny plak. Tento kortikálny plak podnecuje ďalšiu akumuláciu a aktiváciu β -arr, ezrinu a rôznych aktivátorov signálnych dráh (Src kináza, Rho, Rac, Cdc). 2 – 3) Súčasne prebieha aktivácia PI3-K, ktorá aktivuje Rac, a ten je následne aktivátorom kortaktínu. Takto aktivovaný kortaktín sa premiestňuje na aktínový cytoskelet bunky a následne je fosforylovaný pomocou Src kinázy. Fosforylovaný kortaktín prispieva k formácii štruktúr podobných mikroklkom na cytoplazmatickej membráne bunky. Pomocou týchto štruktúr je *N. meningitidis* nielen zachytená na povrchu BMEC, ale aj postupným vytváraním intracelulárnej vakuoly pohltaná do bunky. Tým je zabezpečený transcelulárny prechod patogénu. 4) S reorganizáciou aktínového cytoskeletu je spojené aj prerušenie medzibunkových spojení (adherenčné a tesné spojenia), čo má za následok paracelulárny prechod *N. meningitidis* do CNS. Zdroj: Lambotin a kol., 2005; Miller a kol., 2013

meningokoka na povrch endotelových buniek bola pozorovaná relokácia proteínov tesných spojení popod miesto prichytenia baktérií. Tým vzniká oslabenie intercelulárnych spojení, čo vedie k translokácii meningokokov paracelulárnym spôsobom. Doposiaľ bol tento proces popísaný iba v prípade *N. meningitidis*. Z týchto zistení vyplýva, že signálne dráhy podmienené interakciou beta-2 adrenoreceptor/ β -arrestin sú dôležité pre stabilnú adhéziu meningokoka na hBMEC a následné prekročenie HEB (Coureuil a kol., 2010). V jednej z našich nedávnych štúdií sme sa zaoberali vplyvom *N. meningitidis* a jej liganda MafA na hBMECs

(Kanova a kol., 2019). Zistili sme zvýšenú reguláciu génov kódujúcich VCAM-1, ICAM-1, CD44. Tieto molekuly sú schopné kooperovať s proteínmi ERM, ktoré prispievajú k relokácii aktínového cytoskeletu. Ďalej bola pozorovaná zvýšená regulácia génov kódujúcich proteíny podieľajúce sa na procesoch endocytózy, reorganizácie extracelulárnej matrix, ako aj na apoptóze (Kanova a kol., 2019). Z týchto výsledkov je možné usudzovať, že *N. meningitidis* prostredníctvom jej ligandov aktívne podmieňuje spúšťanie signálnych dráh v hBMECs umožňujúcich jej prechod do CNS.

Regulačné mechanizmy počas neurozápalu

Vďaka zmenám prebiehajúcim na HEB je možný vstup nielen patogénu, ale taktiež aj pasáž imunitných buniek do mozgu. Jednou z majoritných zmien je zvýšená regulácia adhezívnych molekúl na povrchu hBMECs (ICAM-1, VCAM-1 a iné), čo umožňuje leukocytom prechádzať skrz HEB. Prítomnosť lymfocytov v perivaskulárnom priestore je úzko kontrolovaná expresiou unikátneho profilu adhezívnych molekúl nachádzajúcich sa na povrchu parenchymálnych lymfocytov. Týmto sa tieto lymfocyty líšia oproti bunkám imunitného systému z periférnej krvi (Raine a kol., 1990; Engelhardt a kol., 1998). V perivaskulárnom priestore lymfocyty prichádzajú do kontaktu buď s tzv. limitujúcou membránou glieⁿ), alebo so samotnými astrocytmi. Aktivované astrocyty majú schopnosť uvoľňovať faktory indukujúce apoptózu, inhibujúce proliferáciu a povzbudzujúce diferenciáciu na regulačné T lymfocyty (Treg) (Meinl a kol., 1994; Bechmann a kol., 1999). Treg, známe aj ako supresorové T lymfocyty, sú subpopuláciou T lymfocytov, ktoré zmiernujú imunitné odpovede, udržiavajú toleranciu vlastných antigénov, a tým prispievajú k prevencii autoimunitných ochorení. Treg lymfocyty vystupujú ako imunosupresívne bunky, resp. bunky znižujúce reguláciu a proliferáciu efektorových T lymfocytov (Bettelli a kol., 2006).

Ďalšími dôležitými bunkami regulujúcimi neuroinflamačné procesy sú okrem astrocytov aj neuróny a mikroglie, ktorých primárnou úlohou je eliminácia infekčného agensu v čo najkratšej dobe. Ďalšou funkciou týchto buniek je schopnosť okamžite reagovať na prítomnosť patogénov, resp. ich produktov rýchlou sekréciou zápalových mediátorov alebo imunosupresívnych cytokínov, ktoré znižujú rozsah poškodenia CNS neuroinfekciou. Experimentálne bolo dokázané, že mikroglie si vyvinuli schopnosť expresie ko-stimulačnej molekuly B7 Homolog 1 (B7-H1), známej aj ako Programmed death-ligand 1 (PD-L1)^o), ktorý inhibuje aktiváciu T lymfocytov a produkciu cytokínov (Magnus a kol., 2005). Neuróny

napríklad produkujú cytokín zvaný Transforming growth factor beta (TGFβ), ktorý podporuje konverziu CD4 T lymfocytov na Treg lymfocyty. Tento efekt môže byť indukovaný aj expresiou PD-L1 (Liu a kol., 2006).

Účinok mikroglie

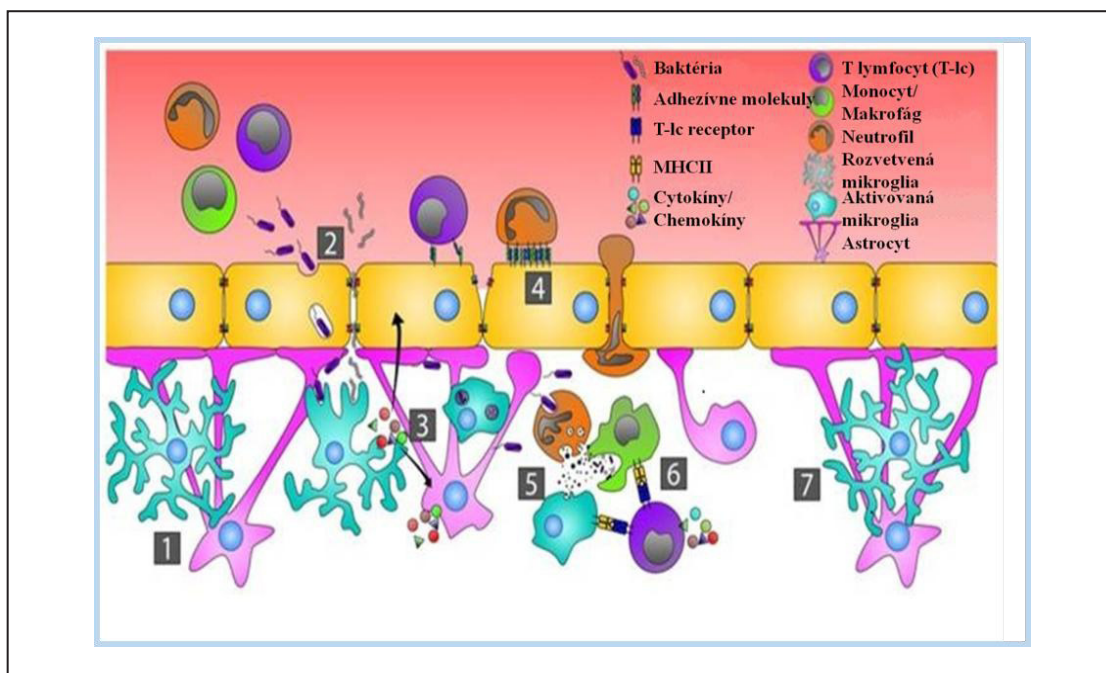
Mikroglie prezentujú na svojom povrchu širokú škálu imunitných receptorov, známych ako PRR^p) (pattern recognition receptor). Táto skupina PRR zahŕňa rozsiahlu podskupinu tzv. Toll-like receptorov (TLR), ktoré interagujú s PAMP^q) (Pathogen associated molecular patterns). Touto interakciou sú mikroglie aktivované a následne u nich prebiehajú morfológické zmeny. Mikroglie sú schopné fagocytovať baktérie a následne prezentovať ich antigény CD4 T lymfocytom nachádzajúcim sa v mozgu. Počas neuroinfekcie leukocyty migrujú do miesta zápalu pod vplyvom pro-inflamačných cytokínov a chemokínov produkovaných práve mikrogliaou. V prítomnosti niektorých neuropatogénov bola popísaná mikroglálna produkcia nasledovných molekúl: tumor nekrotizujúci faktor (TNF α), interleukin 6 a 12 (IL-6, IL-12), C-X-C motif ligand (CXCL1), CXCL2, C-C motif ligand (CCL2), CCL3, CCL5. CXCL1 a CXCL2, ktoré slúžia ako chemotaxíny pre neutrofile, CCL2, CCL3 pre monocyty a CCL5 pre T lymfocyty (Huber a kol., 2014) (viď. obr. 3).

Aktivované mikroglie môžu výrazne ovplyvňovať zvýšenie permeability HEB prostredníctvom sekrécie MMP. Majú priamu baktericídnu aktivitu vďaka sekrécii proteáz, napríklad na báze reaktívneho kyslíka alebo reaktívneho dusíka, ktorých účinkom je poškodenie membrány baktérie, a tým navodenie smrti patogénu (Leppert a kol., 2001).

Účinok astrocytov

Iným typom buniek podieľajúcim sa na eliminácii zápalového procesu sú astrocyty. Tieto bunky sú taktiež aktivované pomocou bakteriálnych PAMP alebo cytokínmi produkovanými mikrogliaou. Tieto

Obr. 3: Znáznornenie imunitnej odpovede počas bakteriálnej neuroinfekcie



1) Znáznornenie fyziologického stavu v CNS. 2 – 3) Po prechode baktérií do CNS sú prostredníctvom väzby PAMPS a PRR rozpoznávané mikrogliami a astrocytmi. Táto interakcia vedie k aktivácii mikroglie a astrocytov, ktoré vyvolávajú štrukturálne zmeny týchto buniek, zvýšenú produkciu zápalových mediátorov, ktoré následne prilákajú neutrofile, monocytu a T lymfocyty. Súčasne prebieha zvýšená expresia adhezívnych molekúl (ICAM-1 a VCAM-1) na endotelových bunkách. 4 – 5) V priebehu neuroinfekcie sú z krvného riečišťa chemotakticky prilákané cirkulujúce neutrofile, monocytu a T lymfocyty do CNS. Neutrofile fagocytujú a priamo usmrcujú patogén uvoľňovaním defenzínov, lytických enzýmov a antimikrobiálnych peptidov. 6) Pre otvorenie HEB a prilákanie T lymfocytov sú taktiež dôležité molekuly, ktoré produkujú neutrofile, ako napr. MMPs, IL-6, IL-8, CXCL9 a CXCL10. Bakteriálne antigény sú prezentované T lymfocytom pomocou mikroglie alebo infiltrovanými monocytmi. 7) Po prekonaní meningokokovej infekcie nastáva obnovenie tesných medzibunkových spojení a umiestnenie mikroglie a astrocytov do pokojného stavu.

Zdroj: Huber a kol., 2014

aktivátory vyvolávajú štrukturálne zmeny astrocytov, ktoré následne spúšťajú uvoľnenie vrodených zápalových mediátorov, ako napríklad proteíny komplementu, IL-1 β , IL-6 a chemokínov CCL2, CCL3, CXCL1, CXCL10, ktorých úlohou je opäť prilákanie neutrofilov, monocytov a T lymfocytov. Navyše astrocyty majú schopnosť zvýšiť expresiu bunkových adhezívnych molekúl, intracelulárnych adhezívnych molekúl (ICAM) a vaskulárnych adhezívnych molekúl (VCAM-1), ktoré napomáhajú infiltrácii monocytov a T lymfocytov do CNS. Zvýšenie expresie týchto molekúl vzniká ako následok po stimulácii interferonom (IFN- γ), TNF- α a IL-1 β

(Huber a kol., 2014). Súčasne s týmito eliminačnými funkciami astrocytov a mikroglie je popísaná aj ich imunosupresívna úloha. Tá pozostáva predovšetkým z produkcie rôznych imunosupresívnych cytokínov, akými sú IL-10, IL-19, IL-20, IL-24 – člen skupiny IL-10. Predovšetkým IL-19 vystupuje ako dôležitý supresorový cytokín oslabujúci zápalovú odpoveď vyvolanú astrocytmi (Cooley a kol., 2014). Podobne ako vyššie spomenuté bunky, tak aj v prípade pericytov (PC) bola pozorovaná produkcia chemokínov a cytokínov (CXCL8, IL-6, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1 a CXCL10), ktoré sú stimulované vrodenými

imunitnými bunkami (Griffith a kol., 2014; Liu a kol., 2016). Tieto bunky efektívne regulujú zápalové procesy prebiehajúce v mozgu za účelom eliminácie patogénu a súbežne zabezpečujú uvoľnenie imunosupresívnych látok tlmiacich škodlivé účinky inflamačných procesov.

ZÁVER

Vplyv buniek hematoencefalickej bariéry má nezastupiteľnú úlohu v boji s neuropatogénmi. Nielen samotný imunitný systém, ale aj bunky CNS napomáhajú pri eliminácii patogénu a navodení pôvodného fyziologického stavu. Pochopenie základných molekulových mechanizmov prebiehajúcich počas neurozápalu vyvolaného *N. meningitidis* vytvára základňu pre vývoj efektívnych liečiv.

Vysvetlivky

- a) **Astrocyte end-feet:** časti astrocytárnych výbežkov tesne priliehajúce na cievy v mozgu. Sú zložkou formujúcou HEB poskytujúcou štruktúrnú integritu krvným cievam.
- b) **Matrix metaloproteinázy (MMP):** skupina minimálne deviatich homológov endopeptidáz vyžadujúcich pri svojej aktivite zinok, ktoré dokážu štiepiť proteínové zložky extracelulárnej matrix – sú zahrnuté pri štiepení povrchových receptorov bunky.
- c) **Homofilická interakcia:** väzba medzi povrchovými proteínmi rovnakého typu, napr. spojenie okludínu s okludínom.
- d) **Proteíny zonula occludens (ZO):** proteíny podieľajúce sa na tvorbe tesného spojenia, kde vystupujú ako podporné proteíny. ZO obsahujú početné domény, ktoré sa viažu na rôzne skupiny spojovacích proteínov. Doposiaľ nie je úplne objasnená molekulárna funkcia ZO 1 – 3.
- e) **VE-kadherin, okludíny, kladíny a JAM:** transmembránové proteíny tvoriace spojovací komplex.
- f) **Kateníny, vinkulíny a ZO 1 – 3:** proteíny nachádzajúce sa v cytoplazme bunky, ktorých

funkciou je prepájať transmembránové proteíny s aktínovým cytoskeletom.

g) **Ezrin-radix-moesin (ERM):** skupina pozostávajúca z troch blízko príbuzných proteínov ezrinu, radixínu a moesínu. Tieto proteíny prepájajú aktínový cytoskelet s cytoplazmatickou membránou bunky, pričom ezrin sa podieľa taktiež aj na tvorbe mikrokľvkov.

h) **Src (sarcoma) kináza:** nereceptorová tyrozínkináza vytvárajúca tri hlavné domény: SH1 doména obsahuje aktívne miesto pre kinázu; SH2 a SH3 domény sa čiastočne podieľajú na proteínových interakciách. Svojou kinázovou doménou dokáže fosforylovať mnoho substrátov majúcich účasť na signálnych kaskádach bunky.

i) **Malé GTPázy (guanozín trifosfatázy):** skupina hydrolázových enzýmov, ktoré hydrolyzujú a viažu sa na guanozín trifosfát (GTP). Enzým s naviazaným GTP je v aktívnom stave, enzým spojený s guanozín difosfátom (GDP) v neaktívnom. Aktívna forma uvádza do činnosti ďalšie enzýmy podieľajúce sa na signalizačnej kaskáde.

j) **Rho rodina:** skupina malých GTPáz, ktorých funkciou je regulácia aktínového cytoskeletu. K Rho GTPázam patria aj skupiny RhoA, Rac a Cdc.

k) **Kortaktín:** proteín lokalizovaný v cytoplazme buniek, ktorý v aktivovanej forme podporuje polymerizáciu a reorganizáciu aktínového cytoskeletu. Aktivácia kortaktínu je založená na jeho fosforylácii serín/treonín alebo tyrozínkinázami (Src kináza) aktivovanými externými stimulmi, ako napr. bakteriálnou okupáciou endotelu/epitelu.

l) **GPCR (G protein-coupled receptors):** tvoria rozsiahlu skupinu integrálnych membránových receptorov, ktoré dokážu detegovať molekuly mimo bunky a následne spúšťať rôzne signálne kaskády v bunke.

m) **ERK (Extracellular signal-regulated kinases) alebo aj klasické MAP kinázy:** početne expresované intracelulárne signálne molekuly, ktoré regulujú rôzne bunkové pochody (meiózu, mitózu a iné postmitotické funkcie). Rôzne stimulačné látky, ako napr. vírusové infekcie, cytokíny, rastové faktory,

ligandy pre GPCR a iné, dokážu aktivovať ERK.

n) **Limitujúca membrána glie:** tenká membrána vytvorená z astrocytárnych výbežkov spojených s parenchymálnou bazálnou membránou obklopujúcou mozog a miechu.

o) **PD-L1 (Programmed death-ligand 1)** taktiež známy aj ako CD274 alebo B7 homológ 1 (B7-H1): transmembránový proteín, ktorý zohráva úlohu pri supersii imunitného systému v prípadoch akými sú gravidita, allotransplantácie, autoimunitné ochorenia a pri iných ochoreniach. Za normálnych okolností organizmus reaguje na prítomnosť cudzieho antigénu proliferáciou špecifických CD8⁺ T lymfocytov. Väzba PD-L1 s PD-1, nachádzajúcich sa na povrchu T a B lymfocytov, prenáša inhibičné signály redukujúce proliferáciu týchto T lymfocytov.

p) **PRR (Pattern recognition receptors):** proteíny nachádzajúce sa na bunkách vrodenej imunity, ktorých funkciou je identifikácia dvoch hlavných skupín antigénov PAMP a DAMP.

q) **PAMP (Pathogen-associated molecular patterns):** konzervatívne molekuly rôznych patogénov (lipopolysacharidy, nukleové kyseliny, rôzne peptidy, peptidoglykán atď.), ktoré sú rozpoznávané PRR. Interakcia PAMP-RPP spúšťa aktiváciu vrodenej imunitnej odpovedi, chrániacich hostiteľa voči infekčným agensom.

POĎAKOVANIE

Autori sú podporovaní grantmi APVV-18-0259, VEGA 1/0439/18 a VEGA 1/0105/19.

ZOZNAM LITERATÚRY

Banks, W. A.: The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation. *Brain Behav. Immun.*, 2015, 44, 1 – 8.

Bechmann, I., Mor, G., Nilsen, J., Eliza, M., Nitsch, R., Naftolin, F.: FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier.

Glia, 1999, 27 (1), 62 – 74.

Bencurova, E., Mlynarcik, P., Bhide, M.: An insight into the ligand-receptor interactions involved in the translocation of pathogens across blood-brain barrier. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 2011, 63 (3), 297 – 318.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., Kuchroo, V. K.: Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006, 441 (7090), 235 – 238.

Combes, V., Guillemin, G. J., Chan-Ling, T., Hunt, N. H., Grau, G. E.: The crossroads of neuroinflammation in infectious diseases: endothelial cells and astrocytes. *Trends Parasitol.*, 2012, 28 (8), 311 – 319.

Cooley, I. D., Chauhan, V. S., Donneyz, M. A., Marriott, I.: Astrocytes produce IL-19 in response to bacterial challenge and are sensitive to the immunosuppressive effects of this IL-10 family member. *Glia*, 2014, 62, 818 – 828.

Coureuil, M., Bourdoulous, S., Marullo, S., Nassif, X.: Invasive meningococcal disease: a disease of the endothelial cells. *Trends Mol. Med.*, 2014, 20 (10), 571 – 578.

Coureuil, M., Lecuyer, H., Scott, M. G., Boularan, C., Enslen, H., Soyer, M., Mikaty, G., Bourdoulous, S., Nassif, X., Marullo, S.: Meningococcus hijacks a beta2-adrenoceptor/beta-arrestin pathway to cross brain microvasculature endothelium. *Cell*, 2010, 143 (7), 1149 – 1160.

DeFea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Dery, O., Mullins, R. D., Bunnett, N. W.: Beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J. Cell. Biol.*, 2000, 148 (6), 1267 – 1281.

DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J., Shenoy, S. K.: Beta-arrestins and cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.*, 2007, 69, 483 – 510.

Doulet, N., Donnadieu, E., Laran-Chich, M. P., Niedergang, F., Nassif, X., Couraud, P. O.,

- Bourdoulous, S.: *Neisseria meningitidis* infection of human endothelial cells interferes with leukocyte transmigration by preventing the formation of endothelial docking structures. *J. Cell Biol.*, 2006, 173 (4), 627 – 637.
- Engelhardt, B., Martin-Simonet, M. T., Rott, L. S., Butcher, E. C., Michie, S. A.: Adhesion molecule phenotype of T lymphocytes in inflamed CNS. *J. Neuroimmunol.*, 1998, 84 (1), 92 – 104.
- Engelhardt, B. a Ransohoff, R. M.: The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.*, 2005, 26 (9), 485 – 495.
- Eugene, E., Hoffmann, I., Pujol, C., Couraud, P. O., Bourdoulous, S., Nassif, X.: Microvilli-like structures are associated with the internalization of virulent capsulated *Neisseria meningitidis* into vascular endothelial cells. *J. Cell Sci.*, 2002, 115, 1231 – 1241.
- Frosch, M., Weisgerber, C., Meyer, T. F.: Molecular characterization and expression in *Escherichia coli* of the gene complex encoding the polysaccharide capsule of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86 (5), 1669 – 1673.
- Gavard, J. a Gutkind, J. S.: VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol.*, 2006, 8 (11), 1223 – 1234.
- Geurts, N., Opdenakker, G., Van den Steen, P. E.: Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacol. Ther.*, 2012, 133 (3), 257 – 279.
- Griffith, J. W., Sokol, C. L., Luster, A. D.: Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2014, 32, 659 – 702.
- Halperin, S. A., Bettinger, J. A., Greenwood, B., Harrison, L. H., Jelfs, J., Ladhani, S. N., McIntyre, P., Ramsay, M. E., Safadi, M. A.: The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*, 2012, 30 (Suppl. 2), B26 – 36.
- Huber, A. K., Duncker, P. C., Irani, D. N.: Immune responses to non-tumor antigens in the central nervous system. *Front Oncol.*, 2014, 4, 328.
- Jimenez-Munguia, I., Pulzova, L., Kanova, E., Tomeckova, Z., Majerova, P., Bhide, K., Comor, L., Sirochmanova, I., Kovac, A., Bhide, M.: Proteomic and bioinformatic pipeline to screen the ligands of *S. pneumoniae* interacting with human brain microvascular endothelial cells. *Sci. Rep.*, 2018, 8 (1), 5231.
- Join-Lambert, O., Morand, P. C., Carbonnelle, E., Coureuil, M., Bille, E., Bourdoulous, S., Nassif, X.: Mechanisms of meningeal invasion by a bacterial extracellular pathogen, the example of *Neisseria meningitidis*. *Prog. Neurobiol.*, 2010, 91 (2), 130 – 139.
- Kanova, E., Jimenez-Munguia, I., Majerova, P., Tkacova, Z., Bhide, K., Mertinkova, P., Pulzova, L., Kovac, A., Bhide, M.: Deciphering the interactome of *Neisseria meningitidis* with human brain microvascular endothelial cells. *Front Microbiol.*, 2018, 9, 2294.
- Kanova, E., Tkacova, Z., Bhide, K., Kulkarni, A., Jimenez-Munguia, I., Mertinkova, P., Drazovska, M., Tyagi, P., Bhide, M.: Transcriptome analysis of human brain microvascular endothelial cells response to *Neisseria meningitidis* and its antigen MafA using RNA-seq. *Sci. Rep.*, 2019, 9, 18763.
- Lambotin, M., Hoffmann, I., Laran-Chich, M. P., Nassif, X., Couraud, P. O., Bourdoulous, S.: Invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis* requires cortactin recruitment by a phosphoinositide-3-kinase/Rac1 signalling pathway triggered by the lipo-oligosaccharide. *J. Cell Sci.*, 2005, 118, 3805 – 3816.
- Leppert, D., Lindberg, R. L., Kappos, L., Leib, S. L.: Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2001, 36 (2 – 3), 249 – 257.
- Liu, R., Lauridsen, H. M., Amezquita, R. A., Pierce, R. W., Jane-Wit, D., Fang, C., Pellowe, A. S., Kirkiles-Smith, N. C., Gonzalez, A. L., Pober, J. S.: IL-17 promotes neutrophil-mediated immunity

by activating microvascular pericytes and not endothelium. *J. Immunol.*, 2016, 197 (6), 2400 – 2408.

Liu, Y., Teige, I., Birnir, B., Issazadeh-Navikas, S.: Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nat. Med.*, 2006, 12 (5), 518 – 525.

Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J.: Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*, 1999, 283 (5402), 655 – 661.

Luttrell, L. M., Roudabush, F. L., Choy, E. W., Miller, W. E., Field, M. E., Pierce, K. L., Lefkowitz, R. J.: Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98 (5), 2449 – 2454.

Magnus, T., Schreiner, B., Korn, T., Jack, C., Guo, H., Antel, J., Ifergan, I., Chen, L., Bischof, F., Bar-Or, A., Wiendl, H.: Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: implications for immune responses and autoimmunity in the CNS. *J. Neurosci.*, 2005, 25 (10), 2537 – 2546.

Meinl, E., Aloisi, F., Ertl, B., Weber, F., de Waal Malefyt, R., Wekerle, H., Hohlfeld, R.: Multiple sclerosis. Immunomodulatory effects of human astrocytes on T cells. *Brain*, 1994, 117 (Pt 6), 1323 – 1332.

Mikaty, G., Soyer, M., Mairey, E., Henry, N., Dyer, D., Forest, K. T., Morand, P., Guadagnini, S., Prevost, M. C., Nassif, X., Dumenil, G.: Extracellular bacterial pathogen induces host cell surface reorganization to resist shear stress. *PLoS Pathog.*, 2009, 5, e1000314.

Miller, F., Lecuyer, H., Join-Lambert, O., Bourdoulous, S., Marullo, S., Nassif, X., Coureuil, M.: *Neisseria meningitidis* colonization of the brain endothelium and cerebrospinal fluid invasion. *Cell Microbiol.*, 2013, 15, 512 – 519.

Nassif, X., Beretti, J. L., Lowy, J., Stenberg, P., O'Gaora, P., Pfeifer, J., Normark, S., So, M.: Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 3769 – 3773.

Raine, C. S., Cannella, B., Duijvestijn, A. M., Cross, A. H.: Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. II. Lymphocyte/endothelial cell adhesion during the initial stages of autoimmune demyelination. *Lab. Invest.*, 1990, 63, 476 – 489.

Scott, M. G., Pierotti, V., Storez, H., Lindberg, E., Thuret, A., Muntaner, O., Labbe-Jullie, C., Pitcher, J. A., Marullo, S.: Cooperative regulation of extracellular signal-regulated kinase activation and cell shape change by filamin A and beta-arrestins. *Mol. Cell. Biol.*, 2006, 26, 3432 – 3445.

Virji, M., Kayhty, H., Ferguson, D. J., Alexandrescu, C., Heckels, J. E., Moxon, E. R.: The role of pili in the interactions of pathogenic *Neisseria* with cultured human endothelial cells. *Mol. Microbiol.*, 1991, 5, 1831 – 1841.



MOŽNOSTI FARMAKOTERAPIE ZLYHÁVAJÚCEHO SRDCA

POSSIBILITIES OF HEART FAILURE PHARMACOTHERAPY

Sučik, Monika¹; Faixová, Dominika²; Gažová, Andrea³; Kyselovič, Ján^{1,4}

¹Katedra farmakológie a toxikológie

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

²Katedra mikrobiológie a imunológie

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

³Ústav farmakológie a klinickej farmakológie

Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Špitalská 24, 813 72, Bratislava

⁴Jednotka klinického výskumu V. Internej kliniky

Lekárska fakulta Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava

Slovenská republika

dominika.faixova@student.uvlf.sk

ABSTRAKT

Srdcové zlyhávanie predstavuje stav, kedy srdce nie je schopné zabezpečiť adekvátnu perfúziu tkanív napriek normálnemu plniacemu tlaku. Je to život ohrozujúce ochorenie, ktorého diagnostika a terapia by mala patriť medzi globálne priority zdravotníctva. V poslednom štádiu ochorenia je najlepším riešením transplantácia srdca, ktorej však predchádza komplexná farmakologická liečba. Sledovali sme farmakoterapiu pacientov v terminálnom štádiu ochorenia. Analyzovali sme farmakoterapiu základných liečiv používaných pri liečbe srdcového zlyhávania: diuretík (93,33 % pacientov), inhibítorov angiotenzín konvertujúceho enzýmu (ACEI; 83,33 % pacientov), antagonistov angiotenzínového receptora (ARB;

83,33 % pacientov) a betablokátorov (BB; 90 % pacientov). Nakoľko 30,3 % skúmaným pacientom bol diagnostikovaný *diabetes mellitus*, analyzovali sme aj farmakoterapiu preskribovaných antidiabetík. Farmakoterapiu pacientov NÚSCH (Národný ústav srdcových a cievnych chorôb) sme analyzovali retrospektívne, pred transplantáciou srdca v období rokov 2009 – 2013. Na základe zistení môžeme povedať, že pacienti sú liečení optimálne a v súlade s najnovšími odporúčaniami Európskej kardiologickej spoločnosti už od roku 2009.

Kľúčové slová: *diabetes mellitus*; Európska kardiologická spoločnosť; farmakoterapia; srdcové zlyhávanie

ABSTRACT

Chronic heart failure is the condition, in which the heart is not able to maintain the adequate perfusion of the periphery despite normal left ventricular filling pressure. It is a life-threatening disease; its diagnostics and therapy should be among the global priorities of the health care. Heart transplantation is the optimal therapy in the last stage of the disease, but it has to be preceded by the comprehensive pharmacological treatment. The aim of the study was to analyze the pharmacotherapy of patients in the terminal stage of the heart failure. We monitored the pharmacotherapy of the basic drugs used in the treatment: diuretics, ACEI, ARB and beta blockers. Since 30.3 % of the patients were diagnosed with *diabetes mellitus*, we also analyzed the pharmacotherapy of the prescribed antidiabetics. The patients were treated in NÚSCH in Bratislava in years 2009 – 2013. Based on these findings, the patients were treated optimally and in accordance with the latest recommendations of the European Society of Cardiology since 2009.

Key words: *diabetes mellitus*; European Society of Cardiology; heart failure; pharmacotherapy

ÚVOD

Srdcové zlyhávanie (SZ) predstavuje stav, kedy srdce nie je schopné zabezpečiť adekvátnu perfúziu tkanív napriek normálnemu plniacemu tlaku. Zo začiatku sa SZ neprejaví, lebo sa uplatnia kompenzačné mechanizmy. Pri prehlbovaní srdcového ochorenia prestávajú byť kompenzačné mechanizmy účinné a napriek tomu, že pracujú maximálne, nestačia zabezpečiť adekvátnu perfúziu periférie. Vtedy nastupuje stresová reakcia ako odpoveď na poškodenú funkciu srdca (Goncalvesová a Fabian, 2006; Šimko, 2006).

SZ je život ohrozujúce ochorenie, ktorého diagnostika a terapia by mala patriť medzi globálne

priority zdravotníctva. V súčasnosti bolo približne 26 miliónom ľudí diagnostikované SZ a vyhliadky na vyliečenie týchto pacientov sú horšie ako u ľudí trpiacich rakovinou hrubého čreva, prsníka alebo prostaty (Ponikowski a kol., 2014). Medzi rizikové faktory tohto ochorenia patria napríklad ischemické ochorenia srdca, hypertenzia alebo *diabetes mellitus*, a samozrejme aj fajčenie či obezita (Bui a kol., 2011).

Narastajúci počet pacientov so SZ sa stáva jedným z najvýznamnejších problémov nielen zdravotníctva, ale aj systému sociálnej starostlivosti. Hrubá prevalencia SZ na Slovensku je 2,3 %. Incidencia hospitalizácií pre novozistené SZ bola 120/100 000 obyvateľov/rok. Počet hospitalizácií pre SZ dramaticky narastá z 9 060 v r. 2005 po 22 112 v roku 2017. Priemerná dĺžka hospitalizácií v roku 2015 bola 9,4 ± 9,7 dňa (Goncalvesová a Danková, 2018). Liečba SZ je teda nákladná a zaťažuje zdravotný systém.

Na základe najnovších výsledkov klinických skúšaní odborníci spoločne zostavujú súbor odporúčaní pre manažment chorôb významne postihujúcich populáciu. Pre terapiu srdcového zlyhávania sú v súčasnosti v Európe platné odporúčania vydané Európskou kardiologickou spoločnosťou (European Society of Cardiology, ESC) v roku 2016 (Ponikowski a kol., 2016).

Cieľom našej štúdie bolo sledovať a porovnať farmakoterapiu pacientov v terminálnom štádiu srdcového zlyhávania s aktuálne platnými odporúčaniami.

MATERIÁL A METÓDY

Analyzovali sme klinické údaje pacientov v terminálnom štádiu SZ, ktorí podstúpili transplantáciu srdca v období od augusta 2009 do júna 2013 v Národnom ústave srdcových a cievnych chorôb (NÚSCH) v Bratislave. Tieto údaje sme zozbierali z hospitalizačných a ambulantných záznamov pacientov uložených v archíve NÚSCH alebo z interných elektronických záznamov. Všetky údaje sú zo záznamov z obdobia pred dňom transplantácie,

Tab. 1: Dávkovanie predpisovaných diuretík

FUROSEMID	Pacienti s DM		Pacienti bez DM	
Dávkovanie (mg)	n	%	n	%
20	0	0,00	1	4,55
40	4	18,18	0	0,00
80	1	4,55	2	9,10
100	1	4,55	1	4,55
120	1	4,55	2	9,10
160	0	0,00	1	4,55
250	2	9,10	2	9,10
290	1	4,55	0	0,00
330	1	4,55	0	0,00
375	1	4,55	2	9,10
500	1	4,55	0	0,00
HYDROCHLOROTHIAZID				
Dávkovanie (mg)				
12,5	0	0,00	1	20,00
25	2	40,00	2	40,00
SPIRONOLAKTÓN				
Dávkovanie (mg)				
25	4	25	9	56,25
50	1	6,25	2	12,50
EPLERENÓN				
Dávkovanie (mg)				
25	0	0	2	22,22
50	3	33,33	4	44,44

nie však viac ako 3 – 6 mesiacov pred zákrokom. Celkovo sme spracovávali údaje od 33 pacientov, pričom 15 % tvorili ženy a 85 % muži. V súbore bolo 30,30 % pacientov s ochorením *diabetes mellitus* (DM). Farmakoterapiu, ktorou boli liečení nami sledovaní pacienti, sme porovnali s platnými odporúčaniami ESC, ktoré na Slovensku preberá Slovenská kardiologická spoločnosť (SKS).

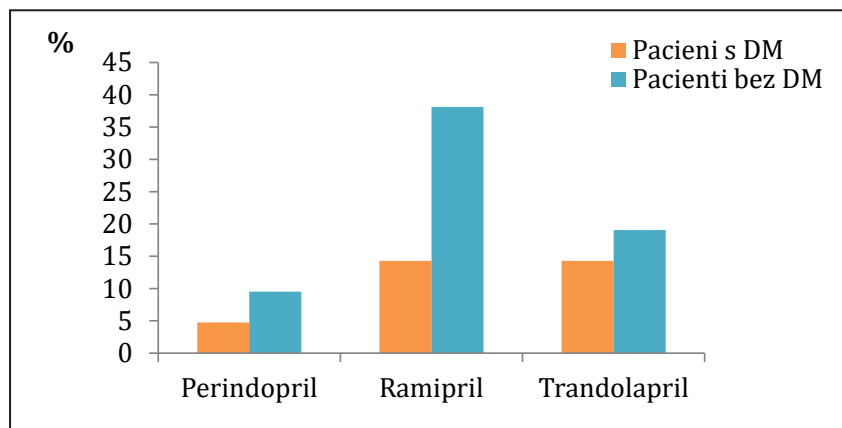
VÝSLEDKY

Diuretiká

Takmer všetci pacienti boli liečení diuretikami (viď tab. 1.). Vyskytovali sa iba dva druhy liečiv, furosemid alebo furosemid spolu s hydro-

chlorotiazidom, teda kľúčovým diuretikom samostatne alebo v kombinácii s tiazidovým diuretikom. U pacientov s komorbiditou DM výrazne prevyšovala preskripcia furosemidu samostatného, predpisované boli rôzne dávky v rozmedzí 20 – 500 mg. Hydrochlorotiazid v kombinácii s furosemidom bol predpisovaný v dávke 12,5 mg alebo 25 mg, pričom prevyšovala vyššia dávka, ale nenašli sme percentuálny rozdiel medzi pacientmi s a bez komorbiditu DM. Obidve diuretiká sú odporúčané ESC ako súčasť terapie SZ. V štúdií bolo 76,67 % pacientov liečených kálium šetriacimi diuretikami. Predpisované boli eplerenón (25 – 50 mg) a spironolaktón (25 – 50 mg). V preskripcii mierne prevládal spironolaktón nad eplerenónom.

Graf 1: Predpisované ACEI



DM – diabetes mellitus

Tab. 2: Dávkovanie najčastejšie indikovaných ACEI

PERINDOPRIL	Pacienti s DM		Pacienti bez DM	
Dávkovanie (mg)	n	%	n	%
5	1	33,33	0	0,00
10	0	0,00	2	66,66
RAMIPRIL				
Dávkovanie (mg)				
1,25	1	9,09	0	0,00
2,5	2	18,18	3	27,27
5	0	0,00	3	27,27
7,5	0	0,00	1	9,09
10	0	0,00	1	9,09
TRANDOLAPRIL				
Dávkovanie (mg)				
0,5	1	12,5	3	37,5
1	0	0,00	1	12,5
2	1	12,5	0	0,00
4	1	12,5	0	0,00

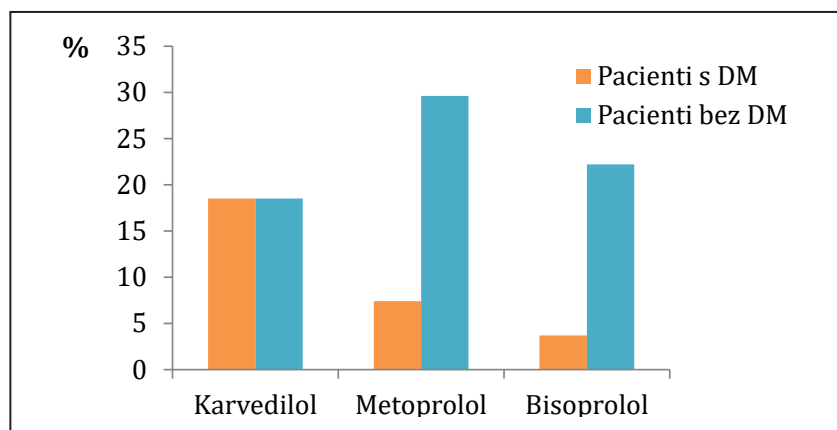
Predpisované dávky boli u oboch liečiv v odporúčanom rozmedzí.

Inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu (ACEI)

ACEI zabraňujú premene neúčinného angiotenzínu I na vysoko účinný angiotenzín II. Výsledkom ich pôsobenia je významný pokles

periférnej cievnej rezistencie a mierny vazodilatačný účinok (Lincová a kol., 2007). V našej štúdii boli z ACEI predpisované perindopril, ramipril, trandolapril v príslušných dávkach 5 – 10 mg; 1,25 – 10 mg a 0,5 – 4 mg (viď graf 1). Preskripcia ramiprilu a trandolaprilu je odporúčaná ESC. Neodporúčaným ACEI je perindopril. Spomedzi predpisovaných ACEI prevládal ramipril. Najpredpisovanejšia

Graf 2: Liečba betablokátormi



DM – diabetes mellitus

Tab. 3: Dávkovanie najčastejšie indikovaných betablokátorov

KARVEDILOL	Pacienti s DM		Pacienti bez DM	
Dávkovanie (mg)	n	%	n	%
12,5	1	10	3	30
25	3	30	1	10
50	1	10	1	10
METOPROLOL				
Dávkovanie (mg)				
12,5	1	10	0	0
25	1	10	1	10
50	0	0	1	10
75	0	0	1	10
100	0	0	4	40
200	0	0	1	10
BISOPROLOL				
Dávkovanie (mg)				
1,25	1	14,28	0	0
2,5	0	0	3	42,86
5	0	0	1	14,28
7,5	0	0	2	28,57

dávka patrí do odporúčaného rozmedzia, avšak boli predpisované aj dávky pod a nad rámec odporúčaní. Trandolapril bol predpisovaný v odporúčanom dávkovaní.

Antagonisty angiotenzínového receptora (ARB, sartany)

ARB sa zaraďujú medzi antihypertenzíva, ktorých

mechanizmus účinku spočíva v kompetitívnom antagonizme angiotenzínu II na AT_1 -receptoroch (Lincová a kol., 2007). Spomedzi sartanov boli predpisované kandesartan (8 – 32 mg), valsartan (40 mg) a telmisartan (80 mg). Kandesartan a valsartan patria medzi odporúčané terapeutiká ESC a v preskripcii boli rovnako zastúpené. Neodporúčaným bol telmisartan, ktorý by bolo vhodnejšie

Tab. 4: Dávkovanie predpisovaných antidiabetík

	Metformín	Glimepirid	Gliklazid	Inzulín
1 mg		1		
3 mg		1		
30 mg			1	
32 U				1
60 mg			1	
500 mg	1			
1700 mg	1			
2000 mg	1			

nahradiť losartanom. Kandesartan bol preskribovaný v odporúčanom dávkovaní. Valsartan bol predpisovaný v počiatočnej dávke (40 mg).

Betablokátory (BB)

Medzi selektívne β_1 -sympatolytiká bez vnútornej sympatomimetickkej aktivity sa zaraďujú bisoprolol a metoprolol. Karvedilol sa zaraďuje medzi sympatolytiká s kombinovanými účinkami (Lincová a kol., 2007). V našej štúdii bolo 90,0 % pacientov liečených betablokátorom. Predpisované boli: bisoprolol (1,25 – 7,5 mg), karvedilol (12,5 – 50 mg) a metoprolol (12,5 – 200 mg) (viď graf 2). Najviac bol v preskripcii zastúpený karvedilol. Všetci pacienti liečení betablokátormi užívali liek v rozmedzí odporúčaných dávok (viď tab. 3).

Pacienti liečení na *diabetes mellitus* užívali metformín, gliklazid, glimepirid a inzulín. Predpísané dávkovanie antidiabetík je uvedené v tabuľke 4.

DISKUSIA A ZÁVER

Nakoľko prevalencia SZ je cca 1 – 2 % v dospelých populácii v rozvinutých krajinách a narastá (≥ 10 %) u ľudí starších ako 70 rokov, tak manažment terapie týchto pacientov je veľmi dôležitá súčasť zdravotných systémov krajín. Cieľom manažmentu pacientov so SZ je zlepšiť ich klinický status, funkčnú kapacitu srdca a kvalitu života, predísť hospitalizáciám a redukovať mortalitu (Sninčák, 2016).

Sledovali sme údaje o pacientoch v terminálnom

štádiu srdcového zlyhávania, ktorým bolo transplantované srdce v NÚSCH v Bratislave. Štúdie sa zúčastnilo 33 pacientov, prevažnú časť tvorili muži. Priemerný vek pacientov bol 49 rokov a v priemere boli v zdravotníckom zariadení sledovaní 80 dní. Sledovali sme farmakologickú terapiu zúčastnených pacientov. Porovnávali sme predpisované liečivá a ich dávkovanie s platnými odporúčaniami ECS, ktorá v roku 2016 vydala posledné usmernenie v oblasti farmakoterapie SZ. Týmto odporúčaniami sa riadi 57 národných kardiologických spoločností sveta, na Slovensku je to Slovenská kardiologická spoločnosť (Chioncel a kol., 2019).

Analyzovali sme farmakoterapiu základných liečiv používaných pri liečbe srdcového zlyhávania: diuretík, ACEI, ARB a betablokátorov. Nakoľko 30,3 % skúmaným pacientom bol diagnostikovaný *diabetes mellitus*, analyzovali sme aj farmakoterapiu preskribovaných antidiabetík.

Diuretiká podporujú vylučovanie tekutín, čo môže spôsobiť hypovolémiu, ktorá môže zhoršiť hypotenziu u ťažkých hypotonikov. Všetci pacienti s ťažkou hypotenziou (STK < 90 mmHg) boli liečení diuretikami, výlučne furosemidom. Všetci pacienti s výraznou hypokalémiou boli liečení diuretikami, napriek tomu, že ju môžu zhoršiť. Pacienti s hodnotou kreatinínu vyššou ako $221 \mu\text{mol.l}^{-1}$ sú považovaní za pacientov s poruchou funkcie obličiek. Najmä tiazidové diuretiká môžu u týchto pacientov spôsobiť zhoršenie funkcie obličiek alebo rezistenciu voči terapii. Títo pacienti boli liečení kľúčovými

diuretikami. Pri kombinovanej terapii kľúčovým a tiazidovým diuretikom hrozí riziko hypovolémie, hypotenzie, hypokalémie a poruchy obličiek (Tendera, 2005; Bada, 2007). Všetci pacienti liečení uvedenou kombináciou boli hypokalemickí. V štúdiu bolo 93,33 % pacientom predpísané diuretikum. Vyskytovali sa iba dva druhy liečiv: furosemid alebo furosemid spolu s hydrochlorotiazidom, teda kľúčové diuretikum samostatne alebo v kombinácii s tiazidovým diuretikom. Výrazne prevyšoval furosemid, a to ako u pacientov s diabetom, tak aj u skupiny pacientov bez diabetu. Predpisované boli rôzne dávky v rozmedzí 20 – 750 mg. Hydrochlorotiazid bol predpisovaný v dávke 12,5 mg alebo 25 mg, pričom prevyšovala vyššia dávka. Obidve diuretiká sú odporúčané ESC. Dávkovanie hydrochlorotiazidu bolo v súlade s odporúčaniami ESC a dávkovanie furosemidu u viac ako polovice pacientov bolo v odporúčanom rozmedzí. Ostatní pacienti boli liečení vyššími dávkami. Najvyššia predpísaná dávka trikrát prevyšovala najvyššiu odporúčanú dávku.

Väčšine sledovaným pacientom (76,67 % zo všetkých sledovaných pacientov) boli predpísané aj liečivá zaraďujúce sa do skupiny antagonistov mineralokortikoidového receptora: eplerenón a spironolaktón v dávkach 25 – 50 mg. Častejšie bol predpisovaný spironolaktón. Predpisované dávky oboch liečiv boli v súlade s odporúčanou dávkovacou schémou.

Betablokátory sú indikované u pacientov so stabilizovaným ľahkým, stredne ťažkým aj ťažkým SZ na podklade ischemickej alebo neischemickej kardiomyopatie so zníženou systolickou funkciou ľavej komory, pokiaľ nie sú prítomné kontraindikácie. Odporúča sa podávať ich pacientom so systolickou dysfunkciou ľavej komory po akútnom infarkte myokardu a pacientom s asymptomatickou systolickou dysfunkciou ľavej komory. Napriek nedostatku validných dôkazov sa použitie betablokátorov považuje za vhodné u chorých so SZ a zachovanou ejekčnou frakciou ľavej komory najmä pre dosiahnutie poklesu srdcovej frekvencie. Kontraindikované

sú u pacientov s významnou atrioventrikulárnou bloádou, bradykardiou so srdcovou frekvenciou < 50/min (pokiaľ nie je implantovaný kardiostimulátor), systolickým tlakom < 85 mmHg, pri astme alebo bronchospastickom ochorení dýchacích ciest, ktoré vyžadujú bronchodilatačnú liečbu. Opatrnosť pri liečbe a častejšie monitorovanie si vyžadujú pacienti s diabetom a okluzívnym ochorením periférnych ciev. V týchto prípadoch je vhodné preferovať podávanie neselektívneho betablokátoru s vazodilatačným účinkom, akým je karvedilol, vzhľadom na jeho pozitívny účinok na inzulínovú senzitivitu (Vítovec a Špinar, 2004; Fukuta a Little, 2008). Nami pozorovaní diabetici sa liečili najmä karvedilolom, no dvom pacientom bol predpísaný metoprolol a jednému bisoprolol. Relatívna kontraindikácia pre preskripciu betablokátorov je asymptomatická hypotenzia, sínusová bradykardia s frekvenciou 50 – 60/min a depresia. V kontexte SZ je liečba betablokátormi nevhodná u pacientov s evidentnými symptómami retencie tekutín alebo hypovolémiou. Iniciácia liečby betablokátormi je kontraindikovaná u pacientov s potrebou i.v. inotropnej podpory alebo krátko po jej ukončení (Remme, 1986; Owan a kol., 2006). Na základe sledovaných údajov usudzujeme, že pacienti boli liečení správnymi liečivami a správnym terapeutickým postupom.

ACEI kompetitívne inhibujú ACE (angiotenzín konvertujúci enzým) v plazme a v cieľových tkanivách (srdce, cievy, obličky), čím zabraňujú konverzii angiotenzínu I na angiotenzín II. V prípade dlhodobého užívania ACEI je dôležitejší práve inhibičný efekt v cieľových tkanivách ako v plazme. Takáto inhibícia vyúsťuje do zníženia cirkulujúcich a lokálnych hladín angiotenzínu II. Kontraindikáciou užívania týchto liečiv je zvýšená koncentrácia draslíka v plazme nad > 6.0 mmol.l⁻¹ a zvýšená koncentrácia kreatinínu nad > 256 mmol.l⁻¹. Liečivá je možné užívať v prípade zníženého klírensu kreatinínu, zvyčajne sa však pristupuje k redukcii maximálnej dávky na polovicu, resp. štvrtinu. Pozornosť by mala byť venovaná aj pacientom s pokročilým SZ a pacientom užívajúcim

vysoké dávky diuretík (Ritter a kol., 2019). Sledovaní pacienti užívali perindopril, ramipril, trandolapril v príslušných dávkach 5 – 10 mg, 1,25 – 10 mg a 0,5 – 4 mg. Terapia perindoprilom nie je odporúčaná ESC. Optimálnejšie by bolo jeho nahradenie iným odporúčaným ACEI ako je kaptopril, enalapril alebo lisinopril. Spomedzi predpisovaných ACEI prevládal ramipril. Najčastejšie predpisovaná dávka patrila do odporúčaného dávkovania, avšak boli predpisované aj dávky pod a nad jeho rámec. Trandolapril bol predpisovaný v odporúčanom dávkovaní.

Spomedzi sartanov boli predpisované kandesartan v dávkach 8 – 32 mg, valsartan 40 mg a telmisartan 80 mg. Kandesartan a valsartan patria medzi odporúčané liečivá ESC a v sledovanej preskripcii boli zastúpené rovnako. Neodporúčaným liečivom bol telmisartan, ktorý by bolo vhodnejšie nahradiť losartanom. Z hľadiska dávok kandesartanu boli použité dávky podľa odporúčaní a všetky boli rovnako zastúpené. Valsartan bol predpisovaný v počiatočnom dávkovaní.

Pacienti, ktorým bol diagnostikovaný *diabetes mellitus* užívali metformín, gliklazid, glimepirid a inzulín. Ich liečba SZ sa v celkovom meradle neodlišovala od farmakoterapie SZ u pacientov bez komorbidít DM.

Pacienti v terminálnom štádiu SZ boli liečení podľa najnovších aktuálne platných odporúčaní pre terapiu SZ už od roku 2009 (escardio.org) a terapia SZ sa nelíšila podľa etiológie. Manažment liečby pacientov v poslednom štádiu ochorenia je zložitý. Navyše touto patológiou trpia čoraz starší pacienti a takmer vždy sú súčasne liečení na inú komorbiditu (Cook a kol., 2014). Komorbidity sú významným problémom pri terapii. Len terapia samotného SZ a obzvlášť pokročilého štádia zahŕňa kombináciu minimálne troch až štyroch liečiv, ktoré so sebou nesú riziko interakcií a nežiaducich účinkov. Ak vezmeme do úvahy aj terapiu komorbidít, toto riziko sa podstatne zvýši. Z týchto dôvodov je potrebné zabezpečiť pacientom optimálnu terapiu s ohľadom na ich konkrétny zdravotný stav.

ZOZNAM LITERATÚRY

Bada, V.: Liečba chronického srdcového zlyhania [Therapy of chronic heart failure]. *Via pract.*, 2007, 4 (11), 516 – 520.

Bui, A. L., Horwich, T. B., Fonarow, G. C.: Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.*, 2011, 8 (1), 30 – 41.

Cook, C., Cole, G., Asaria, P., Jabbour, R., Francis, D. P.: The annual global economic burden of heart failure. *Int. J. Cardiol.*, 2014, 171 (3), 368 – 376.

Fukuta, H. a Little, W. C.: The cardiac cycle and the physiologic basis of left ventricular contraction, ejection, relaxation, and filling. *Heart Fail. Clin.*, 2008, 4 (1), 1 – 11.

Goncalvesová, E. a Danková, M.: Čo vieme o epidemiológii srdcového zlyhávania na Slovensku a vo svete [What we know about epidemiology of heart failure in Slovakia and globally], *Vnitř. Lék.*, 2018, 64 (9), 839 – 846.

Goncalvesová, E. a Fabian, J.: Srdcové zlyhanie: definícia, terminológia a klasifikácia [Heart failure: definition, terminology and classification]. *Cardiol.*, 2006, 15 (4), 214 – 217.

Chioncel, O., Mebazaa, A., Maggioni, A. P., Harjola, V. P., Rosano, G., Laroche, C., Piepoli, M. F., Crespo-Leiro, M. G., Lainscak, M., Ponikowski, P., Filippatos, G., Ruschitzka, F., Seferovic, P., Coats, A. J. S., Lund, L., H.: Acute heart failure congestion and perfusion status – impact of the clinical classification on in-hospital and long-term outcomes; insights from the ESC-EORP-HFA Heart Failure Long-Term Registry, *Eur. J. Heart Failure*, 21 (11): 2019, 1338–1352.

Lincová, D., Farghali, H. a kol.: *Základná a aplikovaná farmakologie* [The essential and applied pharmacology]. Praha: Galén, 2007, 672 s.

Owan, T. E., Hodge D. O., Herges, R. M., Jacobsen S. J., Roger, V. L., Redfield, M. M.: Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N. Engl. J. Med.*, 2006, 355 (3), 251 – 259.

Ponikowski, P., Voors, A. A., Anker, S. D., Bueno, H., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Falk, V., González-Juanatey, J. R., Harjola, V. P., Jankowska, E. A., Jessup, M., Linde, C., Nihoyannopoulos, P., Parissis, J. T., Pieske, B., Riley, J. P., Rosano, G. M. C., Ruilope, L. M., Ruschitzka, F., Rutten, F. H., van der Meer, P., ESC Scientific Document Group: 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur. Heart J.*, 2016, 37 (27), 2129 – 2200.

Ponikowski, P., Anker, S. D., AlHabib, K. F., Cowie, M. R., Force, T. L., Hu, S., Jaarsma, T., Krum, H., Rastogi, V., Rohde, L. E., Samal, U. C., Shimokawa, H., Budi Siswanto, B., Sliwa, K., Filippatos, G.: Heart failure: preventing disease and death worldwide. *ESC Heart Fail.*, 2014, 1 (1), 4 – 25.

Remme, W. J.: Congestive heart failure – pathophysiology and medical treatment. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1986, 8, 36 – 52.

Ritter, J., Flower, R., Henderson, G., Loke, Y. K., MacEwan, D., Rang, H.: *Rang and Dale's Pharmacology*. London, United Kingdom: Elsevier Science, 2019. 808 s.

Šninčák, M.: Srdcové zlyhávanie v roku 2016 – novinky v odporúčaníach, súčasný stav, trendy [Heart failure in 2016 – the news in recommendations, the current state, trends]. *Via pract.*, 2016, 13 (1), 163 – 167.

Šimko, F.: Patológia zlyhania srdca [Pathophysiology of heart failure]. *Via pract.*, 2006, 3, 382 – 384.

Tendera, M.: Epidemiology, treatment, and guidelines for the treatment of heart failure in Europe. *Eur. Heart J. Suppl. J.*, 2005, 7, 5 – 9.

Vítovec, J. a Špinar, J.: *Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění* [Pharmacotherapy of cardiovascular diseases]. Praha: Grada Publishing, 2004. 252 s.



KLINICKÝ VÝZNAM LIEKOVÝCH INTERAKCIÍ U PACIENTOV S HYPERTENZIOU

THE CLINICAL IMPORTANCE OF DRUG INTERACTIONS IN PATIENTS WITH HYPERTENSION

Hodorová, Ingrida¹; Sukeľ, Ondrej^{1, 2}; Marcincáková, Dana³

¹Lekáreň Don Bosco, Námestie slobody 52, 066 01 Humenné

²Slovenská lekárska komora, Nová Rožňavská 3, 831 04 Bratislava 3

³Katedra farmakológie a toxikológie

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

dana.marcincakova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Liekové interakcie sú dôležitou súčasťou poskytovania zdravotnej starostlivosti. Neustály nárast počtu užívaných liekov vedie k zvýšenému riziku vzniku interakcií. Ohrození sú najmä pacienti užívajúcí viacero liekov súčasne. Vzhľadom na fakt, že hypertenzia patrí medzi dlhodobé a časté ochorenie, hypertonici sú z hľadiska liekových interakcií ohrozenou skupinou.

Cieľom štúdie bolo vyhodnotiť údaje získané z projektu Interakcie liekov, ktorý prebieha pod záštitou Slovenskej lekárskej komory. Na základe údajov sme identifikovali a popísali počet zachytených interakcií a ich klinickú závažnosť. Podobne sme postupovali aj s duplicitami.

Z predloženej štúdie vyplýva, že výskyt liekových interakcií u hypertenzných pacientov je častý a najviac interakcií je 2. a 3. stupňa klinickej závažnosti.

Kľúčové slová: duplicity; farmaceut; hypertenzia; lieková interakcia

ABSTRACT

Drug interactions are an important part of health care. The constant increase in the number of used medicines leads to an increased risk of interactions. In particular, patients taking multiple medicines are at a risk. Due to the fact that hypertension is a long-term and frequent disease, hypertensive groups are a threat to drug

interactions.

The objective of the study was to evaluate the data obtained from the Drug interactions project, which takes place under the auspices of the Slovak Chamber of Pharmacists. Based on the data, we identified the number of interactions captured and their clinical severity. The most common interactions were described. We did the same with duplicities.

The presented study shows that the incidence of drug interactions in hypertensive patients is frequent and the most frequent interactions are of grade 2 and 3 of the clinical relevance.

Key words: drug interaction; duplicity; hypertension; pharmacist

ÚVOD

Poskytovanie správnej zdravotnej starostlivosti je založené na viacerých faktoroch. Zahŕňa správnu preskripciu, dispenzarizáciu a samozrejme spoluprácu pacienta. V súčasnej dobe neustáleho nárastu spotreby liekov je nemožné zabrániť vzniku liekových interakcií. Ich predvídanie je však najlepší spôsob ako uchrániť pacienta pred nežiaducimi až škodlivými účinkami, zlepšiť jeho zdravotný stav a v neposlednom rade ušetriť finančné prostriedky, ktoré by boli vynaložené na prípadnú liečbu. Opakovane vo viacerých štúdiách nachádzame informácie, že na interakciách sa najčastejšie podieľajú liečivá ovplyvňujúce kardiovaskulárny systém (Merlo a kol., 2001; Pirmohamed a kol., 2004). Vzhľadom na vysoký počet hypertonikov a z hľadiska liekových interakcií môžeme týchto pacientov považovať za rizikovú skupinu (Alexander, 2017).

Interakcie vznikajú na farmakokinetickej, no s väčšou početnosťou na farmakodynamickej úrovni. Väčšina je tak samozrejma, že ich ani za interakcie nepovažujeme. Ich predvídanie je však zložitejšie a vyžaduje si dôkladné poznatky a precízne zváženie výsledného efektu (Cascorbi, 2012; Scripture a Figg, 2017). Pri farmakokinetických interakciách vieme

presne demonštrovať mechanizmy vzniku na štyroch úrovniach – absorpcie, distribúcie, metabolizmu a exkrécie. Z hľadiska variability sú najzaujímavejšou skupinou interakcie prebiehajúce na úrovni metabolizmu. Rozmanitosť je daná výskytom viacerých typov alel, na základe ktorých nachádzame v populácii ultrarýchlych, rýchlych a pomalých metabolizátorov (Perlík a Slanaš, 2015). Okrem toho je nevyhnutné poznať enzýmový systém, ktorým sa dané liečivo metabolizuje a či je interagujúce liečivo jeho inhibítorom alebo induktorom.

Na Slovensku sa na liečbu hypertenzie používajú 4 základné skupiny liečiv. Prvou sú blokátory kalciových kanálov, kde väčšina interakcií prebieha na farmakokinetickej úrovni z dôvodu metabolizácie prostredníctvom cytochrómu P450 (CYP450). Všeobecne sa radia medzi bezpečné liečivá a nevyvolávajú nebezpečné interakcie (Magulová a kol., 2004). Ďalšou skupinou sú diuretiká, pričom interakcie vyplývajú z ich mechanizmu účinku a najčastejším výsledkom býva dysbalancia iónov, hlavne hypomagneziémia a hypokaliémia. Nasledujú betablokátory vykazujúce farmakokinetické interakcie súvisiace s metabolizmom liečiv (biotransformácia cez CYP450) a farmakodynamické interakcie najčastejšie vedúce k bradykardii. Poslednou skupinou sú inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu (ACE) a sartány, kde najčastejším problémom býva vznik farmakodynamickej interakcie vedúcej k rozvoju hyperkaliémie (Ismail a kol., 2012).

V štúdií sme popísali aj interakcie, ktoré sú pre pacienta prospešné a interakcie s liečivami používanými na terapiu iných, často pridružených ochorení.

METODIKA

Slovenská lekárska komora v roku 2017 spustila projekt zameraný na liekové interakcie a poskytla nám údaje o liekových interakciách za obdobie október 2017 až september 2018. Podľa ATC klasifikácie (Anatomical Therapeutic Chemical Classification)

Tab. 1: Zastúpenie interakcií a duplicit

	Klinická závažnosť	Počet (n = 18 240)	% zastúpenie
Interakcie	0	1556	9
	1	3091	17
	2	5262	29
	3	4735	26
	4	1633	9
	5	509	3
	6	239	1
Duplicity	A	358	2
	B	139	1
	C	87	0
	D	631	3

Interakcie: 0 – neinteraguje, 1 – nezávažná, 2 – málo závažná, 3 – stredne závažná, 4 – závažná, 5 – veľmi závažná, 6 – kontraindikácia. Duplicity: A – zhodné ATC (indikované), B – zhodné ATC (neúčelné s malým rizikom), C – neúčelné s rizikom, D – toxicita

sme sa zamerali na interakcie a duplicity liečiv používaných pri liečbe hypertenzie. Sledovali sme interagujúce lieky z ATC skupín určených na liečbu hypertenzie. Podľa ATC klasifikácie kardiovaskulárny systém ovplyvňujú liečivá skupiny C, konkrétne C02 – antihypertenzíva, C03 – diuretiká, C04 – periférne vazodilatanciá, C07 – betablokátory, C08 – blokátory kalciového kanála, C09 – liečivá s účinkom na renínangiotenzínový systém.

Liekové interakcie a duplicity sme klasifikovali podľa klinickej závažnosti a následne sme v každej skupine vyhodnotili najviac sa vyskytujúce liekové interakcie. Zároveň sme sledovali, či v danej kombinácii je aspoň jedno z interagujúcich liečiv antihypertenzívum, alebo sú oba interagujúce liečivá určené na liečbu hypertenzie.

Údaje sme spracovali prostredníctvom softvéru Microsoft Office Excel 2019 a výsledky sme zobrazili v grafoch a tabuľkách. Pri hodnotení liekových interakcií sme použili klasifikáciu závažnosti podľa klinických stupňov. Rozlišovali sme 7 stupňov klinickej závažnosti, stupeň 0 predstavovali interakcie najnižšej klinickej závažnosti, stupeň 6

najnebezpečnejšie liekové interakcie. Podobné delenie sme použili pri duplicitách. Duplicity s označením A predstavovali najmenšie nebezpečenstvo, duplicity D boli potenciálne najnebezpečnejšie.

VÝSLEDKY

Výsledky štúdie sme zaznamenali v tabuľkách 1 – 5, v ktorých sme uviedli 10 najčastejšie sa vyskytujúcich interakcií v každom stupni klinickej závažnosti. Sumár našich výsledkov prináša zistenia na základe celkového počtu 18 240 liekových interakcií, ktoré sme zachytili. Spomedzi všetkých sme identifikovali 36,44 % interakcií, z ktorých bolo iba jedno liečivo z ATC skupiny určenej na terapiu hypertenzie a 8,51 % liekových interakcií, pri ktorých boli obe liečivá antihypertenzíva. Najvyššie percentuálne zastúpenie predstavovali interakcie 2. stupňa klinickej závažnosti, za nimi nasledovali interakcie 3. stupňa. Duplicity predstavovali iba 6 % z celkového počtu zachytených liekových interakcií (viď tab. 1).

Tab. 2: Najčastejšie sa vyskytujúce interakcie v daných stupňoch klinickej závažnosti

Stupeň	Liečivo 1	Liečivo 2	Počet interakcií
0	perindopril/amlodipín	atorvastatín	155
1	kyselina acetylsalicylová	perindopril	545
2	klopidogrel	perindopril	207
3	amlodipín	klopidogrel	147
4	amiodarón	metoprolol	126
5	amiodarón	eplerenón	22
6	trandolapril/verapamil	ivabradín	35

Stupne interakcií: 0 – neinteraguje, 1 – nezávažná, 2 – málo závažná, 3 – stredne závažná, 4 – závažná, 5 – veľmi závažná, 6 – kontraindikácia

Tab. 3: Sumarizácia interakcií a duplicít medzi antihypertenzívom a iným liečivom

		Počet	%	
			Z celého súboru (n = 18 240)	Z celého súboru (n = 6 647)
Interakcie	0	584	3,20	8,79
	1	1617	8,87	24,33
	2	2382	13,06	35,84
	3	1294	7,09	19,47
	4	550	3,02	8,27
	5	73	0,40	1,10
	6	58	0,32	0,87
Duplicity	A	88	0,48	1,32
	B	0	0,00	0,00
	C	1	0,01	0,02
	D	0	0,00	0,00
	Spolu	6647	36,44	100

Stupne interakcií: 0 – neinteraguje, 1 – nezávažná, 2 – málo závažná, 3 – stredne závažná, 4 – závažná, 5 – veľmi závažná, 6 – kontraindikácia. Duplicity: A – zhodné ATC (indikované), B – zhodné ATC (neúčelné s malým rizikom), C – neúčelné s rizikom, D – toxicita

Interakcie liečiv, z ktorých iba jedno liečivo slúži na liečbu hypertenzie

Spomedzi všetkých zachytených interakcií sme identifikovali 36,44 % z nich, pričom len jedno liečivo bolo z ATC skupiny určenej na terapiu hypertenzie (vid' tab. 2). Klinicky významné interakcie (interakcie 4. až 6. stupňa klinickej závažnosti) sa vyskytli v 681 prípadoch, čo predstavovalo 10,24 % z celkového

počtu interakcií (vid' tab. 3). Identifikované duplicity predstavovali percentuálne veľmi nízky výskyt v sledovanom súbore.

Interakcie liečiv, z ktorých obe terapeutiká slúžia na liečbu hypertenzie

Spomedzi všetkých zachytených interakcií sme identifikovali 8,51 % z nich, pri ktorých boli obe

Tab. 4: Najčastejšie sa vyskytujúce interakcie v daných stupňoch klinickej závažnosti

Stupeň	Liečivo 1	Liečivo 2	Poče
0	valsartan/diuretiká	ramipril	20
1	telmisartan	amlodipín	79
2	furosemid	perindopril/amlodipín	99
3	perindopril/amlodipín/indapamid	urapidil	59
4	trandolapril	eplerenón	37
5	rilménidín	metoprolol	69

Stupne interakcií: 0 – neinteraguje, 1 – nezávažná, 2 – málo závažná, 3 – stredne závažná, 4 – závažná, 5 – veľmi závažná interakcia

Tab. 5: Sumarizácia interakcií a duplicit medzi dvoma antihypertenzívami

		Počet	%	
			Z celého súboru (n = 18 240)	Z daných interakcií a duplicit (n = 1552)
Interakcie	0	49	0,27	3,16
	1	238	1,30	15,34
	2	298	1,63	19,20
	3	344	1,89	22,16
	4	174	0,95	11,21
	5	189	1,04	12,18
	6	0	0,00	0,00
Duplicity	A	112	0,61	7,22
	B	81	0,44	5,22
	C	13	0,07	0,84
	D	54	0,30	3,48
	Spolu	1552	8,51	100

Stupne interakcií: 0 – neinteraguje, 1 – nezávažná, 2 – málo závažná, 3 – stredne závažná, 4 – závažná, 5 – veľmi závažná, 6 – kontraindikácia. Duplicity: A – zhodné ATC (indikované), B – zhodné ATC (neúčelné s malým rizikom), C – neúčelné s rizikom, D – toxicita

liečivá z ATC skupiny určenej na liečbu hypertenzie (viď tab. 4). Klinicky významné interakcie (4. až 6. stupňa klinickej závažnosti) sa vyskytli v 363 prípadoch, čo predstavovalo 23,39 % z celkového počtu interakcií (viď tab. 5).

DISKUSIA

Najviac interakcií sme zaznamenali medzi interakciami druhého a tretieho stupňa klinickej závažnosti z celkového počtu interakcií. Hoci nepredstavujú nebezpečenstvo pre pacienta, aj napriek tomu ich nesmieme podceňovať. Je nevyhnutné, aby lekár o týchto kombináciách vedel a pacienta

dôsledne sledoval.

V nultom a prvom stupni klinickej závažnosti liekových interakcií sme zaznamenali viacero prípadov s účasťou warfarínu. Vzhľadom na jeho vysokú interakčnú aktivitu môžeme vyjadriť spokojnosť s nízkym nebezpečenstvom pre pacienta. Je pravdepodobné, že tento fakt súvisí s vysokou informovanosťou o danom probléme.

V 2. a 3. stupni klinickej závažnosti sa medzi interagujúce liečivá zaradili predovšetkým ACE inhibítory a tamsulosín, ktorý v prípade kombinácie s antihypertenziivami môže vyvolať výraznú hypotenziu.

V štvrtom stupni sa interakčne zaujímavé javili betablokátory, v piatom stupni bola najfrekvencovanejšia interakcia medzi nebivololom a paroxetínom. V oboch prípadoch sa jednalo o farmakokinetickú interakciu vznikajúcu ovplyvnením metabolizmu prostredníctvom cytochrómu P450. Medzi kombináciou dvoch antihypertenzných liečiv sme neidentifikovali ani jednu interakciu klinickej závažnosti, čo by vzhľadom na skutočnosť život ohrozujúceho stavu malo byť samozrejmosťou. Medzi interakciami antihypertenzného liečiva a látky inej ATC skupiny sme však interakcie 6. stupňa klinickej závažnosti zaznamenali. Problém predstavovalo liečivo levomepromazín, ktoré je kontraindikované v prípade podávania hypotenzných liečiv. Napriek tomu sme zaznamenali 22 prípadov ich súčasného užívania. Takáto preskripcia môže viesť k život ohrozujúcim hypotenzným stavom. Zaujímavou skupinou sa javili aj interakcie piateho stupňa klinickej závažnosti, kde sa na všetkých interakciách podieľal rilmenidín. Pozitívnym zistením bolo zachytenie malého množstva duplicit v rámci skupiny interakcií antihypertenzií a iných liečiv.

Projekt Slovenskej lekárskej komory poukázal na nevyhnutnosť zapojenia pacienta do skríningu liekových interakcií. Vzhľadom na fakt, že farmaceut stále nemá prístup k informáciám o kompletnej liečbe pacienta, nemôže všetky liekové interakcie odhaliť.

Je preto nevyhnutné budovať si dôveru pacientov, aby tí boli ochotní konzultovať s farmaceutom svoju farmakoterapiu. Zatiaľ len takýmto aktívnym spôsobom vieme riešiť problematiku liekových interakcií. Môžeme len dúfať, že zavedenie a vývoj elektronického zdravotníctva prinesie zlepšenie aj v oblasti liekových interakcií.

ZÁVER

Predložená štúdia približuje problematiku liekových interakcií, pričom poukazuje na fakt ich častého podceňovania ako súčasť zdravotnej starostlivosti, ktorá si vyžaduje aktívny prístup zo strany lekára, farmaceuta a v neposlednom rade aj pacienta. Vyhľadávanie a zabránenie vzniku liekových interakcií zvyšuje šance pacientov na zlepšenie ich zdravotného stavu, zároveň je to možnosť šetrenia finančných prostriedkov vynaložených na zdravotnú starostlivosť.

ZOZNAM LITERATÚRY

Alexander, M. R., Norlander, A. E., Elijovich, F., Atreya, R. V., Gaye, A., Gnecco, J. S., Madhur, M. S.: Human monocyte transcriptional profiling identifies IL-18 receptor accessory protein and lactoferrin as novel immune targets in hypertension. *British journal of pharmacology*, 2019, 176 (12), 2015 – 2027.

Cascorbi, I.: Drug interactions – principles, examples and clinical consequences. *Deutsches Arzteblatt International*, 2012, 109 (33 – 34), 546 – 556.

Ismail, M., Iqbal, Z., Khattak, M. B., Khan, M. I., Javaid, A., Khan, T. M.: Potential drug-drug interactions in cardiology ward of a teaching hospital. *Health Med*, 2012, 6, 1618 – 24.

Magulová, L., Božeková, L., Kriška, M.: Interakcie liečiv v klinickej praxi. [Drug interactions in clinical practice]. Bratislava: Slovak Academic Press, 2004. 339 s.

Merlo, J., Liedholm, H., Lindblad, U., Björck-

Linné, A., Fält, J., Lindberg, G., Melander, A.: Prescriptions with potential drug interactions dispensed at Swedish pharmacies in January 1999: cross sectional study. *Bmj.*, 2001, 323 (7310), 427 – 428.

Perlík, F. a Slanař, O.: Farmakogenetika metabolismu léčiv – z výzkumu do klinické praxe [Pharmacogenetics of drug metabolism – from research to clinical practice]. *Remedia*, 2015, 226 – 230.

Pirmohamed, M., James, S., Meakin, S., Green, C., Scott, A. K., Walley, T. J., Breckenridge, A. M.: Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *Bmj.*, 2004, 329 (7456), 15 – 19.

Scripture, Ch. D. a Figg, W. D.: Drug interactions in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6 (7), 546 – 558.



PREPARATÍVNA CHROMATOGRÁFIA OLIGOSACHARIDOV HYALURONANU TESTOVANÝCH NA CYTOTOXICITU

PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY OF HYALURONAN OLIGOSACCHARIDES TESTED ON CYTOTOXICITY

Brečková, Dominika¹; Harvanová, Jarmila²

¹Lekáreň Poprad s.r.o., 1.mája 4500/30, 05 801 Poprad

²Katedra chémie, biochémie a biofyziky

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

jarmila.harvanova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Produkty degradácie hyaluronanu, ktorý je hydrofobizovaný ako ester kyseliny hexánovej, môžu reprezentovať biologicky aktívne látky. Keďže hyaluronidáza je prirodzene sa vyskytujúci degradačný enzým, chemicky modifikovaná štruktúra hyaluronanu takisto podlieha tejto fyziologickej degradácii. Je dôležité produkty degradácie izolovať, vyčistiť, ako aj testovať ich na ich potenciálnu cytotoxicitu. Fragmenty enzymatickej degradácie boli separované iónovo-výmennou chromatografiou (IEC) podľa dĺžky reťazca a na základe stupňa acylácie izolovanej pomocou chromatografie na reverzných fázach (RPLC). Štruktúry boli potvrdené hmotnostnou spektrometriou (MS). Cytotoxicita bola stanovená

pomocou MTT testu na bunkovej línii myších fibroblastov (3T3 bunky) s negatívnym výsledkom.

Kľúčové slová: cytotoxicita; degradačné produkty; hyaluronan

ABSTRACT

The products of degradation of hyaluronan that is hydrophobized as an ester of hexanoic acid may represent biologically active substances. Since hyaluronidase is a naturally occurring degradation enzyme, the chemically modified structure of hyaluronan undergoes this physiological degradation as well. It is important to isolate degradation products, purify them and test their potential cytotoxicity. The fragments

of enzymatical degradation were separated by ion-exchange chromatography (IEC), according to chainlength and based on the degree of acylation isolated by the (RPLC). The structures were confirmed by mass spectrometry (MS). Cytotoxicity was determined by the MTT assay on the mouse fibroblast cell line (3T3 cells) with negative result.

Key words: cytotoxicity; degradation products; hyaluronan

ÚVOD

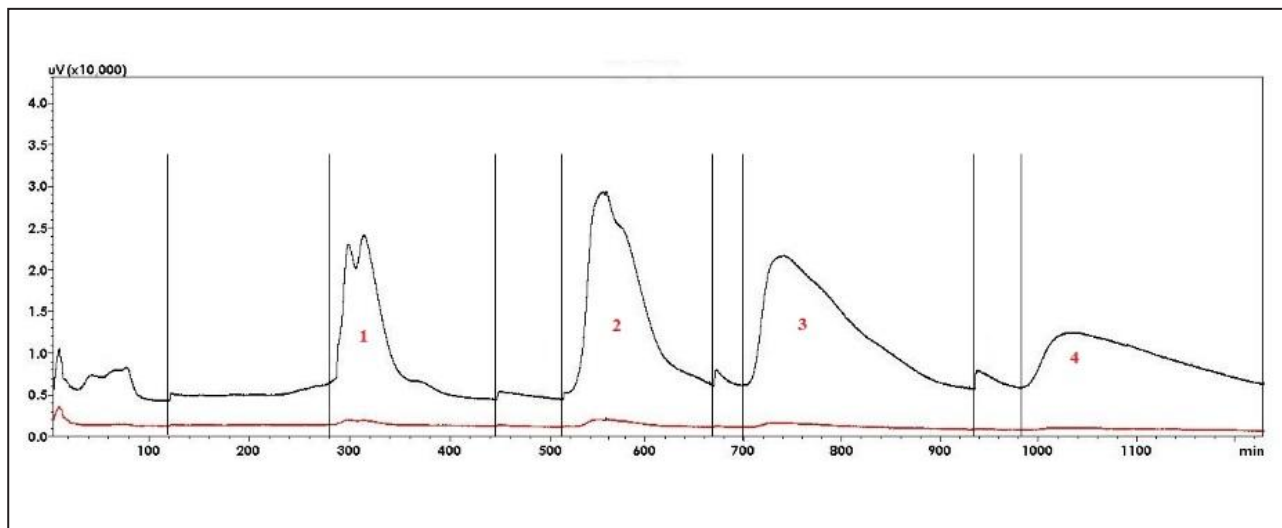
Kyselina hyalurónová je vysokomolekulárny polyaniónový polysacharid zložený zopakujúcich sa disacharidových jednotiek kyseliny D-glukurónovej a N-acetyl-D-glukozamínu viazaných striedajúcimi sa β -(1,4) a β -(1,3) glykozidovými väzbami (Laurent a Fraser, 1992). Biologické účinky sodnej soli hyaluronanu sú funkciou jeho molekulovej hmotnosti (Uthman a kol., 2003). Vysokomolekulárne HA sú imunosupresívne (Delmage a kol., 1986) a antiangiogénne (Feinberg a Beebe, 1983), kým deriváty s nízkou molekulovou hmotnosťou v tele pôsobia ako endogénne „signály nebezpečenstva“ stimulujúce zápalové procesy (Scheibner a kol., 2006). Hyaluronan ako prirodzene sa vyskytujúca zložka živých organizmov je biologicky odbúrateľná, biokompatibilná a netoxická zlúčenina s veľkým potenciálom pre využitie v medicínskej oblasti (Garg a kol., 2005). Výsledky štúdia cytotoxicity dokazujú, že HA nevykazuje antigénne ani imunogénne vlastnosti, len veľmi slabo interaguje s krvnými zložkami (Amarnath a kol., 2006). Za fyziologických podmienok prítomný hyaluronan v organizme podlieha enzymatickej degradácii endogénnymi hyaluronidázami, ktoré štiepia reťazec na oligosacharidové fragmenty rôznej dĺžky. Produkty degradácie môžu vykazovať odlišné vlastnosti oproti východiskovej molekule, je preto potrebné tieto produkty charakterizovať a overiť ich bezpečnosť. V súčasnosti existuje viacero metód na

určenie cytotoxicity *in vitro*, ktoré indukujú metabolické zmeny v bunkách vyvolané pôsobením testovaných látok. Rozšírené je využitie kolorimetrických metód založených na redukcii tetrazóliových solí (napr. MTT, XTT, MTS) na farebné formazánové produkty v prítomnosti koenzýmu NADH a dehydrogenázy metabolicky aktívnych buniek (Stockert a kol., 2018). Chemickými modifikáciami upravené vlastnosti HA sú použiteľné v biomedicínskej, farmaceutickej aj kozmetickej praxi. Východiskovou látkou experimentu bol acyláciou molekuly HA hydrofobizovaný derivát s predpokladaným využitím v biomedicínskej a kozmetickej oblasti. Degradčné produkty kyselinou hexánovou esterifikovaného hyaluronanu po enzymatickej degradácii bovinnou testikulárnou hyaluronidázou boli testované MTT tetrazóliovým testom na potenciálnu cytotoxicitu oligosacharidových fragmentov.

MATERIÁL A METÓDY

Hyaluronan esterifikovaný ako ester kyseliny hexánovej (Contipro Pharma, a. s., Dolní Dobrouč, Česká republika) s molekulovou váhou 15 kDa a stupňom substitúcie 55,9 % bol rozpustený v octanovom tlmivom roztoku s pH 5,3 a enzymaticky degradovaný pri 37 °C po dobu 48 hod bovinnou testikulárnou hyaluronidázou (Finepharm S. A., Jelenia Gora, Poľsko) s výrobcom stanovenou aktivitou 20 976 Ph. Eur./1 mg lyofilizátu. Štiepne produkty enzymatickej degradácie boli na základe dĺžky reťazca oddelené iónovo-výmennou chromatografiou (IEC) metódou gradientovej elúcie s mobilnou fázou 0,3 mol.dm⁻³ roztoku chloridu sodného (Contipro a. s., Dolní Dobrouč, Česká republika) na chromatografickom systéme HPLC Waters 600. Ultrafiltráciou boli zo separovaných vzoriek odstránené zvyšky mobilnej fázy a po lyofilizácii boli štruktúry hodnotené hmotnostnou spektrometriou s ionizáciou elektrosprejom (ESI-MS), autopurifikačným LC-MS systémom Waters s mobilnými fázami; 0,1 % kyselinou mravčou

Obr. 1: IEC chromatogram po degradácii východiskovej látky hyaluronanu hydrofobizovaného kyselinou hexánovou. Vzorky 1 – 4 vyznačené na chromatograme potvrdzujú vznik štiepnych produktov vyplavovaných z kolóny so stúpajúcou tendenciou na základe dĺžky oligosacharidového reťazca



Zdroj: Dominika Brečková, Contipro, a. s.

(Sigma-Aldrich, Nemecko) a metanolom (Lach-Ner, Česká republika) pri 60 V a negatívnom móde ESI. Degradčné produkty v rôznom stupni acylácie boli separované na autopurifikačnom systéme LC-MS Waters. Štiepne produkty, ktoré po záverečnej lyofilizácii dosiahli množstvo 20 mg, boli testované MTT tetrazóliovým testom na bunkovej línii myších fibroblastov 3T3 v 4 koncentráciách: $10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, $100 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, $250 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a $500 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a hodnotené po 24, 48 a 72 hod.

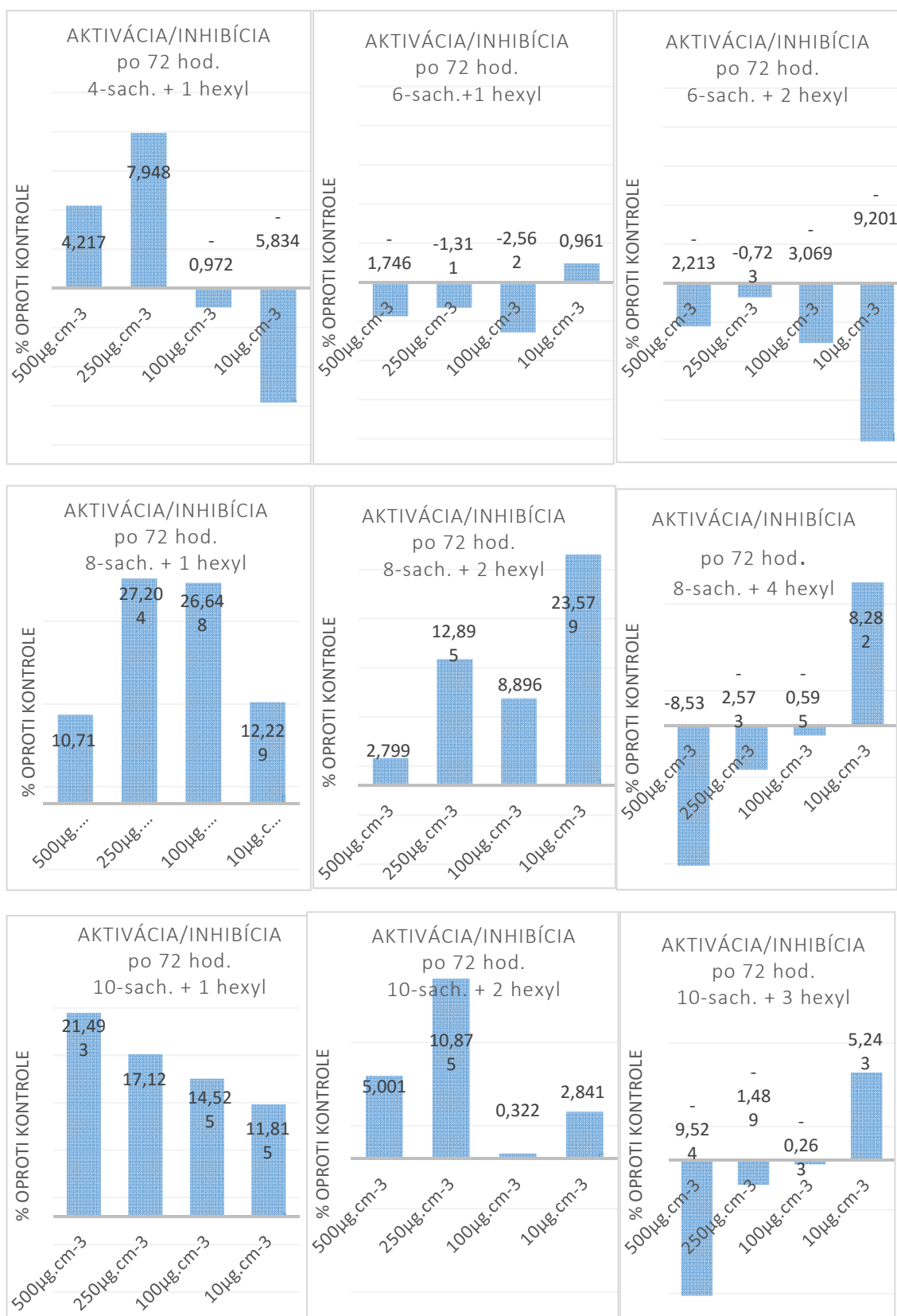
VÝSLEDKY

Východiskovou látkou experimentu bol esterifikáciou kyselinou hexánovou hydrofobizovaný derivát hyaluronanu, ktorý bol enzymaticky degradovaný bovinnou testikulárnou hyaluronidázou. Po 48-hodinovej inkubácii vzorky bola východisková látka dostatočne degradovaná pre následnú separáciu oligosacharidov s rôznou dĺžkou reťazca metódou iónovo-výmennej chromatografie (IEC) s roztokom chloridu sodného ako mobilnej fázy. Na experiment sme využili gradientovú

elúciu, ktorou sme rozseparovali jednotlivé formy degradačných produktov s rôznou dĺžkou reťazca, čo znázorňujú píky 1 – 4 na chromatograme IEC (viď obr. 1).

Vo vzorkách 1 – 4 rozseparovaných metódou IEC sme hmotnostnou spektrometriou (MS) potvrdili prítomnosť 2-sach., 4-sach., 6-sach., 8-sach. a 10-sach. fragmentov východiskovej látky acylovaných 1, 2, 3 a 4 hexylmi. V primárnom experimente sme po lyofilizácii získali 139,76 mg zmesi 4-sach.; 197,0 mg zmesi 6-sach.; 189,16 mg zmesi 8-sach. a 202,1 mg zmesi 10-sacharidových fragmentov vo viacerých stupňoch acylácie. V kontrolnom experimente s dvojnásobným množstvom východiskovej látky sme izolovali 4-sach. v množstve 158,6 mg; 396,9 mg 6-sach.; 627,1 mg 8-sach. a 50,4 mg 10-sach. V ďalších krokoch sme preparatívnou metódou od seba odseparovali MS analýzou potvrdené chemické formy líšiace sa stupňom acylácie. Pre ďalšie stanovenie cytotoxicity a čistoty izolovaných látok bol potrebný výťažok vyšší ako 20 mg, čo bolo úspešné pri derivátoch: 4-sach. acylovaný 1 hexylom, 6-sach. s 1 a 2 hexylmi, 8-sach. s 1, 2 a 4

Obr. 2: Výsledky cytotoxicity izolovaných degradačných produktov hyaluronanu hodnotené po 72 hod v koncentráciách 10 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$, 100 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$, 250 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$ a 500 $\mu\text{g}.\text{cm}^{-3}$. Výsledky inhibície jednotlivých derivátov potvrdzujú, že testované vzorky nevykazujú významnú cytotoxicitu



hexylmi a vzorku 10-sach. s 1, 2, 3 aj 4 hexylmi. Tieto vzorky boli testované pre prípadnú cytotoxicitu MTT tetrazóliovým testom. Pripravené boli 4 koncentrácie každej vzorky: $10 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, $100 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, $250 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ a $500 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Pripravené vzorky boli testované na bunkových líniiach myších fibroblastov 3T3. Vyhodnotením relatívneho počtu živých buniek oproti derivátom neovplyvnenej kontrole po 24, 48 a 72 hod bolo určenie života schopnosti buniek. Na základe týchto hodnôt bola vyhodnotená aktivácia/inhibícia bunkového rastu oproti kontrole. Čím vyššia je inhibícia, tým látka pôsobí na bunky cytotoxickéjšie. Látka je považovaná za necytotoxickú, ak je hodnota stupňa inhibície pod 20 %, hodnota 20 – 40 % označuje látku ako slabocytotoxickú, 40 – 60 % stredne cytotoxickú a nad 60 % dosahujú látky s vysokou cytotoxicitou (viď obr. 2).

DISKUSIA

V posledných rokoch bol vývoj v oblasti výskumu nových biokompatibilných materiálov zameraný na modifikáciu prírodných polymérov, kde dôležitú úlohu vďaka svojim biologickým vlastnostiam zastávajú deriváty hyaluronanu. Tieto prirodzene sa vyskytujúce polysacharidy podliehajú za fyziologických podmienok enzymatickej degradácii prítomnými hyaluronidázami. V rámci intenzívneho výskumu hyaluronanu prebieha enzymatická degradácia *in vitro* cicavčiami hyaluronidázami najčastejšie v prostredí octanového tlmivého roztoku, ktorého pH je upravené v rozmedzí 4,8 až 6,0 pri teplote 37 °C. Určené rozmedzie pH je optimálne pre aktivitu väčšiny HA degradujúcich enzýmov (Park a kol., 1997). Dôležitým aspektom degradácie je aj zvolené časové trvanie enzymatickej degradácie, zmenou trvania sa mení aj priemerná veľkosť vznikajúcich OHA. Zvyšovanie času degradácie vedie k zvyšovaniu podielu nízkomolekulárnych fragmentov HA (Capila, 2004). Pre degradáciu hyaluronanu esterifikovaného kyselinou hexánovou sme v experimente zvolili 48-hod časový interval, ktorého výsledkom bola zmes 4- až 10-sacharidových

fragmentov, ktoré boli na základe dĺžky reťazca odseparované metódou aniónovo-výmennej chromatografie vhodnej pre separáciu negatívne nabitých glykozaminoglykánov. Nakoľko sa s rastúcou dĺžkou reťazca zvyšuje aj záporný náboj molekuly, fragmenty s vyššou molekulovou hmotnosťou sú z kolóny vyplavené pri vyšších retenčných časoch.

Hmotnostná spektrometria s ionizáciou elektrosprejom (ESI-MS) je účinná metóda vhodná na analýzu sacharidov. Štúdie záporne nabitých sacharidov v negatívnom móde ESI-MS dokazujú, že metóda je dobre aplikovateľná aj pre skupinu glykozaminoglykánov (Volpi a kol., 2007), ktoré sú okrem separácie v jednom kroku podrobené aj ich štruktúrnej identifikácii. Hyaluronan vo svojej štruktúre obsahuje karboxylové a hydroxylové skupiny, ktoré ponúkajú jednoduchú možnosť tvorby aniónov, a tak vzniká aj predpoklad vyššej citlivosti v negatívnom móde ionizácie elektrosprejom (Prebyl a kol., 2003).

Chemicky modifikované formy HA rovnako podliehajú fyziologickej degradácii, preto je dôležité izolovať a ďalej testovať z hľadiska bezpečnej aplikácie do organizmu všetky vznikajúce produkty degradácie. V experimente bol na určenie prípadnej cytotoxicity použitý MTT tetrazóliový test prevedený na bunkovej línii myších fibroblastov 3T3. Do žltá sfarbené farbivo (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenylnitetrazólium bromid) sa v prítomnosti aktívnych mitochondriálnych centier živých buniek redukuje na fialovo sfarbený formazánový produkt, ktorý vo forme nerozpustných granúl zostáva vo vnútri buniek. Po pridaní detergentu/okyslení dochádza k rozpusteniu granúl a vzniku vhodne sfarbeného roztoku pre fotometrické stanovenie. Z priemerných paralelných hodnôt relatívnych počtov živých buniek oproti derivátom neovplyvnenej kontroly vo všetkých koncentráciách a časoch so zohľadnením strednej chyby priemeru boli vyhodnotené grafy viability buniek znázorňujúce podiel ovplyvnených buniek vzhľadom k vzorkami neovplyvnenej kontrole a následne bola vyhodnotená miera inhibície, resp. aktivácie bunkového rastu vplyvom

testovaného derivátov závislosti od koncentrácie. Na základe zostavených grafov sme potvrdili, že žiadenz degradačných produktov izolovaných po enzymatickej degradácii východiskovej vzorky nevykazuje v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou významnú cytotoxicitu a deriváty sú vhodné pre využitie na priame aplikácie do organizmu.

ZÁVER

Cieľom experimentálnej štúdie bola izolácia produktov enzymatickej degradácie hyaluronanu hydrofobizovaného esterifikáciou kyselinou hexánovou so zámerom testovania ich potenciálnej cytotoxicity. Vhodnými analytickými metódami boli zo zmesi oligosacharidových degradačných produktov odseparované jednotlivé chemické formy líšiace sa dĺžkou a stupňom acylácie reťazca. Chemické formy izolované v množstve vyššom ako 20 mg boli testované MTT testom cytotoxicity. Množstvo vznikajúcich formazánových produktov v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou nepotvrdilo významnú cytotoxicitu a derivát hyaluronanu esterifikovaný kyselinou hexánovou je vhodný na biomedicínske aplikácie.

SKRATKY A ZNAČKY

IEC – iónovo-výmenná chromatografia; **ESI** – ionizácia elektrosprejom; **HA** – hyaluronan; **HPLC** – vysoko účinná kvapalinová chromatografia; **LC** – kvapalinová chromatografia; **MS** – hmotnostná spektrometria; **MTS** – tetrazoliové farbivo 5-(3-karboxymetoxifenyl)-2-(4,5-dimetyltiazolyl)-3-(4-sulfofenyl)tetrazólium; **MTT** – tetrazoliové farbivo 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium; **NADH** – nikotínamid dinukleotid; **RPLC** – chromatografia na reverzných fázach; **XTT** – tetrazoliové farbivo 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenyl)tetrazólium-5-karboxanilid; **3T3** – bunková línia myších fibroblastov

ZOZNAM LITERTÚRY

Amarnath, L. P., Srinivas, A., Ramamurthi, A.: In vitro hemocompatibility testing of UV-modified hyaluronan hydrogels. *Biomaterials*, 2006, 27 (8), 1416 – 1424.

Capila, I. a Sasisekharan, R.: *Methods for Analysis of Hyaluronan and Its Fragments. Chemistry and Biology of Hyaluronan*. Elsevier Science, 2004. 21 – 39.

Delmage, J. M., Powars, D. R., Jaynes, P. K., Allerton, S. E.: These lective suppression of immunogenicity by hyaluronic acid. *Annals of Clinical Laboratory Science*, 1986, 16 (4), 303–310.

Feinberg, R. N. a Beebe, D. C.: Hyaluronate in vasculogenesis. *Science*, 1983, 220 (4602), 1177 – 1179.

Garg, H. G. a Hales, Ch. A.: Chemistry and Biology of Hyaluronan. *Chem. Bio. Chem.*, 2005, 6, 1288 – 1289.

Laurent, T. C. a Fraser, J. R.: Hyaluronan. *The FASEB Journal*, 1992, 6 (7), 2397 – 2404.

Park, Y., Cho, S., Linhardt, R. J.: Exploration of the action pattern of Streptomyces hyaluronately as using high-resolution capillary electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1337 (2), 217 – 226.

Prebyl, B. S., Kaczmarek, C., Tuinman, A. A., Baker, D. C.: Characterizing the electrospray-ionization mass spectral fragmentation pattern of enzymatically derived hyaluronic acid oligomers. *Carbohydrate Research*, 2003, 338 (13), 1381 – 1387.

Scheibner, K. A., Lutz, M. A., Boodoo, S., Fenton, M. J., Powell, J. D., Horton, M. R.: Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *Journal of Immunology*, 2006, 177, 1272 – 1281.

Stockert, J. C., Horobin, R. V., Colombo, L. L., Blásquez-Castro, A.: Tetrazolium salts and formazan products in cellbiology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, 2018, 120 (3), 159 – 167.

Uthman, I., Raynauld, J. P., Haraoui, B.:
Intra-articular therapy in osteoarthritis. *Postgraduate
Medicinal Journal*, 2003, 79, 449 – 453.

Volpi, N.: On-line HPLC/ESI-MS separation
and characterization of hyaluronan oligosaccharides
from 2-mers to 40-mers. *Analytical Chemistry*, 2007,
79 (16), 6390 – 6397.



**IMUNOLOGICKÉ ASPEKTY REUMATOIDNEJ ARTRITÍDY – ŠTÚDIA
SLOVENSKÝCH PACIENTOV S POKROČILOU FORMOU OCHORENIA
A LIEČENÝCH BIOLOGICKOU LIEČBOU**

**IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF RHEUMATOID ARTHRITIS – STUDY OF SLOVAK
PATIENTS WITH ADVANCED DISEASE AND TREATED BY BIOLOGICAL
TREATMENT**

Kováč, Jozef;¹ Mudroňová, Dagmar;¹ Macejová, Želmíra;² Danko, Jakub³

¹Katedra mikrobiológie a imunológie

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

²Lekárska fakulta UPJŠ v Košiciach, Trieda SNP 1, 040 11 Košice

Slovenská republika

³Fakulta informatiky a štatistiky, Vysoká škola ekonomická, Nám. W. Churchilla 1938/4, 130 67 Praha

Česká republika

dagmar.mudronova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Štúdia sa zaoberá jedným z najčastejších autoimunitných ochorení vo svete – reumatoidnou artritídou. Pomocou dotazníkového prieskumu vzorky pacientov z okresov východnej časti Slovenskej republiky s pokročilou formou ochorenia zisťuje a vyhodnocuje údaje najčastejšie súvisiace s patológiou, patogenézou či epidemiológiou ochorenia. Pohlavná distribúcia pacientov s reumatoidnou artritídou bola v pomere 3:1 v prospech žien. Nástup symptómov reumatoidnej artritídy bol najčastejšie vo vekovom rozmedzí 16 a 55 rokov. Najčastejšie vyskytujúce sa pridružené ochorenia sú hypertenzia a *diabetes mellitus*. Pri diabete sme zaznamenali vyššie

percento postihnutých ako u zdravej populácie. Postihnuté kĺby sa môžu v rámci pohlaví líšiť. Významné rozdiely sme zistili pri malých kĺboch rúk a nôh a rovnako aj pri krčnej chrbtici, ktoré boli postihnuté častejšie u žien. Z liečby farmakopreparátmi štúdia berie do úvahy hlavne prípravky biologickej liečby, keďže celá skúmaná vzorka boli pacienti špeciálnej reumatologickej kliniky, kde je takáto liečba predpisovaná a podávaná. Najpoužívannejšie preparáty zo skupiny biologických liečiv boli na báze inhibítorov tumor nekrotizujúceho faktora – najviac adalimumab, potom etanercept a infliximab. Zo skupiny konvenčných chorobu modifikujúcich liečiv to bol metotrexát a na symptomatickú liečbu bolesti kĺbov pacienti najčastejšie používali diklofenak.

Údaje pacientov z dotazníkov sú doplnené štatistikou reumatoidného faktora (RF) z ambulantných záznamov. Tento faktor predstavuje dôležitý imunoparameter vyhodnocovaný hlavne v rámci diagnostiky ochorenia, pričom 84,4 % pacientov s diagnostikovanou reumatoidnou artritídou malo pozitívny test na tento faktor. Reumatoidná artritída a jej špecifiká (vrátane RF) sledované na skupine pacientov z východných okresov Slovenska sa vo väčšine skúmaných aspektov zhodujú so skúsenosťami zo zahraničných pracovísk.

Kľúčové slová: biologická liečba; klinické príznaky; reumatoidná artritída; terapia

ABSTRACT

The study deals with one of the most common autoimmune diseases in the world – rheumatoid arthritis. Using a questionnaire survey, samples of patients from the districts of the eastern part of the Slovak republic with an advanced form of the disease, it identifies and evaluates data most frequently related to the pathology, pathogenesis or epidemiology of the disease. The sex distribution of rheumatoid arthritis patients was 3:1 in favor of women. The onset of symptoms of rheumatoid arthritis was most frequent between the ages of 16 and 55 years. The most common associated diseases are hypertension and *diabetes mellitus*. In diabetes there is a higher percentage of afflicted people than in the healthy population. Affected joints may vary within sex. Significant differences were found in the small joints of the arms and legs as well as in the cervical spine, which were more often affected in women. From the pharmacopreparation treatment the study takes into account mainly the biological treatment products, as the whole sample examined were patients of a special rheumatology clinic where such treatment is prescribed and administered. The most widely used biological drugs were based

on tumor necrosis factor inhibitors – mostly adalimumab, then etanercept and infliximab. Among the conventional disease modifying drugs it was methotrexate and patients most commonly used diclofenac for symptomatic treatment of joint pain. Patient questionnaire data are supplemented with rheumatoid factor (RF) statistics from the outpatient records. This factor is an important immunoparameter evaluated mainly for disease diagnosis, with 84.4 % of patients diagnosed with rheumatoid arthritis having a positive test for this factor. Rheumatoid arthritis and its specifics (including RF) observed in a group of patients from eastern districts of Slovakia are in most aspects consistent with the experience from foreign workplaces.

Key words: biological therapy; clinical signs; rheumatoid arthritis; therapy

ÚVOD

RA je aktuálne najčastejšie sa vyskytujúcim autoimunitným zápalovým ochorením u dospelaj populácie. Zápalový proces RA postihuje najmä kĺby ohraničené synoviom – špecializovaným tkanivom, ktoré je zodpovedné za udržiavanie výživy a lubrikácie kĺbu. Distribúcia postihnutých kĺbov (synoviálnych kĺbov) je charakteristická. Typicky postihuje malé kĺby rúk a chodidiel, a zvyčajne obe strany rovnako v symetrickej rovnováhe. Avšak každý jeden synoviálny kĺb v organizme je potenciálnym ložiskom zápalu. U pacientov so stálou a agresívnou formou RA sú v konečnom dôsledku väčšinou postihnuté všetky takéto kĺby. Iniciálny spúšťač RA nepoznáme. Postupný výskum potvrdil výskyt určitých abnormalít komponentov imunity, ktoré vedú organizmus k vývoju chorobnej zápalovej reakcie, obzvlášť v kĺboch. Čokoľvek už spustí patológiu ochorenia, vyústi to do značného zvýšenia krvného prietoku v oblasti kĺbu (vznik tepla a niekedy začervenania), proliferácie synoviálnej membrány a zvýšenia množstva synoviálnej tekutiny (opuch),

bolesti (z dôvodu dráždenia receptorov bolesti v okolitých jemných tkanivách a v kosti na opačnej strane kĺbu). Poškodenie kĺbového aparátu spôsobuje progresívnu deformitu, invaliditu a handicap. Aj keď je rozsiahla artritída hlavným príznakom, treba si uvedomiť, že RA je systémovou chorobou a postihuje viac ako len kĺby. U všetkých pacientov sa uvoľnenie vysokých koncentrácií zápalových mediátorov spája so symptómami ako napr. pocit suchosti v očiach a v ústach (tzv. sekundárny Sjörgenov syndróm, častý aj u iných autoimunitných ochorení) (Patel a Shahane, 2014) alebo vznik reumatických nodúl (uzlíky – tvrdé hrčky, obzvlášť nad povrchom extenzorov, napr. na lakt'och). Zápalové prejavy môžu však viesť aj k závažnejším poruchám, ako je fibróza pľúc alebo vaskulitída.

Autoprotilátky sú charakteristickou súčasťou autoimunitných ochorení. Avšak veľa z nich nehrá pri daných poruchách dôležitú patogenetickú rolu. Aktuálne predstavujú skupinu veľmi dôležitých diagnostických indikátorov, napr. pri stanovovaní aktuálneho stupňa aktivity choroby (von Muhlen a Tan, 1995; Steiner a Smolen, 2001). V rámci RA bolo popísaných viacero autoprotilátkových systémov. Preskúvané boli aj ich klinické asociácie, ako je napr. ich úloha ako markerov progresie ochorenia (Blass a kol., 1999). Z týchto len tri (reumatoidný faktor; protilátky proti citrulinovaným antigénom ako je filagrín alebo vimentín, tzv. anti-CCP protilátky; protilátky proti proteínu viažucemu imunoglobulín – BiP) vykazujú dostatočnú senzitivitu a špecifitu. Existuje evidentná spojitosť medzi hladinou reumatoidného faktora (RF) a pozitívnou diagnózou RA. Úloha RF spočíva najmä v podpore zápalového procesu. Preukázateľne zvyšuje hladiny prozápalových cytokínov ako sú TNF- α , IL-1 β , IL-6 a IL-8 (Anquetil a kol., 2015). Prognostický potenciál RF je spojený aj s jeho zapojením do progresie štruktúrneho poškodenia, a to priamym zvyšovaním aktivity ochorenia cez ovplyvňovanie osteoklastogenézy (Aletaha a Blüml, 2016). Normálny rozsah hladiny RF je od 0 do 20 U.ml⁻¹. RF nad 20 U.ml⁻¹ nie je považovaný za dostatočný k

diagnóze RA, keďže existujú aj ďalšie príčiny kedy je hladina faktora zvýšená. Niektoré ochorenia a medicínske procedúry môžu RF zvyšovať. Patria sem napr. iné autoimunitné ochorenia, niektoré chronické infekcie, diabetes, bakteriálna endokarditída, nádorové ochorenia, ale aj samotné starnutie, vakcinácia alebo transfúzie. Je vhodné podotknúť, že pokiaľ je raz RF zvýšený, ostáva na rovnakej hladine aj pokiaľ ochorenie prechádza do remisie. Okolo 20 % pacientov s RA je séronegatívnych, to znamená, že hladiny markerov majú negatívne. V tomto prípade sa reumatológ najčastejšie spolieha na diagnózu pomocou fyzikálneho testovania kĺbov a rádiologických snímok (Richey, 2015).

Momentálne sa nachádzame v čase, kedy je terapia RA na výslni. Na základe definícií a objavov nových cieľových molekúl sa stále vyvíjajú nové a nové prípravky na liečbu autoimunitných ochorení, ktoré sú sumarizované v prehľadnej práci od Kaldena (2016) a sú tu označované ako b-DMARDS, teda biologické choroby modifikujúce antireumatické lieky (biological disease modifying antirheumatic drugs).

Pre terapeutický postup pri liečbe RA existuje množstvo odporúčaní, jedny z takýchto pokynov vypracovala aj American College of Rheumatology (Singh a kol., 2016). Používanie biologickej terapie ako prídavku ku klasickým DMARDS rapídne expanduje, a to vďaka dobrej efektívnosti a bezpečnostnému profilu týchto liečiv. Cílené terapie ako tieto sú väčšinou pacientami dobre tolerované a často vedú aj k dlhodobej remisii. Napriek tomu je biologická liečba používaná len u tých pacientov, kde terapia klasickými DMARDS, nesteroidnými antiflogistikami a glukokortikoidmi nie je účinná alebo na ňu pacienti zle reagujú. Hlavne vysoká cena, niektoré nežiaduce účinky týchto prípravkov, ale aj nepohodlnosť intravenózneho aplikácie bránia jej širokému používaniu pri terapii prvej voľby. Pre terapeutický postup pri liečbe RA existuje množstvo odporúčaní, jedny z takýchto pokynov vypracovala aj American College of Rheumatology (Singh a kol., 2016).

Hlavné cieľové molekuly väčšiny liekov biologickej terapie sú cytokíny, B bunky a kostimulačné molekuly. Medzi antic cytokíny zaraďujeme protilátky proti TNF- α a proti IL-1 a IL-6. Depléciu B buniek spôsobuje použitie protilátok proti CD20 a modulácie receptora B bunky (BCR) cez B lymfocytový stimulátor (BLyS). Bolo zistené, že niektoré biologické terapie sú úspešné pri liečbe viacerých druhov ochorení, niektoré sú zas špecificky účinné pri jednom druhu ochorenia (Rosman a kol., 2013). Okrem infúzných reakcií medzi najčastejšie nežiaduce účinky biologickej terapie patrí zvýšené riziko závažných infekcií vrátane tuberkulózy a vnútorných plesňových infekcií, pľúcne komplikácie ako pneumonitída, fibróza alebo granulomatózna choroba, bolesti hlavy a hypertenzia a niektoré štúdie uvádzajú aj zvýšené riziko vzniku lymfómu a rakoviny pľúc (Simon a kol., 2009; Perez-Alvarez a kol., 2011; Sheppard a kol., 2017; Frieder, Kivelevitch, Menter, 2018).

Cieľom štúdie bolo prostredníctvom dotazníkov získať prehľad o výskyte, prejavoch a špecifikách terapie reumatoidnej artritídy u pacientov s pokročilou formou ochorenia na Východnom Slovensku.

MATERIÁL A METÓDY

Údaje sme získali dotazníkovým prieskumom vlastnej konštrukcie. Kvantitatívna metóda výskumu nám poskytla súbor dát, ktoré sme následne hodnotili. Dotazník vyplnilo 130 pacientov. Každý z dotazníkov obsahoval priložený informovaný súhlas, ktorý uvádzal súhrn informácií o type, použití a spracovaní získaných informácií z dotazníka. Obsahoval takisto potvrdenie o povolení vykonávania tohto prieskumu miestnou etickou komisiou. Dotazníky boli rozdávané pacientom dvoch špecializovaných ambulancií I. internej kliniky UNLP v Košiciach, ktoré realizujú aj biologickú liečbu RA. Po vyplnení dotazníka personál pomocou uvedeného mena vyhľadal pacienta v informačnom systéme ambulancie a na dotazník uviedol údaj o skúmanom sérovom imunoparametri – reumatoidnom faktore. Navyše sme na základe

viacerých zahraničných štúdií vypracovali niekoľko hypotéz, ktoré porovnávame s vybranými získanými výsledkami. Na jednotlivé otázky odpovedalo rôzne množstvo pacientov – v rozpätí najmenej 108 a najviac 130 respondentov. Na vyhodnotenie bol použitý štatistický program IBM SPSS Statistics 23.

VÝSLEDKY

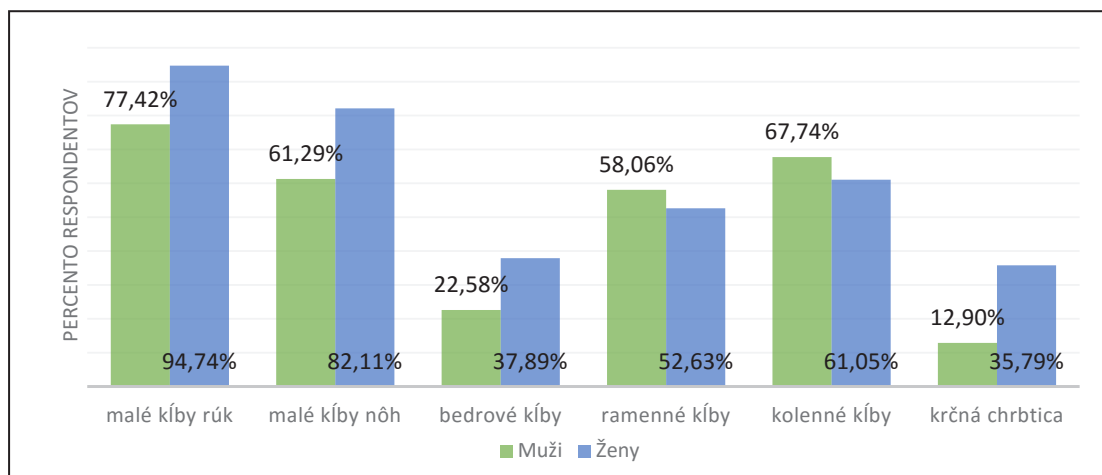
Pohlavná distribúcia našej vzorky pacientov s aktívnou RA zodpovedala percentuálnym hodnotám: 76,2 % žien a 23,8 % mužov. Najviac pacientov sme zaznamenali vo vekovom rozmedzí 51 – 60 rokov (31,0 %), druhou najväčšou skupinou boli 61 – 70 roční (27,1 %) a tretou 41 – 50 roční (18,6 %). V daných ambulanciách tvoria signifikantne najviac pacientov obyvatelia okresu Košice a Košice okolie. Nefajčiarov sme zaznamenali 75,4 %, a to, že fajčia alebo niekedy fajčili uviedlo 24,6 % respondentov. Prvé príznaky sa najčastejšie objavovali v rozmedzí 20 – 40 rokov (40,6 %). Ďalej nasledovala skupina v rozmedzí 40 – 60 rokov (35,9 %) a skupina do 20 rokov (18 %). RA prítomnú v príbuzenstve uviedlo až 36,7 % opýtaných. Väčšinou to bola najbližšia rodina – rodičia alebo súrodenci; uvádzali ale aj starých rodičov a vzdialenejšiu rodinu.

Zo štatistiky postihnutia kĺbových skupín je zrejmé, že najviac postihnuté kĺby sú v rámci ochorenia malé kĺby rúk a malé kĺby nôh. Odchýlky sme zaznamenali pri porovnávaní postihnutia kĺbov v rámci pohlaví. Štatisticky významné boli rozdiely v postihnutí malých kĺbov rúk, malých kĺbov nôh a krčnej chrčtice v prospech ženskej populácie (vid' graf 1). Signifikantné množstvo pacientov uviedlo, že bolestivosť kĺbov je u nich ovplyvňovaná zmenami počasia (84,9 %). Z pohľadu pohlaví sme nezaznamenali významné rozdiely (vid' graf 2).

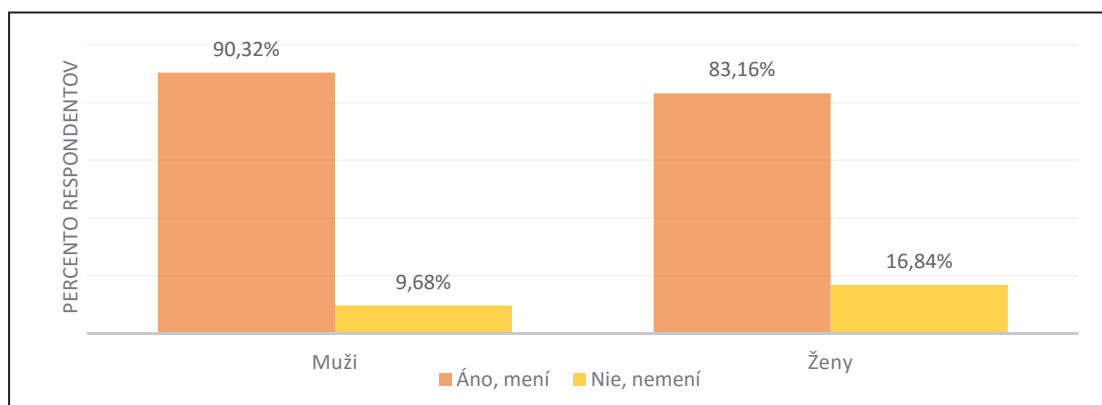
Výskyt určitého pridruženého ochorenia uviedlo 60,5 % opýtaných. Najčastejšou komorbiditou bola hypertenzia (68,1 %) a *diabetes mellitus* (15,3 %).

Štúdia zaznamenávala aj mieru používania prípravkov z jednotlivých skupín liečiv v rámci doterajšej liečby (do času konania štúdie). Z

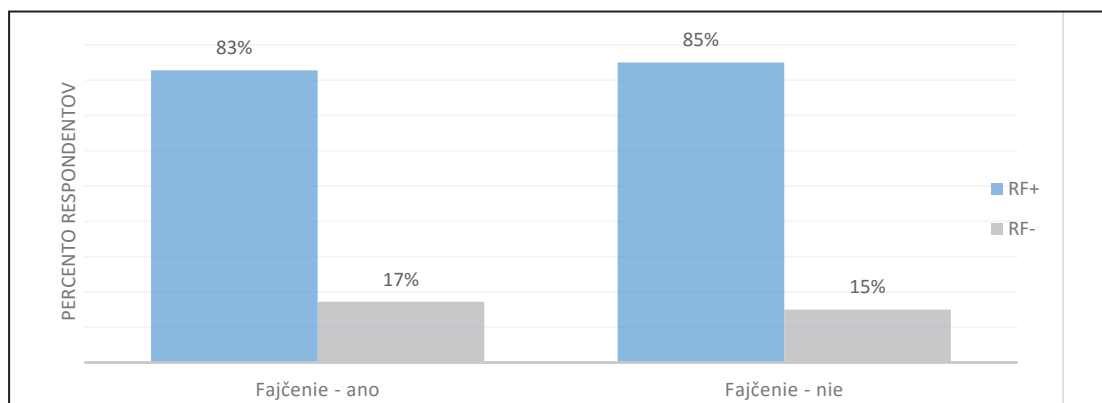
Graf 1: Typy a percentuálne zastúpenie postihnutých kĺbov v závislosti od pohlavia



Graf 2: Závislosť meteosenzitivity a pohlavia



Graf 3: Vzťah fajčenia a sérovej hladiny reumatoidného faktora



konvenčných DMARDs bol najužívanejším metotrexát (69,2 %). Nasledovali sulfasalazín (48,3 %) a hydrochlorochín (23,3 %). Na symptomatickú liečbu kĺbových bolestí využívali najviac lieky s

obsahom diklofenaku (45,3 %), nimesulidu (37,6 %) a metamizolu (27,4 %). Značná skupina opýtaných uviedla, že bolesť potláčali rôznymi voľnopredajnými prípravkami (36,8 %). To, že niekedy boli liečení

glukokortikoidmi, uviedlo 91,5 % pacientov. Z biologickej liečby pacienti najčastejšie podstúpili terapiu adalimumabom (41,0 %), ďalej etanerceptom (26,5 %) a infliximabom (16,2 %). Čo sa týka ostatných foriem terapie, najviac preferovanou bola rehabilitačná forma (až 72,8 %), ktorá viedla nad alternatívnou liečbou (18,4 %), chirurgickou liečbou (17,5 %) a kryoterapiou (15,8 %) s tým, že 20,2 % opýtaných uviedlo, že žiadnu z uvedených možností terapie nevyužili.

Pacienti ďalej uviedli (77,8 % opýtaných), že liečba nastavená reumatológom im nespôsobila problémy. Zvyšných 22,2 % uvádzalo rôznorodé problémy týkajúce sa nežiaducich účinkov liečby, ale aj samotného ochorenia (najčastejšie uvádzali rôzne alergické reakcie na injekčne podávané kortikoidy, prípravky so zlatom, ale aj na biologickú liečbu; druhým najčastejšie uvádzaným problémom bolo liekmi vyvolané poškodenie pečene; ďalej uvádzali pacienti napr. žalúdočné ťažkosti, depresie alebo nauzeu). Následne 88,9 % opýtaných uviedlo, že sa v porovnaní so začiatkom prejavov ochorenia cítia momentálne „oveľa lepšie“ alebo „lepšie“.

Zozbierané dáta o imunoparametri (reumatoidný faktor – RF) získané z ambulantných záznamov pacientov vykazovali takéto výsledky: 84,4 % malo RF pozitívny a 15,6 % malo RF negatívny.

K tejto štatistike sme ešte doplnili hodnotenie korelácie RF a fajčenia u pacientov, kde sme predpokladali odchýlku (Klareskog a kol., 2005). Významné rozdiely sme však nezaznamenali (viď graf 3).

DISKUSIA

U RA je podiel pohlaví pacientov s diagnostikovaným ochorením typicky 3:1 (čiže 75 % žien a 25 % mužov). Tento pomer zvyčajne klesá po piatej dekáde života na 2:1 (Oliver a Silman, 2009). Príčiny tejto dysbalancie nie sú zatiaľ celkom objasnené, no príčinou môžu byť napr. genetické faktory (viazané na X chromozóm) alebo hormonálne aspekty (van Vollenhoven, 2009). Štatistika našej vzorky pacientov

s RA potvrdzuje túto hypotézu.

Ochorenie sa objavuje prvýkrát najčastejšie vo veku medzi 30 a 55 rokom (Font a kol., 1998). Keďže sme si v rámci dotazníka určili špecifické vekové rozmedzia, ktoré si mal respondent vybrať, nie s každou štúdiou bolo možné výsledky relevantne porovnať. V našej štúdii sme zistili, že signifikantne najviac sa objavovali prvé príznaky vo veku 20 až 60 rokov. Podľa tejto štúdie (Goemaere a kol., 1990) by mal medián nástupu RA byť vo veku 47,5 roka.

Najviac postihnuté kĺby boli u pacientov metakarpálne a interfalangeálne kĺby (vrátane zápästia a členku). Ďalšou najčastejšou možnosťou boli kolenné kĺby a následne ramenné kĺby. Naše výsledky korelujú s referenčnou štúdiou (Terao a kol., 2013). Čo sa týka pohlavnej závislosti od postihnutých kĺbových skupín, zistili sme, že rozdiely v niektorých možnostiach dosiahli signifikantnú odchýlku. Príčiny tejto rôznorodosti môžu byť viaceré. Štúdie uvádzajú hormonálne faktory či pohlavné rozdielnosti v správaní (Sokka, 2009). Prieskum z roku 1996 uvádza domnienku, že u žien častejšie dochádza k tomu, že „zveličujú“ symptómy ochorenia, čo rovnako mohlo prispieť k takýmto výsledkom (Katz a Criswell, 1996).

V zdravej populácii má abnormálne vysokú hladinu RF asi 5 % ľudí. Tieto protilátky však predstavujú dôležitý prognostický a diagnostický faktor, keďže až viac ako 80 % pacientov s potvrdenou RA má abnormálne testy na RF. Negatívne hladiny nevylučujú RA, no ani pozitívne testy niekedy negarantujú diagnózu. Aktuálne poznáme špecifickejšie sérové – protilátkové markery, ktoré majú vyššiu špecificitu (napr. anti-CCP) (Richey, 2015).

Keďže existuje viacero zdrojov popisujúcich štatistiku najčastejších civilizačných ochorení na Slovensku, rozhodli sme sa porovnať tieto údaje s našimi výsledkami. Táto štúdia uvádza, že v slovenskej populácii od 19 do 75 rokov trpí až 59,4 % ľudí artériovou hypertenziou. V našej štúdii potvrdilo prítomnosť tejto komorbidity 68,1 % opýtaných (Sninčák, 2007). Ďalší prieskum uvádza, že v rámci obyvateľstva Slovenska má diagnostikovaný *diabe-*

tes mellitus (oba typy) 5,4 % ľudí a zároveň, že 1,2 % má diabetes nediagnostikovaný. U nás odpovedalo, že trpí diabetom; 15,3 % opýtaných (Mokáň a kol., 2005), z čoho možno usudzovať súvis medzi výskytom diabetu a RA.

ZÁVERY

Naša štúdia potvrdila fakt, že reumatoidná artritída a jej prejavy u pacientov na Východnom Slovensku sa vo väčšine skúmaných faktorov zhodujú s výsledkami iných zahraničných pracovísk. Potvrdili sme značnú prevahu žien medzi pacientmi postihnutými týmito ochoreniami a rovnako aj približný vek nástupu symptómov. V rámci skúmania typu postihnutých kĺbových skupín sme zistili, že malé kĺby rúk, malé kĺby nôh a krčná chrbtica môžu patriť k skupinám, ktoré sú viac postihnuté u žien ako u mužov. Zmeny počasia patria k významným faktorom ovplyvňujúcim bolesť kĺbov. Z pridružených ochorení sa najčastejšie objavili hypertenzia a *diabetes mellitus*. Diabetes v tomto prípade vykazoval vyššiu incidenciu ako u zdravej populácie.

V rámci štatistiky využívaných liečiv na liečbu RA sme zistili, že glukokortikoidy tvoria významnú skupinu, ktorá je stále využívaná k manažmentu ochorenia. To, že dôležitou skupinou liečiv na symptomatickú liečbu sú NSAIDs, potvrdila aj naša štúdia. Najviac využívané účinné látky z tejto skupiny boli diklofenak, nimesulid, metamizol a analgetiká vo voľnopredajných prípravkoch. Pri DMARDs svoju dominantnú rolu v liečbe potvrdil metotrexát. Čo sa týka biologických prípravkov, najpoužívanejšie v našej štatistike boli TNF- α inhibítory, a to adalimumab a etanercept. Nefarmakologická zložka bola zastúpená hlavne rehabilitačnou liečbou.

Skúmaný imunoparameter v sére pacientov – reumatoidný faktor, vykazoval rovnaké vlastnosti ako v zahraničných publikáciách. Skúmali sme, či je jeho hladina vyššia alebo nižšia ako štandardizovaná hodnota. Naš prieskum potvrdil tvrdenie, že séropozitívnych pacientov na RF je výrazne viac

ako séronegatívnych. Preto RF aj pri množstve novoobjavených imunomarkeroch stále zohráva dôležitú rolu pri diagnostike a určovaní prognózy ochorenia.

POĎAKOVANIE

Podakovanie za pomoc pri realizácii práce patrí lekárom I. internej kliniky UNLP v Košiciach MUDr. Karimovi Benhatchimu, PhD. a doc. MUDr. Želmíre Macejovej, PhD.

ZOZNAM LITERATÚRY

Aletaha, D. a Blüml, S.: Therapeutic implications of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *RMD Open*, 2016, 2 (1), e000009.

Anquetil, F., Clavel, C., Offer, G., Serre, G., Sebbag, M.: IgM and IgA rheumatoid factors purified from rheumatoid arthritis sera boost the Fc receptor- and complement-dependent effector functions of the disease-specific anti-citrullinated protein autoantibodies. *J. Immunol.*, 2015, 194, 3664 – 3674.

Blass, S., Engel, J. M., Burmester, G. R.: The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1999, 42 (12), 2499 – 2506.

Font, J., Cervera, R., Espinosa, G., Pallares, L., Ramos-Casals, M., Jimenez, S., Garcia-Carrasco, M., Seisdedos, L., Ingelmo, M.: Systemic lupus erythematosus (SLE) in childhood: analysis of clinical and immunological findings in 34 patients and comparison with SLE characteristics in adults. *Ann. Rheum. Dis.*, 1998, 57 (8), 456 – 459.

Frieder, J., Kivelevitch D., Menter, A.: Secukinumab: a review of the anti-IL-17A biologic for the treatment of psoriasis. *Ther. Adv. Chronic Dis.*, 2018, 9 (1), 5 – 21.

Goemaere, S., Ackerman, C., Goethals, K., De Keyser, F., Van der Straeten, C., Verbruggen, G., Mielants, H., Veys, E. M.: Onset of symptoms of rheumatoid arthritis in relation to age, sex and menopausal transition. *J. Rheumatol.*, 1990, 17 (12), 1620 – 1622.

- Kalden, J. R.: Emerging therapies for rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Ther.*, 2016, 3 (1), 31 – 42.
- Katz, P. P. a Criswell, L. A.: Differences in symptom reports between men and women with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.*, 1996, 9 (6), 441 – 448.
- Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K., Källberg, H., Bengtsson, C., Grunewald, J., Rönnelid, J., Harris, H. E., Ulfgren, A. K., Rantapää-Dahlqvist, S., Eklund, A., Padyukov, L., Alfredsson, L.: A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA–DR (shared epitope) – restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.*, 2006, 54 (1), 38 – 46.
- Mokán, M., Galajda, P., Prídavková, D.: VPL.sk – Prevalencia diabetes mellitus a metabolického syndrómu na Slovensku [Prevalence of diabetes mellitus and metabolic syndrome in Slovakia]. http://www.vpl.sk/files/file/dm_files/01_Prevalencia_DM_komplet_pv-cb.pdf. [cit. 2018–03–27].
- Oliver, J. E. a Silman, A. J.: Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Res. Ther.*, 2009, 11 (5), 252.
- Patel, R. a Shahane, A.: The epidemiology of Sjögren's syndrome. *Clin. Epidemiol.*, 2014, 6, 247 – 255.
- Perez-Alvarez, R., Perez-de-Lis, M., Diaz-Lagares, C., Pego-Reigosa, J. M., Retamozo, S., Bove, A., Brito-Zeron, P., Bosch, X., Ramos-Casals, M.: Interstitial lung disease induced or exacerbated by TNF-targeted therapies: analysis of 122 cases. *Semin. Arthritis Rheum.*, 2011, 41 (2), 256 – 264.
- Richey, M.: *Hospital for Special Surgery page*. Understanding rheumatoid arthritis lab tests and results. https://www.hss.edu/conditions_understanding-rheumatoid-arthritis-lab-tests-results.asp. [Accessed March 27, 2018].
- Rosman, Z., Shoenfeld, Y., Zandman-Goddard, G.: Biologic therapy for autoimmune diseases: an update. *BMC Medicine*, 2013, 11, 88.
- Sheppard, M., Laskou, F., Stapleton, P. P., Hadavi, S., Dasgupta, B.: Tocilizumab (Actemra). *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2017, 13 (9), 1972 – 1988.
- Simon, T. A., Smitten, A. L., Franklin, J., Askling, J., Lacaille, D., Wolfe, F., Hochberg, M. C., Qui, K., Suissa, S.: Malignancies in the rheumatoid arthritis abatacept clinical development programme: an epidemiological assessment. *Ann. Rheum. Dis.*, 2009, 68 (12), 1819 – 1826.
- Singh, J. A., Saag, K. G., Bridges, L. S. Jr., Akl, E. A., Bannuru, R. R., Sullivan, M. C., Vaysbrot, E., McNaughton, Ch., Osani, M., Shmerling, R. H., Curtis, J. R., Furst, D. E., Parks, D., Kavanaugh, A., O'Dell, J., King, Ch., Leong, A., Matteson, E. L., Schousboe, J. T., Drevlow, B., Ginsberg, S., James Grober, J., St Clair, E. W., Tindall, E., Miller, A. S., McAlindon, T.: American College of Rheumatology Guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, 2016, 68 (1), 1 – 26.
- Sninčák, M.: Epidemiológia hypertenzie a vek [Epidemiology of hypertension and age]. *Súč. Klin. Pr.*, 2007, 1, 5 – 13.
- Sokka, T.: *The rheumatologist – Sex differences & rheumatoid arthritis*. <http://www.the-rheumatologist.org/article/sex-differences-rheumatoid-arthritis/>. Accessed March 27, 2018.
- Steiner, G. a Smolen, J.: Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. *Arthritis Res.*, 2001, 4 (2), 1 – 5.
- Terao, C., Hashimoto, M., Yamamoto, K., Murakami, K., Ohmura, K., Nakashima, R., Yamakawa, N., Yoshifuji, H., Yukawa, N., Kawabata, D., Usui, T., Yoshitomi, H., Furu, M., Yamada, R., Matsuda, F., Ito, H., Fujii, T., Mimori, T.: Three groups in the 28 joints for rheumatoid arthritis synovitis – analysis using more than 17,000 assessments in the KURAMA database. *PLoS One*, 2013, 8 (3), e59341.
- Van Vollenhoven, R. F.: Sex differences in rheumatoid arthritis: more than meets the eye. *BMC Med.*, 2009, 7, 12.
- Von Muhlen, C. A. a Tan, E. M.: Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic disease. *Semin. Arthritis Rheum.*, 1995, 24, 323 – 358.



STANOVENIE SYNTETICKÝCH SLADIDIEL VO FARMACEUTICKÝCH PRODUKTOCH

DETERMINATION OF SYNTHETIC SWEETENERS IN PHARMACEUTICAL PRODUCTS

Černáková, Lenka; Kudličková, Zuzana; Hudák, Alexander

Katedra chémie, biochémie a biofyziky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

alexander.hudak@uvlf.sk

ABSTRAKT

Syntetické sladidlá sú neodmysliteľnou súčasťou mnohých potravín či farmaceutických produktov. Tým, že dodávajú potravine, lieku alebo výživovému doplnku sladkú chuť a vôňu, zlepšujú celkový vnem konzumenta. Syntetické sladidlá sú pre ľudský organizmus cudzie a pri ich používaní môžu vyvolávať aj negatívnu odozvu organizmu. Preto každá pomocná látka, ktorá je súčasťou lieku, má stanovenú akceptovateľnú dennú dávku (ADI), pri dodržaní ktorej nemôže dôjsť k poškodeniu zdravia pacienta. Vo vzorkách vybraných liekov a výživových doplnkov bolo stanovené množstvo syntetických sladidiel (sodná soľ sacharínu, acesulfám K a aspartám) metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (RP-HPLC) s použitím reverznej fázy. Sladidlá boli analyzované na kolóne Hypersil GOLD C8

(100 x 2,1 mm; 1,9 µm) izokratickou elúciou s použitím fosfátového tlmivého roztoku (0,02 mol. dm⁻³ KH₂PO₄) a acetonitrilu v rôznych objemových pomeroch. Analýza vzoriek preukázala prekročenie ADI hodnoty pre obsah sodnej soli sacharínu v dvoch liekoch.

Kľúčové slová: acesulfám K; akceptovateľná denná dávka; aspartám; sodná soľ sacharínu; syntetické sladidlá

ABSTRACT

Synthetic sweeteners are inseparable part of many foods or pharmaceuticals. They improve overall perception of consumers as they add sweet taste or smell to a food, drug or nutritional supplement. Synthetic sweeteners are not natural for human organism and they can cause a negati-

ve response after being used. Therefore, each excipient that is part of the medicine has a fixed Acceptable Daily Intake (ADI) that does not harm the patient's health. Amounts of synthetic sweeteners (sodium saccharin, acesulfame K and aspartame) were determined in samples of the selected drugs and nutritional supplements by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The sweeteners were analyzed on a Hypersil GOLD C8 column (100 x 2.1 mm, 1.9 μ m) with an isocratic elution of phosphate buffer (0.02 mol.dm⁻³ KH₂PO₄) and acetonitrile (v/v) in various ratios as a mobile phase. The analysis of the samples showed that the ADI value for the saccharin sodium content of the two drugs was exceeded.

Key words: acceptable daily intake, acesulphame K, aspartame, sodium saccharin, synthetic sweeteners

ÚVOD

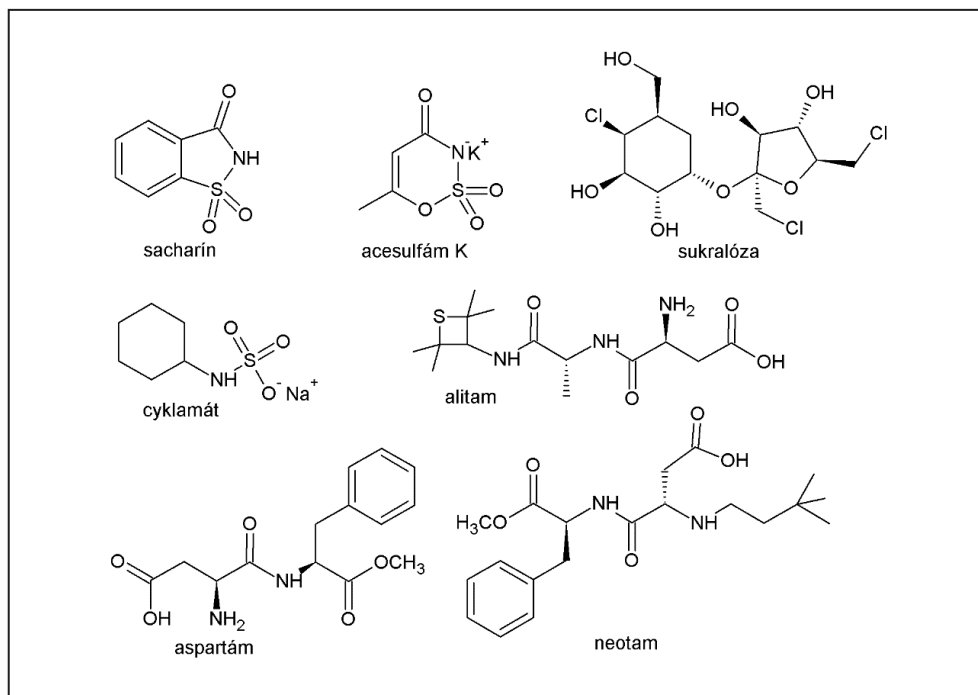
Syntetické sladidlá a ich využitie v potravinárskom a farmaceutickom priemysle zaznamenalo v posledných desaťročiach obrovský nárast. V minulosti boli používané len ako lacné náhrady za prírodný cukor, ktorý bol počas zlej hospodárskej situácie nedostupnou surovinou. Avšak, po mnohých štúdiách tieto aditíva vystriedali pozíciu náhrady a zaujali dominantné postavenie v potravinách a farmaceutických produktoch, určených hlavne pre diabetikov. Syntetické sladidlá možno označiť za nízkoenergetické, pretože ich prídavkom do produktov dosiahneme sladkú chuť a energetická hodnota produktu je nulová. Nezvyšujú hladinu glukózy v krvi, nepodieľajú sa na zvyšovaní telesnej hmotnosti ani tvorbe zubného kazu, čím si upevňujú svoje postavenie v rôznych odvetviach priemyslu. Z ekonomického hľadiska je ich výroba omnoho lacnejšia ako získavanie prírodných cukrov. Potravinový kódex definuje syntetické sladidlá takto: „sladidlá sú prídavné látky, ktoré sa používajú na

dodanie sladkej chuti potravinám alebo ako stolové sladidlá“ (Vestník MP SR, 2008). Ako každá prídavná látka, tak aj syntetické sladidlá majú stanovenú svoju ADI, ktorej dodržanie zaručuje bezpečné používanie bez poškodenia zdravia konzumenta. Prekročením ADI môže dôjsť k nežiaducim účinkom, prípadne k zdravotným komplikáciám konzumenta. Preto je veľmi dôležité sledovať a analyzovať obsah jednotlivých syntetických sladidiel v potravinách či farmaceutických produktoch pre ich bezpečné a kvalitné použitie. Medzi najznámejšie syntetické sladidlá patria sacharín, acesulfám K, aspartám, cyklamát sukralóza, alitam a neotam. Ich chemická štruktúra je znázornená na obrázku 1.

Najstaršou a najlepšie preskúmanou náhradou cukru je **sacharín**. Bol objavený už v roku 1879 Fahlbergom a Remsenom, keď sa im náhodne dostal do jedla ako imid 2-sulfobenzoovej kyseliny a osladil ho (Marti a kol., 2008). Sacharín je biely kryštalický prášok 300-krát sladší než cukor, bez zápachu, s charakteristickou kovovou príchuťou. Jeho medzinárodné označenie je E 954 a stanovená hodnota ADI je 5 mg.kg⁻¹ (Weihrauch a Diehl, 2004). Z chemického hľadiska hovoríme o 1,2-benzothiazol-3(2H)-ón-1,1-dioxide. Používa sa vo forme troch solí, a to sodnej, draselnej a vápenatej, pričom najčastejšie využívaná je sodná soľ (Mortensen, 2006). Sacharín sa v organizme nemetabolizuje a je vylúčený v nezmenenej podobe močom (O'Donnell a Kearsley, 2012). Od svojho objavenia bol sacharín neustále skúmaný z hľadiska jeho vplyvu na ľudský organizmus. Už v roku 1985 prebiehali štúdie vplyvu sacharínu na fyziológiu močového mechúra (MM) a prípadný vznik nádorového ochorenia. Teória rozvoja rakoviny MM predpokladala tvorbu kryštálikov fosforečnanu vápenatého, ktorý poškodzoval tkanivá MM, čo viedlo k proliferácii buniek a k zvýšenému riziku vzniku rakoviny MM. Avšak tieto štúdie nepotvrdili negatívny vplyv sacharínu, pretože fyziológia MM hlodavcov a človeka je odlišná a osmolarita v moči hlodavcov je vyššia než u človeka (Cohen a kol, 2008).

Prvú generáciu syntetických sladidiel tvorí spolu

Obr. 1: Chemická štruktúra vybraných syntetických sladidiel



so sacharínom **cyklamát**, ktorý bol objavený Svedom v roku 1950 pri vývoji nových antipyretík (Mattes a Popkin, 2009). Cyklamát je biely kryštalický prášok bez zápachu. Jeho sladivosť je v porovnaní s inými sladidlami oveľa nižšia (približne 30-krát vyššia než cukor). Medzinárodné označenie cyklamátu je E 952. V roku 2000 bola hodnota ADI stanovená na 0,7 mg.kg⁻¹ (Haroun a Heider, 2018). Po chemickej stránke je cyklamát sodnou soľou kyseliny N-cyklohexylsulfámovej (O'Donnell a Kearsley, 2012). Cyklamát, tak ako aj sacharín, sa spájal s potencionálnym vznikom rakoviny MM. Predpokladal sa rovnaký mechanizmus vzniku rakoviny MM ako u sacharínu, avšak ani v tomto prípade neboli tieto pochybnosti o bezpečnosti cyklamátu potvrdené (Yadav a kol., 2014).

Aspartám uzatvára prvú generáciu syntetických sladidiel. Bol objavený v roku 1965 chemikom Schlatterom, taktiež náhodne pri vývoji nových antiulceróznych liečiv. Na trh sa dostal až v roku 1981 (Weihrauch a Diehl, 2004). Aspartám je biely kryštalický prášok, ktorého sladivosť je 180 až 200-krát vyššia ako u cukru. Medzinárodné označenie

aspartámu je E 951. Jeho ADI nie je vo svete rovnaká. Pre európske štáty a Kanadu je ADI 40 mg.kg⁻¹ a 50 mg.kg⁻¹ pre USA (Choudhary a kol., 2016). Aspartám pozostáva z dvoch aminokyselín: fenylalanínu a kyseliny asparágovej. Systematicky sa jedná o L- α -aspartyl-L- α -fenylalanín metylester (Haighton a kol., 2019). Pätnásť rokov po schválení a používaní aspartámu bol zaznamenaný zvýšený výskyt nádorov mozgu, ktorý sa pripisoval samotnému aspartámu. Rozvoj nádoru mozgu bol pripisovaný metanolu, viazanému v molekule, ktorý sa po odštiepení metabolizáciou mení na formaldehyd, ktorý pri akumulácii v bunkách môže viesť k vyvolaniu vzniku nádoru. Neboli však žiadne konkrétne dôkazy a informácie o tom, že za vznik nádorov bol zodpovedný aspartám (Weihrauch a Diehl, 2004). Jedným z troch metabolitov aspartámu je fenylalanín. Pre jeho obsah v aspartáme je potrebné označenie „výrobok obsahuje fenylalanín“ ako upozornenie pre pacientov trpiacich fenylketonúriou (Čopíková a kol., 2013).

Sedemdesiate roky minulého storočia sa spájajú so syntézou nových moderných syntetických sladidiel, ktoré sa radia do druhej generácie. Jedným z nich

je aj **acesulfám K**, ktorý bol objavený v roku 1967 Claussemom (Kroger a kol., 2006). Acesulfám K je biely hygroskopický prášok so sladivosťou 200–krát vyššou než cukor. Vyskytuje sa v 3 soliach: sodnej, draselnej a vápenatej. Medzinárodné označenie acesulfámu K je E 950 a E 962 v kombinácii s aspartámom (Patel, 2005). Prvotná ADI hodnota pre acesulfám K bola 9 mg.kg^{-1} , neskôr po označení za bezpečný bola zvýšená na 15 mg.kg^{-1} . Chemicky sa toto sladidlo zaraďuje medzi heterocyklické zlúčeniny a je to draselná soľ 6-metyl-1,2,3-oxatiazin-4(3H)-on-2,2-dioxidu (Klug a Lipinski, 2012). V ľudskom organizme acesulfám K nepodlieha žiadnym metabolickým zmenám. Z organizmu je vylúčený v nezmenenej forme močom, a to už do 24 hodín (O'Donnell a Kearsley, 2012).

Sukralóza je jedným z najnovších vysokoúčinných syntetických sladidiel. Objavená bola v roku 1976 chemickou modifikáciou sacharózy (O'Donnell a Kearsley, 2012). Sukralóza je biely prášok bez zápachu. Jej medzinárodné označenie je E 955. ADI hodnota pre sukralózu bola stanovená na 15 mg.kg^{-1} (Mortensen, 2006). Jej sladivosť sa nedá jednoznačne určiť, pretože závisí od teploty, koncentrácie a hodnoty pH. Je v rozmedzí 400 až 800-krát vyššia než u cukru (Aguilar a kol., 2016). Z chemického hľadiska hovoríme o halogenovanom disacharide-1,6-dichlór-1,6-dideoxy- β -D-fruktofuranosyl-4-chlór-4-deoxy- α -D-galaktopyranozide, ktorý vzniká selektívnou chloráciou sacharózy na troch hydroxylových skupinách (Grotz a Munro, 2009). Po prijíme do organizmu sa sukralóza nevstrebáva a v nezmenenej podobe je vylučovaná močom či stolicou. Zo strany chlóru, ktorý je súčasťou molekuly, nehrozí žiadne nebezpečenstvo (Kroger a kol., 2006).

Syntetické sladidlo **neotam** patrí k sladidlám 2. generácie. Neotam je metylester dipeptidu zložený z 2 aminokyselín, a to kyseliny asparágovej a fenylalanínu. Je 7000-krát sladší než cukor a má ADI hodnotou 2 mg.kg^{-1} . Jeho použitie v Európe nebolo ešte schválené (Bobrovová, 2018). Po vstupe do organizmu sa metabolizuje na aminokyseliny a metanol. Neotam a jeho metabolity sú rýchlo

vylučované močom či stolicou (Kroger a kol., 2006; Mortensen, 2006).

Alitam ako ďalšie syntetické sladidlo objavené začiatkom 80-tych rokov minulého storočia patrí do druhej generácie syntetických sladidiel. Obsahuje kyselinu L-asparágovú a D-alanín. Neobsahuje fenylalanín, preto je vhodný pre ľudí s fenylketonúriou (Kroger a kol., 2006). Používa sa v Mexiku a Austrálii, v Európe jeho použitie nie je povolené (Račická, 2012). Je to kryštalický, nehygroskopický prášok bez zápachu, so sladivosťou 2000-krát vyššou než cukor. Jeho ADI je 1 mg.kg^{-1} . Z chemického hľadiska ide o 1- α -aspartyl-N-(2,2,4,4-tetrametyl-3-tioetanyl)-D-alanínamid (Caballero a kol., 2003). Metabolické dráhy alitamu prebiehajú rôzne. Vo väčšine sa alitam nevstrebáva a je vylučovaný v nezmenenej forme stolicou, prípadne jeho malá časť sa môže absorbovať a následne hydrolyzovať na kyselinu asparagovú a amid alanín (Abbott, 2002).

MATERIÁL A METÓDY

Na stanovenie obsahu syntetických sladidiel vo vybraných farmaceutických prípravkoch bola zvolená metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s využitím reverznej fázy (RP-HPLC). Pri výbere vhodných podmienok separácie sa využili poznatky o simultánnom kvantitatívnom stanovení syntetických sladidiel v sladených vodách (Trandafir a kol., 2009).

Pri príprave mobilnej fázy a roztokov bolo použité bežné laboratórne sklo, striekačkový membránový PVDF filter ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$; 25 mm), poloautomatické pipety, 100 μl mikrostriekačka (Hamilton) a skúmavky Eppendorf Tubes.

Boli použité nasledujúce reagenty: ultračistá voda pre HPLC, KH_2PO_4 (p. a.), H_3PO_4 (85 %, p. a.), acetonitril pre HPLC (Fisher), štandardy aspartámu (Sigma Aldrich > 99 %), acesulfámu K (Fluka > 99 %), sodnej soli sacharínu (Sigma Aldrich > 99 %). Ako vzorky boli vybrané lieky a výživové doplnky, v ktorých je deklarovaná prítomnosť jednotlivých sladidiel: Panadol Ultra Rapide (GlaxoSmithKline,

Tab.1: Podmienky pre stanovenie syntetických sladidiel

	sodná soľ sacharínu	acesulfám K	aspartám
nástrek [μl]	20	20	20
čas analýzy [min]	10	10	10
zloženie mobilnej fázy fosfátový pufr : acetonitril (v/v)	95:5	90:10	85:15
kontinuálny prietok MF [$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$]	0,3	0,3	0,3
vlnová dĺžka [nm]	202	227	217
retenčný čas [min]	3,33	2,09	2,87

MF – mobilná fáza

ČR), Coldrex Max Grip citrón (GlaxoSmithKline, ČR), Fenistil (Nyon, Švajčiarsko), Nurofen sirup (Reckitt Benckiser Healthcare Limited, Hull, Veľká Británia), Smecta (Ipsen Pharma, Francúzsko), Trifed Expectorant (Hikma Pharmaceuticals Ltd. Co., SR), Solmucol (IBSA Slovakia s. r. o., SR), Glimbax (Montefarmaco S. o. A., Taliansko), Flector EP Rapid (IBSA Slovakia s. r. o., SR), Vitamín C pre deti (Simply You Pharmaceuticals, ČR), Celaskon horúci nápoj (Zentiva, ČR), Garganta (ICM Polfa, Poľsko), šumivé Magnézium (Vitar Slovakia spol. s. r. o., SR), Flamexin (Chiesa Farmaceutici S. p. A., Taliansko). Vzorky liekov a výživových doplnkov boli poskytnuté verejnými lekárňami. Ich samotné spracovanie vychádzalo z jeho farmaceutickej formy.

Vzorky a štandardné látky sa vážili na analytických váhach KERN ABT 220-5DM. Na urýchlenie rozpustenia vzoriek boli vzorky umiestnené na 5 min do ultrazvukovej vane (Bandelin Sonorex RK 100 H). Rozpustené vzorky boli zakalené, preto sa centrifugovali po dobu 10 min na centrifúge Eppendorf Centrifuge 5430. Pred meraním sa roztoky vzoriek filtrovali cez striekačkový membránový filter. Na sledovanie pH pri príprave fosfátového pufru sa použil pH meter inoLab pH 7110 s kombinovanou sklenou elektródou.

Stanovenie sladidiel prebiehalo na kvapalinovom chromatografe Dionex UltiMate 3000

(ThermoScientific) v izokratickom režime so spektrofotometrickým detektorom. Výsledky jednotlivých meraní boli spracované pomocou software Chromeleon 7, ktorý je súčasťou programového vybavenia chromatografu. Analyzované roztoky boli dávkované manuálne, pomocou mikrostriekačky. Mobilnú fázu tvoril fosfátový tlmivý roztok ($0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztok KH_2PO_4 s hodnotou pH upravenou na 4,5 prídavkom 5 % H_3PO_4) a acetonitril v rôznych objemových pomeroch. Analýza sa uskutočnila na kolóne Hypersil GOLD C8 s dĺžkou 100 mm; priemerom 2,1 mm a veľkosťou častíc $1,9 \mu\text{m}$ pri laboratórnej teplote. V tab. 1 sú uvedené optimalizované podmienky pre stanovenie jednotlivých sladidiel: sodnej soli sacharínu, acesulfámu K a aspartámu (dávkovaný objem roztokov, zloženie mobilnej fázy, kontinuálny prietok mobilnej fázy a vlnová dĺžka vhodná pre stanovenie).

Na základe merania kalibračných roztokov bola zostrojená kalibračná závislosť (závislosť plochy píku od koncentrácie roztoku). Pre jednotlivé syntetické sladidlá boli na základe lineárnej regresie určené rovnice kalibračných priamok: pre sodnú soľ sacharínu: $y = 9,6065 x + 1,5452$ s korelačným koeficientom $R = 0,9886$; pre acesulfám K $y = 3,7527 x - 3,9264$ s korelačným koeficientom $R = 0,99915$ a pre aspartám $y = 0,9542 x + 0,023$ s korelačným koeficientom $R = 0,9997$.

Pri rovnakých podmienkach ako boli merané

Tab.1: Podmienky pre stanovenie syntetických sladidiel

zloženie mobilnej fázy fosfátový pufor : acetonitril (v/v)	sodná soľ sacharínu	acesulfám K	aspartám
nástrek [μl]	20	20	20
čas analýzy [min]	10	10	10
zloženie mobilnej fázy fosfátový pufor: acetonitril (v/v)	95:5	90:10	85:15
kontinuálny prietok MF [ml.min⁻¹]	0,3	0,3	0,3
vlnová dĺžka [nm]	202	227	217
retenčný čas [min]	3,33	2,09	2,87

MF – mobilná fáza

roztoky štandardných látok boli analyzované aj roztoky jednotlivých vzoriek. Každá vzorka bola analyzovaná trikrát. Pomocou rovníc kalibračných priamok boli vypočítané obsahy stanovovaných sladidiel v jednotlivých vzorkách.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V súčasnosti je evidentný tlak spotrebiteľov na ponuku kvalitných a bezpečných produktov. Lieky a výživové doplnky s príjemnou vôňou, chuťou, farbou, nízkym príjmom energie, dlhou dobou použiteľnosti a prijateľnou cenou sú atribútmi, pre ktoré sa produkty stávajú pre pacienta atraktívne. Tieto a mnoho ďalších funkcií zabezpečujú prídavné látky – aditíva, ku ktorým radíme aj syntetické sladidlá. Aj keď sa použitie syntetických sladidiel v posledných rokoch rozmáha pre ich výhodné vlastnosti, ich použitie sa v minulosti spájalo aj s negatívnym vplyvom na ľudský organizmus. Realizovaných bolo mnoho štúdií, ktoré sa zaoberali touto problematikou. Avšak nikdy tieto dohady neboli potvrdené a syntetické sladidlá sa považujú za bezpečné. Syntetické sladidlá čoraz viac nahrádzajú prírodné sladidlá. Dôvodom je ich jednoduchšia a lacnejšia syntéza, ich pridávanie do liekov a výživových doplnkov zvyšuje ich atraktivitu a zlepšuje celkový compliance pacienta. Použitie syntetických sladidiel usmerňujú rôzne právne predpisy a normy. Pre Euró-

pu platí Nariadenie EP a rady (ES) č. 1333/2008 zo 16. decembra 2008 o prídavných látkach v potravinách, ktoré stanovuje ADI pre jednotlivé sladidlá (EFSA). Hodnoty ADI sú zahrnuté v dokumentoch EFSA (European Food Safety Authority), ktorá priebežne aktualizuje informácie o účinkoch týchto látok na ľudský organizmus a prehodnocuje ich akceptovateľné denné dávky. Potrebná je však neustála kontrola obsahu jednotlivých syntetických sladidiel v liekoch a výživových doplnkoch. V tab. 2 sú uvedené výsledky stanovenia troch analyzovaných syntetických sladidiel v jednotlivých liekoch a výživových doplnkoch a prepočet na kilogram telesnej váhy. Výsledky boli prepočítané na kilogram telesnej hmotnosti u dospelého človeka (75 kg) a detského pacienta (pre Nurofen 20 kg, pre Solmucol 35 kg a Vitamín C 30 kg) a porovnané s ADI.

Prvým analyzovaným syntetickým sladidlom bola sodná soľ sacharínu, ktorého ADI je 5 mg.kg⁻¹. Toto sladidlo bolo stanovované v liekoch Panadol Ultra Rapide, Coldrex Max Grip, Smecta, Solmucol, Fenistil, Trifed Expectorans a Nurofen pre deti. Najvyššie stanovené množstvo sodnej soli sacharínu bolo vo vzorke Coldrex Max Grip (31,272 mg.kg⁻¹), ktoré prekročilo ADI až 6-násobne. Dôvodom pre vyšší obsah sodnej soli sacharínu môže byť kompenzácia kyslej chuti citrónovej príchute Coldrex Max Grip. Ďalšie 2-násobne prekročené množstvo sodnej soli sacharínu bolo vo vzorke PUR (10,67

Tab. 2: Stanovenie syntetických sladidiel v liekoch a výživových doplnkoch

Syntetické sladidlo ADI [mg.kg ⁻¹]	Analyzované vzorky	Lieková forma	Priem. obsah v 1 LF [mg]	Množstvo sladidla v DDD na 1 kg tel. hmotnosti [mg.kg ⁻¹]	Porovnanie výsledkov s ADI
Sodná soľ sacharínu 5 mg.kg⁻¹	Panadol Ultra Rapide	TBL EFF	400,122	10,670	Nesplňa
	Coldrex Max Grip citrón	PLO POR	586,357	31,272	Nesplňa
	Solmucol	GRA	14,858	1,273	Spĺňa
	Smecta	PLV SUS	19,869	0,794	Spĺňa
	Fenistil	PRK	0,430	0,043	Spĺňa
	Nurofen sirup	SUS POR	0,617	0,617	Spĺňa
	Trifed Expectorant	SIR	0,813	0,325	Spĺňa
Acesulfám K 15 mg.kg⁻¹	Glimbax	IRR ORA	1,100	0,660	Spĺňa
	Flector EP rapid	GRA	46,355	1,854	Spĺňa
Aspartám 40 mg.kg⁻¹	Garganta	PAS OCP	6,697	0,267	Spĺňa
	Coldrex Max Grip citrón	PLO POR	70,943	3,783	Spĺňa
	Vitamín C pre deti	TBL	5,181	1,381	Spĺňa
	Celaskon horúci nápoj	PLV	12,613	0,168	Spĺňa
	Magnézium	TBL EFF	6,226	0,249	Spĺňa
	Flector EP Rapid	GRA	15,397	0,615	Spĺňa
	Flamexin	TBL	8,200	0,109	Spĺňa

ADI – akceptovateľná denná dávka, DDD – doporučená denná dávka, GRA – granulát, IRR LF – lieková forma, ORA – ústny výplach, PAS OCP – lisovaná pastilka, PLO POR – prášok na perorálny roztok, PLV – prášok, PLV SUS – prášok na prípravu suspenzie, PRK – perorálne roztokové kvapky, SIR – sirup, SUS POR – perorálna suspenzia, TBL EFF – šumivé tablety

mg.kg⁻¹). Sodná soľ sacharínu je jediným sladidlom v tomto produkte, preto jeho vyššie množstvo bolo zrejme potrebné pre dosiahnutie sladkej chuti. Ostatné analyzované vzorky liekov obsahovali sodnú soľ sacharínu v súlade s ADI.

Obsah acesulfámu K bol stanovený v liekoch Glimbax a Flector EP Rapid. V perorálnom kloktadle Glimbax bol obsah acesulfámu K 0,660 mg.kg⁻¹ a v lieku Flector EP Rapid bol obsah acesulfámu K 1,854

mg.kg⁻¹. Obe stanovené množstvá sú výrazne nižšie ako hodnota ADI (15 mg.kg⁻¹).

Aspartám bol stanovený v liekoch a výživových doplnkoch Garganta, Coldrex Max Grip, Vitamín C pre deti, Celaskon horúci nápoj, šumivé magnézium, Flector EP Rapid a Flamexin.

Najvyšší obsah aspartámu bol v lieku Coldrex Max Grip, a to 3,7837 mg.kg⁻¹. Toto množstvo je výrazne nižšie ako je stanovená ADI pre aspartám,

takže aj pri prípadnej kombinácii lieku Coldrex Max Grip s potravinami s obsahom aspartámu nemôže nijakým spôsobom dôjsť k poškodeniu zdravia pacienta. Druhé najvyššie množstvo aspartámu sa nachádzalo vo Vitamíne C, a to 1,38 mg.kg⁻¹. Vzorky Garganta, Celaskon, Magnézium, Flector EP Rapid a Flamexin obsahovali aspartám v rozmedzí 0,10 – 0,61 mg.kg⁻¹. Vo všetkých analyzovaných vzorkách farmaceutických produktov bol obsah aspartámu v súlade s jeho stanovenou ADI (40 mg.kg⁻¹). Aspartám je zdrojom fenylalanínu, ktorý je zdravie ohrozujúci pre pacientov s fenylketonúriou, preto dodržiavanie jeho bezpečnej hladiny je veľmi dôležité.

Prekročenie stanovených limitov pre syntetické sladidlá v potravinách a nealkoholických nápojoch bolo zistené aj v štúdiu z roku 2014 (Chang, 2014), napr. v mede bol obsah acesulfámu K prekročený 100-násobne, vo víne bol obsah sacharínu 2,5-krát vyšší a najvyššie prekročené hodnoty aspartámu a acesulfámu K boli v nealkoholickom nápoji Cola Zero, kde aspartám prekračoval ADI 2,5-krát a acesulfám K 1160-krát.

S použitím syntetických sladidiel sú spájané mnohé zdravotné komplikácie. Ich dlhodobé používanie môže viesť k dysmikróbii, čím dochádza k zhoršeniu glykemického profilu pacienta a k zvyšovaniu telesnej hmotnosti (Kapusta, 2019). Preto sa neustále venuje veľká pozornosť výskumu v oblasti vplyvu syntetických sladidiel na ľudský organizmus.

ZÁVER

V štúdiu sú prezentované výsledky stanovenia obsahu sladidiel v liekoch a výživových doplnkoch, u ktorých výrobca deklaroval prítomnosť sodnej soli sacharínu, acesulfámu K a aspartámu pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Vo väčšine liekov a výživových doplnkov bol obsah sladidiel v súlade s ich ADI, v dvoch liekoch bol prekročený obsah sodnej soli sacharínu. Na základe týchto meraní a výsledkov vidíme, že farmaceutické produkty boli uvedené na trh ako bezpečné a zdravie nepoškodzujúce, aj keď nie všetky spĺňali

predpísané limity. Prídavné látky sú súčasťou liekov a výživových doplnkov a môžu mať v niektorých prípadoch negatívny vplyv na ľudský organizmus.

Naše výsledky, ale aj výsledky celosvetových monitoringov len potvrdzujú dôležitosť spätnej kontroly použitého množstva jednotlivých prídavných látok v potravinách a farmaceutických prípravkoch.

ZOZNAM LITERATÚRY

Abbott, P. J., Walker, J., Leclercq, C.: *WHO food additives series: Alitame. International Programme on Chemical Safety*. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je02.htm>. Accessed March 14, 2020.

Aguilar, F., Boskou, D., Gott, D., Grilli, S., Grunow, G., Hulshof, K., Larsen, J. Chr., Leclercq, C., Leblanc, J.-Ch., Mennes, W., Mortensen, A., Parent-Massin, D., Pöting, A., Pratt, I., Rietjens, I., Speijers, G., Tobback, P., Toldrá, F.: EFSA – Neotame as a sweeteners and flavour enhancer – scientific opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food. *EFSA Journal*, 2007, 581, 1 – 43.

Bobrovová, Z.: Umělá sladidla a jejich bezpečnost [Synthetic sweeteners and their safety]. *Edukafarm – farminews*, 2018, 2, 69 – 72.

Caballero, B., Finglas, P. M., Toldra, F.: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd edn. San Diego: Academic Press Inc., 2003, 6000 s.

Cohen, S. M., Arnold L. L., Emerson J. L.: Safety of saccharin. *Agro Food Industry Hi-Tech.*, 2008, 19 (6), 24 – 28.

Čopíková, J., Moravcová, J., Wimmer, Z., Opletal, L., Lapčík, O., Drašer P.: Náhradní sladidla [Alternative sweeteners]. *Chem. listy*, 2013, 107, 867 – 874.

Grotz, V. L. a Munro, I. C.: An overview of the safety of sucralose. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2009, 55 (1), 1 – 5.

Haighton, L., Roberts, A., Jonaitis, T., Lynch, B.: Evaluation of aspartame cancer epidemiology

studies based on quality appraisal criteria. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2019, 103, 352 – 362.

Haroun, M. a Haider, N.: Artificial sweeteners and their safety. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 2018, 11 (2), 176 – 182.

Chang, C. S. a Yeh, T. S.: Detection of 10 sweeteners in various foods by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2014, 22, 318 – 328.

Choudhary, A. K., Sundareswaran, L., Devi, R. S.: Effects of aspartame on the evaluation of electrophysiological responses in Wistar albino rats. *Journal of Taibah University for Science*, 2016, 10, 505 – 512.

Kapusta, P.: *Umelé sladidlá: zatajuje sa ich škodlivosť?* [Synthetic sweeteners: is their harmfulness kept secret?]. <https://www.napaleta.sk/umele-sladidla-zatajuje-sa-ich-skodlivost/>. [cit 2019-04-11].

Klug, C. a Lipinski, G. W. R.: Acesulfame Potassium. In *Alternative Sweeteners*. Boca Raton: CRC Press, 2012, s. 13.

Kroger, M., Meister, K., Kava, R.: Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2006, 5 (2), 35 – 47.

Mattes, D. R. a Popkin, B. M.: Non nutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2009, 89 (1), 1 – 14.

Marti, N., Funes, L. L., Saura, D., Micol, V.: An update on alternative sweeteners. *Agro Food Indust. Hi-Tech.*, 2008, 19, 8 – 10.

Mortensen, A.: Sweeteners permitted in the European Union, Safety aspects. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*, 2006, 50 (3), 104 – 116.

O'Donnel, K. a Kearsley, M. W.: *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*. United Kingdom: JohnWiley & Sons, 2012, 471 s.

Patel, A. A., Singh, A. K., Singh, R. R. B., Sabikhi, L.: Recent developments in health foods and nutraceuticals. *Lecture Compendium*, 2005, 118 s.

Račická, E.: Náhradní sladidlá, jejich místo v současné diabetologii [Sugar substitutes, their role in current diabetology]. *Interní medicína pro praxi*, 2012, 14 (8 – 9), 331 – 335.

Transafir, I., Nour, V., Ionica, M. E.: Development and validation of an HPLC method for simultaneous quantification of acesulfame-K, saccharin, aspartame, caffeine and benzoic acid in Cola soft drinks. *Scientific Study & Research*, 2009, X (2), 185 – 194.

Yadav, D. P., Kaur, B., Srivastava, R., Srivastava, S.: Sugar substitutes and health. *Journal of Dental and Medical Sciences*, 2014, 13 (8), 68 – 75.

Weihrauch, M. R. a Diehl, V.: Artificial sweeteners – do they bear a carcinogenic risk? *Ann Oncol.*, 2014, 15 (10), 1460 – 1465.

04650/2008-*Vestník-Ministerstvo pôdohospodárstva Slovenskej republiky-XXXX/4-25*. február 2008. https://www.svps.sk/dokumenty/legislativa/4650_2008.pdf. [cit.2020-06-18].



TREATMENT OPTIONS FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN CHILDREN AND RELATED RISKS: A CASE REPORT

Rozman Antoliová, Natália

Department of Pharmacology and Toxicology
University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice
Komenského 73, 041 81 Košice
The Slovak republic

natalia.antolikova@uvlf.sk

ABSTRAKT

This study reports the case of treatment options of a 3,5-year old boy with acute lymphoblastic leukemia (ALL). The therapy was initiated in January 2013 and ended in February 2015. This boy suffered from long-term and non-retreating infections, which did not respond to a common antibiotic therapy. In laboratory parameters, we observed neutropenia, anaemia, thrombocytopenia and blasts present in the peripheral blood (28 %). Using CT (computed tomography) examination of the brain and CSF (cerebrospinal fluid) sample from the monitored boy, the initial CNS impairment was evaluated as CNS status 1. This case emphasizes the need for the therapy according to the ALL IC-BFM 2002-protocol. In the conclusion we describe new-alternative methods of the ALL treatment.

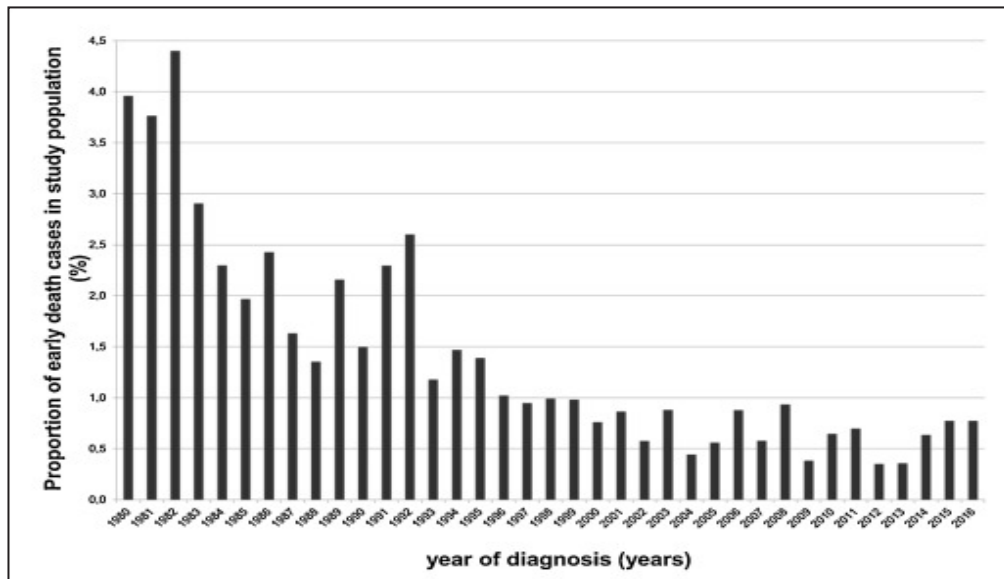
These are focused on creating a mechanism of early identification of patients at the time of initial diagnosis, with the subsequent development of a targeted therapy.

Key words: acute lymphoblastic leukemia; ALL IC-BFM 2002-protocol; childhood cancer; case report

INTRODUCTION

The survival of patients with childhood cancer has improved over the last few decades. Five-year survival probability rose from 65 % in the 1980s to about 80 % in the 2000s in Europe. Such a positive development has been attributed to better diagnosis and referral to specialized hospitals and the use of modern treatments. Nevertheless, there are still children dying shortly after the diagnosis, and the reasons

Fig. 1: Percentage of 671 early death cases based on the entire study population (n = 54.320)



The percentage of early deaths decreased considerably by the period of diagnosis from 2.6 % in the 1980s to 0.6 % in 2010 – 16.

Source: Becker et al., 2020

Table 1: The various classes of childhood age

Preterm newborn	
Newborn	(0 – 28 days)
Infant	(> 28 days – 12 months)
Toddler	(> 12 months – 23 months)
Preschool child	(2 – 5 years)
School age child	(6 – 11 years)
Adolescents	(1 – 18 years)

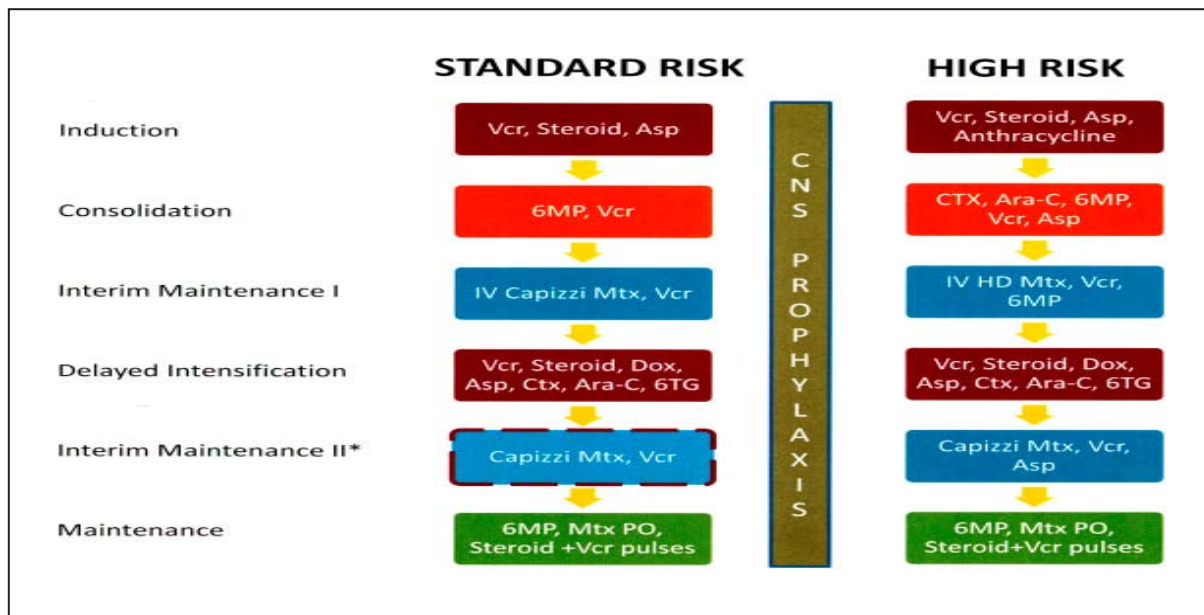
Source: Batchelor and Marriott, 2015

Table 2: The ADME processes different in the childhood age compared with adults

Absorption	• we register higher pH • slower stomach evacuation • secretion in the first 2–3 weeks of life is known to be poor
Distribution	• decreased binding to proteins and immature blood-brain barrier • lipophilic drugs have a relatively larger volume of distribution in infants compared with older children owing to their higher comparative levels of fat
Metabolism	• decreased activity of liver enzymes and faster metabolism in older children (higher doses of therapeutics are needed) • the hepatic clearance of drugs can be higher in infants and preschool children as liver blood flow is increased compared with adults, owing to the larger ratio of liver to total body mass in the former population – this can increase the first pass effect
Excretion	• lower perfusion speed of kidneys

Source: Batchelor and Marriott, 2015

Fig. 2: Phases of therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia



A schematic representation of the therapeutic roadmaps for a standard risk and high risk of ALL, as per current Children's Oncology Group protocols. Vcr-vincristine; Asp-pegaspargase; 6MP-6-mercaptopurine; CTX-cyclophosphamide; Ara-C-cytarabine; Mtx-methotrexate; Capizzi Mtx-escalating dose regimen for methotrexate; HD Mtx-high dose methotrexate; Dox-doxorubicin; 6TG-6-thioguanine (Madhusoodhan et al., 2016).

for these “early deaths” are not always understood (see Fig. 1) (Becker et al., 2020). Leukemia is a group of haematological malignancies characterized by oligoclonal expansion of cells with abnormal differentiation, or sometimes haematopoietic cells with incorrect differentiation that enter the bone marrow or other extramedullary tissues. In general, leukemia group can be divided into acute/chronic and lymphoid/myeloid, according to their progression or an affected cell line. Therefore, we can identify these subtypes: acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia and chronic myeloid leukemia (Cruz-Miranda et al., 2019). Acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia are the most frequent types of leukemia and represent approximately 80 % and 15 % to 20 % of all childhood leukemias respectively (Pelland-Marcotte et al., 2020).

ALL is also defined by recurrent chromosomal aberrations including hyperdiploidy and chromosomal translocations. Many of these aberrations

originate in the utero and the cell transformation in early childhood through acquired secondary mutations (Hein et al., 2020). It belongs to the most common, but also most aggressive forms of malignities in children – more common in boys than in girls and boys have a slightly poorer prognosis (Madhusoodhan et al., 2016; Naderali et al., 2019).

CASE REPORT AND DISCUSSION

In this study we present the case of a 3,5-year old boy with acute lymphoblastic leukemia, who suffered from long-term and non-retreating infections, which did not respond to a common antibiotic therapy. The therapy was initiated in January 2013 and ended in February 2015.

Paediatric patients are now recognized as a special population for the drug therapy, many physiological changes take place during the childhood which may have an impact on pharmacokinetics and dynamics of a compound. For that reason childhood can be

divided into various classes (see Table 1) (Batchelor and Marriott, 2015).

Our monitored patient is in the preschool class according to Table 1. Factors that influence tissue drug concentrations over the time include absorption, distribution, metabolism and excretion – these processes differ in paediatric populations compared with adults and have consequences on the pharmacokinetic profile of a drug. The understanding of these processes is important to ensure effective therapy in paediatric populations (see Table 2) (Batchelor and Marriott, 2015).

The current treatment of ALL involves prolonged chemotherapy with multiple agents over a period of 2–3 years, depending on risk stratification and gender. Treatment phases are traditionally described as induction, consolidation and maintenance. Modern studies also include a second course of intensive therapy–delayed intensification, which is preceded by interim maintenance (see Figure 2) (Madhusoodhan et al., 2016). This treatment category also includes the boy we follow.

COURSE OF THE DISEASE

The 3,5-years old boy, with the height of 97 cm and weight of 15,35 kg (first physiological pregnancy, regular vaccinations) was hospitalized 3 times due to atypical pneumonia, respiratory infection and febrile spasms. Parents are allergic, the boy is reportedly allergic to amoxicillin in combination with clavulanic acid, further treated with methisoprinol. Transferred to paediatric oncology and haematology clinic due to leukopenia, persisting febricity with gradual anaemia, slight thrombocytopenia and presence of blast cells in blood count.

The etiology of ALL unfortunately remains largely unknown, though epidemiological studies have identified a number of potential genetic and environmental risk factors (Malagoli et al., 2016). The clinical picture includes mainly specific symptoms caused by the influx of blasts (> 25 % in the bone marrow) and their infiltration into other organs,

resulting in their enlargement or damaged function. Patients' symptoms include enlarged lymph nodes (41 %), hepatosplenomegaly (42 %) and haemorrhagic diathesis (42 %) as a result of thrombocytopenia. The first symptom can be relapsing or abnormally progressing infections (49 %) which do not respond to common antibiotics. Other non-specific initial symptoms include loss of appetite, irritability, lethargy, and a relatively common symptom is fever. Fever is probably caused by induction of pyrogenic cytokines released from the leukemic cells. After the initiation of chemotherapy, fever retreats in 72 hours. In younger children, we often observe musculoskeletal symptoms, such as joint, bone (43 %) and muscle pain, limping, refusing to walk as a symptom of leukemic infiltration of bone periosteum (Madhusoodhan et al., 2016; Chudej et al., 2016).

During admission to the clinic, only small lymph nodes are palpable on the neck and in the inguinal region, and one in left axilla. In laboratory parameters, we observe neutropenia, anaemia, thrombocytopenia and blasts present in the peripheral blood (28 %). The findings from various examinations were evaluated as ALL phenotype common – B ALL without co-expression of signs of other cell lines, with hyper-diploid pathological clone with overall 53 chromosomes, CNS status 1.

Acute lymphoblastic leukemia belongs to genetically heterozygous diseases, connected with a wide range of chromosomal and molecular changes. Assessment of these signs at the time of diagnosis can help define the therapeutic decision and contributes to the prediction of patients' clinical results (Vaska et al., 2019). One of the monitored parameters is the initial CNS status. It can be defined by imaging methods and/or by cell count and cytomorphology of cerebrospinal fluid (CSF), CSF-based on which it is possible to determine presence of leukemic blasts in 15 – 20 % of patients, while neurological symptoms are not present in most of them (Bürger et al., 2003).

Using CT (computed tomography) examination of the brain and CSF sample from the monitored boy, the initial CNS impairment was evaluated as

Table 3: Summary of the first phase of the induction therapy

TREATMENT ELEMENT/ DRUG	TREATMENT METHOD	SPECIFIC DOSE FOR OUR PATIENT	DAYS OF ADMINISTRATION
Prednisone	PO	37.8 mg (three doses)	1 – 28
Vincristine	IV	0.9 mg (0.9 ml)	8, 15, 22, 29
Daunorubicin	PI (over one hour)	18.9 mg (9.5 ml)	8, 15, 22, 29
L-asparaginase	PI (over one hour)	3150 IU (1.6 ml)	12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33
Methotrexate MTX	IT	12 mg	1, 12, 33

Abbreviations: PO – by mouth; IV – intravenous push; PI – intravenous infusion; IT – intrathecal;
MTX – methotrexate

Table 4: Summary of the second phase of the induction therapy

TREATMENT ELEMENT/ DRUG	TREATMENT METHOD	SPECIFIC DOSE FOR OUR PATIENT	DAYS OF ADMINISTRATION
Cyclophosphamide	PI (over one hour)	640 mg (32 ml)	36, 64
Cytarabine	IV	48 mg (2.4 ml)	38 – 41, 45 – 48, 52 – 55, 59 – 62
6-mercaptopurine	PO	37.5 mg (Sunday) 12.5 mg (other days)	36 – 63
MTX	IT	12 mg	45, 59

Abbreviations: PI – intravenous infusion; IV – intravenous push; PO – by mouth; IT – intrathecal;
MTX – methotrexate

CNS status 1 (CSF without blasts; no evidence of CNS abnormalities directly connected to leukemia). Radiotherapy was not indicated, which decreased the possibility of late consequences of the treatment.

THERAPY OF THE DISEASE

The genome of acute lymphoblastic leukemia is comprised of a complex of sub-microscopic DNA gains and deletions, which take part in the key cell mechanisms affecting leukemogenesis and probability of treatment failure (Mullighan, 2013). Therefore, the treatment requires a complex approach focused on combined systemic therapy, lasting for 2 – 3 years (Pieters and Carroll, 2008; Stanulla and

Schrapppe, 2009). Chemotherapeutics are considered a priority, and the intensity of their use depends on age and number of leukocytes at the time of diagnosis, biological characteristics of leukemic cells and response of the organism to the treatment (Sary, 2010).

PHASE OF THE INDUCTION OF THE ALL THERAPY

The boy's therapy was initiated according to the ALL IC-BFM 2002 protocol – first phase (see Table 3), which was created based on the results from multicentre randomised trials performed on an international level.

Currently, oncological patients with ALL in Slovakia are treated according to the newest protocol BFM ALL IC 2009, but according to the study of Trujillo et al. (2016), this method of treatment shows a certain type of acute toxicity related to the chemotherapy, with the most common symptom being febrile neutropenia and infections. At the same time, a comparison of the frequency of side effects between this protocol and the protocol used to treat the observed boy (ALL IC BFM 2002) was carried out. The treatment according to the newest protocol showed, apart from cardiotoxicity in high-risk patients, lower toxicity.

The ALL IC BFM 2002 protocol defines and characterizes the ways of treatment including support care, determines the conditions for reducing the chemotherapy doses, follows a strict time schedule, sets time points for decisions about the next treating method (Sary et al., 2014).

After a month of tolerating the therapy, the boy continued in the 2nd phase of the protocol (see Table 4).

The boy's induction of ALL therapy started with a prednisone pre-phase with a good response, with blast count of 145 per μL .

Prednisone is used from the 1st until the 28th day of the treatment. The doses are gradually lowering during the next 9 days, until complete discontinuation (Sary et al., 2014). Early *in vivo* response to prednisone treatment is a practical, cheap and good prognostic factor in children with ALL. In Felice et al. (2001) study, patients with blast count lower than 1000 per μL were evaluated as PGR (prednisone good responder), and subsequently indicated for conventional therapy. The boy's blast number therefore represented a 67 % chance for 5-year survival without incidents. Initial bone marrow blasts reduction is determined in the 15th day of the protocol. To evaluate the possible remission, it is necessary to perform complete blood count, bone marrow puncture, lumbar puncture and clinical and imaging methods of the localized infiltrates (if they were originally

present) on the 33rd day (Jeha and Pui, 2009; Creutzig et al., 2014).

On the 15th and 33rd day of the protocol, a bone marrow sample was taken from the boy, and the completion of all criteria for reaching the first complete remission were based on its results on the 33rd day. Based on the bone marrow samples from the 8th, 15th and 33rd day with respect to the age, initial leukocyte count and negative translocation, the boy was assigned to a group which predicts good prognosis of the disease and was prescribed a less intensive consolidation therapy.

Consequences of the induction therapy

After the end of the induction therapy, the boy developed Cushing syndrome.

A study carried out by Mahachoklertwattana et al. (2004) observed patients who were given prednisone orally during a standard induction therapy. After 28 days, the treatment was ended abruptly, without gradual reduction of the dose. All patients suffered from symptoms of Cushing syndrome. A correlation between HPA (Hypothalamic-pituitary-adrenal) and the age was shown, while suppression of adrenal glands in 5-year olds and younger children lasted significantly longer. Since this condition belongs to the expected side effects of ALL treatment, it is necessary to monitor cortisol level and gradually decrease the dose of prednisone up to complete discontinuation, as it was in the case of the observed boy. High doses of MTX (methotrexate) create a transient, reversible and acute hypertransaminasemia, however its connection with chronic liver damage in children was not proven (Howard et al., 2016).

Elevation of the serum ALT level was also observed in the boy; during the treatment he suffered from post-medication hepatopathy. He was given hepatoprotectives for stabilization, such as essential phospholipids and silymarin. For reduction of toxicity, he was also given calcium folinate after each dose of MTX.

Table 5: Summary of the consolidation phase of the treatment

TREATMENT ELEMENT/ DRUG	TREATMENT METHOD	SPECIFIC DOSE FOR OUR PATIENT	DAYS OF ADMINISTRATION
6-mercaptopurine	PO	37.5 mg (Sunday) 12.5 mg (other days)	1 – 56
MTX	PI (over 24 hours)	1280 mg (64 ml)	8, 22, 36, 50
MTX	IT	12 mg	8, 22, 36, 51

Abbreviations: PO – by mouth; PI – intravenous infusion; IT – intrathecal; MTX – methotrexate

Table 6: First phase of the late intensification therapy

TREATMENT ELEMENT/ DRUG	TREATMENT METHOD	SPECIFIC DOSE FOR OUR PATIENT	DAYS OF ADMINISTRATION
Dexamethasone	PO	6 mg (three doses)	1 – 21
Vincristine	IV	1 mg (1 ml)	8, 15, 22, 29
Doxorubicin	PI (over one hour)	19.5 mg (10 ml)	8, 15, 22, 29
L- asparaginase	PI (over one hour)	6500 IU (3.3 ml)	8, 11, 15, 18

Abbreviations: PO – by mouth; IV – intravenous push; PI – intravenous infusion

CONSOLIDATION THERAPY PHASE

After reaching morphological remission, the patients further continue eradicating the residual leukemic blasts in so-called consolidation phase of the treatment. High-dose methotrexate and 6-mercaptopurine are used (Pui and Howard, 2008).

The boy was given the therapy according to the protocol (see Table 5). However, he developed an infection of the upper respiratory tract, therefore antibiotics were added to the treatment (clarithromycin) and it was necessary to interrupt the chemotherapy. After improvement of clinical condition and decrease of inflammatory activity, the protocol treatment was resumed after a 5-day break. The condition of the boy also required substitution of

erythrocytes and thrombocytes during hospitalization. The treatment was tolerated without problems, the boy was released into home care. Partial alopecia occurred, however, it retreated after the end of the treatment. Until this time, during 4-years long period since the end of the therapy, no late toxicity was found during special examinations of the child.

Course of the treatment

The therapy was initiated with mercaptopurine, while the boy was medicated with clarithromycin for 10 days. After the MTX therapy, the boy was indicated to hepatoprotective treatment, due to hepatopathy. Objectively, alopecia in the boy still persisted. There were also problems with wetting, however, cultivation findings were negative.

Table 7: Second phase of the late intensification therapy

TREATMENT ELEMENT/ DRUG	TREATMENT METHOD	SPECIFIC DOSE FOR OUR PATIENT	DAYS OF ADMINISTRATION
Cyclophosphamide	PI (over one hour)	650 mg (32.5 ml)	36
Cytarabine	IV	48.75 mg (2.5 ml)	38 – 41, 45 – 48
6-thioguanine	PO	37.5 mg	36 – 49
MTX	IT	12 mg	38, 45

Abbreviations: PI – intravenous infusion; IV – intravenous push; PO – by mouth; IT – intrathecal; MTX – methotrexate

Table 8: Summary of the maintenance treatment

TREATMENT ELEMENT/ DRUG	TREATMENT METHOD	SPECIFIC DOSE FOR OUR PATIENT	DAYS OF ADMINISTRATION
6-mercaptopurine	PO	37.5 mg (Sunday) 25 mg (other days)	Once per day (in the evening on the empty stomach)
MTX	PO	2.5 mg (2.5 ml)	Once per week

Abbreviations: PO – by mouth; MTX – methotrexate

INTENSIFICATION PHASE

In approximately 5 – 6 months since determining the diagnosis, late intensification or re-induction (shortened version of introductory induction) (Pui and Howard, 2008) followed; this was administered also in the observed boy in two phases (see Table 6 and 7).

Signs of cardiotoxicity were not observed in the boy, the therapy continued without significant complications. During detracting of corticoids there was a short-term morning hypoglycaemia with spontaneous adjustment. With respect to bowel discomfort and two days long mushy stool, the chemotherapy was administered on the 29th day with a 2-day shift. Cultivation examination of the stool was negative. Ultrasonography examination

of the abdomen was also without signs of typhlitis. Due to anaemia, the boy required substitution of erythrocytes.

MAINTENANCE THERAPY PHASE

The last phase is the maintenance phase, with the aim of further stabilization of the remission by suppression of resistant clones with continual decrease of resistant cells pool, with combination of mercaptopurine and methotrexate (Sary et al., 2014).

Maintenance therapy was indicated also in the boy (see Table 8). It started with MTX, but due to further occurrence of febrile respiratory infection it had to be interrupted. Antibiotics were applied and control examination of the bone marrow was performed, because of repeated decrease of

leukocytes in blood count, to check the persistence of complete remission. Because of decrease of boy's weight, the dosing of chemotherapeutics also had to be adjusted. After further accentuated hepatopathy, ursodeoxycholic acid was added to the treatment.

After 13 months of the treatment, the boy is in complete remission with post-medication leukopenia and hepatopathy, and after two years, the maintenance treatment is finished.

It is advised to apply probiotic strains that have, besides other effects, also strong anti-inflammatory and anti-mutagenic properties. Specifically, a study was performed on strains *Lactobacillus acidophilus* LA – 5® and *Bifidobacterium animalis subspec. lactis* BB – 12®, proving that they produce certain substances. In *in vitro* condition they inhibited division and growth of cancer cells in mice (Roller et al., 2004) and decreased the number of tumours in rats (Femia et al., 2002). These results were subsequently verified in *in vivo* condition, with the expectation of prophylaxis of infections in oncological patients (Wada et al., 2010). With administration of probiotic strains LA – 5® and BB – 12®, a demonstrable delay of fever onset was reached, which increased the probability of survival in patients extremely prone to infections at the time of chemotherapy treatment (Lee and Salminen, 2008).

For high-risk patients, meaning those who do not reach remission due to death from toxicity, complications related to the treatment or due to resistant disease, new, alternative methods of treatment are reserved (Pui and Howard, 2008). These are focused on creating a mechanism of early identification of patients at the time of initial diagnosis, with the subsequent development of a targeted therapy. One of the very promising approaches in ALL treatment is immunotherapy. It involves application of monoclonal antibodies (rituximab, epratuzumab, alemtuzumab), bi-specific antibodies (blinatumomab), immunotoxins (combotox), immunoconjugates (inotuzumab), and according to the newest studies also application of so-called „chimeric antigen receptors T cells“ (CAR) (Advani, 2013).

CONCLUSION

Currently, oncological patients with ALL in Slovakia are treated according to the newest BFM ALL IC 2009 protocol. But, this study reports a case of the treatment options of the 3,5-year old boy with acute lymphoblastic leukemia according to ALL IC BFM 2002 protocol. This protocol defines and characterizes the ways of treatment including support care, determines the conditions for reducing the chemotherapy doses, follows a strict time schedule, sets time points for decisions about the next treating method. It contains drugs such as prednisone, vincristine, daunorubicin, L-asparaginase, methotrexate, cyclophosphamide, cytarabine, 6-mercaptopurine, dexamethasone, doxorubicin or 6-thioguanine. For high-risk patients new, alternative methods of the treatment are reserved. It involves application of monoclonal antibodies, bi-specific antibodies, immunotoxins, immunoconjugates and according to the newest studies also application of so-called „chimeric antigen receptors T cells“.

I would also like to thank our patient's parents for providing the data.

REFERENCES

- Advani, S. A.: New immune strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: antibodies and chimeric antigen receptors. *Hematology*, 2013, 2013, 131 – 137.
- Batchelor, H. K. a Marriott, J. F.: Paediatric pharmacokinetics: key considerations. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2015, 79 (3), 395 – 404.
- Becker, C., Graf, N., Grabow, D., Creutzig, U., Reinhardt, D., Weyer-Elberich, V., Spix, C., Kaatsch, P.: Early deaths from childhood cancer in Germany 1980 – 2016. *Cancer Epidemiology*, 2020, 65. doi: 10.1016/j.canep.2020.101669.
- Bürger, B., Zimmermann, M., Mann, G., Köhl, J., Löning, L., Riehm, H., Reiter, A., Schrappe, M.: Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia:

significance of low leukocyte counts withh blasts or traumatic lumbar picture. *J. Clinical Oncol.*, 2003, 21 (2), 184 – 188.

Creutzig, U., Zimmermann, M., Dworzak, M. N., Gibson, B., Tamminga, R., Abrahamsson, J., Ha, S. Y., Hasle, H., Maschan, A., Bertrand, Y., Leverger, G., von Neuhoff, Ch., Razzouk, B., Rizarri, C., Smisek, P., Smith, O. P., Stark, B., Reinhardt, D., Kaspers, G. L.: The prognostic significance of early treatment response in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: results of the international study Relapsed AML 2001/01. *Haematologica*, 2014, 99 (9), 1472 – 1478.

Cruz-Miranda, G. M., Hidalgo-Miranda, A., Bárcenas-Lopéz, D. A., Núñez-Enriquez, J. C., Ramirez-Bello, J., Mejía-Aranguré, J. M., Jiménez-Morales, S.: Long non-coding RNA and acute leukemia. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20 (3), 735.

Felice, M. S., Zubizarreta, P. A., Alfaro, E. M., Sackmann-Muriel, F.: Childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic value of initial peripheral blast count in good responders to prednisone. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 2001, 23 (7), 411 – 415.

Femia, A. P., Luceri, C., Dolara, P., Giannini, A., Biggeri, A., Salvadori, M., Clune, Y., Collins, K. J., Paglierani, M., Caderni, G.: Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, 2002, 23 (11), 1953 – 1960.

Hein, D., Borkhardt, A., Fischer, U.: Insights into the prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Metastasis Rev.*, 39 (1), 2020, 161 – 171.

Howard, S. C., McCormick, J., Pui, C. H., Buddington, R. K., Harvey, R. D.: Preventing and managing toxicities of high-dose methotrexate. *Oncologist*, 2016, 21 (12), 1471 – 1482.

Chudej, J., Hrnčár, M., Sokol, J., Válek, J., Staško, J.: Acute leukemias – what should general practitioner know. *Via practica*, 2016, 13, 110 – 113.

Jeha, S. a Pui, C. H.: Risk-adapted treatment

of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 2009, 23 (5), 973 – 990.

Lee, Y. K. a Salminen, S.: *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, 2nd edn., New Jersey: Wiley, 2008. 616 s.

Madhusoodhan, P. P., Carroll, W. L., Bhatla, T.: Progress and prospects in pediatric leukemia. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care*, 2016, 46 (7), 229 – 241.

Mahachoklertwattana, P., Vilaiyuk, S., Hongeng, S., Okascharoen, C. H.: Suppression of adrenal function in children with acute lymphoblastic leukemia following induction therapy with corticosteroid and other cytotoxic agents. *J. Pediatr.*, 2004, 144 (6), 736 – 740.

Malagoli, C., Costanzini, S., Heck, J. E., Malavolti, M., Girolamo, G. D., Oleari, P., Palazzi, G., Teggi, S., Vinceti, M.: Passive exposure to agricultural pesticides and risk of childhood leukemia in an Italian community. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 2016, 219 (8), 742 – 748.

Mullighan, C. G.: Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Hematol.*, 2013, 50 (4), 314 – 324.

Naderali, E., Valipour, B., Khaki, A. A., Soleymani Rad, J., Alihemmati, A., Rahmati, M., Nozad Charoudeh, H.: Positive effects of PI3K/Akt signaling inhibition on PTEN and P53 in prevention of acute lymphoblastic leukemia tumor cells. *Adv. Pharm. Bull.*, 2019, 9 (3), 470 – 480.

Pelland-Marcotte, M. C., Pole, J. D., Sutradhar, R., Nathan, P. C., Sung, L.: Infection as a potential long-term risk following childhood leukemia. *Medical Hypotheses*, 2020. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109554.

Pieters, R. a Carroll, W. L.: Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Clin. North. Am.*, 2008, 55 (1), 1 – 20.

Pui, Ch. a Howard, S. C.: Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *Lancet Oncol.*, 2008, 9 (3), 257 – 268.

Roller, M., Femia, A. P., Caderni, G., Rechkemmer, G., Watzl, B.: Intestinal immunity of

rats with colon cancer is modulated by oligofructose-enriched inulin combined with *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*. *Br. J. Nutr.*, 2004, 92 (6), 931 – 938.

Stanulla, M. a Schrappe, M.: Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Hematol.*, 2009, 46 (1), 52 – 63.

Sary, J., Zimmermann, M., Campbell, M., Castillo, L., Dibar, E., Donska, S., Gonzalez, A., Izraeli, S., Janic, D., Jazbec, J., Konja, J., Kaiserova, E., Kowalczyk, J., Kovacs, G., Li, Ch.-K., Magyarosy, E., Popa, A., Stark, B., Jabali, Y., Trka, J., Hrusak, O., Riehm, H., Masera, G., Schrappe, M.: Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *J. Clin. Oncol.*, 2014, 32 (3), 174 – 184.

Sary, J.: Acute leukemias in children. *Onkologie*, 2010, 4, 120 – 124.

Trujillo, A. M., Linares, A., Sarmiento, I. C.: Intensive chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. Interim analysis in a referral center in Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina*, 2016, 64 (3), 417.

Vaska, A., Makohusova, M., Plevova, K., Skalicka, K., Cermak, M., Chovanec, F., Fabri, O., Svec, P., Kolenova, A.: Clinical impact of genomic analysis in children with B-acute lymphoblastic leukemia: A pilot study in Slovakia. *Neoplasma*, 2019, 66 (6), 1009 – 1018.

Wada, M., Nagata, S., Saito, M., Shimizu, T., Yamashiro, Y., Matsuki, T., Asahara, T., Nomoto, K.: Effects of the enteral administration of *Bifidobacterium breve* on patients undergoing chemotherapy for pediatric malignancies. *Support Care Cancer*, 2010, 18 (6), 751 – 759.



ADHERENCIA PACIENTOV K LIEČBE REUMATOIDNEJ ARTRITÍDY

ADHERENCE OF PATIENTS TO THE THERAPY OF RHEUMATOID ARTHRITIS

Zummerová, Andrea; Kolesárová, Mária

Katedra farmakológie a toxikológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

maria.kolesarova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Reumatoidná artritída (RA) je chronické zápalové ochorenie, ktoré sa vyskytuje u ľudí rôzneho veku. Postihuje hlavne kĺby a jej zákernosť spočíva najmä v deformovaní kĺbov a kostí, čo môže viesť až k trvalej invalidite. Hlavným cieľom terapie je navodenie remisie ochorenia, pre ktoré je nevyhnutné nasadenie agresívnej a dlhotrvajúcej liečby, ktorá musí byť striktné dodržiavaná. Cieľom tejto štúdie bolo zistiť, nakoľko pacienti trpiaci RA dodržiaujú terapeutický postup zvolený po dohode s reumatológom. Prieskum bol vykonaný za použitia dotazníkov, ktoré vyplnilo 70 pacientov trpiacich RA v čase od apríla 2019 do augusta 2019. Z výsledkov prieskumu vyplýva, že RA sa objavuje častejšie u žien (81 %) ako u mužov (19 %), a to najmä vo veku 51 – 60 rokov (31,48 %).

Väčšina pacientov z výskumu bola nastavená na biologickú liečbu (82,35 %). Indikovanú farmakoterapiu dodržiavalo 100 % pacientov, zatiaľ čo nefarmakologické opatrenia len 79,17 % pacientov. Pri farmakoterapii komorbidít bola miera adherencie 94,20 %, z čoho vyplýva, že dodržiavanie terapie RA je pre pacientov dôležitejšie v porovnaní s inými ochoreniami.

Kľúčové slová: adherencia; farmakoterapia; nefarmakologické opatrenia; reumatoidná artritída

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease that occurs in people of all ages. It affects mostly the joints and its viciousness results from destruction of the joints and bones,

which can lead to permanent disability. The main goal of the treatment is to induce remission. Aggressive and long-lasting therapy is necessary for the remission. This therapy must be strictly followed. The aim of this study was to find out how patients suffering from RA follow the therapy chosen in agreement with the rheumatologist. The research was conducted using questionnaires filled by 70 patients suffering from the disease from April 2019 to August 2019. The results showed that RA occurs more often in women (81 %) than in men (19 %), especially at the age of 51 – 60 years (31.48 %). Most of the patients in the research were using biological treatment (82.35 %). All patients follow the prescribed pharmacotherapy, while only 79.17 % of them follow non-pharmacological interventions. In pharmacotherapy of other comorbidities, the adherence was 94.20 %. This suggests that adherence to the therapy of RA for the patients is more important than adherence to therapy of other diseases.

Key words: adherence; non-pharmacological interventions; pharmacological therapy; rheumatoid arthritis

ÚVOD

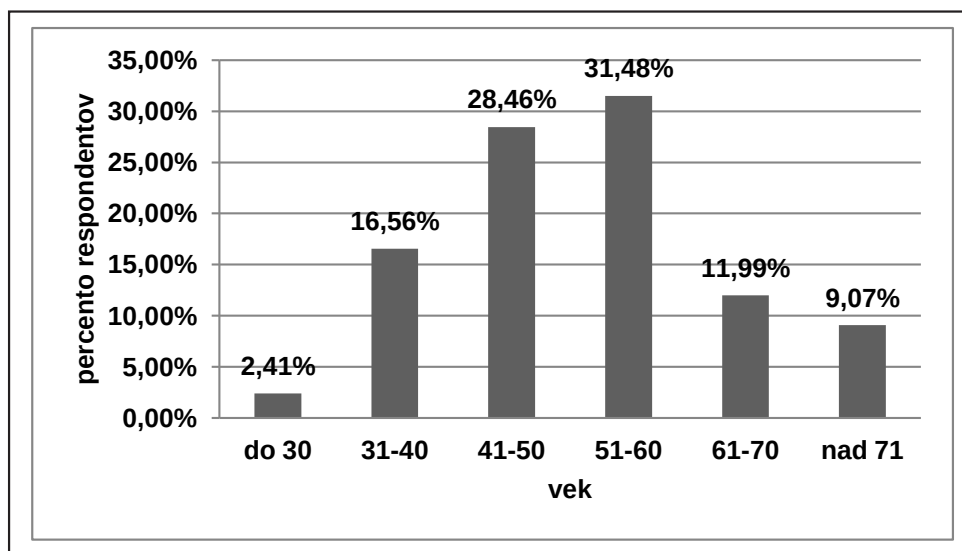
Adherencia pacienta k liečbe tvorí neoddeliteľnú súčasť úspešnej terapie. Adherencia predstavuje správanie sa pacienta v súvislosti s jeho zdravotným stavom a jeho schopnosť a snahu dodržiavať rady lekára alebo lekárnika, a tým zabezpečiť čo možno najefektívnejšiu terapiu ochorenia (WHO, 2003). Je dôležitá pri terapii takmer všetkých ochorení. Spravidla platí, že adherencia je vyššia u pacientov s akútnym stavom než u pacientov so stavom chronickým (Osterberg a Blaschke, 2005). Podľa rozličných literárnych zdrojov sa odhaduje, že 45 – 50 % pacientov ukončí liečbu chronického ochorenia do 12 mesiacov od jej začatia. Adherencia je tvorená perzistenciou a komplianciou. Perzistencia predstavuje dĺžku obdobia terapie od začiatku až po

skončenie a kompliancia určuje presnosť a správnosť užívania lieku (Payer a kol., 2010).

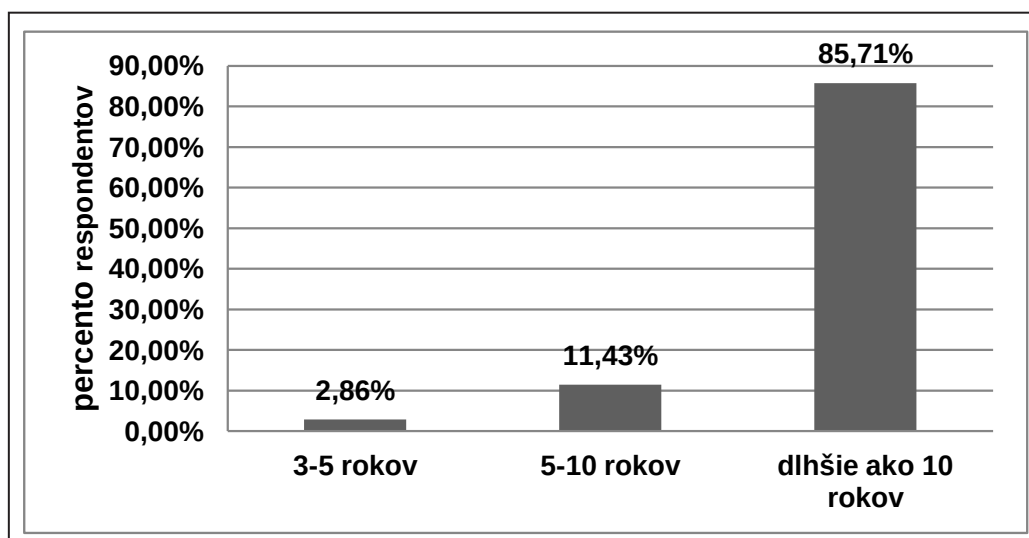
RA je autoimunitné systémové ochorenie, ktoré postihuje ľudí všetkých vekových skupín. Postihuje dva až trikrát viac ženy ako mužov (Isaacs a Moreland, 2019). Dochádza pri ňom ku zápalu najmä synoviálnych kĺbov, ale postihovať môže aj pľúca, srdce, cievnu stenu či iné orgány (Macejová a Rybár, 2010). Pri RA dochádza k deštrukcii artikúlárnej chrupavky a subchondrálnej kosti zapáleným invazívnym synoviom (pannus), ktoré sa pri RA rozširuje do artikúlárnej chrupavky. Následná sekrecia cytokínov a enzýmov degradujúcich chrupavku, napr. kolagenázy, vedie k deštrukcii kĺbu (Isaacs a Moreland, 2019).

Cieľom liečby RA je dosiahnutie remisie. K tomu je nevyhnutná včasná diagnostika a včasný začiatok terapie. Ak počas liečby dôjde k potlačeniu synovitídy, dochádza k zmierneniu bolesti, stuhnutosti, zlepšeniu funkcie, a následne k zníženiu invalidity a mortality pacientov (Geročová, 2014). Medzi liečivá využívané pri terapii RA patria nesteroidné antiflogistiká (NSAIDs), glukokortikoidy (GK), chorobu modifikujúce antireumatické liečivá (DMARDs), z ktorých sa najčastejšie používa metorexát (MTX) ako liek 1. voľby, a biologické lieky (BL). V prípade biologickej liečby sa používajú blokátory tumor nekrotizujúceho faktora α (TNF α) (infiximab, etarnecept, adalimumab, golimumab, certolizumab pegol), inhibítory povrchových antigénov B-lymfocytov (rituximab), inhibítory kostimulácie T-lymfocytov (abatacept) a inhibítory pre interleukín 1 a interleukín 6 (tocilizumab, anakinra) (Geročová, 2014). Na trhu je aj nová trieda cielených syntetických malých molekúl, ktorá interferuje s intracelulárnou signalizáciou prostredníctvom inhibície Janusových kináz (JAK), čím zoslabuje signalizáciu interleukínov (IL-2, 4, 6, 7, 9, 12, 15, 21, 23) a interferónov typu I a II (tofacitinib, baricitinib) (Vuitton a kol., 2013). Na potlačenie príznakov ochorenia je nevyhnutné dlhodobé a pravidelné užívanie liekov, ktoré môže viesť v určitých prípadoch ku vzniku nežiaducich účinkov (NÚ). Táto skutočnosť môže mať za následok

Graf 1: Vekové kategórie respondentov



Graf 2: Dĺžka trvania ochorenia u respondentov



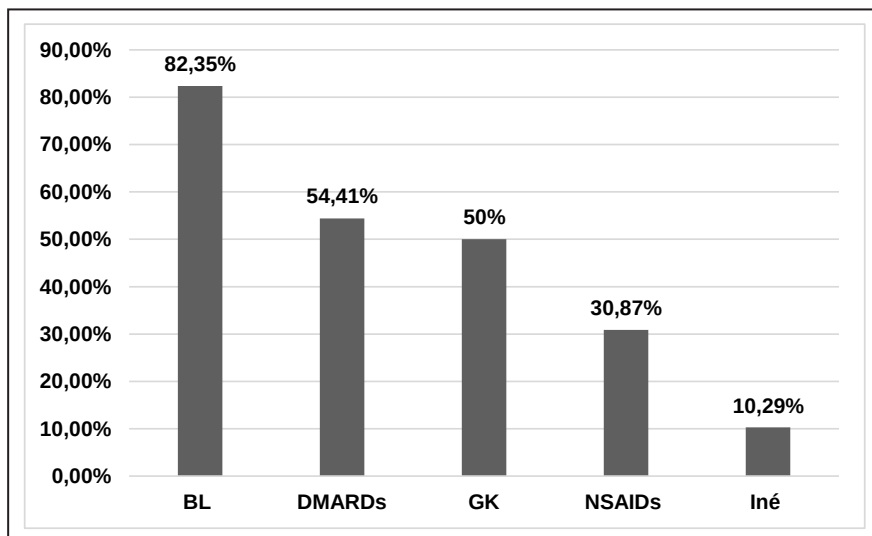
nedodržiavanie lekárom stanovených terapeutických postupov. Navyše, k viditeľnému zlepšeniu ochorenia môže dôjsť niekedy až po 3 – 6 mesiacoch od začatia terapie, v dôsledku čoho má dotknutá osoba pocit, že jej lieky nepomáhajú, čo tiež negatívne ovplyvňuje postoj pacienta k liečbe.

Cieľom štúdie bolo vyhodnotiť adhérenciu pacientov k ich farmakologickej a nefarmakologickej terapii RA i terapii komorbidít prostredníctvom dotazníka.

MATERIÁL A METÓDY

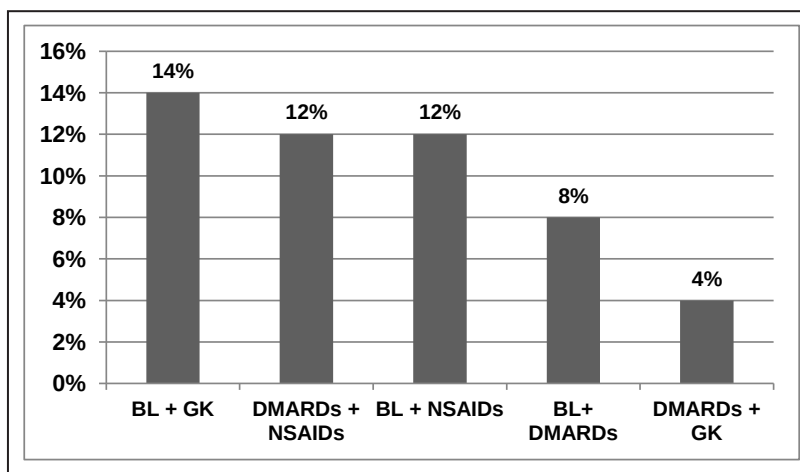
Praktický výskum pozostával z vyhotovenia dotazníka, ktorý vyplnilo 70 pacientov s diagnostikovaným reumatologickým ochorením, ktorí navštevovali reumatologickú ambulanciu v Košiciach. Dotazník pacienti vyplňali v období od apríla 2019 do augusta 2019. Pozostával z 18 otázok týkajúcich sa pohlavia, veku, dĺžky trvania ochorenia, typu terapie, dodržiavania/nedodržiavania terapie

Graf 3: Zastúpenie jednotlivých farmakoterapeutických skupín liečiv u respondentov



BL – biologická liečba, DMARDs – chorobu-modifikujúce lieky, GK – glukokortikoidy, NSAIDs – nesteroidné antiflogistiká

Graf 4: Zastúpenie kombinácií dvoch liečiv



RA, ale i iných komorbidít. Ďalšia časť dotazníka obsahovala informácie ohľadom dodržiavania nefarmakologickej terapie. Výsledky z dotazníka boli vyhodnotené formou tabuliek a grafov v programe Excel.

VÝSLEDKY

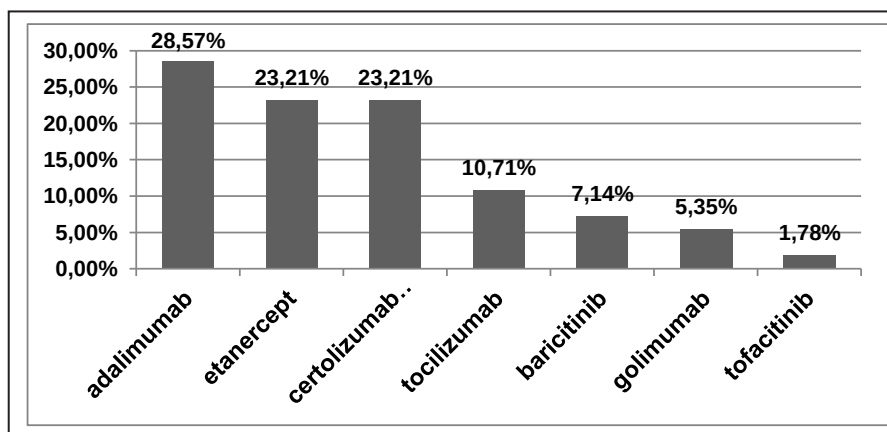
Charakteristika pacientov

V skupine 70 respondentov s RA sa vyskytlo viac žien (81 %) ako mužov (19 %). Najviac pacientov

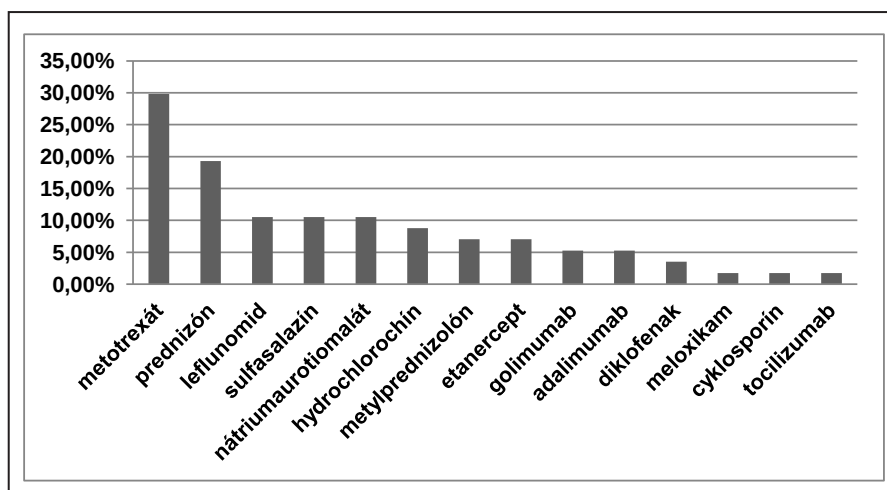
bolo zaznamenaných vo vekovej kategórii 51 – 60 rokov (31,48 %), následne 41 – 50 rokov (28,49 %). Najmenej pacientov s RA bolo vo veku do 30 rokov (2,41 %) (viď graf 1).

Z údajov týkajúcich sa trvania ochorenia vyplýva, že 85,71 % respondentov trpí RA už viac ako 10 rokov; 11,43 % pacientov trpí ochorením 5 až 10 rokov a 2,86 % pacientov trpí RA od 3 do 5 rokov. Ani jeden pacient neuviedol, že by trpel ochorením menej ako 3 roky (viď graf 2).

Graf 5: Celkové zastúpenie biologických liečiv indikovaných u respondentov



Graf 6: Percentuálne zastúpenie pacientov užívajúcich antireumatiká v minulosti



Terapia reumatoidnej artritídy

V terapii RA bola väčšine pacientom indikovaná kombinovaná liečba (72 %). Z farmakoterapeutických skupín liečiv bola pacientom najčastejšie nasadená biologická liečba (82,35 %), liečivá zo skupiny DMARDs užívalo 54,41 % pacientov, GK boli indikované u 50 % pacientov a NSAIDs u 30,87 % pacientov. Iné liečivá užívalo 10,29 % pacientov. Boli to predovšetkým liečivá zo skupiny antianemík (viď graf 3).

Pacienti uviedli, že v rámci monoterapie užívali hlavne BL (89,47 %). Len 10,53 % pacientov užívalo v monoterapii MTX. V prípade BL 36,84 % pacientov užívalo adalimumab; 26,32 % pacientov etanercept;

10,53 % pacientov certolizumab pegol; 5,26 % golimumab; 5,26 % baricitinib a 5,26 % pacientov užívalo tocilizumab.

V rámci kombinovanej terapie až 50 % pacientov uviedlo, že užíva dvojkombinovanú terapiu, u 42 % pacientov bola indikovaná trojkombinovaná liečba a len 8 % pacientov užívalo štvorkombináciu liečiv. V prípade dvojkombinovanej liečby sa najčastejšie vyskytla kombinácia GK a BL (14 %), následne DMARDs v kombinácii s NSAIDs (12 %) a BL zároveň s NSAIDs (12 %). BL v kombinácii s DMARDs užívalo 8 % a DMARDs súčasne s GK 4 % respondentov (viď graf 4). V prípade trojkombinácie liečiv bola najčastejšie uvádzaná kombinácia BL,

Tab. 1: Percentuálne zastúpenie užívaných liečiv iných terapeutických skupín

Terapeutická skupina	Percentuálne zastúpenie
Antihypertenzíva	33,33 %
Antiulceróza	12,50 %
Liečivá na štítnu žľazu	10,42 %
Minerály	8,33 %
Antihistaminiká	8,33 %
Antikoagulanciá	6,25 %
Hepatoprotektíva	4,16 %
Liečivá na žlčové cesty	4,16 %
Antivirotiká	4,16 %
Antianemiká	2,08 %
Hypnotiká a sedatíva	2,08 %
Antiašmatiká	2,08 %
Kontraceptíva	2,08 %
Hypolipidemiká	2,08 %
Antimigreniká	2,08 %

DMARDs a GK (36 %), nasledovala kombinácia DMARDs, GK a iné liečivo (4 %), a napokon dve rôzne liečivá zo skupiny DMARDs spolu s GK (2 %). Iba 8 % respondentov uviedlo, že užíva štyri rôzne liečivá, najčastejšie kombináciu BL, DMARDs, NSAIDs a antianemikum (4 %).

V rámci biologickej liečby bol u respondentov najčastejšie indikovaný adalimumab (28,57 %), následne etanercept (23,21 %) a certolizumb pegol (23,21 %). Najmenej predpisovanými boli golimumab (5,35 %) a tofacitinib (1,78 %) (viď graf 5).

Zo skupiny DMARDs bol pacientom najčastejšie naordinovaný MTX (81,08 %), sulfasalazín bol indikovaný u 8,11 % pacientov a hydroxychlorín u 5,41 % respondentov. Leflunomid a cyklosporín malo užívať len 2,70 % respondentov.

Z glukokortikoidov bol pacientom pre liečbu najčastejšie stanovený prednizón (36,76 %), následne metylprednizolón (13,24 %). Z NSAIDs bol indikovaný najčastejšie diklofenak (11,76 %), ako aj celecoxib (5,88 %).

Pri otázkach týkajúcich sa pravidelného užívania

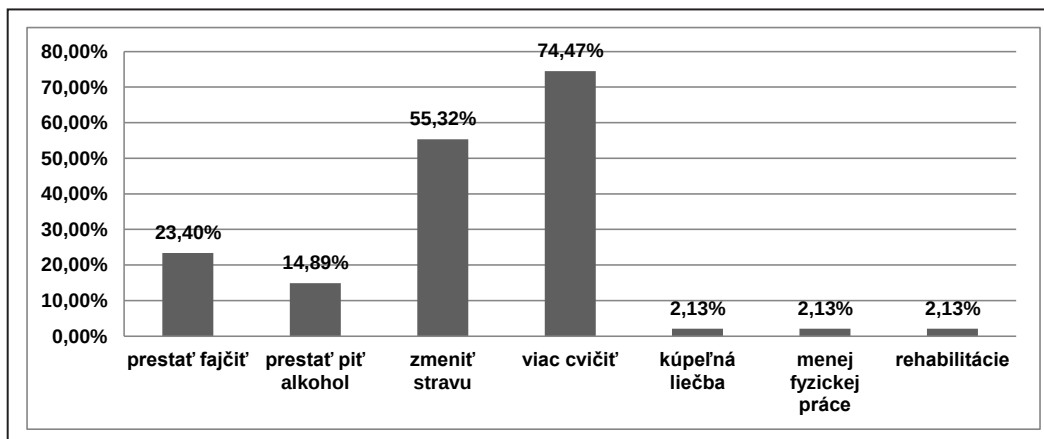
liekov 100 % pacientov odpovedalo, že predpísané lieky na terapiu RA užíva pravidelne a podľa pokynov lekára. Napriek tomu, že respondenti uviedli, že užívajú lieky pravidelne; 4,29 % pacientov udalo, že má strach z možných nežiaducich účinkov. Nežiaduci účinok potvrdilo 4,29 % respondentov, boli to hlavne tráviace ťažkosti (2,86 %) a kožné alergické prejavy (1,43 %).

Počas trvania ochorenia došlo u 81,43 % pacientov k zmene farmakoterapie. Graf 6 znázorňuje zastúpenie jednotlivých liečiv v predchádzajúcej farmakoterapii pacientov. Najviac respondentov uviedlo, že im bol v minulosti indikovaný MTX (29,82 %). Všetci pacienti potvrdili, že aj v prípade predchádzajúcej terapie RA lieky užívali pravidelne podľa pokynov lekára.

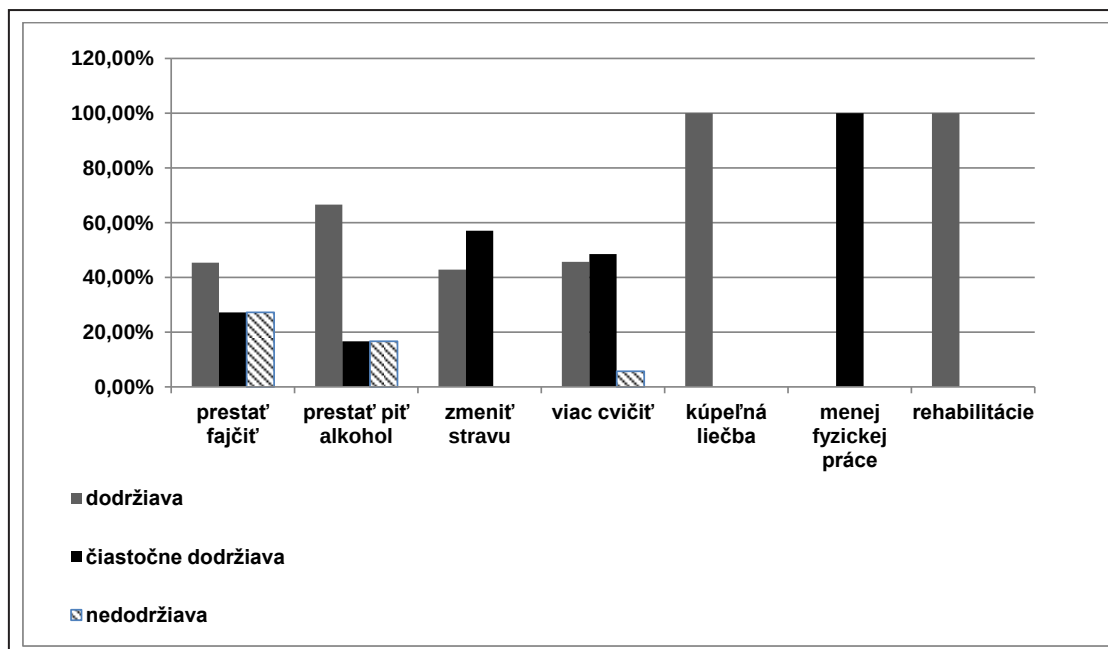
Terapia komorbidít

Väčšina dotazovaných pacientov (72,46 %) mala indikované aj iné lieky ako lieky určené na terapiu RA. V rámci terapie komorbidít pacienti najčastejšie užívali antihypertenzíva (33,33 %), antiulceróza (12,5 %) a liečivá na štítnu žľazu (10,42

Graf 7: Znázornenie odporúčaní na zmenu životného štýlu



Graf 8: Znázornenie adherencie pacientov ku zmene životného štýlu



%) (vid' tabuľka 1). Z hľadiska adherencie až 94,20 % pacientov odpovedalo, že dodržiava lekárom stanovenú farmakoterapiu komorbidít; kým 5,80 % respondentov uviedlo, že pri terapii komorbidít sa plne neriadia pokynmi lekára.

Nefarmakologická terapia

V terapii RA zohrávajú svoju úlohu aj nefarmakologické opatrenia. Lekár odporúča zmenu životného štýlu 69,57 % pacientov. Najčastejšie lekár odporúča pacientom viac cvičiť (74,47 %) a zmeniť

stravovanie (55,32 %) (vid' graf 7).

Graf 8 znázorňuje, nakoľko boli pacienti ochotní tieto odporúčania dodržiavať. Kúpeľnú liečbu a rehabilitácie podstúpili všetci pacienti, ktorým to bolo navrhnuté. Pitia alkoholu sa vzdalo 66,67 % pacientov z dotknutej skupiny. Fajčiť prestalo 45,45 % z predtým fajčiacich pacientov. Naopak; 27,27 % pacientov stále pokračuje vo fajčení. Stravovacie návyky úplne zmenilo 42,86 % pacientov, a čiastočne 57,14 %.

DISKUSIA

Výsledky získané z dotazníkov potvrdzujú, že reumatoidná artritída sa vyskytuje častejšie medzi ženským pohlavím (81 %). Napriek predpokladu, že ochorenie postihuje dva až trikrát viac žien ako mužov (Isaacs a Moreland, 2019), naše výsledky hovoria o viac ako štvornásobne väčšom výskyte ochorenia u žien. Pacienti boli v širokom vekovom rozpätí od 24 do 77 rokov, pričom najviac ich bolo zastúpených v skupine 51 – 60 rokov (31,48 %). Ochorenie bolo u väčšiny pacientov (85,71 %) diagnostikované pred viac ako 10 rokmi. Aj odborná literatúra uvádza výskyt reumatoidnej artritídy vo všetkých vekových skupinách (Rovenský, 2008).

Pri monoterapii ochorenia išlo najčastejšie o BL (89,47 %), ako aj DMARDs (10,53 %). V tomto bode sa naše výsledky rozchádzajú s odbornou literatúrou, ktorá uvádza, že najčastejšie sa v monoterapii užívajú DMARDs (Smolen a kol., 2019). Rovnako sa uvádza, že pri monoterapii sa z BL častejšie využíva tocilizumab než adalimumab kvôli vyššej účinnosti (Smolen a kol., 2019). Avšak, naše výsledky ukázali, že z BL bol v monoterapii pacientom najviac indikovaný adalimumab (36,84 %). Tocilizumab ako humanizovaná monoklonálna protilátka proti receptoru IL-6 bol indikovaný samostatne len u 5,26 % pacientov. Rovnako 5,26 % pacientov užívalo aj nové liečivo baricitinib, inhibítora JAK, ktorý sa na rozdiel od 2 – 3-týždňového parenterálneho podávania blokátorov TNF α a inhibítorov IL podáva perorálne 1x denne, čo môže ovplyvniť adhérenciu k liečbe. Baricitinib je indikovaný na liečbu stredne závažnej až závažnej aktívnej RA u pacientov, ktorí neodpovedali alebo netolerovali jedno, či viac DMARDs. Môže sa používať samostatne alebo v kombinácii s MTX (www.prolekare.cz). U väčšiny pacientov (72,46 %) bola nasadená kombinovaná terapia pozostávajúca z minimálne dvoch antireumatík. Časté využívanie kombinovanej terapie je v súlade s aktuálnym trendom v rámci manažmentu ochorenia (Isaacs a Moreland, 2019). Najčastejšie sa vyskytujúcou skupinou liečiv v celkovej terapii boli BL, ktoré

užívalo až 82,35 % opýtaných pacientov. To znamená, že veľká časť pacientov, ktorí sa zúčastnili výskumu, mali za sebou terapiu bazálnymi liečivami, na ktorú reagovali nedostatočne, alebo ju mali kontraindikovanú. Toto tvrdenie podporuje aj fakt, že u 81,43 % pacientov došlo k zmene liečby v čase od stanovenia diagnózy. Najčastejšie sa vyskytujúcim liečivom, ktoré pacienti kedysi užívali, ale v súčasnosti ho už neužívajú, bol MTX (29,82 %). Tento fakt môžeme dať do súvislosti s tým, že na nasadenie BL je potrebné, aby u pacienta predtým zlyhala liečba minimálne dvomi DMARDs, pričom jedným z nich musí byť spomínaný MTX (Smolen a kol., 2019). Štúdia, ktorú vykonali Wan a Mok v roku 2017 hovorí, že najčastejšie využívaným BL pri terapii RA je etanercept, nasledujú tocilizumab, infliximab a až následne je adalimumab. V našom prieskume v rámci celkovej BL pacienti najviac užívali adalimumab (28,57 %), rovnako etanercept a certolizumab pegol (23,21 %). Až na treťom mieste skončil tocilizumab (10,71 %), ktorý je zameraný proti IL 6 (viď graf 5). Najčastejšie užívaným liečivom zo skupiny DMARDs bol jednoznačne MTX (81,08 %). Všetky tieto skutočnosti potvrdzujú, že MTX je liekom prvej voľby pri RA (Isaacs a Moreland, 2019). V prevencii nežiaducich účinkov MTX (trombocytopénie, neutropénie, bolesť hlavy, únava, erytém atď.) sa aplikuje kyselina listová v dávke 10 – 30 mg 1-krát týždenne, v iný deň ako MTX. Kyselinu listovú udávalo ako užívané antiemetikum 10,29 % pacientov (Geročová, 2014).

Všetci pacienti uviedli, že lieky užívajú pravidelne podľa pokynov lekára a v dávke, ktorú lekár stanovil. To platí pre súčasnú farmakoterapiu rovnako ako aj pre lieky, ktoré už pacienti neužívajú. Takúto vysokú mieru adhérencie môžeme pripísať najmä predpokladu, že pacienti chcú predchádzať bolestiam, ktoré so sebou ochorenie prináša a taktiež dávkovaniu, ktoré je pri BL raz za niekoľko týždňov prijateľnejšie a menej časté ako u iných liekov. 100 % -ná adhérenca bola pozorovaná napriek tomu, že sa u niektorých pacientov (4,29 %) vyskytli NÚ a rovnaké percento pacientov má z NÚ strach. Veľké

množstvo pacientov (72,46 %) užíva okrem liekov na RA aj iné lieky. Najčastejšie ide o antihypertenzíva (33,33 %) a antiulceróza (12,50 %). Náš výskum ukázal, že pri terapii komorbidít je miera adherencie o niečo nižšia (94,20 %) ako pri terapii RA. Podobné výsledky boli publikované vo viacerých štúdiách, keď napríklad adherencia pri hypertenzii bola stanovená na 80 – 89 % (Caro a kol., 1999) a pri antiulcerózach 62,5 % (Iwasawa a kol., 2019). Tento fakt môže znamenať, že pacienti sú viac dôslednejší v terapii RA, aby u nich nedošlo k zhoršeniu stavu ochorenia a bolestivých symptómov, na rozdiel od terapie ochorení, ktoré „nebolia.“

Súčasťou terapie RA sú aj nefarmakologické opatrenia, ktoré by mal pacient dodržiavať. Až 69,57 % pacientov dostalo od lekára odporúčanie, že by mali zmeniť svoj životný štýl. Najčastejšie bolo pacientom odporúčané, aby začali viac cvičiť (74,47 %). Hlavnou úlohou cvičenia je udržať pohyblivosť postihnutých kĺbov a dostatočnú svalovú silu. Cvičenie sa musí vykonávať dlhodobo a aj napriek bolesti, ktorá však musí ustúpiť do dvoch hodín po skončení cvičenia (Rovenský a kol., 2005). Viac ako polovici pacientov (55,32 %) bolo odporúčané zmeniť stravovacie návyky. Ide najmä o vylúčenie potravín, ktoré by mohli nepriaznivo ovplyvňovať zápalový proces a naopak, je potrebné konzumovať potraviny potláčajúce zápal. Medzi nich patria najmä ryby, olivový olej, zelený čaj či čerstvá zelenina (Zima, 2018). 23,40 % pacientov by malo prestať fajčiť a 14,89 % pacientov by malo prestať piť alkoholické nápoje, ktoré zhoršujú zápalový proces v kĺboch (Isaacs a Moreland, 2019). Pomerne veľké percento pacientov, ktorým bolo odporúčané, aby prestali piť alkohol, toto odporúčanie dodržiava (66,67 %), resp. dodržiava aspoň čiastočne (16,67 %). Naopak; až 27,27 % pacientov, ktorým bolo odporúčané aby prestali fajčiť, v tomto zlozvyku naďalej pokračuje, čo môže byť spojené so vznikom silnej závislosti na nikotíne (Čupka, 2005).

ZÁVER

Výsledky štúdie ukázali 100 %-nú adhérenciu pacientov k indikovanej farmakoterapii RA, kým dodržiavanie nefarmakologických odporúčaní bolo zaznamenané len u 79,17 % pacientov. V terapii komorbidít bola zistená 94,2 % miera adherencie pacientov, čo môže súvisieť s tým, RA je ochorenie, ktoré so sebou prináša určitú mieru bolesti, ktorej sa pacienti chcú vyhnúť.

ZOZNAM LITERATÚRY

Caro, J. J., Speckman, J. L., Salas, M., Raggio, G.: Effect of initial drug choice on persistence with antihypertensive therapy: the importance of actual practice data. *Canadian Medical Association Journal*, 1999, 160 (1), 31 – 64.

Čupka, J.: Odvykání kouření v ambulanci praktického lékaře [Smoking cessation in the general practitioner's office]. *Via Practica*, 2016, 2, 98 – 99.

Geročová T.: Farmakoterapia zápalových reumatických chorôb [Pharmacotherapy of inflammatory rheumatic diseases]. *Praktické lekárnictvo*, 2014, 4 (2 – 3), 42 – 49.

<https://www.prolekare.cz/tema/biologicka-lecba/detail/baricitinib-nova-latka-v-lecbe-revmatoidni-artritidy-7899>. [cit. 2020-06-24].

Isaacs, J. D. a Moreland, L. W.: *Rýchle fakty: reumatoidná artritída* [Fast facts: Rheumatoid Arthritis]. Bratislava: Raabe. 2019. 116 s.

Iwasawa, M., Sagami, K., Yokoyama, S., Hosomi, K.: Adherence to guidelines for antiulcer drug prescription in patients receiving low-dose aspirin therapy in Japan. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2019, 57 (4), 197 – 206.

Macejová, Ž. a Rybár, I.: Farmakoterapia reumatoidnej artritídy I. – nesteroidné antireumatiká, DMARDs [Pharmacotherapy of rheumatoid arthritis I. – non-steroidal anti-inflammatory drugs, DMARDs]. *Via Practica*, 2010, 7 (1), 30 – 33.

Osterberg, L. a Blaschke, T.: Adherence to medication. *The New England Journal of Medicine*, 2004, 50, ISSN 1533-4406.

Payer, J., Brázdilová, K., Jackuliak, P., Killinger, Z.: Farmakoterapia osteoporózy a adherencia pacienta [Osteoporosis pharmacotherapy and adherence of patient]. *Via practica*, 2010, 7 (5), 202 – 206.

Rovenský, J.: Reumatoidná artritída – klinický obraz, diagnostika a liečba [Rheumatoid arthritis – clinical picture, diagnostics and treatment]. *Via Practica*, 2008, 5 (1), 6 – 13.

Rovenský, J., Rybár, I., Mičková, D., Žlnay, D., Lukáč, J., Poprac, P.: Farmakoterapeutické postupy pri reumatoidnej artritíde [Pharmacotherapeutic approaches for rheumatoid arthritis]. *Via Practica*, 2005, 2 (2), 66 – 74.

Smolen, J. S., Landewe, R., Bijlsma, J., Burmester, G., Chatzidionysiou, K., Dougados, M., Nam, J., Ramiro, S., Voshaar, M., van Vollenhoven, R., Aletaha, D., Aringer, M., Boers, M., Buckley, Ch. D., Buttgerit, F., Bykerk, V., Cardiel, M., Combe, B., Cutolo, M., van Eijk-Hustings, Y., Emery, P., Finckh, A., Gabay, C., Gomez-Reino, J., Gossec, L.,

Gottenberg, J.-E., Hazes, J. M. W., Huizinga, T., Jani, M., Karateev, D., Kouloumas, M., Kvien, T., Li, Z., Mariette, X., McInnes, I., Mysler, E., Nash, P., Pavelka, K., Poór, G., Richez, Ch., van Riel, P., Rubbert-Roth, A., Saag, K., da Silva, J., Stamm, T., Takeuchi, T., Westhovens, R., de Wit, M., van der Heijde, D.: EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2017, 76, 960 – 977.

Vuitton, L., Koch, S., Peyrin-Biroulet, L.: Janus kinase inhibition with tofacitinib: changing the face of inflammatory bowel disease treatment. *Current drug targets*, 2013, 14 (12), 1385 – 1391.

Wan, R. a Mok, C. C.: The Hong Kong Society of Rheumatology Biologics Registry: update report 2017. *Hong Kong Bulletin on Rheumatic Diseases*, 2017, 17, 29 – 32.

World Health Organization. *Adherence to long-term therapies: evidence for action*, 2003. 199 s.

Zima, J.: *Diéta pri reume* [Diet in rheuma]. 2018. < <https://www.mojareuma.sk/2012/04/dieta-pri-reume/>>. [cit. 2020-06-24].



HYPOTYREÓZA V GRAVIDITE A JEJ VPLYV NA DIEŤA

HYPOTHYROIDISM IN PREGNANCY AND ITS IMPACT ON THE CHILD

Kostová, Lenka; Piešová, Elena

Katedra biológie a fyziológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

elena.piesova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Poruchy štítnej žľazy môžu nepriaznivo ovplyvňovať koncepciu, udržanie gravidity, zvyšujú riziko komplikácií v tehotenstve a môžu mať negatívny vplyv na optimálny psychosomatický vývoj dieťaťa. Subklinická hypotyreóza je charakterizovaná hladinami voľného tyroxínu (fT4), ktoré sú v normálnom referenčnom rozmedzí, zatiaľ čo hladiny sérového tyreoidálneho stimulačného hormónu (TSH) sú mierne zvýšené. Zistenie laboratórneho nálezu zodpovedajúceho subklinickej hypotyreóze v gravidite sa pokladá za jednoznačnú indikáciu na liečbu levotyroxínom. Cieľom štúdie bolo u skupiny 20 tehotných žien rôzneho veku sledovať zmeny koncentrácií TSH a fT4 v závislosti od trimestra gravidity, od podanej substitučnej dávky levotyroxínu a vyhodnotiť ich stav po pôrode. Výsledky boli získané retrospektívnou analýzou chorobopisov

pacientok endokrinologickej ambulancie. 80 % žien sledovaného súboru bolo prvorodičiek, pričom u 15 % z nich sa v minulosti vyskytol potrat. U 45 % žien bola diagnostikovaná hypotyreóza po tehotenskom skríningu realizovanom ošetrovujúcim gynekológom. V preskripcii výrazne dominoval originálny liek Euthyrox® (69,7 %) oproti generickému L-Thyroxinu®. Po diagnostikovaní gravidity u 9 dispenzarizovaných pacientok bola zahájená substitučná liečba alebo bola zvýšená dávka lieku, u dvoch pacientok nebola potrebná korekcia doterajšej liečby. Po pôrode bola potrebná úprava doterajšej terapie u 89,5 % žien. V súbore narodených detí sledovaných žien nebol zaznamenaný žiadny výskyt kongenitálnej hypotyreózy.

Kľúčové slová: gravidita; hypotyreóza; levotyroxín; skríning; tyreoidálny stimulačný hormón; voľný tyroxín

ABSTRACT

Thyroid disorders can adversely affect conception, maintain pregnancy, increase the risk of complications in pregnancy and have a negative effect on the optimal psychosomatic development of the child. Subclinical hypothyroidism is characterized by levels of free thyroxine (fT4) that are within the normal reference range, while serum thyroid stimulating hormone (TSH) levels are slightly elevated. The result of a laboratory finding corresponding to subclinical hypothyroidism in pregnancy is considered a clear indication for levothyroxine treatment. The aim of the study was to monitor changes in TSH and fT4 concentrations in the group of 20 pregnant women of different ages depending on the trimester of pregnancy, the administered replacement dose of levothyroxine and to evaluate their condition after childbirth. The results were obtained by retrospective analysis of medical records of endocrinology outpatients. 80 % of the women in the sample were primiparas, and 15 % of them had a miscarriage in the past. 45 % of the women were diagnosed with hypothyroidism after pregnancy screening by a gynecologist. The original drug Euthyrox® (69.7 %) significantly dominated in the prescription over the generic L-Thyroxine®. After diagnosing pregnancy in 9 outpatients, substitution treatment was started or the dose was increased, in two patients no correction of the previous treatment was necessary. After delivery, 89.5 % of women needed to adjust their current therapy. No incidence of congenital hypothyroidism was reported in the group of births of the monitored women.

Key words: free thyroxine; hypothyroidism; levothyroxine; pregnancy; screening; thyroid-stimulating hormone

ÚVOD

Poruchy funkcie štítnej žľazy postihujú významnú časť žien v reprodukčnom veku. Hypotyreóza môže byť príčinou neplodnosti, zvyšuje sa pri nej riziko potratov, preeklampsie, predčasného pôrodu, perinatálnej mortality a stúpa percento indikovaného cisárskeho rezu (Khalil a kol., 2018). Novorodenci týchto matiek majú nízku pôrodnú hmotnosť a pri pôrode časté respiračné problémy (Sahay a kol., 2012). Najčastejšou príčinou hypotyreózy v gravidite je autoimunitná tyreoiditída, neupravené dávky l-tyroxínu u žien s diagnostikovanou hypotyreózou v dobe zvýšených nárokov a relatívny nedostatok jódu (Jiskra, 2012). Deficit tyreoidálnych hormónov, ktoré sa nedajú zistiť klinicky, ale iba stanovením TSH (tyreotropín) a fT4 (voľná forma tyroxínu) v sére matky, majú za následok zníženie stupňa neuropsychologického vývoja u potomkov (Hnilica, 2008). Zistenie laboratórneho nálezu zodpovedajúceho subklinickej hypotyreóze v gravidite sa preto, na rozdiel od takéhoto nálezu mimo gravidity, pokladá za jednoznačnú indikáciu na liečbu levotyroxínom s endokrinologickým sledovaním. V Slovenskej republike je od roku 2009 platné Odborné usmernenie MZ SR z roku 2009 pre diagnostiku a liečbu ochorení štítnej žľazy u žien v období tehotenstva. Podľa neho sa skrining pacientky realizuje v gynekologickej ambulancii, optimálne do desiateho týždňa tehotnosti. Ak je zaznamenaná subklinická hypotyreóza (zvýšené TSH pri fyziologických hodnotách fT4), je iniciovaná terapia levotyroxínom na špecializovanom endokrinologickom pracovisku. Cieľom štúdie bolo sledovať zmeny koncentrácií TSH a fT4 v sére 20 tehotných žien rôzneho veku v závislosti od trimestra gravidity a podania substitučnej dávky levotyroxínu, sledovať koncentrácie TSH a fT4 po pôrode a zaznamenať závažnejšiu patológiu u novorodencov.

Tab. 1: Charakteristika sledovaného súboru

Pacientka	Rok narodenia	Poradie tehotenstva	Spontánny potrat	Liečená / odoslaná na endokrinológiu
1.	1983	prvé	–	liečená
2.	1994	prvé	–	liečená
3.	1983	druhé	–	odoslaná – liečená
4.	1982	tretie	áno	odoslaná
5.	1989	prvé	–	liečená
6.	1993	prvé	–	liečená
7.	1988	druhé	áno	odoslaná – liečená
8.	1983	prvé	–	odoslaná
9.	1988	prvé	–	odoslaná
10.	1991	prvé	–	liečená
11.	1989	prvé	–	odoslaná
12.	1985	štvrté	2 x potrat; 1x IVF	liečená
13.	1980	prvé	–	odoslaná
14.	1989	prvé	–	odoslaná
15.	1987	prvé	–	sledovaná (bez liečby)
16.	1991	prvé	–	sledovaná (bez liečby)
17.	1993	prvé	–	odoslaná
18.	1987	prvé	–	liečená
19.	1985	prvé	–	sledovaná (bez liečby)
20.	1989	prvé	–	odoslaná

IVF – *in vitro* fertilizácia

MATERÁL A METÓDY

Analyzovaná skupina

Hodnotený súbor tvorili dve skupiny žien. Tehotné ženy s hypotyreózou, u ktorých bola choroba diagnostikovaná pred otehotnením, a teda boli už liečené, a novo diagnostikované pacientky odoslané gynekológom na endokrinologickú ambulanciu pre patologické laboratórne hodnoty. Celkovo bolo analyzovaných 20 chorobopisov v sledovanom období od decembra 2018 do septembra 2019.

Retrospektívna analýza laboratórných výsledkov tehotných žien

Vďaka spolupráci s ambulantným endokrinológom sa získali podklady pre realizáciu retrospektív-

nej analýzy lekárskeho chorobopisu u 20 tehotných žien s hypotyreózou. Spracovali sa laboratórne markery funkcie štítnej žľazy v závislosti od trimestra gravidity a prebiehajúcej medikamentózne liečby.

Endokrinologické vyšetrenie

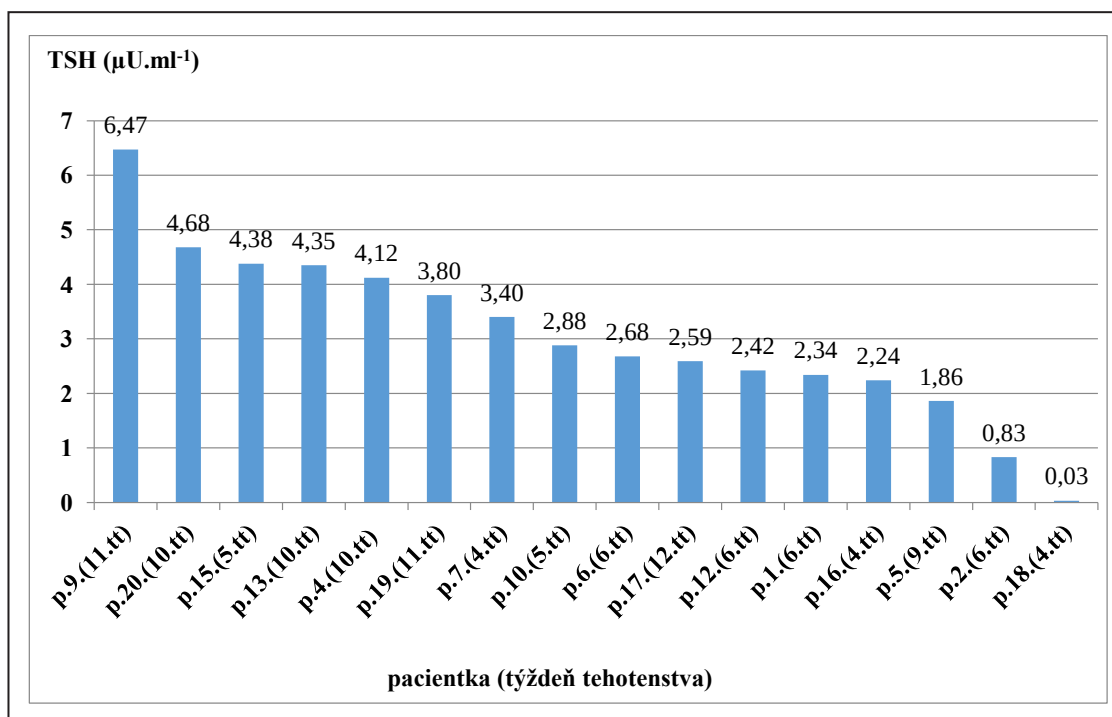
Podľa hodnôt koncentrácií TSH a fT4 v sére a v závislosti od trimestra gravidity sa pacientky rozdelili na tie, ktoré sa na prvú endokrinologickú kontrolu dostavili v prvom trimestri a na tie, ktoré prišli až v druhom trimestri. Ženy sa následne prerozdělili podľa toho, či boli pred graviditou dispenzarizované na endokrinológiu alebo sa endokrinopatia objavila až po otehotnení.

Tab. 2: Terapia prvej liečenej skupiny žien

Pacientka č.	Terapia po diagnostikovaní gravidity
6, 7, 15, 16, 19	začatie substitučnej terapie
12	po potrate a neúspešnej IVF levotyroxín 75 µg/deň zvýšený na 100 µg/deň
1, 10, 18	po otehotnení levotyroxín zvýšený
2, 5	bez korekcie liečby
3	po prerušení liečby (nauzea) opätovné začatie terapie

IVF – *in vitro* fertilizácia

Graf 1: Koncentrácia TSH v sére v 1. trimestri



VÝSLEDKY A DISKUSIA

Charakteristika sledovaného súboru

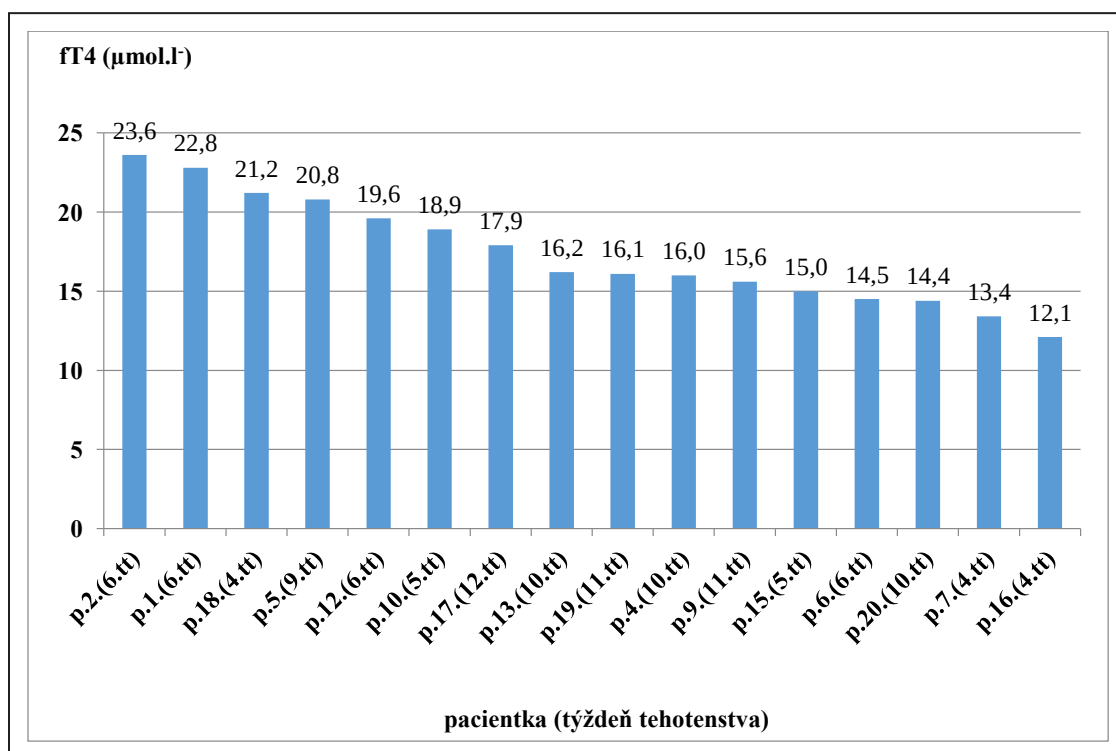
Do štúdie boli zaradené pacientky vo veku 25 – 39 rokov, pričom najvyššie percento (40 %) tvorili ženy vo veku 29 – 33 rokov. 35 % tvorili ženy 34 – 39 ročné a 5 % tvorili ženy vo veku od 25 do 28 rokov. Prvorodičky predstavovali 80 %; 10 % žien bolo druhýkrát tehotných, 5 % tretíkrát a 5 % štvrtýkrát tehotných. U troch pacientok došlo k potratu v predchádzajúcom období. Charakteristika sledovaného súboru je uvedená v tabuľke 1.

Počas prvej endokrinologickej kontroly po potvrdení gravidity lekár na základe laboratórnych výsledkov indikoval liečbu pacientkam nasledovne (prvá liečená skupina žien) (viď tabuľka 2).

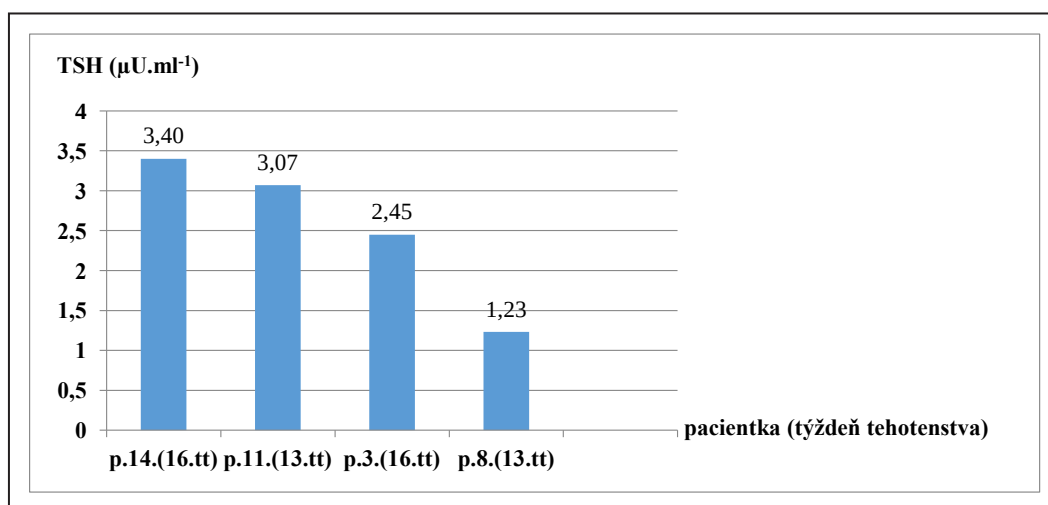
Na základe výsledkov tehotenského skríningu boli pacientky č. 3, 4, 8, 9, 11, 13, 14, 17 a 20 z gynekologickej ambulancie odoslané k endokrinológovi, pretože im boli zistené abnormálne hodnoty markerov funkcie štítnej žľazy (novo diagnostikované pacientky) (viď graf 1, 2, 3 a 4).

Pacientky č. 3, 8, 11 a 14 prišli na prvú endokrinologickú kontrolu v 2. trimestri (viď graf

Graf 2: Koncentrácia fT4 v sére v 1. trimestri



Graf 3: Koncentrácia TSH v sére v 2. trimestri počas prvej endokrinologickej kontroly

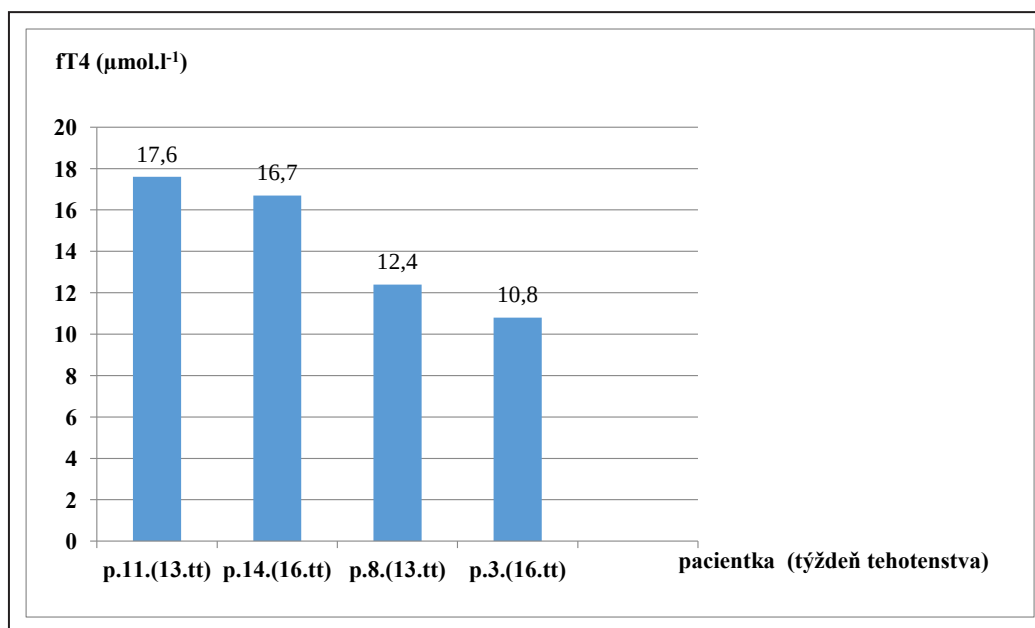


3 a 4). Všetky pacientky (okrem pacientky č. 8) boli na základe dôsledného vyšetrenia nastavené na terapiu chýbajúceho hormónu levotyroxínu. Pretože pacientka č. 8 mala koncentráciu TSH v norme, nebolo potrebné začatie medikamentózneho liečby, len dôsledné monitorovanie jej

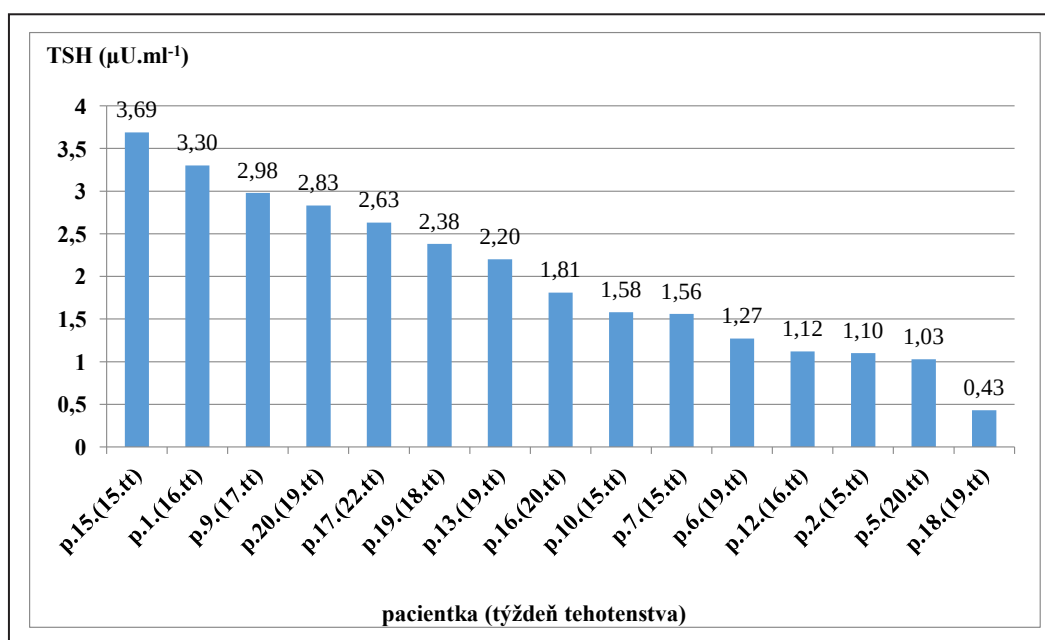
zdravotného stavu. Koncentrácia fT4 v sére bola u všetkých analyzovaných žien v referenčných medziach.

Sumárom môžeme teda vyhodnotiť, že 55 % pacientok malo diagnostikovanú hypotyreózu už pred graviditou, 45 % pacientok bolo novo

Graf 4: Koncentrácia fT4 v sére v 2. trimestri počas prvej endokrinologickej kontroly



Graf 5: Koncentrácia TSH v sére počas 2. trimestra



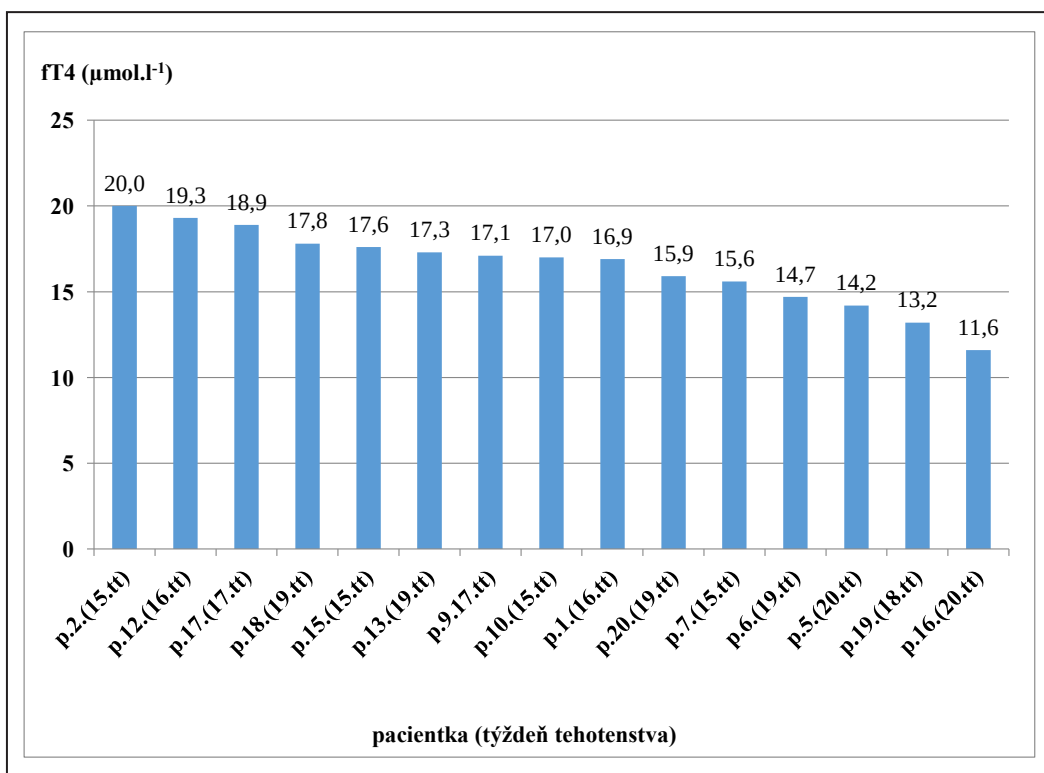
diagnostikovaných ošetrojúcim gynekológom po vykonanom skríningu. 51,51 % žien malo v anamnéze uvedený rodinný výskyt hypotyreózy.

Diagnostika tyreopatií v gravidite

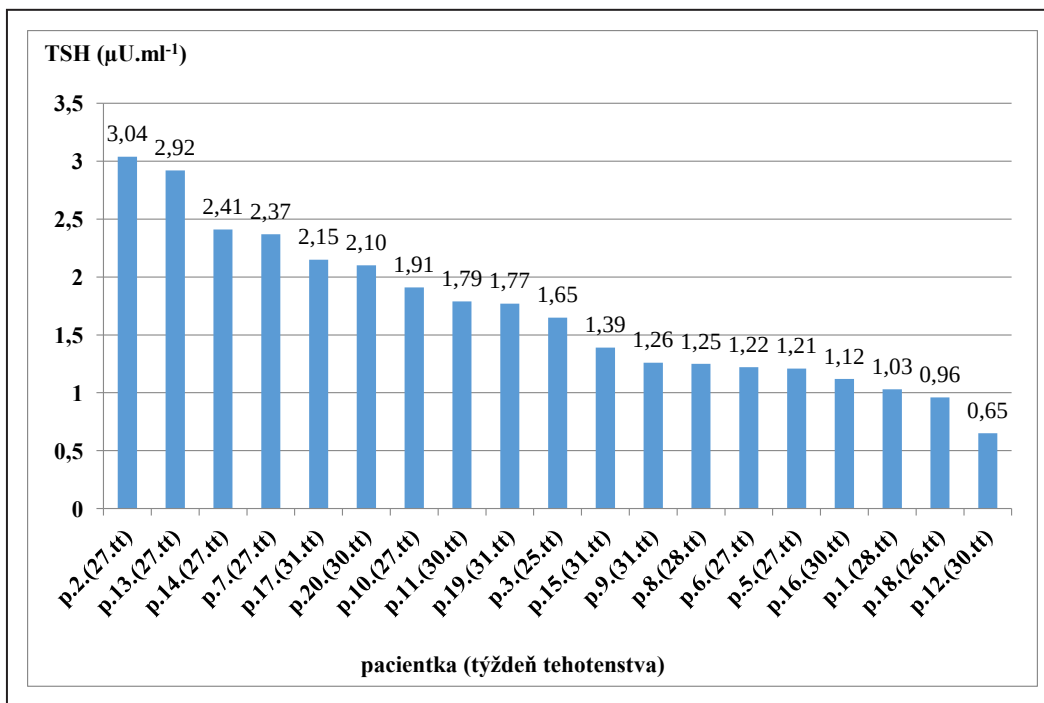
Diagnostika tyreopatií v gravidite je založená

na laboratórnych testoch, pretože väčšina žien je asymptomatických, alebo má len nešpecifické príznaky. Vplyvom hormonálnych zmien sú v tehotenstve iné normy tyreoidálnych parametrov. Najlepšie štandardizovaným a najspoľahlivejším parametrom v gravidite je TSH, naopak, normy pre

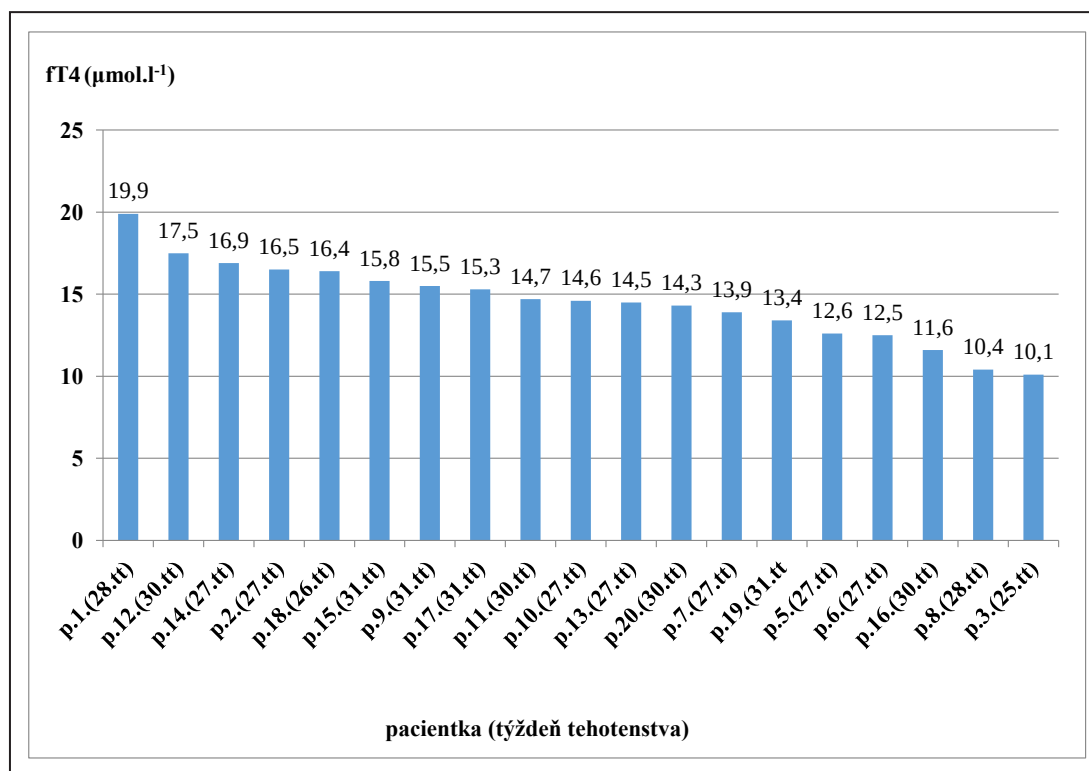
Graf 6: Koncentrácia fT4 v sére počas 2. trimestra



Graf 7: Koncentrácia TSH v sére v 3. trimestri



Graf 8: Koncentrácia fT4 v sére v 3. trimestri



fT4 sa môžu líšiť podľa použitej metodiky (Jiskra, 2012). Podľa MZ SR (2009) hodnota pre TSH v sére počas tehotenstva by mala byť do 2,5 $\mu\text{U}.\text{ml}^{-1}$ v 1. trimestri a do 3,0 $\mu\text{U}.\text{ml}^{-1}$ v 2. a 3. trimestri. Koncentrácia fT4 v sére by mala byť v rozmedzí 11,0 – 22,0 $\mu\text{mol}.\text{l}^{-1}$ v 1. trimestri a v 2. a 3. trimestri 8,2 – 25 $\mu\text{mol}.\text{l}^{-1}$.

Endokrinologické vyšetrenie – druhý trimester

Laboratórne výsledky, ktoré boli pacientkam diagnostikované počas druhého trimestra (približne + / – v 18. týždni tehotenstva) sme prezentovali v grafe 5 a v grafe 6.

Pacientku č. 4 sme zo štúdie vylúčili, nakoľko u nej v 10. týždni gravidity došlo k spontánnemu *abortu*. Pacientkam č. 1, 9, 15 a 20 kvôli zvýšenej a hraničnej koncentrácii TSH v sére bolo potrebné zvýšiť dennú dávku levotyroxínu nasledovne: pacientka č. 1 zvýšenie o 18 $\mu\text{g}/\text{deň}$, č. 9 zvýšenie o 12,5 $\mu\text{g}/\text{deň}$,

č. 15 zvýšenie o 25 $\mu\text{g}/\text{deň}$, č. 20 zvýšenie o 10,7 $\mu\text{g}/\text{deň}$.

Ostatným ženám ostala farmaceutická liečba pôvodná bez potreby ďalšej korekcie.

Endokrinologické vyšetrenie – tretí trimester

V grafe 7 a 8 sme znázornili koncentráciu TSH a fT4 v sére zistenú v treťom trimestri.

Väčšine žien ostala terapia pôvodná, okrem pacientky č. 2 a č. 13. Pacientka č. 2 mala TSH nad referenčnú normu (3,04 $\mu\text{U}.\text{ml}^{-1}$), preto lekár zvýšil dávku hormónu o 12 $\mu\text{g}/\text{deň}$ a pacientke č. 13 o 25 $\mu\text{g}/\text{deň}$ kvôli hraničnej hodnote TSH v sére (2,92 $\mu\text{U}.\text{ml}^{-1}$).

Farmakologická liečba pacientok

Farmakoterapeutiká, ktoré boli ženám predpisované pri terapii hypotyreózy spolu s obsahom účinnej látky a ich percentuálnym zastúpením

Tab. 3: Predpisované lieky

Typ lieku	Obsah liečiva (µg)	Počet žien (%)
Euthyrox ®	25	12,12
	50	6,06
	75	9,09
	88	6,06
	100	21,22
	125	6,06
	150	9,09
L-Thyroxin ®	75	6,06
	125	3,03
	100	6,06

Tab. 4: Zmeny terapie po pôrode

% žien	Terapia
26,31	terapia ukončená po pôrode a opätovné začatie substitučnej terapie
21,08	úplné vysadenie terapie
10,5	rovnaká terapia pred a po pôrode
42,11	redukcia dávky levotyroxínu

v sledovanom súbore sú uvedené v tabuľke 3.

V preskripcii dominoval originálny liek Euthyrox® (69,7 %) oproti generickému L-Thyroxinu® (15,15 %). Pacientky pri kontrolách zdravotného stavu potvrdili, že dodržiavajú liečebný režim odporúčaný endokrinológom, a to 20 – 30 minútový odstup medzi podaným liekom a príjmom potravy, pretože je to jeden z kľúčových faktorov podmieňujúcich úspešnosť terapie (Jiskra, 2012). V období tehotenstva je pre správne fungovanie štítnej žľazy veľmi dôležitý dostatočný príjem jódu, pretože v dôsledku jeho zvýšeného klírensu a prechodu placentárnou bariérou môže dôjsť u vyvíjajúceho sa plodu k rozvoju strumy, k potratom, k retardácii rastu, k neurologickým ako aj k psychologickým poruchám (Delange, 2002; Zimmermann, 2012; Delitala a kol., 2019). Sledovaná skupina žien užívala výživové doplnky určené pre tehotné ženy,

pričom u nich prevažoval multivitamínový doplnok Ladee Vita® (39,39 %) s obsahom jódu 200 µg, čo predstavuje 133,33 % RVH (referenčná výživová hodnota).

Zdravotný stav žien a novorodencov po pôrode

Na základe laboratórnych výsledkov, klinických vyšetrení a zhodnotení subjektívnych pocitov žien endokrinológ upravil doterajšiu terapiu u 89,5 % žien z celkového počtu 19 (pacientka č. 4 bola kvôli *abortu* zo štúdie vylúčená). Terapia po pôrode u žien bola pozmenená (viď tabuľka 4).

Vznik ochorenia štítnej žľazy je závislý od genetickej výbavy jedinca, jeho imunologických vlastností, dostatočného príjmu jódu, od expozície antityreoidálnym látkam a ďalších faktorov (Kani-ke a kol., 2017; Persani a kol., 2018). Počas tehotenstva by mala byť liečená každá abnormalita funkcie

štítnej žľazy, zvlášť jej hypofunkcia, nakoľko bol dokázaný priamy súvis poklesu tyroxínu s následným zhoršeným vývojom CNS plodu (Bernal, 2005; Zamrazil, 2015) a skeletálneho systému (Bassett a kol., 2016). Viaceré štúdie dokázali, že deti narodené hypotyreoidným neliečeným ženám majú oproti svojim rovesníkom výrazne nižšie IQ (inteligentný kvocient), problémy s koncentráciou a učením (Smallredge a Ladenson, 2001; Sahay a kol., 2012). Z tohto dôvodu je v súčasnosti medikamentózna terapia odporúčaná už pri subklinickej forme hypotyreózy matky (Jiska, 2012). Tento postup je zvolený najmä kvôli bezpečnému priebehu tehotenstva a pre správny vývoj dieťaťa. V konečnom dôsledku to potvrdila aj nedávna metaanalýza 18 kohortných štúdií, ktorá preukázala, že komplikácie neliečenej subklinickej hypotyreózy sú oproti liečenej vzorke žien mnohonásobne vyššie (Límanová, 2017). K odhaleniu abnormálnej funkcie štítnej žľazy matky, ale aj plodu, prispieva realizácia tehotenského a novorodeneckého skríningu (Lysinová a kol., 2015). Vďaka zavedeniu ich povinnej realizácie je v súčasnosti záchyt hypotyreoidných žien oveľa vyšší ako tomu bolo v minulosti. Skrining teda nemá len pozitívny vplyv na zníženie výskytu intelektuálneho postihnutia detí (Ford a kol., 2014), ale umožňuje skorú diagnostiku ochorenia u žien, a teda aj promptnú a adekvátnu liečbu s cieľom zabrániť následným komplikáciám, ktoré manifestná hypotyreóza so sebou prináša. Výsledkami štúdie sme poukázali na to, že tehotenským skríningom bolo v našom súbore žien odhalených až 45 % nových prípadov ochorenia, z toho u 26,3 % žien bolo potrebné *postpartum* podávanie levotyroxínu.

Podľa údajov z Národného centra zdravotníckych informácií v súčasnosti na Slovensku každoročne klesá počet detí s kongenitálnou hypotyreózou. Pre porovnanie v roku 2012 (pred zavedením skríningu) to bolo až 25 detí, pričom v roku 2017 to boli už len traja novorodenci s vrodenu hypotyreózou (NCZI, 2014; NCZI, 2019). Neonatológovia skriningové testovanie na odhalenie kongenitálnej hypotyreózy na území Slovenskej republiky povinne vykonávajú

od roku 2013 (MZ SR, 2012). V našom súbore pacientok sa nenarodilo ani jedno dieťa s vrodenu hypotyreózou.

ZÁVER

V procese vývoja dieťaťa a bezpečného priebehu tehotenstva zohrávajú kľúčovú úlohu najmä hormóny štítnej žľazy. V štúdii sme sledovali zmeny koncentrácií TSH a fT4 v sére v súbore 20 tehotných žien rôzneho veku v závislosti od trimestra gravidity a od podania substitučnej dávky levotyroxínu, a to pred pôrodom, a hodnotili sme aj zdravotný stav žien a výskyt vrodenej hypotyreózy u novorodencov po pôrode. Farmakoterapeutickú liečbu je u pacientok dôležité zahájiť okamžite pri zistení zvýšenej koncentrácie TSH, zníženej hladiny fT4 a v prípade nálezů protilátok v sére. U každej pacientky je nutné postupovať individuálne a zohľadniť trimester tehotenstva. Výrazne väčší dôraz by mal byť kladený na ich dôslednú edukáciu s cieľom zvýšiť ich adhérenciu a compliance k liečbe. Veľmi významnú úlohu pri záchyť gravidných žien s hypotyreózou zohráva skriningové testovanie tehotných žien gynekológom. Pri poruche štítnej žľazy objavujúcej sa v tehotenstve je vysoké riziko rozvoja permanentnej primárnej hypotyreózy v časovom období päť až desať rokov.

POĎAKOVANIE

Za poskytnutie materiálu vhodného na spracovanie pri tvorbe tejto štúdie ďakujeme MUDr. Lucii Zlatnickej, ktorá pôsobí ako endokrinológ v Nemocnici svätého Jakuba v Bardejove.

ZOZNAM LITERATÚRY

Bassett, J. H. a Williams, G. R.: Role of thyroid hormones in skeletal development and bone maintenance. *Endocr. Rev.*, 2016, 37 (2), 135 – 187.

Bernal, J.: Thyroid hormones and brain development. *Vitam. Horm.*, 2005, 71, 95 – 122.

- Delange, F.: Iodine deficiency in Europe and its consequences: an update. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2002, 29 (Suppl. 2), S404 – S416.
- Delitala, A. P., Capobianco, G., Cherchi, P. L., Dessole, S., Delitala, G.: Thyroid function and thyroid disorders during pregnancy: a review and care pathway. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2019 (2), 299, 327 – 338.
- Ford, G. a La Franchi, S. H.: Screening for congenital hypothyroidism: A worldwide view of strategies. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2014, 28 (2), 175 – 187.
- Jiskra, J.: Choroby štítné žlázy v graviditě [thyroid disease in pregnancy]. *Med. Praxi*, 2012, 9 (5), 233 – 237.
- Khalil, A. B., Salih, B. T., Chinengo, O., Bardies, M. R. D., Turner, A., Abdel Wareth, L. O.: Trimester specific reference ranges for serum TSH and Free T4 among United Arab Emirates pregnant women. *Pract. Lab. Med.*, 2018, 1 – 7.
- Kanike, N., Davis, A., Shekhawat, P. S.: Transient hypothyroidism in the newborn: to treat or not to treat. *Transl. Pediatr.*, 2017, 6 (4), 349 – 358.
- Límanová, Z.: Štítna žláza a infertilita [Thyroid gland and infertility]. *Remedia*, 2017, 27, 88 – 92.
- Lysinová, M., Knapková, M., Dluholucký, S., Králinský, K.: Novorodenecký skrínig v súčasnosti [Newborn screening nowadays]. *Pediatr. Prax*, 2015, 16, 188 – 191.
- MZ SR. *Vestník Ministerstva zdravotníctva SR*. Bratislava: Obzor s. r. o. 2009. 241 – 292.
- MZ SR. *Vestník Ministerstva zdravotníctva SR*. Bratislava: Obzor s. r. o. 2012. 282 – 324.
- Národné centrum zdravotníckych informácií. *Zdravotnícka ročenka Slovenskej republiky 2012*. Bratislava: Národné centrum zdravotníckych informácií, 2014, s. 255.
- Národné centrum zdravotníckych informácií. *Zdravotnícka ročenka Slovenskej republiky 2017*. Bratislava: Národné centrum zdravotníckych informácií, 2019, s. 280.
- Persani, L., Rutale, G., de Filippis, T., Galazzi, E., Muzza, M., Fugazzola, L.: Genetics and management of congenital hypothyroidism. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2018, 32 (4), 387 – 396.
- Sahay, R. K. a Nagesh, V. S.: Hypothyroidism in pregnancy. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2012, 16 (3), 364 – 370.
- Smallridge, R. C. a Ladenson, P. W.: Hypothyroidism in pregnancy: consequences to neonatal health. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, 86, (6), 2349 – 2353.
- Zamrazil, V.: Léčba hormonu štítné žlázy v klinické praxi [Thyroid hormones in clinical practice]. *Interní Med.*, 2015, 17 (4), 165 – 167.
- Zimmermann, M. B.: The effects of iodine deficiency in pregnancy and infancy. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.*, 2012, 26 (Suppl. 1), 108 – 117.



RETROSPEKTÍVNA ANALÝZA TERAPIE U PACIENTOK S HER2 POZITÍVNYM KARCINÓMOM PRSNÍKA

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF THERAPY OF HER2 POSITIVE BREASTS CANCER PATIENTS

Zigová, Martina¹; Vasková, Michaela²

¹Ústav farmakológie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta
Trieda SNP 1, 040 11 Košice

²Katedra farmakológie a toxikológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Komenského 73, 041 81 Košice

Slovenská republika

chripkova.martina@gmail.com

ABSTRAKT

Karcinóm prsníka patrí medzi najčastejšie diagnostikované nádory a najčastejšiu príčinu úmrtia u žien v produktívnom veku. Cílená biologická liečba je novým liečebným postupom pri rôznych nádoroch vrátane karcinómu prsníka. V klinickej praxi sa pri tomto ochorení využívajú monoklonové protilátky ako trastuzumab, pertuzumab, bevacizumab a lapatinib. Na Slovensku je najčastejšie indikovaný trastuzumab a v menšej miere pertuzumab. Cieľom štúdie bola retrospektívna analýza terapie u pacientok s HER2 pozitívnym karcinómom prsníka, u ktorých bola použitá monoklonová protilátka trastuzumab. V rámci sledovaného súboru pacientok sme sa zamerali na výskyt

nežiaducich účinkov a hlavne na incidenciu kardiotoxicity. Pri sledovaní výskytu kardiotoxicity sme hodnotili aj rizikové faktory, ktoré môžu potencovať jej vznik. Podľa klinických štúdií sa percento výskytu kardiotoxicity u pacientok liečených trastuzumabom v monoterapii pohybuje okolo 4 % a v kombinácii s antracyklínmi a cyklofosfamidom sa zvyšuje na 27 %. Výskyt kardiotoxicity bol zaznamenaný v našom súbore v šiestich prípadoch (21,6 %), v ktorých bol trastuzumab použitý v kombinácii s tradičnou chemoterapiou. Vysokú incidenciu kardiotoxicity pripisujeme aj malému počtu pacientok (23) v analyzovanom súbore.

Kľúčové slová: karcinóm prsníka; kardiotoxicita; monoklonové protilátky; trastuzumab

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most frequently diagnosed tumors and the leading causes of death of women of productive age. Targeted biological therapy is a new treatment for various tumors, including breast cancer. In clinical practice, monoclonal antibodies such as trastuzumab, pertuzumab, bevacizumab and lapatinib are used. In Slovakia the most commonly indicated antibody is trastuzumab, and pertuzumab is less often. The aim of the study was to analyze retrospectively the therapy of patients with HER2-positive breast cancer in which the monoclonal antibody trastuzumab was used. Within the monitored group we focused on the occurrence of adverse effects in patients, especially on the incidence of cardiotoxicity. We also evaluated the risk factors that can potentiate the occurrence of cardiotoxicity. Clinical studies showed that cardiotoxicity in patients treated with trastuzumab monotherapy was about 4 % and in combination with anthracyclines and cyclophosphamide it increased to 27 %. The incidence of cardiotoxicity in our group was reported in six cases (21.6 %). In these cases, trastuzumab was used in combination with traditional chemotherapy. We attribute a high incidence of cardiotoxicity to a small number of patients (23) in the analyzed file.

Key words: breast cancer; cardiotoxicity; monoclonal antibodies; trastuzumab

ÚVOD

Zhubné nádory predstavujú závažný sociálny, spoločenský, ale aj ekonomický problém v celosvetovom meradle (Bella, 2012). Výrazný vzostup výskytu karcinómu prsníka sa eviduje od 90. rokov minulého storočia (Ondrušková a kol., 2015). Každoročne sa odhaduje nárast incidencie až o 5 % (Cughlin a Ekwueme, 2009). Incidencia rakoviny prsníka je najvyššia vo veku od 50 do 69

rokov (Davies, 2012). Medzi rizikové faktory vzniku sa radí genetická predispozícia, menopauza, užívanie kontraceptív, fajčenie, obezita a požívanie alkoholu (Špánik, 2007; Bella, 2012; Davies, 2012). V liečbe karcinómu prsníka je cieľom dosiahnuť najvyššiu optimalizáciu podanej terapie, pričom dôraz sa kladie na stanovenie prognostických a prediktívnych faktorov. Štandardy v terapii karcinómu prsníka sa celosvetovo tvoria na základe výsledkov z mnohých klinických štúdií, pričom terapeutický postup je nutné prispôbiť potrebe jednotlivých pacientok, s ohľadom na charakteristiku pacientky a biologickú povahu nádoru (Vertáková, 2011). Terapiu možno rozdeliť na chirurgickú liečbu, rádioterapiu a systémovú terapiu zahŕňajúcu chemoterapiu, hormonálnu liečbu a cielenú molekulárnu biologickú liečbu (Lincová a Farghali, 2007).

Cielená liečba karcinómu prsníka v podobe monoklonových protilátok významne ovplyvnila liečebné výsledky na úrovni adjuvancie, neoadjuvancie či pri liečbe metastatickej choroby. Tento liečebný postup je možné využiť iba v prípade, pokiaľ to dovoľí prítomnosť špecifických receptorov na povrchu nádorov, teda HER2 receptorov (HER2 – human epidermal growth factor receptor 2) (Těšarová, 2013). Monoklonové protilátky sú liečivá využívajúce sa práve na tento typ terapie. HER2 je slabo penetrujúci protoonkogén kódujúci membránový receptor s tyrozín-kinázovou aktivitou a je lokalizovaný na dlhšom ramene chromozómu 17 (Špánik, 2011; Ušáková a Ševčíková, 2012; Furrer a kol., 2015). HER2 sa v normálnom prsnom tkanive podieľa na raste, oprave a rozmnožovaní buniek prsníka (Sandoo a kol., 2014), a teda je základným mediátorom bunkovej proliferácie a diferenciácie vo vyvíjajúcom sa embryu a v dospelých tkanivách (Furrer a kol., 2015). Tento receptor je súčasťou rodiny HER receptorov epidermálneho rastového faktora, ktorá pozostáva zo štyroch izoforiem tyrozín-kinázových receptorov: HER1 (EGFR), HER2/neu (c-erb-2), a HER4 (Scott a kol., 2013; Sandoo a kol., 2014; Furrer a kol., 2015) a ich príbuzných ligandov, vrátane EGF, neuregulínu (NRG1-4), TGF- α , amfiregulínu,

betacelulínu, heparín-viažúceho EGF-like rastového faktora a epiregulínu (Kalous a kol., 2012). HER2 receptor, na rozdiel od ostatných členov rodiny (za normálnych podmienok) nemá žiadny známy ligand, a teda predtým, než dôjde k aktivácii signálnych dráh, tvorí heterodiméry s ostatnými členmi rodiny, ktoré sú schopné intereagovať (Nielsen a kol., 2009; Špánik, 2011; Kalous a kol., 2012). Po vytvorení diméru dochádza ku spusteniu signalizačných kaskád a výsledkom tohto procesu je zvýšenie syntézy DNA v bunkách, ktoré na povrchu bunky exprimujú HER2 proteín (Žúbor, 2013). Mnohé nádory prsníka sa vyznačujú vznikom génovej amplifikácie v géne kódujúcom HER2, čo vyvoláva nadmernú expresiu HER2, teda overexpresiu (Sandoo a kol., 2014). Zvýšenie množstva HER2 v bunke následne podmieňuje zvýšenie tvorby heterodimérov, ktoré sú stabilnejšie, sú dlhšie prítomné na povrchu bunky, teda nedochádza tak často k ich endocytóze (Žúbor, 2013).

Monoklonové protilátky

V našej krajine je na liečbu dospelých pacientov s HER2 pozitívnym metastatickým karcinómom prsníka z monoklonových protilátok najčastejšie indikovaný trastuzumab a v menšej miere pertuzumab.

Pertuzumab

Je to monoklonová protilátka, ktorá sa viaže na extracelulárnu doménu II. receptora HER2 (Petruželka, 2010; Wagnerová a Garanová, 2016).

Mechanizmus účinku: účinkuje dvomi mechanizmami, prvou možnosťou je blokovanie schopnosti HER2 heterodimerizovať s ostatnými členmi rodiny HER, čím zabraňuje signálnej transdukcii. Druhým mechanizmom účinku je sterické blokovanie HER2 dimerizácie s ostatnými HER receptormi (Vora a kol., 2009; Těsařová, 2013; Wagnerová a Garanová, 2016).

Nežiaduce účinky: hnačka, únava, nauzea, zvracanie, rash (Jones a Buzdar, 2009; Petruželka, 2010; Wagnerová a Garanová, 2016) a dysfunkcia ľavej komory srdca (Vora a kol., 2009).

Dávkovanie: pertuzumab je podávaný výlučne v i. v. kombinácii s trastuzumabom v trojtýždňovom režime vo fixnej dávke 840 mg a následne 420 mg ako udržiavacia dávka (Buchler, 2008; Wagnerová a Garanová, 2016).

Trastuzumab

Trastuzumab je rekombinantná humanizovaná monoklonová protilátka typu IgG1 proti receptoru HER2. Táto protilátka sa špecificky viaže na extracelulárnu doménu HER2 proteínu (Lee a kol., 2014). Štúdie dokazujú, že trastuzumab redukuje rekurenciu rakoviny prsníka o 50 % a úmrtnosť o 30 % (Sandoo a kol., 2014).

Mechanizmus účinku: špecifickou väzbou tejto protilátky na HER2 dochádza k inhibícii HER2 signalizácie (Špánik, 2007), teda nastáva inhibícia tvorby v membráne viazaného skráteného fragmentu p95, čoho výsledkom je štiepenie extracelulárnej domény HER2. Navyše trastuzumab inhibuje PI3K (fosfatidylinozitol-3-kináza) dráhu, ktorá je aktivovaná overexpresiou HER2. PI3K spôsobuje translokáciu serín/treonín proteínovej kinázy (AKT), čo má za následok jeho forforyláciu a aktiváciu. Po aktivácii AKT dochádza k fosforylácii ďalších ciest vedúcich k bunkovej proliferácii. Aktivovaný AKT je negatívne regulovaný PTEN (fosfatáza a tenzín homológ, nádorový supresorový gén). Trastuzumab inhibuje PI3K dráhu, znižuje tým fosforyláciu PTEN a AKT defosforyláciu, čím dochádza k smrti bunky (Jones a Buzdar, 2009).

Indikácie: trastuzumab je vhodný na terapiu HER2-pozitívnych pacientok s karcinómom prsníka, v 1. línii v liečbe metastatického ochorenia, adjuvancii aj neoadjuvancii (Lee a kol., 2014).

Nežiaduce účinky: kardiotoxicita (Těsařová, 2012), neutropénia, anémia (Stramská, 2015), intersticiálne pľúcne ochorenia, pneumónia, syndróm dychovej tiesne, hnačky, vracanie, bolesti brucha a nauzea (Špánik, 2011; Buchler a Čejková, 2015).

Dávkovanie: nasycovacia i. v. dávka v týždňovom režime je 4 mg/kg živej hmotnosti a udržiavacia dávka je 2 mg/kg. V trojtýždňovom režime sa nasycovacia

dávka zvyšuje na 8 mg/kg a udržiavacia dosahuje hodnotu 6 mg/kg (Špánik, 2009). Trastuzumab je dostupný aj v subkutánnej forme, ktorá je menej invazívna než intravenózna forma. Aplikácia trvá 5 minút oproti 30 – 90 minútovému i. v. podaniu (Buchler a Čejková, 2015). Dĺžka terapie trastuzumabom je stanovená na jeden rok, avšak stále prebiehajú rôzne štúdie s cieľom stanovenia optimálnej dĺžky liečby (Vertáková, 2011; Kakalejčík, 2012).

Trastuzumab-maytasin (T-DM1)

T-DM1 je konjugát monoklonovej protilátky, trastuzumabu, na ktorý je naviazané antimikrotubulárne pôsobiace cytostatikum maytasin (DM1). DM1 bol formulovaný za účelom zníženia toxicity trastuzumabu, kým dosiahne cieľové miesto (Jones a Buzdar, 2009; Fabiánová, 2012).

Mechanizmus účinku: účinkuje blokádou HER2 signalizácie a zároveň inkorporuje cytostatickú molekulu maytazínu do HER2-pozitívnej bunky. T-DM1 sa viaže na povrch bunky cez HER2 receptor, čím aktivuje imunitné mechanizmy a dochádza k likvidácii malígnych buniek. Po naviazaní dochádza k endocytóze daného komplexu a k jeho degradácii v lyzozómoch, kde sa uvoľňuje aktívny metabolit maytazínu (Petruželka, 2010; Fabiánová, 2012; Palacka, 2012).

Nežiaduce účinky: neutropénia (Vora a kol., 2009), trombocytopenia, zvýšenie pečenej transamináz, hnačka, vracanie (Palacka, 2012; Stramská, 2015).

Dávkovanie: doporučená dávka T-DM1 je 3,6 mg/kg telesnej hmotnosti podávaná formou intravenózne infúzie každé 3 týždne do progresie alebo neprijateľnej toxicity (Stramská, 2015; Buchler a Čejková, 2015).

Kardiotoxicity trastuzumabu

Mechanizmus vzniku kardiotoxicity u pacientok liečených trastuzumabom nie je doteraz celkom známy (Těsařová, 2012; Mladosičová a Rečková, 2013). S najväčšou pravdepodobnosťou súvisí s mechanizmom jeho protinádorového účinku sprostredkovaného receptorom HER2/neu. Taktiež

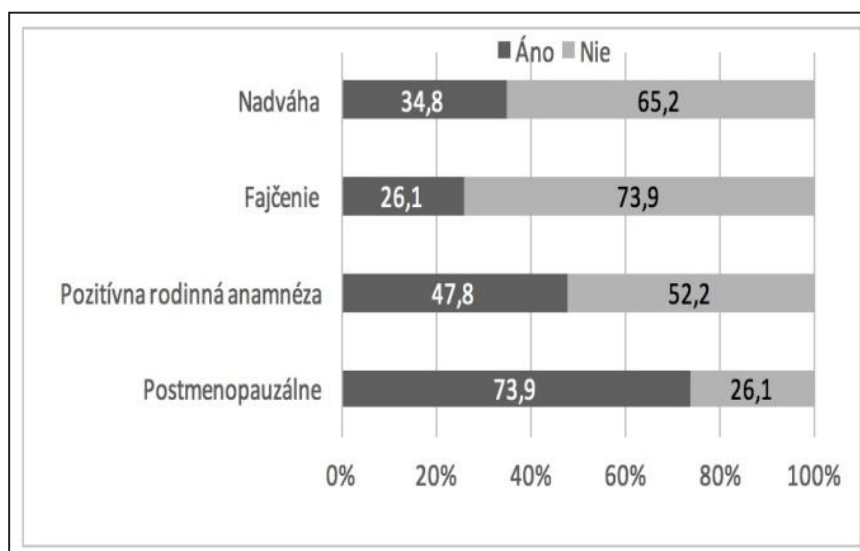
je známy aj fakt, že v krvi pacientov s kardiálnymi poruchami sa zvyšujú koncentrácie solubilného HER2 a priamoúmerne korelujú s hodnotou ejekčnej frakcie ľavej komory (EF_{LK}) (Těsařová, 2012). Predpokladá sa zásah do HER4 a HER2 kaskády, pričom dochádza k nadprodukcii reaktívnych foriem kyslíka, ktoré eventuálne spôsobujú apoptózu kardiomyocytov (Sandoo a kol., 2014). Medzi najčastejšie pozorované klinické prejavy kardiotoxicity patrí: ľavokomorová dysfunkcia, artériová hypertenzia, akútny koronárny syndróm, zlyhávanie srdca až náhla kardiálna smrť (Mladosičová a Rečková, 2013).

Cieľom tejto štúdie bola retrospektívna analýza terapie u pacientok s HER2 pozitívnym karcinómom prsníka, u ktorých bola použitá monoklonová protilátka trastuzumab. V rámci sledovaného súboru pacientok sme sa zamerali na výskyt nežiaducich účinkov a hlavne na incidenciu kardiotoxicity. Pri sledovaní výskytu kardiotoxicity sme hodnotili aj rizikové faktory, ktoré môžu potencovať jej vznik.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vykonalí sme retrospektívnu analýzu terapie pacientok s HER2 pozitívnym karcinómom prsníka, u ktorých bola použitá monoklonová protilátka trastuzumab. Pacientky boli liečené vo Východoslovenskom onkologickom ústave v Košiciach v období od augusta 2008 do decembra 2016. K dispozícii sme mali zdravotné dokumentácie pacientok obsahujúce ich anamnézy, záznamy z každej návštevy klinického onkológa, aplikácie liečiv, všetky vyšetrenia podstúpené počas liečby od onkológov, rádiológov, neurológov, internistov a kardiológov a dekurzy počas hospitalizácie. Výskumný protokol bol schválený lokálnou etickou komisiou (EK/1/11/2016) a každá pacientka podpísala informovaný súhlas so štúdiou. Konečný súbor tvorilo 23 pacientok, ktoré spĺňali nasledujúce kritériá: imunohistochemickým vyšetrením zistená HER2 pozitivita karcinómu v prsníku, zahájenie terapie monoklonovými protilátkami HER2

Obr. 1: Percentuálne vyjadrenie rizikových faktorov vzniku karcinómu prsníka v analyzovanom súbore pacientok



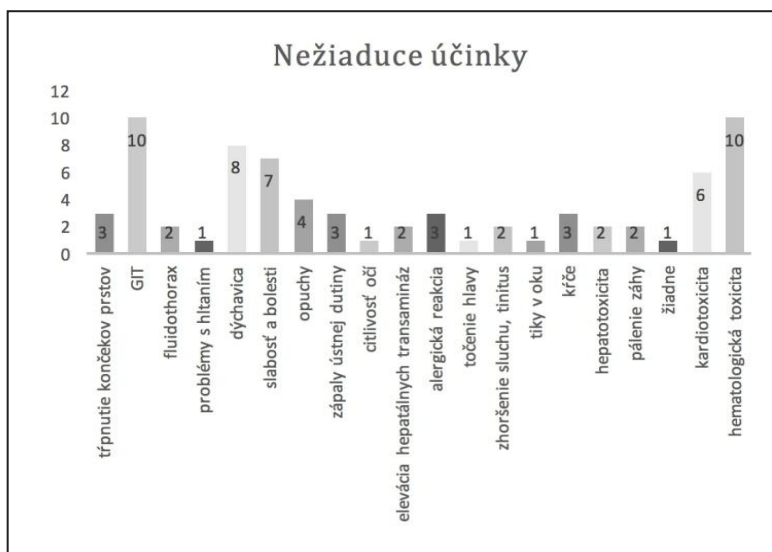
pozitívneho nádoru prsníka, dostatok klinických údajov potrebných pri hodnotení terapie monoklonovými protilátkami. V rámci sledovaného súboru sme sa zamerali na výskyt nežiaducich účinkov počas terapie a hlavne na výskyt kardiotoxicity. Pri sledovaní výskytu kardiotoxicity sme hodnotili aj rizikové faktory, ktoré môžu potencovať jej vznik.

V liečbe karcinómu prsníka bol použitý trastuzumab u všetkých pacientok v analyzovanom súbore, a to buď v kombinácii s inými cytostatikami, alebo v kombinácii s pertuzumabom a docetaxelom a v 5 prípadoch aj v monoterapii. Vzhľadom na to, že niektoré pacientky boli liečené dlhšiu dobu (nakolko došlo k progresii ochorenia alebo k recidíve), bolo v niektorých prípadoch zahájených viacero rozdielnych liečebných cyklov. Protinádorová liečba týmito liečivami bola nasadená u 14 (60,1 %) pacientok adjuvantne, u 5 (21,7 %) pacientok neoadjuvantne, zvyšné pacientky začali terapiu neoadjuvantne, ale neskôr im museli prsník operovať alebo odstrániť, preto pokračovali v adjuvantnej terapii. Dĺžka terapie vo väčšine prípadov (65,2 %) nepresahovala 1 rok, avšak pokiaľ došlo k recidíve ochorenia, bolo nutné terapiu znova nasadiť.

V sledovanom súbore bola najmladšia pacientka vo veku 28 rokov a najstaršia 77 rokov, pričom vekový medián bol 56 rokov. U týchto pacientok došlo k rozvoju nádorového ochorenia v priemernom veku 57 rokov (vekové rozpätie 26 – 75 rokov). Vzhľadom na možné rizikové faktory, ktoré môžu ovplyvniť vznik nádoru prsníka, sme sledovali, či ide o ženu v reprodukčnom období života, alebo postmenopauzálnu pacientku, genetickú predispozíciu a životný štýl, konkrétne fajčenie a nadváhu (viď obr. 1). Pozitívnu rodinnú anamnézu uvádzala takmer polovica súboru, a teda do budúcnosti je možné predpokladať vznik tohto ochorenia u pacientok, u ktorých sa už v rodine objavil nejaký typ karcinómu prsníka. Z toho hľadiska je vhodné odporúčať častejšie a dôkladnejšie sledovanie týchto pacientok. U približne tretiny z nich sa vyskytovala obezita a fajčenie.

Pri celkovom hodnotení nežiaducich účinkov (NÚ) môžeme povedať, že v 13 prípadoch (57 %) išlo o závažné prejavy, ktoré vyžadovali sledovanie stavu pacientky, zmenu terapie či nevyhnutnú hospitalizáciu. Ďalších 9 pacientok (39 %) bolo liečených bez výrazných NÚ, aj keď pacientky hlásili ťažkosti a len u jednej pacientky (4 %) prebehla

Obr. 2: Výskyt nežiaducich účinkov počas protinádorovej terapie v analyzovanom súbore pacientok



celá liečba bez akýchkoľvek NÚ. Ako najčastejšie nežiaduce účinky terapie sme určili hematologickú toxicitu (10 pacientok) a GIT toxicitu (10 pacientok). Gastrointestinálne komplikácie sa prejavovali nauzeou, vomitom, hnačkami alebo obštipáciami či meteorizmom a z toho u jednej pacientky sa vyskytlo krvácanie do GIT, a tzv. meléna (čierna stolica s prímiesou krvi). Okrem GIT toxicity sa viackrát objavovala slabosť a bolesti (30,4 %). Tieto nežiaduce účinky však nie sú špecifické a nie je vylúčené ani zapríčinenie chemoterapeutikami použitými v kombinácii s monoklonovými protilátkami, nakoľko ani jedna pacientka s prejavmi GIT toxicity nebola na monoterapii trastuzumabom. Medzi ďalšie nešpecifické nežiaduce účinky, ktoré sa však vyskytovali menej často, sme zaradili opuchy tváre alebo končatín (17,4 %), tŕpnutie končiek prstov (13,1 %), zápaly v ústnej dutine (13,1 %), najmä vznik áft, stomatitídy a pálenia v ústach, problémy s prehltaním (4,3 %), citlivosť očí (4,3 %), tiky v oku (4,3 %), kŕče (13,1 %), hepatotoxicitu (8,7 %), eleváciu hepatálnych transamináz (8,7 %), zhoršenie sluchu a tinitus (8,7 %), pálenie záhy (8,7 %), točenie hlavy (4,3 %) a alergické reakcie, najmä žihľavku a svrbenie (13,1%). Výskyt rôznych NÚ,

ktoré sa objavili počas terapie aj s počtom pacientok zobrazuje obr. 2.

Medzi najzávažnejšie a najčastejšie nežiaduce reakcie doteraz hlásené v súvislosti s používaním trastuzumabu patria srdcová dysfunkcia (Mladosičová a Rečková, 2013), reakcie súvisiace s infúziou, hematotoxicita (najmä neutropénia) (Stramská, 2015), infekcie a pľúcne nežiaduce reakcie (Špánik, 2011). V analyzovanom súbore sa hematologická toxicita objavila 10-krát (43,5 %). Vekový medián pacientok, u ktorých bola popísaná daná toxicita, bol 60 rokov. K rozvoju leukocytózy došlo u troch žien (13 %), šesť pacientok (26,1 %) trpelo leukopéniou, konkrétne išlo o neutropéniu a u jednej ženy bola definovaná anémia (4,3 %). Protinádorová terapia, ktorá bola podávaná pacientkam počas vzniku hematologickej toxicity, zahŕňala v každom prípade trastuzumab, ktorý bol kombinovaný s rôznymi liečivami, najčastejšie s taxánmi (60 %), z toho štyrikrát s docetaxelom (40 %) a dvakrát s paklitaxelom (20 %). Ďalšie aplikované liečivá boli navelbin (20 %) a FEC (20 %). V jednom prípade nastala toxicita v kombinácii trastuzumabu s pertuzumabom a raz v monoterapii trastuzumabom. Neutropénia sa prejavila v 60 % prípadov, a teda

u 26,1 % pacientok z celého súboru. Štúdia Gori a kol. (2004) zaznamenáva nižší výskyt leukopénie (4 %) a anémie (8 %) u pacientok liečených kombináciou paklitaxelu a trastuzumabu s predchádzajúcim použitím antracyklínov (Gori a kol., 2004). Výsledok vysokej incidencie prejavov hematotoxicity v našom súbore pripisujeme malému počtu pacientok. Podľa štúdie Slamon a kol. (2001) pridanie trastuzumabu do kombinácie s antracyklínmi a cyklofosfamidom zvýšilo výskyt leukopénie u pacientok z 33 % na 52 %. Liečebná kombinácia paclitaxel + trastuzumab zvýšila výskyt leukopénie zo 17 % na 24 % v porovnaní s liečbou len samotným paklitaxelom (Slamon a kol., 2001).

Trastuzumab zlepšuje celkové prežívanie u pacientok s karcinómom prsníka, no taktiež zvyšuje riziko vzniku kardiotoxicity. Incidencia kardiotoxicity sa u pacientok liečených trastuzumabom v monoterapii pohybuje okolo 4 % a v kombinácii s antracyklínmi a cyklofosfamidom sa zvyšuje na 27 % (Keefe, 2002; Russell a kol., 2010).

Výskyt kardiotoxicity bol v našom súbore zaznamenaný v šiestich prípadoch. V porovnaní s literatúrou, kde Pondé a kol. (2016) uvádzajú prejavy KVS toxicity v 29,4 % súbore, u nás bolo toto číslo o niečo nižšie, a to 21,6 % pacientok. Vysokú incidenciu kardiotoxicity pripisujeme malému počtu pacientok. Pacientky s prejavmi kardiotoxicity sme očíslovali číslami od 1 do 6. Pacientka 2 a 5 boli premenopauzálné, vo veku 28 (pacientka 5) a 40 rokov (pacientka 2). Ostatné boli postmenopauzálné vo veku 60 (pacientka 1), 64 (pacientka 6), 74 (pacientka 4) a 76 (pacientka 3) rokov. Vekový medián pacientok s kardiotoxicitou bol 57 rokov. V inej štúdii u viac ako 9 500 pacientok s karcinómom prsníka, ktoré boli vo veku najmenej 66 rokov (s priemerným vekom 71 rokov), sa zistila vyššia incidencia chronického srdcového zlyhávania u pacientok liečených trastuzumabom (29,4 %) v porovnaní s pacientkami, ktoré pri liečbe trastuzumab nedostávali (18,9 %) (Chavez-MacGregor a kol., 2013).

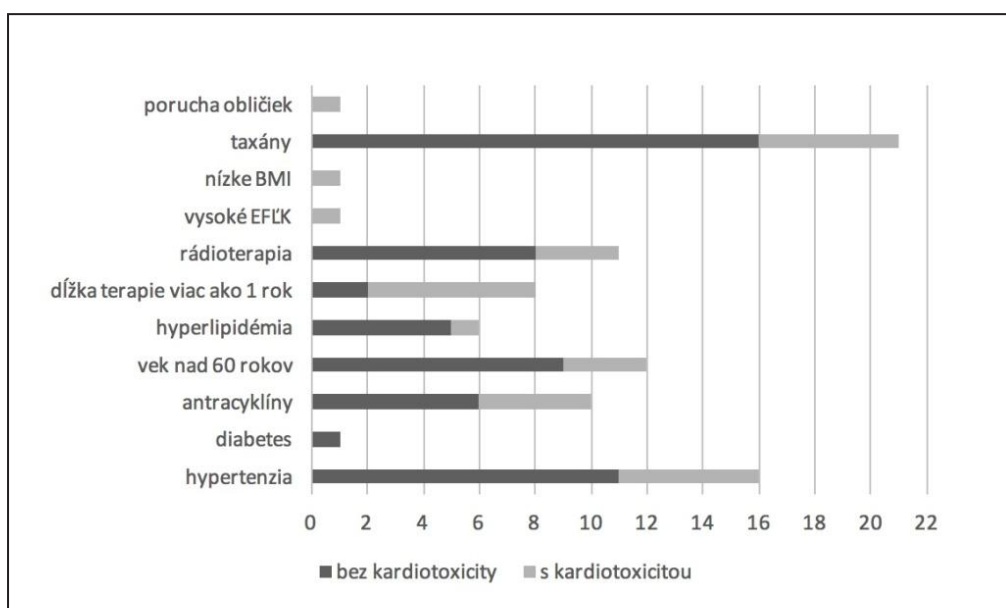
Recidíva ochorenia sa v nami sledovanom súbore prejavila v piatich prípadoch (83,3 %) (pacientka 2,

3, 4, 5, 6), pričom ku kardiotoxickému účinku došlo v troch prípadoch počas prvej liečby (pacientka 2, 4, 5) a v dvoch prípadoch až po relapse ochorenia (pacientka 3 a 6). Pacientky 4 a 5 (30 %) neprežili, avšak za príčinu ich smrti sa nedá označiť práve kardiotoxicita.

V prípade piatich pacientok (2, 3, 4, 5, 6) sa prejavil kardiotoxický účinok poklesom EFLK. Pre zdravé srdce je charakterizovaná hodnota EFLK od 55 – 60 %. U štyroch pacientok bolo zaznamenané zníženie až na 30 – 35 %, čo predstavuje vážne riziko náhlej kardiálnej smrti, avšak iba pacientka 4 bola hospitalizovaná z dôvodu poklesu EFLK. Jawa a kol. (2016) vo svojom výskume zaznamenali pokles EFLK u 10 % pacientok. V našom súbore sa kardiotoxicita prejavila výrazným znížením EFLK u 17,3 % pacientok. Iba u pacientky 5 došlo k miernemu zníženiu EFLK na 45 – 48 %. V jednom prípade nedošlo k zníženiu hodnoty EFLK (pacientka 1), no aj napriek tomu bola zaznamenaná zhoršená funkcia srdca. Podľa lekárskeho správ mala pacientka pred terapiou trastuzumabom kardiálny nález v medziach normy, avšak počas terapie sme evidovali vznik poruchy plnenia LK, malú perikardálnu efúziu, naznačenú hyperkinetickú cirkuláciu a hypertrofiu septa. V danom prípade sa však tiež neupravovala protinádorová terapia.

Incidencia prejavov kardiotoxicity je podmienená stavom pacientky, predchádzajúcou chemoterapiou, ďalšími súčasne prítomnými ochoreniami srdca a vekom. Výskyt kardiotoxicity v prvých klinických štúdiách závisel od toho, či pacientky dostávali trastuzumab v monoterapii, či v kombinácii s paclitaxelom alebo antracyklínmi a cyklofosfamidom (3 – 7 %, 13 %, 27 %) (Russell, 2010). Na hodnotenie kardiotoxického účinku je teda potrebné poznať aj terapiu, ktorá bola zavedená pred a počas jej vzniku. V prípade pacientky 5 bola kardiotoxicita evidovaná v monoterapii trastuzumabom, avšak po predchádzajúcej kombinovanej liečbe trastuzumabu s FEC, u pacientky 2 nastal toxický účinok v terapii trastuzumab + docetaxel + FEC, v prípade pacientky 3 išlo o kombináciu trastuzumab + navelbin (s

Obr. 3: Porovnanie rizikových faktorov v analyzovanom súbore u pacientok s kardiotoxicitou a bez kardiotoxicity



predchádzajúcou liečbou paklitaxel + trastuzumab, monoterapia trastuzumabom, trastuzumab + kapecitabin), u pacientky 1 vznikla kardiotoxicita počas liečby s paklitaxelom a u pacientky 4 aj s AC, a v poslednom prípade (pacientka 6) išlo už o spomínaný trastuzumab s pertuzumabom a docetaxelom (s predchádzajúcou terapiou FEC). Z uvedeného je možné si všimnúť, že liečba monoklonovými protilátkami v kombinácii s taxánmi (kedy došlo ku kardiotoxicite) bola nasadená v štyroch prípadoch (66,6 %). V jednom prípade boli taxány aplikované v predchádzajúcej terapii. Antracyklíny, u ktorých je dokázaný kardiotoxický účinok, boli využité v štyroch z týchto prípadov. Podľa klinickej štúdie Onitilo a kol. (2014) sa kardiotoxicita objavila v monoterapii trastuzumabom v 8 %, avšak v aplikácii spolu s antracyklínmi sa incidencia zvýšila až na 30 %. Súčasná štúdia taktiež hodnotia vzťah medzi kardiotoxicitou a kumulatívnou dávkou antracyklínov. Realizovaný bol výskum, na základe ktorého bolo konštatované, že pri dávke doxorubicínu 400 mg/m² sa vyskytol KVS nežiaduci účinok v 3 %, pri dávke 550 mg/m² v 7 % a až v 18 % pri aplikácii kumulatívnej dávky

700 mg/m² (Guo a Wong, 2014). V prípade epirubicínu je kritická kumulatívna dávka nad 500 mg/m², pričom pri 600 mg/m² bola kardiotoxicita evidovaná v 35 % oproti 9 % bez aplikácie epirubicínu (Onitilo a kol., 2014). Pri našom hodnotení súboru sa kardiotoxicita vyskytla u 4 pacientok, ktoré dostávali aj antracyklíny, čo predstavuje 17,4 % z celej vzorky. Antracyklíny však boli podané aj 6 pacientkam (26,1 %), u ktorých sa KVS nežiaduci účinok neprejavil. Kumulatívne dávky neprekročili vyššie popísané hranice toxicity ani raz. Kombinovaná terapia s antracyklínmi sa v tejto vzorke neprejavila ako rizikový faktor, avšak tento výsledok pripisujeme skôr malému súboru pacientok, ktorý sme hodnotili.

Medzi ďalšie faktory, ktoré sme si všimli pri kardiotoxicite, patrili prediktory, ktoré podľa rôznych výskumov môžu zvyšovať riziko jej vzniku. Do dnešnej doby boli skúmané nasledovné rizikové faktory: vysoký vek (Guo a Wong, 2014; Onitilo a kol., 2014; Jawa a kol., 2016), hypertenzia (Guo a Wong, 2014; Jawa a kol., 2016; Yoon a kol., 2016), diabetes mellitus (Jawa a kol., 2016), poruchy obličiek (Onitilo a kol., 2014), hyperlipidémia (Pondé a kol., 2016), dĺžka terapie viac ako rok

(Onitilo a kol., 2014; Pondé a kol., 2016), kombinácia s antracyklínmi (Onitilo a kol., 2014; Guo a Wong, 2014), taxánmi (Yoon a kol., 2016), rádioterapia (Jawa a kol., 2016), nízke EFLK alebo vysoké EFLK (Onitilo a kol., 2014), nízke BMI (Yoon a kol., 2016). Výskyt týchto rizikových faktorov sme hodnotili u pacientok s prejavmi kardiotoxicity a aj bez prejavov kardiotoxicity (viď obr. 3). Z daných ukazovateľov sme spočítali, koľko faktorov mali jednotlivé pacientky s kardiotoxicitou, ale aj bez kardiotoxicity. U žien s týmto nežiaducim účinkom sa vyskytovalo 4 – 7 prediktorov, pričom priemerná hodnota bola 5, a u pacientok bez kardiotoxicity 1 – 7 prediktorov, teda priemerná hodnota bola 3,5. Sledovať prediktory je dôležité, pretože pacientky s ich vyšším počtom a s kombináciou viacerých faktorov sú viac ohrozené vznikom kardiotoxicity. V našom súbore sa z týchto prediktorov potvrdila najmä dĺžka terapie, ktorá presahovala 1 rok u všetkých pacientok s kardiotoxicitou, a u pacientok bez kardiotoxicity iba 2-krát. Z toho vyplýva, že v 75 %, kedy bola terapia dlhšia ako 1 rok, došlo aj ku KVS toxicite. Daný rizikový faktor bol klinicky hodnotený v štúdií HERA, kde bola incidencia kardiotoxicity vyššia v prípade podávania trastuzumabu počas dvoch rokov oproti jednému roku. Okrem toho bolo zistené, že dlhšia doba aplikácie liečiva nemá vplyv na klinický benefit (Pondé a kol., 2016). V prípade pacientok, ktoré sme sledovali, však bola doba expozície trastuzumabom vyššia aj z dôvodu recidívy ochorenia, ku ktorej došlo až u piatich pacientok. Vysoké riziko vzniku kardiotoxicity hrozí pri kombinácii trastuzumabu s antracyklínmi, ktoré už samy spôsobujú KVS poruchy (Onitilo a kol., 2014).

ZÁVER

Cielená biologická liečba trastuzumabom je dôležitou súčasťou terapeutického režimu pre mnoho pacientok s HER2 pozitívnym karcinómom prsníka a nepochybne má za následok významné zlepšenie prognózy HER2 pozitívnych karcinómov prsníka. Veľmi dôležité je teda zhodnotenie benefitu liečby

vzhľadom na možné riziká. Aj z toho dôvodu je veľmi prínosné poznať prediktory, ktoré môžu vyvolávať vznik nežiaducich účinkov, najmä kardiotoxicitu. Pochopenie rizikových faktorov pre kardiotoxicitu indukovanú trastuzumabom a vhodné monitorovanie pacientok počas liečby umožňuje jeho bezpečné a účinné použitie.

ZOZNAM LITERATÚRY

- Bella, V.: Karcinóm prsníka u starších žien [Breast cancer in older women]. *Onkol.*, 2012, 7 (5), 298 – 301.
- Büchler, T.: Biologická liečba karcinomu prsu [Biological therapy of breast cancer]. *Remedia*, 2008, 18 (3), 204 – 211.
- Büchler, T. a Čejková, J.: Přehled biologické léčby HER2-pozitivního metastatického karcinomu prsu [Overview of biological therapy for HER2-positive metastatic breast cancer]. *Klin. Farmakol. a Farm.*, 2015, 29 (1), 8 – 12.
- Coughlin, S. S. a Ekwueme, D. U.: Breast cancer as a global health concern. *Canc. Epid.*, 2009, 33 (5), 315 – 318.
- Davies, L. E.: Breast Cancer. *Medic.*, 2012, 40, 5 – 9.
- Fabiánová, J.: Trastuzumab emtanzín v liečbe pokročilého karcinómu prsníka – klinické skúšanie EMILIA [Trastuzumab emtansine in therapy of advanced breast cancer – EMILIA clinical trial]. *Karc. prsníka: novinky v liečbe*, 2012, 1, 102 – 103.
- Furrer, D., Sanschagrin, F., Jacob, S., Diorio, C.: Advantages and disadvantages of technologies for HER2 testing in breast cancer specimens. *Amer. J. of Clin. Pathol.*, 2015, 144 (5), 686 – 703.
- Gori, S., Colozza, M., Mosconi, A. M., Franceschi, E., Basurto, C., Cherubini, R., Sidoni, A., Rulli, A., Bisacci, C., De Angelis, V., Crinò, L., Tonato, M.: Phase II study of weekly paclitaxel and trastuzumab in anthracycline- and taxane-pretreated patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer.*, 2004, 90 (1), 36 – 40.

- Guo, S. a Wong, S.: Cardiovascular toxicities from systemic breast cancer therapy. *Front. in Oncol.*, 2014, 4, 1 – 16.
- Chavez-MacGregor, M., Zhang, N., Buchholz, T. A., Zhang, Y., Niu, J., Elting, L., Smith, B. D., Hortobagyi, G. N., Giordano, S. H.: Trastuzumab-related cardiotoxicity among older patients with breast cancer. *J Clin Oncol.*, 2013, 31 (33), 4222 – 4228.
- Jawa, Z., Perez, R. M., Garlie, L., Singh, M., Qanar, R., Khandheria, B. K., Jahangir, A., Shi, Y.: Risk factors of trastuzumab-induced cardiotoxicity in breast cancer. *Medic.*, 2016, 95 (44), 101 – 107.
- Jones, K. L. a Buzdar, A. U.: Evolving novel anti-HER2 strategies. *Lanc. Oncol.*, 2009, 10 (12), 1179 – 1187.
- Kakalejčík, M.: Komentár k štúdii: Adjuvantná terapia trastuzumabom znižuje riziko lokoregionálnej recidívy u pacientok po prsníku zachovávaným výkone [Comment to the study: Adjuvant therapy with transtuzumab lowers the risk of locoregional recurrence in patients after breast-conserving surgery]. *Karcinóm prsníka: novinky v liečbe*, 2012, 1, 8.
- Kalous, O., Conklin, D., Desai, A. J., O'Brien, N. A., Ginther, Ch., Anderson, L., Cohen, D. J., Britten, C. D., Taylor, I., Christensen, J. G., Slamon, D. J., Finn, R. S.: Dacomitinib (PF-00299804), an irreversible pan-HER inhibitor, inhibits proliferation of HER2-amplified breast cancer cell lines resistant to trastuzumab and lapatinib. *Molec. Canc. Therap.*, 2012, 11, 1978 – 1988.
- Keefe, D. L.: Trastuzumab-associated cardiotoxicity. *Cancer*, 2002, 95 (7), 1592 – 600.
- Lee, H. J., Seo, A. N., Kim, E. J., Jang, M. H., Suh, K. J., Ryu, H. S., Kim, Y. J., Kim, J. H., Im, S. A., Gong, G., Jung, K. H., Park, I. A., Park, S. Y.: HER2 Heterogeneity affects trastuzumab responses and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Amer. J. of Clin. Pathol.*, 2014, 142 (6), 755 – 766.
- Lincová, D. a Farghali, H.: *Základní a aplikovaná farmakologie* [Basic and applied pharmacology]. 2. vyd. Praha: Galén 2007, 672 s.
- Mladosičová, B. a Rečková, M.: Kardiotoxicita cielenej liečby nádorov [Cardiotoxicity of targeted tumor treatment]. *Onkol.*, 2013, 8, 10 – 14.
- Nielsen, D. L., Andersson, M., Kamby, C.: HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Canc. Treat. Rev.*, 2009, 335, 121 – 136.
- Ondrušová, M., Mardiak, J., Pšenková, M.: Vybrané ukazovatele epidemiológie karcinómu prsníka na Slovensku [Selected trends in breast cancer epidemiology in Slovakia]. *Onkol.*, 2015, 10 (4), 210 – 213.
- Onitilo, A., Angel, J., Stankowski, V.: Cardiovascular toxicity associated with adjuvant trastuzumab therapy: prevalence, patient characteristics, and risk factors. *Therap. Adv. in Drug Saf.*, 2014, 5 (4), 154 – 166.
- Palacka, P.: Trastuzumab-emtazín v liečbe pacientok s HER2-pozitívnym metastatickým karcinómom prsníka [Trastuzumab-emasine in treatment of patients with HER2-positive metastatic breast cancer]. *Karcinóm prsníka: novinky v liečbe*, 2012, 1, 84 – 86.
- Petruželka, L.: Perspektivy v léčbě HER2-pozitivních karcinomů prsu. Biol. léčba HER2/neu-poz. solid. nádorů. *Farmakoter.*, 2010, 6, 37 – 40.
- Pondé, N., Lambertini, M., Azambuja, E.: Twenty years of anti-HER2 therapy-associated cardiotoxicity. *ESMO Open-Canc. Horiz.*, 2016, 1 (4), 1 – 14.
- Russell, S. D., Blackwell, K. L., Lawrence, J., Pippen, J. E. Jr., Roe, M. T., Wood, F., Paton, V., Holmgren, E., Mahaffey, K. W.: Independent adjudication of symptomatic heart failure with the use of doxorubicin and cyclophosphamide followed by trastuzumab adjuvant therapy: a combined review of cardiac data from the National Surgical Adjuvant breast and Bowel Project B-31 and the North Central Cancer Treatment Group N9831 clinical trials. *J. Clin. Oncol.*, 2010, 28 (21), 3416 – 3421.
- Sandoo, A., Kitas, G. D., Carmichael, A.

R.: Endothelial dysfunction as a determinant of trastuzumab-mediated cardiotoxicity in patients with breast cancer. *Anticanc. Res.*, 2014, 34 (3), 1147 – 1152.

Scott, J. M., Lakoski, S., Mackey, J. R., Douglas, P. S., Haykowsky, M. J., Jones, L. W.: The potential role of aerobic exercise to modulate cardiotoxicity of molecularly targeted Cancer therapeutics. *The Oncologist.*, 2013, 18 (2), 221 – 231.

Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., Norton, L.: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.*, 2001, 344 (11), 783 – 792.

Stramská, D.: Primární výsledky studie MARIANNE – randomizované studia fáze III hodnotící trastuzumab emtasin ± pertuzumab vs. Trastuzumab + taxan, v 1. linii léčby HER2 pozitivního metastazujícího karcinomu prsu [Primary results of MARIANNE study – phase III, a randomized study evaluating trastuzumab emtasine ± pertuzumab vs. trastuzumab + taxan in 1st. line of HER2-positive metastatic breast cancer treatment]. *Breast Canc. News*, 2015, 5, 9 – 10.

Špáňik, S.: Karcinóm prsníka [Breast cancer]. *Edukafarm Medinews*, 2007, 5 (3), 144 – 145.

Špáňik, S.: Trastuzumab [Trastuzumab]. *Farmakoter.*, 2011, 1 (1), 46 – 54.

Těšařová, P.: Novinky v anti-HER2 cílené léčbě u karcinomu prsu [Advances in anti-HER2 targeted therapy of breast cancer]. *Farmakoter.*, 2013, 3, 26 – 30.

Těšařová, P.: Trastuzumab a poškození srdce [Trastuzumab and heart damage]. *Farmakoter.*, 2012, 2, 39 – 43.

Ušáková, V. a Ševčíková, K.: Liečba HER2-pozitívneho metastatického karcinómu žalúdka [Treatment of HER2-positive metastatic gastric cancer]. *Farmakoter.*, 2012, 2, 19 – 22.

Vertáková Krakovská, B.: Neoadjuvantná a adjuvantná liečba HER2 pozitívneho karcinómu prsníka [Neoadjuvant and adjuvant therapy of HER2-positive breast cancer]. *Onkol.*, 2011, 6 (Suppl. 1), 32 – 34.

Vora, T., Azambuja, E., Awada, A., Piccart, M.: Novel therapeutics in breast cancer – Looking to the future. *Upd. on Canc. Therap.*, 2009, 3 (4), 189 – 205.

Wagnerová, M. a Garanová, H.: Prvá línia štandardnej liečby metastatického karcinómu prsníka [1st line of standard metastatic breast cancer therapy]. *Prague ONCO J.*, 2016, 25 – 32.

Yoon, H. J., Kim, K. H., Kim, J. Y., Park, H. J., Cho, J. Y., Hong, Y. J., Park, H. W., Kim, J. H., Ahn, Y., Jeong, M. H., Cho, J. G., Park, J. C.: Chemotherapy-induced left ventricular dysfunction in patients with breast cancer. *J. Breast Cancer.*, 2016, 19 (4), 402 – 409.

Žúbor, P.: *Karcinóm prsníka, etiopatogenetické aspekty* [Breast cancer, etiopathogenetic aspects]. 1. vyd. Martin: Osveta, 2013, 268 s.

POKYNY PRE AUTOROV

ZAMERANIE ČASOPISU

Folia Pharmaceutica Cassoviensia je vedecký časopis založený v roku 2019 a vydávaný Univerzitou veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, SR. Časopis je vydávaný štvrťročne a uverejňuje pôvodné štúdie prinášajúce najnovšie poznatky z farmaceutickej a biomedicínskej oblasti, prehľadové články a kazuistiky z lekárenskej a z klinickej praxe. Okrem toho sa v časopise publikujú aj krátke oznámenia zamerané na rýchle uverejnenie poznatkov o aktuálnych vedeckých problémoch a objavoch vo farmácii a medicíne. Časopis neuverejňuje správy o vedeckých podujatiach a redakciou nevyžiadané recenzie.

Autori sú zodpovední za originalitu zaslaných príspevkov, správnosť ich obsahu a za to, že predkladaná práca alebo jej časti neboli publikované alebo zaslané na publikovanie inde.

Autori zasielajú príspevky elektronicky vo formáte textového procesora MS Word alebo vo formáte RTF. O zaradení príspevkov do časopisu rozhoduje redakčná rada na základe posudkov aspoň dvoch anonymných recenzentov. Príspevky schválené na publikovanie sa zasielajú autorovi spolu s recenznými posudkami na prípadné doplnenie alebo prepracovanie. Autor vráti redakcii upravený rukopis a pripojí písomné stanovisko k návrhom a pripomienkam recenzentov. Rozhodnutie redakčnej rady o prijatí alebo zamietnutí príspevku je konečné.

Za uverejnenie článku v časopise sa nevyžadujú žiadne poplatky.

VŠEOBECNÉ ZÁSADY

Príspevky sa uverejňujú v slovenskom, českom alebo anglickom jazyku. Ak je príspevok písaný v

inom ako anglickom jazyku, vyžaduje sa názov práce, abstrakt a kľúčové slová v angličtine.

Kompletný text rukopisu vrátane fotografií, obrázkov, tabuliek a grafov sa zasiela v elektronickej forme na nasledovnú adresu: **folia.pharma@uvlf.sk**. Ak rukopis nespĺňa pokyny pre autorov, redakčná rada si vyhradzuje právo vrátiť rukopis autorom pred jeho posúdením recenzentmi.

Pri písaní príspevku (včítane grafov, tabuliek a pod.) je potrebné zachovávať jednotný štýl a formát práce (Times New Roman, veľkosť písma 12 bodov, riadkovanie 1,5, okraje 2,5 cm, zarovnanie podľa okrajov).

Pri zasielaní rukopisu autori pripájajú prehlásenie, že ich článok je pôvodný, nebol publikovaný ani zaslaný na publikáciu inde.

Ak štúdia hodnotí farmaceutický produkt, lekárske alebo vedecké zariadenie/pomôcku, alebo iný komerčný výrobok, autori informujú vydavateľa dôverným listom o akomkoľvek finančnom zainteresovaní, ktoré existuje v rámci spoločnosti, ktorá takýto produkt vyrába, alebo prípadnej konkurenčnej spoločnosti.

Používanie jednotiek. V texte sa zásadne používa medzinárodný systém jednotiek (SI). Iné jednotky je nevyhnutné vysvetliť a definovať.

Skratky a symboly. Pri voľbe fyzikálnych alebo fyzikálno-chemických symbolov je záväzný IUPAC Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units (Pergamon Press, Oxford, 1993). Používajú sa len štandardné skratky. Odporúča sa vyhýbať sa skratkám v názve a v abstrakte. Skratky by sa mali používať len pri ich častom opakovaní. Pri prvom použití skratky v texte sa pripojí jej vysvetlenie v zátvorke, pokiaľ sa nejedná o štandardnú jednotku merania.

Názvoslovie a terminológia. V texte je potrebné používať štandardné slovenské názvoslovie v zmysle platných odporúčaní IUPAC. Detailné inštrukcie pre anglicky písaný text sa nachádzajú v publikáciách IUPAC *Brief Guide to the Nomenclature of Inorganic Chemistry IUPAC 2015, Pure App. Chem. 87, 1039-1049*, © IUPAC & De Gruyter 2015 and *Nomenclature of Organic Chemistry, IUPAC Recommendations and Preferred Names 2013*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 2014. Je vhodné sa vyhnúť novým triviálnym názvom. Nové zlúčeniny musia byť pomenované systémovým názvoslovím podľa IUPAC.

Pri uvádzaní látok izolovaných z prírodných zdrojov sa latinsky uvedie názov zdroja (napr. rodový a druhový názov rastliny) a príslušná čeľad'. Liečivá sa uvádzajú INN názvom v slovenskej, českej resp. v anglickej mutácii a to podľa jazyka, v ktorom je rukopis napísaný. Ak je známy liekopisný názov, tak sa uprednostní, resp. prípustné sú obidva.

Príklady: paracetamol (nie acetaminofén), bisfosfonát (nie bifosfonát), adrenalin/liekopis (nie epinefrín/INN), hydroxykarbamin (nie hydroxyurea), kromoglykán (nie chromoglykán), cholestyramín (nie colestyramín, kolestyramín), lítium (lithium), manitol (nie mannitol).

Latinské termíny sa píše kurzívou.

Fotografie, obrázky, grafy. Aby sa vyhlo prípadným nepresnostiam či chybám, odporúčame pripojiť fotografie, obrázky a grafy ako osobitný súbor a v texte uviesť odkaz na príslušnú fotografiu, obrázok a graf. Fotografie majú mať minimálne rozlíšenie na úrovni 300 dpi a musia byť jasné a ostré. Vzhľadom na technické komplikácie, ku ktorým môže dôjsť pri konvertovaní farebných obrázkov pre potreby čierno-bielej tlače sa odporúča zaslať obrázky a ilustrácie vo verzii vhodnej pre takúto tlač. V časopise môžu mať obrázky a ilustrácie šírku len 8,5 cm a nachádzať sa na strane širokej 17,5 cm, preto by veľkosť písmen v legende mala zodpovedať týmto rozmerom. Obrázky, fotografie a grafy majú byť priebežne očíslované a má byť k nim pripojený príslušný text týkajúci sa obsahu a prípadne aj zdroja.

Číslo a text nemá byť súčasťou fotografie/obrázku/grafu. Číslo a názov obrázku, fotografie a grafu sa má umiestniť nad a príslušný text týkajúci sa obsahu a prípadne aj zdroja (legenda) sa má umiestniť pod nimi. Pri mikrofotografiách text obsahuje aj údaje o mierke a technike farbenia. Hlavné objekty, zmeny a zistenia sa v mikrofotografiách označujú šípkou alebo iným symbolom, ktorý je vysvetlený v legende.

Ak sa nejedná o vlastný obrázok/fotografiu, pre každý obrázok/fotografiu sa v legende uvádza zdroj.

Tabuľky majú byť priebežne číslované a majú obsahovať podstatné a dôležité údaje, ktoré sa nenachádzajú v texte. Číslo a príslušný opis (názov) sa uvádza nad tabuľkou. Tabuľky obsahujú vodorovné a zvislé čiary, ktoré podporujú prehľadnosť zverejnených údajov. Pod tabuľkou sa uvádza vysvetlenie symbolov/skratiek použitých v tabuľke vrátane štatistiky (legenda).

Etické aspekty. Pri popise experimentov vykonávaných na zvieratách sa uvádza, či boli schválené etickou komisiou a či boli dodržané príslušné aktuálne legislatívne opatrenia, ktoré sa vzťahujú na túto oblasť ako aj číslo povolenia Štátnej veterinárnej a potravinovej správy SR. Pri klinických štúdiách sa uvádza, či boli schválené príslušnou etickou komisiou.

Štatistika. Pri opise použitých štatistických metód sa uvádzajú informácie potrebné na to, aby si informovaný čitateľ mohol na základe pôvodných výsledkov overiť ich správnosť.

ŠTRUKTÚRA PRÍSPEVKOV

Každý príspevok má byť tematicky kompletný. Odporúčaný rozsah pre odborný článok (pôvodnú štúdiu) je 12 strán, pre prehľadový článok 15 strán a pre kazuistiku 7 strán.

Hlavný text príspevku sa začína názvom príspevku v slovenskom alebo v českom jazyku a následne názov v jazyku anglickom, ktorý má byť stručný a výstižný (veľké tučné písmená, veľkosť písma 14, zarovnanie na stred). Pod názvom sa uvádzajú mená autorov (priezvisko, iniciála/y), pod nimi pracovné zaradenie

autorov (inštitúcia) a štát a nakoniec e-mailová adresa prvého/korešpondujúceho autora (všetko zarovnané na stred).

Pri empiricky orientovaných štúdiách je potrebné dodržať usporiadanie rukopisu do nasledovných častí: **ABSTRAKT, ÚVOD, MATERIÁL A METÓDY, VÝSLEDKY, DISKUSIA, ZÁVERY, (POĎAKOVANIE), ZOZNAM LITERATÚRY.**

Každý nadpis sa uvádza na osobitnom riadku (veľké tučné písmo, veľkosť 12). Nad ním a pod ním sa vynechá voľný riadok. Každý odsek začína zarážkou.

ABSTRAKT

Vyžaduje sa abstrakt v angličtine (tučné písmo, veľkosť 12). Jeho dĺžka by nemala presiahnuť 250 slov. Abstrakt stručne prezentuje cieľ a relevantnosť štúdie, základné postupy, hlavné zistenia a vyvedené závery. Zdôrazňuje nové a dôležité aspekty štúdie a pozorovaní.

Key words: Kľúčové slová (3–10) sa uvádzajú v slovenskom resp. českom a v anglickom jazyku v abecednom poradí pod abstraktom, od ktorého sú oddelené jedným voľným riadkom. Oddelujú sa bodkočiarkou.

ÚVOD

Uvádza sa stručný prehľad problematiky. Namiesto podrobného literárneho prehľadu je vhodnejšie sústrediť sa na striktné relevantné zdroje bez zahrnutia podrobných údajov a záverov prezentovaných v týchto zdrojoch. Úvod sa má končiť cieľom, ktorý si autori vytýčili.

MATERIÁL A METÓDY

Prezentuje sa podrobný popis a charakteristika objektov pozorovania/experimentov, vrátane kontrol. Identifikujú sa použité metódy, prístroje (meno a adresa výrobcu v zátvorke) a postupy s dostatočnými podrobnosťami na to, aby ich bolo možné reprodukovať. Citujú sa zavedené metódy a ich zdroje a stručne sa opisujú metódy, ktoré boli publikované,

ale nie sú veľmi známe. Poskytuje sa kompletný opis nových alebo podstatne modifikovaných metód, dôvody ich použitia a ich prípadné obmedzenia. Presne sa identifikujú všetky použité liečivá a chemikálie vrátane ich generického názvu, dávky a spôsobu podávania.

Poskytujú sa kompletné informácie o štatistických metódach a opatreniach použitých vo výskume.

VÝSLEDKY

Pri uvádzaní výsledkov sa používa medzinárodný systém jednotiek (SI).

Prezentácia výsledkov má byť výstižná, s logickou nadväznosťou a využívaním tabuliek a názorných grafov. V tabuľkách a grafoch je potrebné sa vyhnúť duplicite prezentovaných výsledkov. V texte sa zdôrazňujú a sumarizujú len dôležité pozorovania. Tam, kde je to vhodné/potrebné, tabuľky majú obsahovať výsledky štatistickej analýzy (hladiny významnosti).

DISKUSIA

Zdôrazňujú sa nové a dôležité aspekty štúdie, ktoré vedú ku konečným záverom. Je potrebné sa vyhnúť podrobnému opakovaniu údajov už spomenutých v častiach Úvod a Výsledky. Diskusia má obsahovať zhrnutie prezentovaných zistení, relevantné obmedzenia a význam týchto zistení pre ďalší výskum. Výsledky štúdie sú porovnávané s publikovanými výsledkami iných autorov.

ZÁVERY

Dávajú sa do súvislosti závery s cieľom štúdie. Je potrebné sa vyhnúť nekvalifikovaným vyhláseniam a záverom, ktoré nie sú plne podporované získanými údajmi. Tam, kde je to vhodné, môžu sa uvádzať odporúčania.

POĎAKOVANIE

(Kurzívou) Ak je to potrebné, uvádza sa poďakovanie (grant, špeciálne analýzy, technická podpora...).

ZOZNAM LITERATÚRY

Všetky zdroje uvedené v zozname musia byť citované v texte.

Používané zdroje sa v zozname uvádzajú v abecednom poradí (podľa priezviska prvého autora), a každý z nich sa začína písať na nový riadok s odsadením. Zdroje musia obsahovať priezviská a iniciály všetkých autorov. Neodporúča sa použiť nadmerný počet citácií na podporu jedného vyhlásenia.

Od autorov sa vyžaduje použitie iba overiteľných a recenzovaných zdrojov z celosvetovo akceptovaných vedeckých databáz.

V texte sa cituje/ú autor/i priezviskom a rok publikovania. V slovenskom a českom jazyku sa používajú spojky „a“ a „a kol.“, ak je rukopis v anglickom jazyku spojky „and“ a „et al.“. Viacnásobné citácie sa uvádzajú v chronologickom poradí.

Pri písaní zdrojov štýl a interpunkcia má zodpovedať príkladom uvedeným nižšie:

Časopis (vedecký/odborný): Priezvisko/á a iniciála/y autora /ov. Celý názov článku, názov časopisu (kurzívou), rok publikácie, ročník a príslušné strany. Číslo časopisu sa uvedie (v zátvorke) len vtedy, keď sa v časopise neuvádza ročník. Možno uviesť skrátený názov časopisu, ak sa takýto nachádza v štandardnom ISO zozname skrátených názvov časopisov. ISSN číslo sa nevyžaduje:

Bagirova, V. L., Miřkina, L. I.: Determination of Tartrazine in drugs. *Pharm. Chem. J.*, 2003, 37, 558 – 559.

Kniha (editovaná, needitovaná):

Mená a iniciály autorov citovanej časti knihy, autori/editori knihy, názov knihy (kurzívou), miesto vydania, vydavateľ, rok vydania, celkový počet strán alebo citované strany (ISBN sa nevyžaduje):

Choi, C. K., Dong, M. W.: Chapter 5 – Sample preparation for HPLC analysis of drug products. In Ahuja, S., Dong, M. W. (Eds.). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. United Kingdom: Elsevier, 2005. 123 – 144.

Podczek, F., Jones, B. E.: *Pharmaceutical Capsules*, 2nd edn., Pharmaceutical Press, 2004. 66 –

67.

Zborník z konferencie: Mená a iniciály autorov. Celý názov článku. Názov zborníka/konferencie, miesto a dátum konania, rok publikácie, celkový počet strán alebo citované strany:

Canganella, F., Balsamo, R.: Isolation and selection of probiotic microorganisms with antagonistic activity against *Paenibacillus larvae* and *Paenibacillus alvei*. In *Proceedings of the International Probiotic Conference: Probiotics for the 3rd Millennium*, High Tatras, Slovakia, June 4 – 7, 2008, 28 – 29.

Online časopis:

Simon, J. A., Hudes, E. S.: Relationship of ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA* 1999, 281, 2289 – 2293. <http://url>. Accessed July 11, 2009.

Online website:

King, M. W.: *The Medical Biochemistry Page*. <http://themedicalbiochemistrypage.org>. Updated July 14, 2009. Accessed July 14, 2009.

PREHLADOVÉ ČLÁNKY

Publikujú sa aj články, ktoré prezentujú súhrnné informácie o významných aspektoch vo farmácii a medicíne s relevantnou historickou perspektívou. Odporúčaná štruktúra prehľadových článkov je nasledovná:

NÁZOV/AUTORI – názov (aj v angličtine) má byť stručný a informatívny.

ABSTRAKT (v angličtine) – uvádza ciele a výsledky prehľadu s kľúčovými slovami (3-10).

ÚVOD – poskytuje informácie o kontexte, indikuje motiváciu autora/autorov prehľadu, definuje príslušné zameranie a otázky pre výskum a vysvetľuje štruktúru textu.

MATERIÁL A METÓDY – opisuje/sumarizuje metódy použité pre lokalizáciu, získavanie, selekciu a syntetizovanie údajov.

Hlavná časť prehľadového článku – pre prehľadnosť sa používajú relevantné podnadpisy.

ZÁVER – Zodpovedanie otázok pre výskum, položených v úvode.

ZOZNAM LITERATÚRY – Potvrďuje práce iných vedcov – zabraňuje obvineniam z plagiátorstva. Neodporúča sa použiť viac ako 100 literárnych zdrojov.

KAZUISTIKY

Publikujú sa aj články, ktoré prezentujú správy o výnimočnom prípade určitého liečiva, resp. substancie či zmesi a jej neobvyklého účinku alebo opis zaujímavého klinického prípadu, choroby a pod. Odporúčaná štruktúra kazuistik je nasledovná:

NÁZOV/AUTORI – názov (aj v angličtine) má byť stručný a informatívny.

ABSTRAKT (v angličtine) – skrátená verzia celého textu s kľúčovými slovami (3-10)

ÚVOD – vysvetľuje dôvody, pre ktoré bol daný prípad opísaný

OPIS PRÍPADU/PRÍPADOV – hlavná časť kazuistiky - uvádza sa priebeh, liečba, prognóza a ukončenie prípadu

DISKUSIA – zdôrazňujú sa zaujímavé aspekty prípadu

ZÁVER – opisujú sa súvislosti medzi hlavnými zisteniami/pozorovaniami a cieľom práce

ZOZNAM LITERATÚRY

RECENZIA

Publikujú sa aj kritické rozborové odborného diela (napr. knihy, článku), ktoré obsahujú odôvodnené hodnotenie. Odporúčaná štruktúra recenzie je nasledovná:

ZÁKLADNÉ INFORMÁCIE – uvádza sa názov knihy (článku, časopisu), mená autorov (priezvisko, iniciály), miesto vydania a názov vydavateľstva, rok vydania, počet strán, odporúčaná cena, ISBN

OBSAH KNIHY (ČLÁNKU, ČASOPISU) – opisujú sa dôležité informácie, napr. čím kniha (článok, časopis) recenzenta zaujala/sklamala.

VÝZNAM KNIHY (ČLÁNKU, ČASOPISU) – uvádza sa jej využitie pre odbornú verejnosť.

Redakčná rada