

# Klinická farmakologie a farmacie

2016

3

www.solen.cz | www.klinickafarmakologie.cz | ISSN 1212-7973 | Ročník 30 | 2016

## ORIGINÁLNÍ PRÁCE

Monitoring of the serum biomarkers during the therapy period of the patients with rheumatoid arthritis. Pilot Study

## PŘEHLEDOVÉ ČLÁNKY

Ibrutinib v hematologii

Dabigatran – klinické důkazy pro léčbu pacientů s TEN

Koloidní stříbro a jeho biologická aktivita

Léčba neuropatické bolesti se zaměřením na opioidy

Nová antibiotika v klinické praxi a výzkumu

Sepse z pohledu klinické mikrobiologie

## KAZUISTIKY

Amiodaron: dobrý sluha, zlý pán.

Kazuistika amiodaronem indukované tyreotoxikózy s fatálním koncem

## ORIGINÁLNÍ PRÁCE

- 3 David Suchý, Ondřej Topolčan, Jindra Windrichová, Radka Fuchsová, Hana Brabcová, Soňa Loudová  
**Monitoring of the serum biomarkers during the therapy period of the patients with rheumatoid arthritis. Pilot Study**

## PŘEHLEDOVÉ ČLÁNKY

- 8 Jana Fečková Mihályová, Juraj Ďuraš, Jana Zuchnická, Michal Kaščák, Roman Hájek  
**Ibrutinib v hematologii**
- 15 Tomáš Kvasnička  
**Dabigatran – klinické důkazy pro léčbu pacientů s TEN**
- 18 Renata Večeřová  
**Koloidní stříbro a jeho biologická aktivita**
- 21 Marek Hakl, Olga Haklová  
**Léčba neuropatické bolesti se zaměřením na opioidy**
- 23 Lenka Součková, Adriana Ruzsíková  
**Nová antibiotika v klinické praxi a výzkumu**
- 29 Milan Kolář  
**Sepse z pohledu klinické mikrobiologie**

## KAZUISTIKY

- 33 Viktor Talafa, Ondřej Zela, Dalibor Pastucha, Petra Šrubařová  
**Amiodaron: dobrý sluha, zlý pán. Kazuistika amiodaronem indukované tyreotoxikózy s fatálním koncem**

### Klinická farmakologie a farmacie

Ročník 30, 2016, číslo 3, vychází 4x ročně

Šéfredaktor: doc. MUDr. Karel Urbánek, Ph.D.

**Redakční rada:** prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc., Olomouc, PharmDr. Daniela Fialová, Ph.D., Praha, doc. MUDr. Milan Grundmann, CSc., Ostrava, doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., Olomouc, doc. Ing. Jaroslav Chládek, Ph.D., Hradec Králové, prof. MUDr. Jaroslav Jezdinský, CSc., Olomouc, prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D., Olomouc, prof. MUDr. Jan Krejsek, CSc., Hradec Králové, prof. MUDr. Milan Křiška, DrSc., Bratislava, prof. RNDr. Dr.h.c. Jaroslav Květina, DrSc., FCMA, Hradec Králové, prof. MUDr. Vladimír Mihal, CSc., Olomouc, prof. Momir Mikov, MD, Ph.D., Novi Sad, prof. MUDr. Jaroslav Opavský, CSc., Olomouc, MUDr. David Suchý, Ph.D., Plzeň, doc. MUDr. Karel Urbánek, Ph.D., Olomouc, doc. MUDr. Jitka Patočková, Ph.D., Praha, doc. MUDr. Martin Wawruch, Ph.D., Bratislava, prof. Adam Vas, MD, Ph.D., Budapešť

**Poradní sbor:** prof. MUDr. Zdeněk Fendrich, CSc., Hradec Králové, prof. MUDr. Jan Filipovský, CSc., Plzeň, doc. MUDr. Jozef Glasa, CSc., Bratislava, doc. MUDr. Ladislav Hess, DrSc., Praha, doc. MUDr. Jiří Hovorka, CSc., Praha, PharmDr. Blanka Koříšková, Ph.D., Ostrava, doc. RNDr. Jozef Kolář, CSc., Brno, prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc., Olomouc, doc. MUDr. Otto Mayer, CSc., Plzeň, doc. MUDr. Karel Němeček, CSc., Praha, prof. MUDr. František Perlík, DrSc., Praha, doc. MUDr. Petr Petr, Ph.D., České Budějovice, doc. MUDr. Jan Příborský, CSc., Praha, doc. MUDr. Jarmila Rulcová, CSc., Brno, MUDr. Věra Štrnadová, CSc., Brno, MUDr. Josef Šedivý, CSc., Praha, doc. RNDr. Nina Škottová, CSc., Olomouc, prof. MUDr. Jan Švihovec, DrSc., Praha, prof. MUDr. Tomáš Trnovec, DrSc., Bratislava, prof. MUDr. Helena Vaverková, CSc., Olomouc, prof. MUDr. Jiří Vítovec, CSc., Brno, prof. RNDr. Jiří Vlček, CSc., Hradec Králové, doc. MUDr. Pavel Weber, CSc., Brno

#### Vydavatel:

SOLEN, s.r.o., Lazecká 297/51, 779 00 Olomouc

#### Adresa redakce:

SOLEN, s.r.o., Lazecká 297/51, 779 00 Olomouc  
tel: 582 397 407, fax: 582 396 099, www.solen.cz

#### Redaktorka:

Eva Dokoupilová  
dokoupilova@solen.cz, tel.: 777 557 420

#### Grafická úprava a sazba:

DTP SOLEN, Aneta Mikulíková, mikulikova@solen.cz

#### Obchodní oddělení:

Ing. Lenka Mihulková, mihulkova@solen.cz,  
Charlese de Gaulla 3, 160 00 Praha 6, tel.: 734 567 854

#### Všechny publikované články procházejí recenzí.

Registrace MK ČR pod číslem E 7223.

Citační zkratka: Klin. farmakol. farm.

ISSN 1803-5353 (online)

#### Časopis je indexován v:

Embase, Scopus, Bibliographia Medica Československa  
a v Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik  
vydáváných v ČR.

Vydavatel nenes odpovědnost za údaje a názory  
autorů jednotlivých článků či inzerátů. Reprodukce  
obsahu je povolena pouze s přímým souhlasem redakce.

Redakce si vyhrazuje právo příspěvky krátit  
či stylisticky upravovat. Na publikování rukopisu  
není právní nárok.

# Monitoring of the serum biomarkers during the therapy period of the patients with rheumatoid arthritis. Pilot Study

David Suchý<sup>1</sup>, Ondřej Topolčan<sup>2</sup>, Jindra Windrichová<sup>2</sup>, Radka Fuchsová<sup>2</sup>, Hana Brabcová<sup>1</sup>, Soňa Loudová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Pharmacology, University Hospital in Pilsen, Charles University in Prague – Medical Faculty in Pilsen, Czech Republic

<sup>2</sup>Research Laboratory for Immunoanalysis, University Hospital in Pilsen, Charles University in Prague – Medical Faculty in Pilsen, Czech Republic

## Monitorování sérových biomarkerů během léčby pacientů s revmatoidní artritidou. Pilotní studie

**Cíl:** Provéřit možnost monitorace efektu anti TNF $\alpha$  terapie u pacientů léčených pro revmatoidní artritidu pomocí multiplexového stanovení sérových hladin vybraných biomarkerů odrážejících základní patofyziologické mechanismy a aktivitu onemocnění.

**Metody:** Byla hodnocena skupina 23 pacientů s aktivní revmatoidní artritidou, z toho 20 žen, 3 muži, průměrný věk  $48,6 \pm 10,3$  let, průměrná hmotnost  $68,5 \pm 13$  kg před léčbou a po 14–16 týdnech léčby s inhibítorem TNF $\alpha$  adalimumabem 40 mg subkutánně podávaným jednou za dva týdny (N = 21) nebo etanerceptem 25 mg podávaným podkožně dvakrát týdně (N = 2). Z 23 pacientů, 16 (70%) užívalo současně s glukokortikoidy (GC) a 19 subjektů (84%) methotrexát. Krev byla odebrána ze žíly pomocí odběrové zkumavky Vacuette (Greiner Bio One, Rakousko). Krevní vzorky byly odstředěny při 640 g po dobu 10 min. Sérum bylo rozděleno na alikvoty a zamraženo do provedení analýzy při teplotě  $-75^{\circ}\text{C}$ . Sérové hladiny IL 1 $\beta$ , IL10, IL6, VEGF, MMP9 a adiponektinu byly stanoveny multiplexovou analýzou pomocí technologie XMAP komerčním kitem Human Cardiovascular 1, Lineo Research (USA) podle návodu výrobce k použití. Analýza byla provedena na přístroji Luminex 100 a analýza dat pomocí Luminex 100 IS software verze 2.3. Tyto parametry byly korelovány s krevními hladinami CRP, PCT, TK (stanoveno radioenzymaticky), hmotností pacienta a DAS-28. Pro všechny parametry byl vypočten průměr, medián, směrodatná odchylka, minimální a maximální hodnoty z výsledků před a po terapii. Data byla analyzována Wilcoxonovým párovým testem a koeficientem pořadové korelace.

**Výsledky:** Potvrdili jsme statisticky signifikantní snížení hladiny CRP ( $p = 0,001$ ), VEGF ( $p = 0,05$ ) a adiponektinu ( $p = 0,05$ ), aktivity onemocnění hodnocené pomocí DAS-28 ( $p = 0,001$ ) a významné zvýšení hmotnosti po léčbě ( $p = 0,01$ ). Pokles hodnot všech tří prozánětlivých interleukinů nebyl významný.

**Závěry:** Naše pilotní studie prokázala potencionální využitelnost i limity multiplexové analýzy cytokinů a některých dalších biomarkerů v monitorování léčby revmatoidní artritidy. Ke stanovení doporučení pro rutinní klinickou praxi je nezbytné zvolit vhodnější panel a rozšířit skupinu pacientů.

**Klíčová slova:** revmatoidní artritida, blokátory TNF $\alpha$ , biomarkery, multiplexová analýza.

## Monitoring of the serum biomarkers during the therapy period of the patients with rheumatoid arthritis. Pilot Study

**Aims:** To evaluate the possibility of monitoring the effect of anti TNF $\alpha$  therapy in patients with active rheumatoid arthritis by multiplex assessment of serum levels of different biomarkers which reflects underlying pathogenic mechanisms and activity of this disease.

**Methods:** A group of 23 patients with active rheumatoid arthritis, 20 female, 3 male, average age 48.6 years  $\pm$  10.3, average weight  $68,5 \pm 13$  kg was evaluated prior therapy and after 14–16 weeks of therapy with TNF $\alpha$  blocking agent adalimumab 40 mg subcutaneously every two weeks (No = 21) and etanercept 25 mg subcutaneously twice weekly (No = 2). Of 23 patients, 16 (70%) of subject were treated concomitantly with glucocorticoids (GC), and 19 subject (84%) with methotrexate. The blood was collected by venipunc-

KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA: MUDr. David Suchý, Ph.D., suchyd@fnplzen.cz

Oddělení klinické farmakologie, Fakultní nemocnice Plzeň

tř. dr. E. Beneše 13, 205 99 Plzeň

Cit. zkr: Klin Farmakol Farm 2016; 30(3): 3–7

Článek přijat redakcí: 3. 3. 2016

Článek přijat k publikaci: 15. 11. 2016

ture using Vacuette collection tubes (Greiner Bio-One, Austria). The blood samples were centrifuged at 640 g for 10 min, serum was aliquoted and stored until analysed in freezer at -75°C. Serum levels of six parameters: IL 1β, IL10, IL6, VEGF, MMP9 and adiponectin were assessed by multiplex immunoanalysis using xMAP technology with commercially available multiplex kits Human Cardiovascular 1 panel and Human Cytokines-Chemokines panel, both from Linco Research (USA) according to manufacturer's instructions for use. The analysis was performed on Luminex 100 instrument and data analysis on Luminex 100 IS software version 2.3. These parameters were correlated with blood levels of CRP, PCT, TK (assessed by traditional immunoassays), patient weight and DAS-28. For all parameters there was counted average, median, standard deviation, minimal and maximal values from results prior and after therapy. Furthermore, data were analysed by Wilcoxon pair test and Rank-order correlation.

**Results:** We confirmed significantly decreased CRP levels ( $p = 0,001$ ), VEGF( $p = 0,05$ ) and adiponectin ( $p = 0,05$ ), disease activity score DAS-28 ( $p = 0,001$ ) and significant increase of weight after therapy ( $p = 0,01$ ). Decrease of all of three proinflammatory interleukins were not significant.

**Conclusions:** Our pilot study showed the usefulness and limitations of multiplex measurements of cytokines and some other biomarkers in monitoring of rheumatoid arthritis therapy. But to establish guidelines for the routine clinical practice it is necessary to select preferable panel and to enlarge a group of the patients.

**Key words:** rheumatoid arthritis, TNFα blocking agents, biomarkers, multiplex assessment.

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, systemic, inflammatory disease that leads to inviable joint destruction. Increasing numbers of cytokines have been involved in RA pathology. Advances in understanding the pathogenesis of the disease have fostered the development of new therapeutics. The utility of cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis has been demonstrated by the therapeutic success of tumour necrosis factor alpha (TNFα), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 1 (IL-1) blockade. Tumor necrosis factor (TNF) inhibitors are used as a treatment for moderate to severe RA patients who have inadequate responses to conventional disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) including methotrexate. In RA patients, TNFα blockade is associated with reduction in articular inflammation and damage and in improvement and subsequent changes in some composite activity measures (e.g Disease Activity Index DAS-28). However, up to one-quarter of patients with RA fail to respond to one or more of these drugs (1). For these reasons, a concerted effort has been made over the last decade to identify biomarkers of response to these agents. Certain demographic and clinical factors seem to influence the therapeutic efficacy of TNF inhibitors, including age, sex, smoking status and the presence of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, but these factors together contribute < 20% of the variability in response to these agents (2). Therefore, focus has shifted to discovery of molecular biomarkers as predictors of response and several studies have been conducted to discover valid and reliable

predictive biomarkers for RA therapies, which may provide guidance in determining optimal treatment in the context of personalised medicine. In RA, typical biological biomarkers encompass genetic markers, autoantibodies, cytokine or growth factors, acute phase reactants, cell subset and others. Nevertheless, the performance of biomarkers may greatly depend on the age of onset, duration of symptoms, the current level of inflammation as well as on the type of tissue tested. There are a number of conditions that can influence cytokine production including patient related variability, circadian rhythm, exercise, and preanalytical related variability. Furthermore, the complexity and heterogenous nature of RA further complicates such issues and limits their clinical utility.

A clinical biomarkers (clinical variables) encompass joint counts, pain score, duration of morning stiffness, functional scores and widely used composite activity indices.

In this study, we investigated whether some of selected biomarkers may represent useful predictive tool for efficacy anti TNF in patients who were initiating therapy with TNFi. We measured CRP, IL 1β, IL10, IL6, VEGF, MMP9, TK, PCT and adiponectin. These parameters were correlated with blood levels of CRP, PCT, TK (assessed by traditional immunoassays), and clinical biomarkers -patient weight and DAS-28 .

## Methods

Baseline characteristics of the study population see table no. 1. Average prednisolone dose was 8.13 mg ± 6.62, methotrexate average

**Tab. 1.** Baseline characteristics of the study population

Number of subjects: 23	
Female	20
Male	3
Age (years)	48.6 ± 10.3
Weight (kg)	68.5 ± 13
GC use (%)	70
MTX use (%)	83
Adalimumab (%)	91
Etanercept (%)	9

dose was 9.84 mg ± 4. Patients were evaluated prior therapy and after 14–16 weeks of therapy with TNFα blocking agent adalimumab administered as 40 mg subcutaneous injection every two weeks (No = 21) and etanercept 25 mg applied subcutaneously twice weekly (No = 2). Baseline mean disease activity expressed as Disease Activity Score (DAS-28 28-FW) – was high (6.1 ± 0.73), indicating active disease.

The blood was collected by venipuncture using Vacuette collection tubes (Greiner Bio-One, Austria). The blood samples were centrifuged at 640 g for 10 min, serum was aliquoted and stored until analysed in freezer at -75°C.

Serum levels of six parameters: IL 1β, IL10, IL6, VEGF, MMP9 and adiponectin were assessed by multiplex immunoanalysis using xMAP technology. The assays were run using commercially available multiplex kits Human Cardiovascular 1 panel and Human Cytokines-Chemokines panel, both from Linco Research (USA) according to manufacturer's instructions for use. The analysis was performed on Luminex 100 (USA) instrument and data analysis on Luminex 100

**Tab. 2.** Change in measured biomarkers after 14–16 weeks of therapy with TNF  $\alpha$  blocking agents

Parameter	IL 1 $\beta$ (pg/mL)				IL 10 (pg/mL)				IL 6 (pg/mL)			
	Mean	Median	Min	Max	Mean	Median	Min	Max	Mean	Median	Min	Max
Prior therapy	24.53	3.78	3.20	280.27	364.32	3.20	3.20	5538.51	102.25	66.56	3.20	392.98
After 14–16 weeks	16.44	3.20	3.20	208.5	61.15	5.12	3.20	339.36	73.69	47.08	2.67	221.52
Parameter	VEGF (pg/mL)				MMP 9 (ng/mL)				Adiponectin (ng/mL)			
	Mean	Median	Min	Max	Mean	Median	Min	Max	Mean	Median	Min	Max
Prior therapy	272.56	178.66	3.20	995.79	428.92	364.84	153.21	1158.42	18.29	17.81	8.05	25.00
After 14–16 weeks	205.32	153.94	3.20	820.66	391.66	326.88	106.10	1324.32	17.31	14.91	7.03	25.00

**Tab. 3.** ???

Parameter	CRP (mg/L)				TK (IU/L)				PCT ( $\mu$ g/L)			
	Mean	Median	Min	Max	Mean	Median	Min	Max	Mean	Median	Min	Max
Prior therapy	39.08	33.0	1.0	9.06	7.45	3.1	35.5	113.0	0.04	0.04	0.01	0.10
After 14–16 weeks	22.22	7.0	1.0	9.36	7.3	2.7	26.4	138.0	0.04	0.03	0.01	0.29
Parameter	DAS-28				Weight (kg)							
	Mean	Median	Min	Max	Mean	Median	Min	Max				
Prior therapy	6.14	6.09	4.60	7.45	68.92	65.50	52.00	95.00				
After 14–16 weeks	3.90	3.94	2.68	6.19	68.61	63.00	52.00	99.00				

IS software version 2.3. These parameters were correlated with blood levels of CRP, PCT, TK (assessed by traditional immunoassays), patient weight and DAS-28.

**Statistical interpretation:** There was counted average, median, standard deviation, minimal and maximal values prior and after therapy for all parameters. Furthermore, data were analysed by Wilcoxon pair test and Rank-order correlation.

## Results

For results see Table 2 and 3. Parameters with significant changes are written in bold letters.

Note: DAS-28 above 5.1 means high disease activity whereas a DAS-28 below 3.2 indicates low disease activity. Remission is achieved by a DAS-28 lower than 2.6 (comparable to the ARA remission criteria). Significant decrease in disease activity is achieved, when decrease in DAS-28 score  $\geq 1.2$ .

## Discussion

We found expected significant decrease of CRP ( $p = 0.001$ ), disease activity DAS-28 ( $p = 0.001$ ) and increase of weight after therapy ( $p = 0.01$ ). From the other markers significant decrease after therapy was confirmed for VEGF ( $p = 0.05$ ) and adiponectin ( $p = 0.05$ ) only. This findings are in accordance with previously described results. Lack of correlation was observed between serum cytokine levels and disease activity (DAS-28). We registered non significant

numerical decrease of all of the three interleukins. Changes of serum adiponectin levels show the link between RA, systemic inflammation and adiponectin concentrations and suggest its role in modulating of immune response in patients with RA.

Many clinical trials have reported the excellent clinical efficacy of tumour necrosis factor  $\alpha$  (anti-TNF $\alpha$ ) inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) (1). Several mechanism have been proposed to explain action of different TNF inhibitors. Neutralization of TNF $\alpha$  has a profound impact on the biology of inflammation and is reflected by the rapid reduction in the concentration of C reactive protein (CRP), an acute phase protein. TNF $\alpha$  inhibition also showed ability to induce a rapid and marked reduction in circulating interleukin 6 (IL-6) levels, suggesting that its efficacy may result from the suppression of IL-6 as well as TNF $\alpha$  (1). In RA patients, IL-6 is detectable in elevated levels in the serum and synovial tissue together with its receptor IL-6R. IL-6 plays a crucial role in arthritis-related bone loss due to its involvement in osteoclast recruitment and activation. Levels of IL-6 are tightly proportional to levels of C reactive protein (CRP) and disease severity and blockade of IL-6 is generally accepted as therapeutic approach in treatment of RA patients (2, 3). An age-related increase in IL-6 concentration has been reported in serum obtained from elderly subjects. Some studies demonstrated that plasma levels of tumor necrosis factor are elevated in elderly populations (2). Postprandial cytokine levels are

also affected by feeding; notably circulating IL-6 levels are increased while TNF- $\alpha$  levels are decreased (2).

The reduction of IL-1 synthesis in synovial tissue by an anti-TNF antibody *in vitro* was the pivotal observation that led investigators to suspect the involvement of a cytokine cascade in RA; however, it has been more difficult to verify these observations *in vivo* (4, 5). RA is associated with elevated levels of IL-1 in synovium. IL-1 is closely related to inflammation and articular damage in many arthritis models, IL-1 and TNF also play an important role in the degradation of articular cartilage by stimulating synovial fibroblasts and chondrocytes to secrete degradative enzymes, including matrix metalloproteinases (MMPs) (2, 6).

Serologic analysis of extremely low levels of IL-1 with different assays has provided conflicting results, with significant reductions observed in one study and no consistent trend in another study (5, 7). IL-1, production exhibits gender related differences and distinct diurnal rhythms that peak in the early morning and are related to the rhythm of plasma cortisol and melatonin (2).

Interleukin 10 (IL-10) is a major immunoregulatory cytokine that is usually considered to mediate down regulation of the inflammatory response, as it inhibits the activation and effector functions of T cells, macrophages and monocytes. Regulatory T cells (Treg) are an important source of IL-10 production. It acts as a negative autocrine regulator of TNF $\alpha$  and other proinflammatory cytokines. Raised levels of IL10



have been found in the serum and synovial fluid of patients with RA, possibly contributing to the diminished T-cell function and increased antibody and rheumatoid factor production (8–10). The influence of TNF alpha inhibition on serum IL-10 was described in patients with Crohn disease and ankylosing spondylitis, but data in RA patient are limited. High IL10 production has been found more frequently in patients with a higher rate of joint destruction and higher autoantibody titres. Regulatory T cells (Treg) are an important source of IL-10 production and this cell type might have been activated in vitro by etanercept. A restoration of function of Treg by infliximab in RA have been described. Enhancement of Treg cells in vivo and in vitro by TNF $\alpha$ -blockers may be probably another therapeutic mechanism of these substances (9, 11, 12). Prolonged endurance type physical exercise can probably increase IL-10 levels in the circulation (2).

Several observations demonstrated reduction in serum VEGF concentrations after therapeutic intervention (13). Patients with early RA responding to disease-modifying antirheumatic drugs showed significant reductions in serum VEGF concentrations compared to non responders to the same treatment. Serum VEGF levels are reported to decrease under therapy with Infliximab in a dose-dependent way (14).

Adiponectin is a fat tissue protein that plays a role in maintaining the homeostasis of glucose and lipids and has an effect on insulin sensitivity. There is increasing evidence that adipocytokines may exert proinflammatory and destructive effects in RA. In addition to its metabolic properties, adiponectin has substantial immunomodulatory potential. RA is associated with increased serum adiponectin levels compared to healthy subjects and increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis (17). It may be involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) by stimulating the expression of IL-6, IL-8, matrix metalloproteinase (MMP)-1–13 in RA fibroblast-like synoviocytes. It was shown, that VEGF levels were positively correlated with adiponectin levels in RA joint fluid, but not in OA joint fluid (18). This adiponectin may play a significant role in the pathogenesis of RA by stimulating the production of VEGF and MMPs

in fibroblast-like synoviocytes, leading to joint inflammation and destruction. Some recent reports suggest that tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) blockade therapy can change circulating adiponectin levels, but data are sparse and inconsistent. Published results of two studies from 2010 do not support a significant effect of TNF $\alpha$  blockade therapy on circulating adiponectin levels in patients with autoimmune disease. No correlation was observed between changes in levels of adiponectin and C-reactive protein (19).

In our study, significant decrease of adiponectin serum levels in patients receiving anti TNF therapy was confirmed. This was accompanied with significant concomitant decrease in VEGF levels, confirming previous results listed above. Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been demonstrated to have a central involvement in the angiogenic process in RA. The additional activity of VEGF as a vascular permeability factor may also increase oedema and hence joint swelling in RA. Serum VEGF showed significant correlation with C-reactive protein levels (20, 21). Interestingly serum VEGF concentrations have been found higher in patients with newly diagnosed RA than in those with long-standing disease (22).

MMP-9 activity may correlate with synovium proliferation with vascularization in rheumatoid arthritis. MMP-9 levels are substantially elevated in the sera and SF from patients with RA and may be a potentially useful laboratory marker of disease activity. MMP-9 in blood serum correlates significantly with disease activity and did not correlate with rheumatoid factor status (14, 15).

Early stages of RA showed high MMP-9 release and MMP-9 level is increased in stages II and III in RA, but this was not confirmed in more severe stage IV (15, 16).

The clinical significance of changes in serum procalcitonin (PCT) and thymidinkinase levels in patients with RA is not completely understood and their significance is not fully established. Significantly elevated PCT levels showed good specificity and sensitivity for systemic infection in patients with systemic autoimmune diseases, regardless of the use of corticosteroids or immunosuppressive agents (23, 24). Whether serum procalcitonin levels also reflect the activity of the underlying rheumatic disease is questionable. Information regarding plasma PCT

levels in patients with active underlying systemic autoimmune diseases is limited (23). However, as showed in our study, PCT monitoring may probably not contribute to better accuracy in measurement of disease activity and therapeutic response in patients with RA.

Thymidine kinase activity, an enzyme of salvage pathway in thymidine phosphate synthesis, is increased during high cell turnover caused by inflammation or tumour growth which requires higher DNA synthesis rate and it interferes in methotrexate mechanism of action as well (25). Thymidin kinase levels may be decreased by some antirheumatic drugs, mainly methotrexate, which is often used as monotherapy or in combination with anti TNF agents (25). In our study no changes of serum activity levels were observed after treatment.

There are number of features and conditions that can influence cytokine production: patients related variability, diurnal rhythmicity and sample handling factors may influence the measurement of cytokine levels and are also likely to change not only with treatment but also with stress, cachexia and others. Such factors contribute considerably to the limited usefulness of cytokine production in context of treatment monitoring.

## Conclusion

Biomarkers allowing effective treatment strategy for a particular patient may represent essential step to the individual personalised medicine. Our pilot study has proposed the usefulness and limitations of multiplex measurements of cytokines and other biomarkers leading to complex monitoring of rheumatoid arthritis therapy as a supplement to nowadays scoring system (DAS-28). In order to establish guidelines for the routine clinical practice it is necessary to use a larger panel of the parameters, take into account variability and limitations of cytokine measurement and to enlarge a group of the patients.

### Author's conflict of interest disclosure:

The authors stated, that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

## Abbreviations

DAS-28 – Disease activity score, IL= interleukin, RA = rheumatoid arthritis, CRP = C-reactive protein, PCT = procalcitonin, TK = Thymidine Kinase, GC = glucocorticoids, MTX = methotrexate.

REFERENCES

1. Hyrich KL, Watson KD, Silman AJ, Symmons DP. Predictors of response to anti-TNF- $\alpha$  therapy among patients with rheumatoid arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 1558–1565.
2. Burska A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. *Mediators of Inflammation* Volume 2014 (2014), Article ID 545493, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/545493>.
3. Nishimoto N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18: 277–281.
4. Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M: Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1989; 2: 244–247.
5. Charles P, Elliott MJ, Davis D, Potter A, Kalden JR, Antoni C, Breedveld FC, Smolen JS, Eberl G, deWoody K, Feldmann M, Maini RN: Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1999; 163: 1521–1528.
6. Hosaka K, Ryu J, Saitoh S, et al. The comined effect of anti TNF alpha antipody and IL-1 receptor antagonist in human rheumatoid arthritis synovial membrane. *Cytokine* 2005; 32: 263–269.
7. Lorenz HM, Antoni C, Valerius T, Repp R, Grunke M, Schwerdtner N, Nusslein H, Woody J, Kalden JR, Manger B: In vivo blockade of TNF-alpha by intravenous infusion of a chimeric mono-clonal TNF-alpha antibody in patients with rheumatoid arthritis. Short term cellular and molecular effects. *J Immunol* 1996; 156: 1646–1653.
8. Wanidworanun C, Strober W. Predominant role of tumor necrosis factoralpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol* 1993; 151: 6853–6861.
9. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683–765.
10. Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonemann G, Angel JB, et al. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses. *J Immunol* 1995; 154: 5492–5499.
11. Lard LR, van Gaalen FA, Schonkeren JJ, Pieterman EJ, Stoeken G, Vos K, et al. Association of the -2849 interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1841–1848.
12. Maynard CL, Weaver CT. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulativ. *Immunol Rev* 2008; 226: 219–233.
13. Paleolog EM, Young S, Stark AC, McCloskey RV, Feldmann M, Maini R Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41(7): 1258–1265.
14. Strunk J, Bundke E, Lange U. Anti-TNF-alpha antibody Infliximab and glucocorticoids reduce serum vascular endothelial growth factor levels in patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *Rheumatology International* 2006; 26: 252–256.
15. Takemura T, Kanbe K, Takeuchi K, et al. Serum matrix metalloproteinase activity relating to cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *APLAR Journal of Rheumatology* 2005; 3: 213–219.
16. Gruber BL, Sorbi D, French DL, Marchese MJ, Nuovo GJ, Kew RR, Arbeit LA. Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 78(2): 161–171.
17. Senolt L, Pavelka K, Houza D, Haluzik M. Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2006; 35: 247–252.
18. Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2563–2568 .
19. Peters MJL, et al. Lack of effect of TNF $\alpha$  blockade therapy on circulating adiponectin levels in patients with autoimmune disease: results from two independent prospective studies. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1687–1690.
20. Marrelli A, Cipriani P, Liakouli V, et al. Angiogenesis in rheumatoid arthritis: A disease specific process or a common response to chronic inflammation? *Autoimmunity Reviews* 2001; 10: 595–598.
21. Afuwape AO, Kiriakidis S, Paleolog EM. The role of the angiogenic molecule VEGF in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol* 2002; 17: 961–972.
22. Latour F, Zabraniecki L, Dromer C, Bouchet A, Durroux R, Fournie B. Does vascular endothelial growth factor in the rheumatoid synovium predict joint destruction? A clinical, radiological and pathological study in 12 patients monitored for 10 years. *Joint Bone Spine* 2001; 68(6): 493–498.
23. Buhaescu I, Yood RA, Izzedine H. Serum procalcitonin in systemic autoimmune diseases--where are we now? *Semin Arthritis Rheum*. 2010; 40(2): 176–183.
24. Dejmková H, Šléglová O, Bečvář R, Pavelka K, Uhrová J. Omezený význam procalcitoninu v odlišení septického stavu od vzplanutí autoimunitního onemocnění. *Čes Revmatol* 200; 17: 79–82.
25. Tian HN, Cronstein BN. Understanding the Mechanisms of Action of Methotrexate: Implications for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*. 2007; 65(3): s. 168–173. ISSN 1936-9719.

# Ibrutinib v hematologii

Jana Fečková Mihályová<sup>1</sup>, Juraj Ďuraš<sup>1,2</sup>, Jana Zuchnická<sup>1</sup>, Michal Kaščák<sup>1</sup>, Roman Hájek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Klinika hematologie, Fakultní nemocnice Ostrava

<sup>2</sup>Klinika hematologie, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava

Poznání funkce B-buněčného receptoru a jeho signalizační kaskády umožnilo vývoj molekul, které inhibují jednotlivé enzymy této dráhy. Ibrutinib je inhibitor Brutonovy tyrozinkinázy, která má klíčové postavení v přenosu signálu tohoto receptoru. V současné době je preparát registrovaný pro léčbu relabující a refrakterní B-chronické lymfocytární leukemie, primoterapii B-chronické lymfocytární leukemie s průkazem delece krátkého raménka chromozomu 17 nebo mutace genu TP53, léčbu relapsu lymfomu z pláštových buněk a dále pro léčbu nově léčené a relabující Waldenströmovy makroglobulinemie. V práci je blíže popsán mechanismus účinku a výsledky klinických studií hodnotící efektivitu a bezpečnost tohoto preparátu.

**Klíčová slova:** ibrutinib, Brutonova tyrozinkináza, chronická lymfocytární leukemie, folikulární lymfom, lymfom z buněk pláštové zóny, difúzní velkobuněčný lymfom, Waldenströmova makroglobulinemie.

## Ibrutinib in hematology

Knowing the function of B cell receptor and its signaling cascade enabled the development of the new molecules that inhibit the enzymes of this pathway. Ibrutinib is the inhibitor of Bruton's tyrosine kinase which has the key role in the transmission of signals from this receptor. Nowadays, ibrutinib is approved for the treatment of relapsed or refractory B-chronic lymphocytic leukemia, for the first-line therapy of chronic lymphocytic leukemia with the deletion of the 17p deletion or mutation in the TP53 gen. Moreover, it is approved for the treatment of follicular lymphoma and Waldenström's macroglobulinemia. In our work, there is a closer description of the mechanism of action, the results of clinical trials, drug efficacy and safety observed in clinical trials.

**Key words:** ibrutinib, Bruton tyrosine kinase, chronic lymphocytic leukemia, follicular lymphoma, mantle cell lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, Waldenström's macroglobulinemia.

## Úvod

V roce 1952 byl poprvé popsán vrozený, na chromozom X vázaný imunodeficit, Brutonova agamaglobulinémie (1). Nemoc byla pojmenovaná podle svého objevitele, amerického pediatra Ogdena Brutona. Příčinou je mutace genu kódujícího Brutonovu tyrozinkinázu (BTK). Enzym má důležité postavení ve vývoji a diferenciaci B-lymfocytů (2) a jeho objev byl významný i pro výzkum dalších B-buněčných onemocnění.

V patogenezi B lymfoproliferací se uplatňuje aktivní signalizace drahami B-buněčného receptoru (BCR). (BTK) je součástí těchto drah a její inhibice se proto stala zajímavým cílem léčby.

Ibrutinib (PCI-32765) je perorální selektivní inhibitor BTK, který byl Food and Drug Administration poprvé registrován k léčbě lymfomu z buněk pláštové zóny v roce 2013. V České republice je mimo klinické studie dostupný od roku 2015. Může být indikován u chronické lymfocytární leukemie, lymfomu z buněk pláštové zóny a Waldenströmovy makroglobulinémie (podrobně v části věnované klinickému využití). Aktuální úhrada léku podléhá schvalování revizním lékařem dle § 16 zákona č. 48/1997 Sb. Kombinované režimy ibrutinibu s monoklonální protilátkou, chemoimunoterapií, inhibitory Bcl2, ale i další generace inhibitorů BTK (APC-196, ONO-4095,

CC-292) jsou testované v několika probíhajících klinických studiích (3–5).

V této práci je blíže popsán mechanismus účinku a výsledky léčby hodnotící efektivitu a bezpečnost tohoto preparátu.

## Mechanismus účinku

B-buněčný receptor (BCR) je transmembránový protein, který sehrává klíčovou roli v aktivaci B lymfocytů, jejich proliferaci a produkci protilátek. Po navázání antigenu se aktivuje několik signálních drah a současně je antigen buňkou zpracován, exprimován na jejím povrchu a prezentován pomocným T lymfocytům (Th) (6). Jednou z klíčových kináz těchto signálních drah



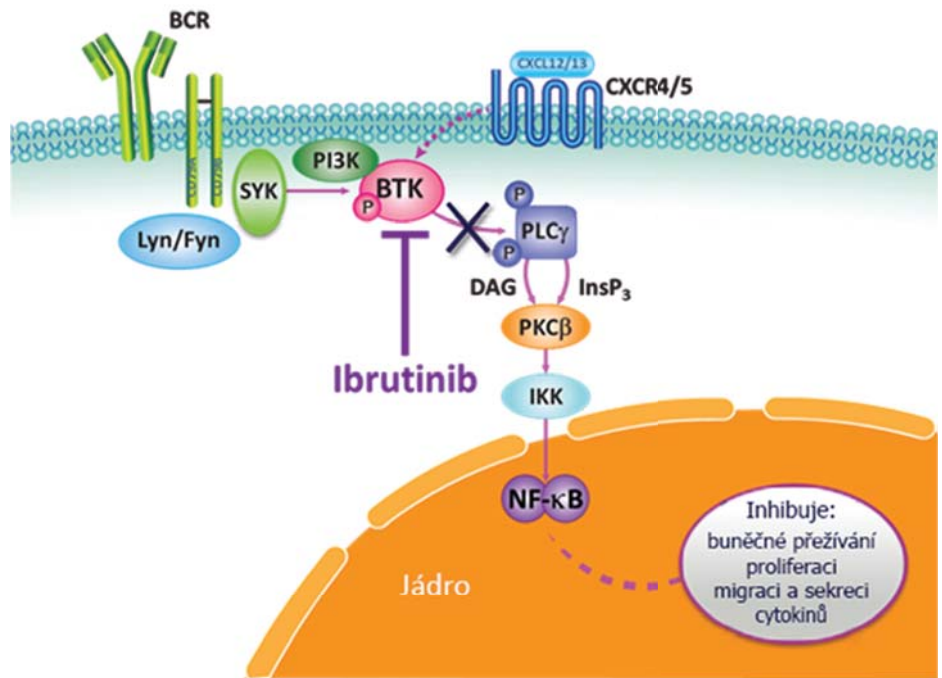
je BTK, enzym, který po své fosforylaci aktivuje fosfolipázu  $\text{C}\gamma 2$  (PLC $\gamma 2$ ). V navazujících krocích hydrolyzuje fosfatidylinositoldifosfát (PIP2) na diacylglycerol (DAG) a inositoltrifosfát (IP3), mobilizuje intracelulární vápník a aktivuje další molekuly (AKT, MAP kinázu, NF $\kappa$ B) (7). Zúčastňuje se i přenosu signálů z jiných buněčných receptorů (CXCR4, BDFS-R, TLR4), které regulují růst a migraci nádorových buněk (8, 9). Aktivní signalizace drahami BCR a BTK nezávisle na specifickém antigenu hraje významnou roli v etiopatogenezi B-lymfoproliferativních onemocnění (chronická lymfocytární leukemie – CLL, lymfom z malých lymfocytů – SLL, lymfom z pláštových buněk – MCL, difuzní velkobuněčný lymfom – DLBCL, folikulární lymfom – FL, mnohočetný myelom – MM, Waldenströмова makroglobulinemie – WM i další) (10).

Ibrutinib (PCI-32765), chemicky 1-[(3R)-3-[4-amin-3-(4-fenoxyfenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl]-1-piperidinyl]-2-propen-1-on, je malá molekula s empirickým vzorcem  $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2$  s molekulární hmotností 440.50. Jde o první ireverzibilní perorální (iBTK). Vytvořením kovalentní vazby s cysteinovým reziduem kinázy (Cys 481) brání její fosforylaci a blokuje signální dráhy BCR a dalších receptorů. Znemožňuje přežívání a proliferaci nádorových B lymfocytů, brzdí jejich migraci a inhibuje sekreci některých cytokinů (CCL3, CCL4) (11). Kompletní inhibice BTK je dosaženo při užití minimálně 2,5 mg/kg tělesné hmotnosti, přičemž nebyla stanovena hladina maximální tolerovatelné dávky (12). Ibrutinib není inhibitorem zcela selektivním, kromě BTK byl popsán inhibiční efekt i na další kinázy aktivní v normálních i nádorových B-lymfocytech (12).

## Farmakokinetika

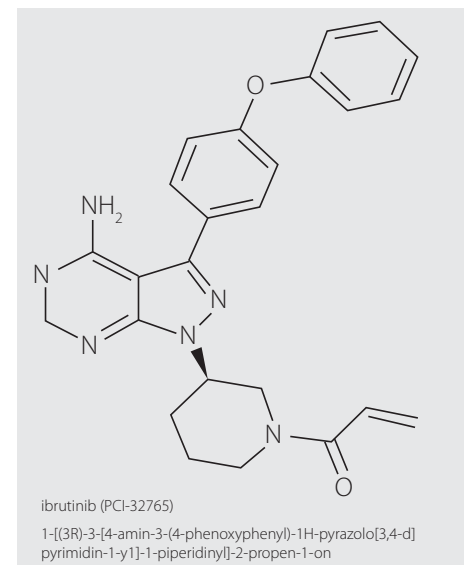
Farmakokinetika ibrutinibu se u jednotlivých onemocnění liší jen minimálně. Po perorálním podání je rychle absorbován s průměrnými vrcholovými koncentracemi v plazmě po 1–2 hodinách po užití (12). S jídlem se absorpce

Obr. 1. Ibrutinib – mechanismus účinku



zvýšuje dvoj- až čtyřnásobně a v aktivní formě setrvává 24 hodin. Metabolizován je v játrech, především cytochromem P450 (CYP3A4) (13) s eliminačním poločasem 4–6 hodin. Renální vylučování je zanedbatelné. S ohledem na uvedené u pacientů s renální insuficiencí není potřebná úprava dávkování, u pacientů s mírnou až středně těžkou poruchou jaterních funkcí je doporučena redukce dávek a podávání ibrutinibu u pacientů s těžkou poruchou jaterní není doporučováno. Metabolizace cytochromem CYP3A4 je podkladem pro klinicky významné lékové interakce při současném podávání silných inhibitorů a induktorů CYP3A4 (tabulka 5). In vitro byl prokázán i jeho inhibiční vliv na transport glykoproteinu P. Proto se doporučuje minimalizovat potenciální interakce s jeho substráty (digoxin, metotrexát) užitím alespoň 6 hodin před nebo 6 hodin po podání iBTK. Z důvodů závažné trombocytopenie je kontraindikované současné užívání antagonistů vitamínu K a opatrnost je třeba věnovat i antiagregační terapii.

Obr. 2. Ibrutinib



## Nežádoucí účinky

Spektrum nežádoucích účinků je ve srovnání se standardní chemoterapií odlišné. Ve většině případů jde o nezávažné komplikace (stupeň 1–2), nevyžadující přerušení léčby. Nejčastěji jsou to průjemy, únava, infekce, zejmé-

Tab. 1. Hematologická a specifická nehematologická toxicita ibrutinibu gr. 3–4

Studie	Fáze	Indikace	Počet pacientů (n)	Anemie % (n)	Neutropenie % (n)	Trombocytopenie % (n)	Fibrilace síní % (n)	Krvácení % (n)	Infekce (pneumonie) % (n)
Byrd et al., 2013	I-II	R/R CLL/SLL	85	6% (5)	15% (13)	6% (5)	4% (3)	4,7% (4)	12% (10)
Byrd et al., 2014	III	R/R CLL/SLL	195	8% (15)	14% (26)	4% (8)	3% (6)	1% (2)	5% (9)
O'Brien et al., 2014	I-II	CLL/SLL	31	0% (0)	3% (1)	3% (1)	6,5% (2)	-	-
Wang et al., 2013	II	R/R MCL	111	10% (9)	16% (18)	11% (12)	4,5% (5)	4,5% (5)	6% (7)
Treon et al., 2015	II	R/R WM	63	2% (1)	14% (9)	12,7% (8)	2% (1)	6,3% (4)	8% (5)

**Tab. 2.** Ibrutinib – publikované studie N-HL, CLL, SLL

Studie	fáze	Indikace	předchozí léčebné linie (median)	n	režim	ORR % (n)	CR % (n)	PFS	OS
<b>NCT00849654</b> Study of the Safety and Tolerability of PCI-32765 in Patients With Recurrent B Cell Lymphoma (PCYC-04753) (Advani et al., 2013)	I	R/R NHL, CLL, SLL, MM, WM	3	50	ArmA: ibrutinib p.o., eskalovaná dávka 1,25–17,5 mg/kg/den, D1-28, 35denní cyklus ArmB: ibrutinib p.o., 8,3 mg/kg/den a 560 mg/den, kontinuálně, 35denní cyklus	60% (30)	16% (8)	13,6 m (median)	40% (v 18. m)
<b>NCT01105247</b> Safety of PCI-32765 in Chronic Lymphocytic Leukemia (Byrd et al., 2013)	I/II	R/R CLL/SLL	4	85	ArmA: ibrutinib p.o. 420 mg/den ArmB: ibrutinib p.o., 840 mg/den kontinuálně do PD nebo netolerovatelné toxicity	71% (36) 71% (24)	4% (2) 21% (5)	75% (v 26. m)	83% (v 26. m)
<b>NCT01578707</b> A Phase 3 Study of Ibrutinib (PCI-32765) Versus Ofatumumab in Patients With Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (RESONATE™) (Byrd et al., 2014)	III	R/R CLL/SLL	3	391	ArmA: ibrutinib 420 mg/d p.o., kontinuálně do PD nebo netolerovatelné toxicity ArmB: ofatumumab i.v., 28denní cyklus, do PD nebo netolerovatelné toxicity, max 12 dávek	63% (122) 4% (8)	0% (0) 0% (0)	median nedosažen 8,1 m	90% (v 12. m) 81%
<b>NCT01744691</b> A Multicenter Phase 2 Study of PCI-32765 (Ibrutinib) in Patients With Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) or Small Lymphocytic Lymphoma (SLL) With 17p Deletion (O'Brien et al., 2014a)	II	R/R CLL/SLL	2	144	ibrutinib 420 mg/d p.o., kontinuálně do PD nebo netolerovatelné toxicity	83% (119)	5% (3)	79,3% (v 12. m)	neuveдено
<b>NCT01611090</b> A Study of Ibrutinib in Combination With Bendamustine and Rituximab in Patients With Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia or Small Lymphocytic Lymphoma <a href="https://www.jnj.com/news/all/Ibrutinib-IMBRUVICA-HELIOS-Interim-Analysis-Study-Data-Show-Significant-Reductions-in-Risk-of-Progression-or-Death-Patients-with-Previously-Treated-Chronic-Lymphocytic-Leukemia">https://www.jnj.com/news/all/Ibrutinib-IMBRUVICA-HELIOS-Interim-Analysis-Study-Data-Show-Significant-Reductions-in-Risk-of-Progression-or-Death-Patients-with-Previously-Treated-Chronic-Lymphocytic-Leukemia</a>	III	R/R CLL/SLL	neuveдено	578	ArmA: ibrutinib p.o., bendamustin i.v. rituximab i.v. ArmB: Placebo p.o., bendamustin i.v., rituximab i.v. 28denní cyklus, 6 cyklů BR, ibrutinib kontinuálně do PD nebo netolerovatelné toxicity	83% (240) 68% (197)	10% (29) 3% (9)	79% (v 18. m) 24%	neuveдено
<b>NCT01520519</b> Phase 2 Study of the Combination of Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor PCI-32765 and Rituximab in High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia and Small Lymphocytic Lymphoma Patients (Burger et al., 2014)	II	R/R CLL/SLL	0–4	40	ibrutinib 420 mg/d p.o., kontinuálně do PD nebo netolerovatelné toxicity rituximab i.v., celkem 6 dávek 28denní cyklus	95% (38)	8% (3)	78% (v 18. m)	84% (v 18. m)
<b>NCT01105247</b> Safety of PCI-32765 in Chronic Lymphocytic Leukemia (O'Brien et al., 2014b)	I/II	dosud neléčená CLL	0	31	ArmA: ibrutinib p.o. 420 mg/d ArmB: ibrutinib 840 mg/d kontinuálně do PD nebo netolerovatelné toxicity	71% (22)	13% (4)	96,3% (v 24. m)	96,6% (v 24. m)
<b>NCT01722487</b> A Multicenter, Open-label, Phase 3 Study of the Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib Versus Chlorambucil in Patients 65 Years or Older With Treatment-naive Chronic Lymphocytic Leukemia or Small Lymphocytic Lymphoma (RESONATE™-2) (Burger et al., 2015)	III	dosud neléčená CLL	0	269	ArmA: ibrutinib p.o. 420 mg/d, kontinuálně do PD nebo netolerovatelné toxicity, ArmB: chlorambucil p.o., celkem 12 cyklů 28denní cyklus	86% (117) 35% (47)	4% (5) 2% (3)	median nedosažen 19 měsíců	98% (v 24. m) 85%
<b>NCT01236391</b> Safety and Efficacy of PCI-32765 in Participants With Relapsed/Refractory Mantle Cell Lymphoma (MCL) (PCYC-1104-CA) (Wang et al., 2013)	II	R/R MCL	3	111	ibrutinib p.o. 560 mg/d, kontinuálně do PD nebo netolerovatelné toxicity	68% (75)	21% (23)	13,9 m (median)	58% (v 18. m)
<b>NCT01614821</b> Ibrutinib (PCI-32765) in Waldenstrom's Macroglobulinemia (Trean et al., 2015)	II	R/R WM		63	ibrutinib p.o. 420 mg/d, kontinuálně do PD nebo netolerovatelné toxicity	91% (57)	0%	9,6 m (median)	95,2% (v 24. m)

<b>NCT01325701</b> Safety and Efficacy Study of Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor in Subjects With Relapsed or Refractory Diffuse Large B-cell Lymphoma (Wilson et al., 2015)	II	R/R DLBCL	3	58	ibrutinib p.o. 560 mg/d, kontinuálně do PD nebo netolerovatelné toxicity	ABC DLBCL: 37% (14/38) GCB DLBCL: 5% (1/20)	16% (6) 0%	2,02 m (median) 1,31 m (median)	10,31 m 3,35 m
---	----	-----------	---	----	--	--	---------------	------------------------------------	-------------------

R/R – relabující, a/nebo refrakterní, NHL – non Hodgkinské lymfomy, CLL – chronická lymfocytární leukemie, SLL – lymfom z malých lymfocytů, MCL – mantle cell lymfom, DLBCL – difúzní velkobuněčný lymfom, ABC DLBCL – z aktivovaných B-buněk, GCB DLBCL – z buněk germinálního centra, FL – folikulární lymfom, WM – Waldenströмова makroglobulinemie, i. v. – intravenózně, p. o. – perorálně, PD – progresse onemocnění, m – měsíc

na respirační (horních i dolních cest dýchacích), nevolnost, pyrexie (14–18). Toxicita vyššího stupně (stupeň 3–4) je především hematologická (tabulka 1), z nehematologických jsou to infekční komplikace (pneumonie) (tabulka 1), nechutenství a nauzea (14–18). Specifické projevy léčby (lymfocytóza, krvácení, fibrilace síní) vyplývají z inhibice BTK a enzymů, které jsou na aktivitě kinázy závislé, podrobně se jim věnujeme níže. Jak zásadní a limitující bude toxicita kombinovaných režimů, ozřejmí běžící klinické studie.

## Lymfocytóza

Vzestup celkového počtu lymfocytů v periferní krvi je typickým jevem úvodní fáze terapie CLL a vyvine ji asi 20 % pacientů (19). U ostatních B-lymfoproliferativních onemocnění lymfocytóza nebývá tak výrazná. Rychlá redukce velikosti lymfatických uzlin (LU) je asociovaná s redistribucí maligních B-lymfocytů (20), které v periferní krvi přežívají pravděpodobně díky aktivitě signálních drah nezávislých na BTK. Tyto buňky již neproliferují a jeví se nefunkční (19). Maximální nárůst nastává kolem čtvrtého týdne a k poklesu dochází v průběhu osmého až dvanáctého měsíce (19, 21). Dlouhé období lymfocytózy bylo pozorované zejména u pacientů s příznivými prognostickými ukazateli (delece 13q, mutovaný IGVH) (19). Projevy leukostázy byly výjimečné, a to při hodnotách lymfocytů nad  $500 \times 10^9/l$  (21). Samotná lymfocytóza by proto neměla být indikací k přerušení léčby a měla by být zohledněna v hodnocení léčebné odpovědi (22).

## Krvácení

S krvácivými komplikacemi se v průběhu terapie setkáváme až u poloviny pacientů. Asi v 5 % jde o závažné krvácení (stupeň 3–4), které je ve většině případů provázené traumatem (14, 15) a konkomitantním užíváním antiagregační nebo antikoagulační léčby (23). Poraněním cévní stěny se obnaží kolagen, na

**Tab. 3.** Dávkovací schéma v indikacích schválených v České republice k roku 2016

Diagnóza	Dávka	Délka užívání
<b>Chronická B-lymfocytární leukemie</b>	420 mg p.o. jednou denně	kontinuálně ve 28denním cyklu do progresse onemocnění nebo nepříjemné toxicity
<b>Lymfom z plášťových buněk</b>	420 mg p.o. jednou denně	kontinuálně ve 28denním cyklu do progresse onemocnění nebo nepříjemné toxicity
<b>Waldenströмова makroglobulinemie</b>	560 mg p.o. jednou denně	kontinuálně ve 28denním cyklu do progresse onemocnění nebo nepříjemné toxicity

Vysvětlivky: p. o. – perorální

**Tab. 4.** Úprava dávkování po odeznění nehematologické toxicity a hematologické toxicity

Nežádoucí účinek	Chronická B-lymfocytární leukemie/lymfom z plášťových buněk	Waldenströмова makroglobulinemie
<b>1. epizoda</b>	420 mg p.o. jednou denně	560 mg p.o. jednou denně
<b>2. epizoda</b>	280 mg p.o. jednou denně	420 mg p.o. jednou denně
<b>3. epizoda</b>	140 mg p.o. jednou denně	280 mg p.o. jednou denně
<b>4. epizoda</b>	Vysadit	Vysadit

Vysvětlivky: p. o. – perorální

*Komentář:* Přerušení léčby je indikované při každém novém výskytu nebo zhoršení nehematologické toxicity stupně  $\geq 3$  a hematologické toxicity stupně  $\geq 4$ . Po ústupu nežádoucích účinků na stupeň 1 nebo při úplném uzdravení může být léčba obnovena v počáteční dávce. Při další recidivě nežádoucího účinku je indikovaná redukce denní dávky o 140 mg, při nedostatečném efektu lze zvážit další snížení dávky o 140 mg. Pokud nežádoucí účinky přetrvávají nebo recidivují, ibrutinib je nutné vysadit.

**Tab. 5.** Doporučená úprava dávkování při současném užívání inhibitorů cytochromu CYP3A4

	Účinná látka	Úprava dávkování
<b>Silný inhibitor CYP3A4</b>	ketokonazol, indinavir, nelfinavir, ritonavir, sachinavir, klarithromycin, telithromycin, itrakonazol, nefazodon, kobicistat	vysadit inhibitor CYP3A4/ ibrutinib 140 mg jednou denně pokud nelze inhibitor CYP3A4 vysadit/ ibrutinib dočasně vysadit (po dobu 7 dnů nebo méně)
<b>Středně silný inhibitor CYP3A4</b>	vorikonazol, erythromycin, amprenavir, aprepitant, atazanavir, ciprofloxacin, krizotinib, darunavir, ritonavir, diltiazem, flukonazol, fosamprenavir, imatinib, verapamil, amiodaron, dronedaron, grepfruitová šťáva, pomeranč	vysadit inhibitor CYP3A4/ ibrutinib 140 mg jednou denně po celou dobu užívání inhibitoru CYP3A4
<b>Slabý inhibitor CYP3A4</b>	azythromycin, fluvoxamin	není indikovaná redukce
<b>Induktory CYP3A4</b>	rifampicin, karbamazepin, fenytoin, třezalka tečkovaná	vysadit induktor CYP3A4/ pokud nelze vysadit sledovat trvání/ ztrátu účinku léčby

*Komentář:* Současné užívání inhibitoru CYP3A4 zvyšuje expozici ibrutinibu. U slabých inhibitorů bylo prokázáno zvýšení plochy pod křivkou (AUC)  $< 2$ krát, u středně silných inhibitorů 5–9krát, u silných inhibitorů 14–24krát. Současné užívání induktorů CYP3A4 snižuje účinek ibrutinibu. U silných induktorů – rifampicin bylo prokázáno snížení AUC o 90%.

který se pomocí von Willebrandova faktoru (VWF) vážou trombocyty svými glykoproteinovými (GP) receptory. Součástí signální dráhy jednoho z receptorů, GPVI, je BTK a protein-tyrozin kináza Tec. Aktivita obou kináz je při terapii ibrutinibem nižší, v důsledku čeho dochází k poruše agregace trombocytů (primární hemostáze) (24, 25) a oslabená je i vazba trom-

bocytů s VWF (26). Akutní komplikace vyžadující urgentní zásah by měly být zvládnuté substitucí trombokoncentrátem a přerušením léčby (12). U plánovaných intervenčních zákroků je třeba počítat s úpravou primární hemostázy do 3–5 dnů od vysazení ibrutinibu. Závažné krvácivé projevy jsou limitujícím faktorem pro pokračování v léčbě (26).

## Fibrilace síní

Fibrilace síní se vyskytuje u všech skupin testovaných pacientů a v průměru postihuje 3,5–6,5% (stupeň 3–4) nemocných s CLL, MCL a WM (14, 15, 16, 17, 18, 27). Příčina vzniku je pravděpodobně v inhibici intracelulární signální dráhy PI3k-AKT v kardiomyocytech (28–30). Kardioprotektivní izoforma PI3k (fosfatidylinositol-3-fosfatázy) je přítomná v srdeční tkáni osob se sinusovým rytmem a u pacientů s atakou fibrilace síní je její aktivita menší (29, 30). Antikoagulační léčba je limitovaná častou trombocytopenií doprovázenou krvácivými komplikacemi. Současné užívání antagonistů vitamínu K a ibrutinibu je kontraindikováno a pacienti jsou ve většině případů léčeni nízkomolekulárním heparinem. Fibrilace síní je komplikací, která vyžaduje přerušování a v některých případech i ukončení terapie.

## Rezistence

Příčinou primární rezistence vůči ibrutinibu, pozorované u 13–43% pacientů (14, 31), jsou pravděpodobně mutace v kinázách signálních drah distálně od BTK (MAPK, PI3K) (32). Sekundární rezistence (15) vzniká v různě dlouhém období po primární odpovědi přibližně u 30% pacientů. Příčiny mohou být různé. U CLL byly pozorovány mutace na úrovni spojení cysteinu se serinem (C481S) ve vazebném místě BTK (33) a/nebo mutace fosfolipázy  $\text{C}\gamma 2$  (PLC $\gamma 2$ ) (33, 34). Za získanou rezistenci u MCL je zodpovědná mutace C481S (35), zatímco u WM rezistentní k ibrutinibu byly pozorovány změny v receptoru CXCR4 (36) a u difúzního velkobuněčného lymfomu z aktivovaných B-buněk (ABC DLBCL) defekt proteinu CARD11 (37). V důsledku uvedených změn dochází buď k ireverzibilní vazbě ibrutinibu na BTK (enzym není kompletně blokován a zachovává si částečnou funkci), nebo jsou signální dráhy maligních buněk aktivované nezávisle na funkci BTK (33). K překonání rezistence se nabízí využití molekul vážících se na jiné místo BTK nebo inhibice jiné kinázy. Účinné mohou být i Bcl-2 inhibitory nebo jejich kombinace s inhibitory B buněčného receptoru (38).

## Klinické využití

Ibrutinib je zatím nejúčinnějším iBCR v terapii hematologických onemocnění. Oficiální součástí klinické praxe se stal v roce 2013, kdy byl Food and Drug Administration registrován k terapii MCL pro pacienty s minimálně jednou předchozí léčebnou linií. K rozšíření indikací do-

šlo v roce 2014, kdy se ibrutinib stal lékem volby pro relabující nebo refrakterní (R/R) CLL s delecí krátkého raménka chromozomu 17 (del17p) nebo mutací TP53. O dva roky později došlo ke zrušení omezení vztahujícího se na přítomnost del17p nebo mutaci TP53 a rovněž byl schválen k terapii CLL v první linii. V meziobdobí, v roce 2015, Food and Drug Administration umožnila jeho užívání v léčbě WM. V České republice je ibrutinib schválen v terapii R/R CLL/SLL a jako primární léčba pro pacienty s del17p nebo mutací TP53. Dalšími indikacemi jsou R/R MCL a R/R WM a u WM i léčba první linie pacientů, kteří nejsou schopni podstoupit chemoimunoterapii.

První publikovaná data uveřejnily výsledky studie fáze I, ve které bylo 56 pacientů s různými typy R/R B lymfoproliferativních onemocnění (NHL, CLL, SLL, MM, WM). Léčebná odpověď (ORR) se hodnotila u 50 z nich. Na terapii zareagovalo 60% (30/50) a 16% (8/50) dosáhlo kompletní remise (CR). Medián přežití bez progresu (PFS) byl 13,6 měsíce. Léčba se zahajovala dávkou 2,5 mg/kg jednou denně a postupně se navyšovala do dosažení 12,5 mg/kg v jedné denní dávce. Maximální tolerovatelná dávka dosažena nebyla. Nežádoucí účinky se objevily přibližně u 10% pacientů, ve většině případů byly nezávažné (stupeň 1–2) a nezávislé od dávky. Nejčastěji se jednalo o únavu, respirační infekce, kašel, průjem, nauzeu (12). Na základě uvedených výsledků je ibrutinib dále testován v monoterapii, v kombinovaných režimech s monoklonální protilátkou, chemoterapií a novými molekulami.

## Chronická lymfocytární leukemie

Jde o nejčastější leukemii dospělého věku, při které dochází k akumulaci zralých B-lymfocytů periferní krvi, kostní dřeni a sekundárních lymfatických orgánech (9). I když se řadí mezi indolentní onemocnění, průběh a prognóza jsou ovlivněny přítomností genetických aberací (39, 40). Chronická lymfocytární leukemie zatím není vyléčitelné onemocnění, ale dostupná léčba umožňuje dosažení různě dlouho trvajících remisí.

## Monoterapie

Na základě prokázaného efektu v první studii byla iniciovaná fáze I/II pro pacienty s R/R CLL/SLL (průměrně 4 předchozí léčebné linie). Pacienti byli rozděleni do dvou skupin. V první

byl ibrutinib aplikován v dávce 420 mg a v druhé v dávce 840 mg jednou denně. Délka léčebné odpovědi nezávisela na dávce ani přítomnosti prognosticky nepříznivých ukazatelů (del17p, del11, nemutovaný IGVH). Celkové přežití (OS) ve 26 měsících bylo 83% a PFS 75%. V obou skupinách odpovědělo na léčbu 71% (60/85). Maximální tolerovatelná dávka dosažena nebyla a na základě srovnatelné léčebné odpovědi se ve studiích fáze III (léčba první linie i R/R CLL/SLL) používá dávka 420 mg jednou denně, a to v monoterapii i kombinovaných režimech (14).

Studie fáze II, RESONATE™-17, vznikla pro vysoce rizikovou skupinu s del17p nebo mutací TP53 s relabovaným nebo refrakterním onemocněním. Přežití bez progresu ve 12. měsíci dosáhlo 79,3% (114/144) a na léčbu odpovědělo 82,6% (119/144) (41).

V další studii fáze I/II byl ibrutinib podáván jako léčba první linie starším pacientům (nad 65 let). V úvodu byli pacienti rozděleni do dvou skupin (420 mg vs. 840 mg jednou denně), ale díky prokázanému efektu z předchozí studie se krátce po zahájení pokračovalo u všech v aplikaci 420 mg. Přežití bez progresu a celkové přežití hodnocené ve dvou letech bylo 96,3% a 96,6%. Na léčbu reagovalo 71% (22/31) pacientů a 13% (4/71) dosáhlo CR (16).

V randomizované studii fáze III, RESONATE (ibrutinib vs. ofatumumab) určené pro pacienty s R/R CLL, dosáhl ibrutinib signifikantně lepší výsledky. Ibrutinib ve srovnání s ofatumumabem prodloužil medián PFS (nedosažen vs. 8,1 měsíce) a zlepšil roční celkové přežití (90% vs. 81%). Na léčbu zareagovalo 63% (122/195) vs. 4% (8/196) pacientů, všechny odpovědi byly PR. Nemocní s nepříznivými cytogenetickými změnami (57%) měli srovnatelné výsledky s pacienty s nízkým rizikem (15).

Ibrutinib jako léčba první linie byl srovnáván s chlorambucilem v monoterapii ve studii fáze III, RESONATE™-2. Terapie iBTK zlepšila dvouleté přežití na 98% vs. 85% a při sledování na začátku 19. měsíce medián PFS nebyl dosažen vs. 18,9 měsíce. Z 269 pacientů nad 65 let odpovědělo na léčbu 85% (116/136) vs. 36% (48/133) v rámci s chlorambucilem (16).

## Kombinované režimy

Studie fáze II pro vysoce rizikovou skupinu CLL testuje kombinaci ibrutinibu a rituximabu (monoklonální protilátka anti-CD20). Publikovaná



data uvádí OS 84 % (v 18. měsíci), ORR 95 % (38/40) a CR 8 % (3/40) (27). Pro další hodnocení je nutné podrobnější a delší sledování srovnávající in vitro účinek. Existují projekty, ve kterých byl efekt těchto dvou léků protichůdný (42).

Výsledky studie fáze III, HELIOS, byly publikované na základě interní analýzy v roce 2015. Konvenční chemoimunoterapie, bendamustin plus rituximab (BR), je srovnávána s kombinací ibrutinibu plus BR. U pacientů s R/R CLL došlo k prodloužení PFS (79 vs. 24 % v 18. měsíci). Na léčbu reagovalo 83 % (240/289) vs. 68 % (197/289) a CR dosáhlo 10 % (29/289) vs. 3 % (9/289) (43).

## Lymfom z buněk pláštové zóny

Kromě CLL je efekt ibrutinibu dobře prozkoumán především u MCL a WM. V registrační studii pro MCL (fáze 2) v souboru 111 nemocných s R/R onemocněním s mediánem 3 předešlých linií léčby vedla léčba ibrutinibem v dávce 560 mg denně k celkové léčebné odpovědi u 67 % (75/111) (kompletní remise u 21 %) s mediánem trvání odpovědi 17,5 měsíce. 2leté přežití bez progresu a celkové přežití bylo 31 % (33/111) resp. 47 % (52/111), až 20 % pacientů bylo úspěšně léčeno déle než 2 roky (18, 44).

## Waldenströmová makroglobulinemie

Ve studii fáze II u 63 nemocných s relabující nebo refrakterní WM (medián předešlého počtu linií = 2) vedla monoterapie ibrutinibem 420 mg/den k celkové odpovědi u 91 % (16 % velmi dobrá parciální remise, 57 % PR, 17 % minimální léčebná odpověď, 0 % CR). Dosažené léčebné odpovědi byly nezávislé na věku, pohlaví, celkovém stavu (performance status), hodnotě mezinárodního prognostického indexu pro WM (IPSSWM), počtu předešlých linií i klinické situaci (relabující versus refrakterní nemoc). Odhadované PFS a OS ve 2 letech bylo 69 % resp. 95 % (17).

## LITERATURA

- Sanford JP, Favour CB, Tribeman MS. Absence of serum gamma globulins in an adult. *N Engl J Med.* 1954; 250(24): 1027–1029.
- Tsakada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *1993. J Immunol Baltim Md* 1950. 2012; 188(7): 2936–2947.
- Fegan C, Bagshawe J, Salles G, Karlin L, Rule S, Shah N, et al. The Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor ONO-4059: Promising Single Agent Activity and Well Tolerated in Patients with High Risk Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL). *Blood.* 2014; 124(21): 3328–3328.

Dosahované léčebné výsledky u WM závisí na přítomnosti resp. absenci mutací 2 základních genů – MYD88 (pro WM je typická mutace MYD88 L265P) a CXCR4 WHIM. Nejvyšší odpovědi jsou dosahované ve skupině pacientů s mutací MYD88 L265P bez současné mutace CXCR4 (ORR 100 %, CR + VGPR + PR u 91 %) následované skupinou s mutací MYD265P a současně mutací CXCR4 WHIM (86 % a 62 %), nejnižší odpovědi byly pozorovány u pacientů s nemutovaným MYD88 i CXCR4 (43 % a 0 %) (17).

V předběžném hodnocení výsledků studie INNOVATE u 31 předléčených pacientů (počet předešlých linií  $\geq 3$  u 68 % pacientů) s relapsem WM refrakterních k rituximabu byla při průměrné délce sledování 7,7 měsíce léčebná odpověď dosažena u 84 % pacientů (PR a lepší až u 65 %) (45).

## Difuzní velkobuněčný B-lymfom

Difuzní velkobuněčný B-lymfom je nejčastějším typem maligního lymfomu v západním světě. Jedná se o heterogenní klinickou jednotku s 2 hlavními molekulárními podtypy – ABC subtyp (subtyp z aktivovaných B-buněk) a GCB subtyp (subtyp z buněk germinálního centra) s odlišným profilem genové exprese. Aktivita signalizační dráhy BCR včetně BTK je charakteristická pro ABC subtyp.

Ve studii fáze I/II vedla monoterapie ibrutinibem 560 mg denně u R/R DLBCL k celkové odpovědi u 37 % (14/38) pacientů s ABC DLBCL (CR u 16 %). Pozorovaný medián PFS byl ovšem krátký, pouze 2,02 měsíce, nicméně 4 pacienti s dosaženou CR setrvávají v remisi déle než rok. Léčebná odpověď závisí na profilu genových aberací – nejvyšší celková odpověď byla pozorovaná u pacientů se současně prokázanou mutací MYD88 i CD79b (80 %; 4/5), pacienti s mutací CD79b bez mutace MYD88 odpovídali v 55,5 % (5/9), naproti tomu pacienti s mutací MYD88 bez

mutace CD79b neodpovídali na terapii vůbec (0 %; 0/7).

Přínos ibrutinibu v kombinaci se standardní imunochemoterapií R-CHOP u DLBCL je předmětem probíhající klinické studie. V další probíhající studii se ibrutinib v kombinaci s rituximabem jeví jako potenciálně zajímavá možnost léčby první linie i u folikulárního lymfomu (46) a dále v kombinačním režimu i pro léčbu relapsu primárních CNS lymfomů (47).

## Mnohočetný myelom

Cytotoxická aktivita ibrutinibu na zhoubné plazmatické buňky byla prokázána in vitro (47). V klinické praxi proběhla studie fáze I/II, ve které byla zjištěna jen minimální účinnost ibrutinibu (4 % PR). Aktuálně běží několik studií fáze II pro relabované nebo refrakterní onemocnění s kombinovanými režimy (ibrutinib plus dexametazon, ibrutinib plus pomalidomid plus dexametazon, ibrutinib plus bortezomib plus dexametazon, ibrutinib plus carfilzomib) (NCT01478581, NCT02548962, NCT02902965, NCT01962792).

## Závěr

Cílená terapie ibrutinibem významně rozšiřuje současné možnosti léčby CLL i dalších B-lymfoproliferativních onemocnění. Vysoká efektivita při současně poměrně příznivém profilu toxicity a odlišný mechanismus účinku ve srovnání s konvenční chemoterapií umožňují léčbu a zlepšení prognózy i u pacientů nevhodných nebo refrakterních k chemoterapii, včetně vysoce rizikových pacientů s porušenou funkcí tumor supresorového genu TP53. Přes nesporný efekt se nejedná ale o léčbu kurativní. Možnosti dalšího zlepšení výsledků léčby využitím preparátů v kombinačních režimech jako i vývoj nových inhibitorů BTK jsou předmětem klinického výzkumu.

- inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia.* 2014; 28(3): 649–657.
- Buggy JJ, Elias L. Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. *Int Rev Immunol.* 2012; 31(2): 119–132.
- Burger JA. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape. *Curr Opin Oncol.* 2012; 24(6): 643–649.
- Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci.* 2010; 107(29): 13075–13080.



11. Ponader S, Chen S-S, Buggy JJ, Balakrishnan K, Gandhi V, Wierda WG, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood*. 2012; 119(5): 1182–1189.
12. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, et al. Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) Has Significant Activity in Patients With Relapsed/Refractory B-Cell Malignancies. *J Clin Oncol*. 2013; 31(1): 88–94.
13. Cameron F, Sanford M. Ibrutinib: first global approval. *Drugs*. 2014; 74(2): 263–271.
14. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013; 369(1): 32–42.
15. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2014; 371(3): 213–223.
16. O'Brien S, Furman RR, Coutre SE, Sharman JP, Burger JA, Blum KA, et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol*. 2014; 15(1): 48–58.
17. Treon SP, Tripsas CK, Meid K, Warren D, Varma G, Green R, et al. Ibrutinib in previously treated Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2015; 372(15): 1430–1440.
18. Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2013; 369(6): 507–516.
19. Woyach JA, Smucker K, Smith LL, Lozanski A, Zhong Y, Ruppert AS, et al. Prolonged lymphocytosis during ibrutinib therapy is associated with distinct molecular characteristics and does not indicate a suboptimal response to therapy. *Blood*. 2014; 123(12): 1810–1817.
20. Rossi D, Gaidano G. Lymphocytosis and ibrutinib treatment of CLL. *Blood*. 2014; 123(12): 1772–1774.
21. Herman SEM, Niemann CU, Farooqui M, Jones J, Mustafa RZ, Lipsky A, et al. Ibrutinib-induced lymphocytosis in patients with chronic lymphocytic leukemia: correlative analyses from a phase II study. *Leukemia*. 2014; 28(11): 2188–2196.
22. Cheson BD, Byrd JC, Rai KR, Kay NE, O'Brien SM, Flinn IW, et al. Novel Targeted Agents and the Need to Refine Clinical End Points in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2012; 30(23): 2820–2822.
23. Jones JA, Hillmen P, Coutre S, Tam C, Furman RR, Barr PM, et al. Pattern of Use of Anticoagulation and/or Antiplatelet Agents in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Treated with Single-Agent Ibrutinib Therapy. *Blood*. 2014; 124(21): 1990–1990.
24. Atkinson BT, Ellmeier W, Watson SP. Tec regulates platelet activation by GPVI in the absence of Btk. *Blood*. 2003; 102(10): 3592–3599.
25. Quek LS, Bolen J, Watson SP. A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. *Curr Biol CB*. 1998; 8(20): 1137–1140.
26. Levade M, David E, Garcia C, Laurent P-A, Cadot S, Michallet A-S, et al. Ibrutinib treatment affects collagen and von Willebrand factor-dependent platelet functions. *Blood*. 2014; 124(26): 3991–3995.
27. Burger JA, Keating MJ, Wierda WG, Hartmann E, Hoellnriegel J, Rosin NY, et al. Safety and activity of ibrutinib plus rituximab for patients with high-risk chronic lymphocytic leukaemia: a single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2014; 15(10): 1090–1099.
28. McMullen JR, Amirahmadi F, Woodcock EA, Schinke-Braun M, Bouwman RD, Hewitt KA, et al. Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110α) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104(2): 612–617.
29. McMullen JR, Boey EJH, Ooi JYY, Seymour JF, Keating MJ, Tam CS. Ibrutinib increases the risk of atrial fibrillation, potentially through inhibition of cardiac PI3K-Akt signaling. *Blood*. 2014; 124(25): 3829–3830.
30. Pretorius L, Du X-J, Woodcock EA, Kiriazis H, Lin RCY, Marasco S, et al. Reduced phosphoinositide 3-kinase (p110α) activation increases the susceptibility to atrial fibrillation. *Am J Pathol*. 2009; 175(3): 998–1009.
31. Zhang SQ, Smith SM, Zhang SY, Lynn Wang Y. Mechanisms of ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukaemia and non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2015; 170(4): 445–456.
32. Woyach JA, Johnson AJ. Targeted therapies in CLL: mechanisms of resistance and strategies for management. *Blood*. 2015; 126(4): 471–477.
33. Woyach JA, Furman RR, Liu T-M, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med*. 2014; 370(24): 2286–2294.
34. Zhou Q, Lee G-S, Brady J, Datta S, Katan M, Sheikh A, et al. A hypermorphic missense mutation in PLCG2, encoding phospholipase Cγ2, causes a dominantly inherited auto-inflammatory disease with immunodeficiency. *Am J Hum Genet*. 2012; 91(4): 713–720.
35. Chiron D, Di Liberto M, Martin P, Huang X, Sharman J, Bleuca P, et al. Cell-cycle reprogramming for PI3K inhibition overrides a relapse-specific C481S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma. *Cancer Discov*. 2014; 4(9): 1022–1035.
36. Cao Y, Hunter ZR, Liu X, Xu L, Yang G, Chen J, et al. The WHIM-like CXCR4(S338X) somatic mutation activates AKT and ERK, and promotes resistance to ibrutinib and other agents used in the treatment of Waldenström's Macroglobulinemia. *Leukemia*. 2015; 29(1): 169–176.
37. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010; 463(7277): 88–92.
38. Cervantes-Gomez F, Lamothe B, Woyach JA, Wierda WG, Keating MJ, Balakrishnan K, et al. Pharmacological and Protein Profiling Suggests Venetoclax (ABT-199) as Optimal Partner with Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015; 21(16): 3705–3715.
39. Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 8(1): 38–47.
40. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, Kantorova B, Pavlova S, Tom N, et al. Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015; 29(4): 877–885.
41. O'Brien S, Jones JA, Coutre S, Mato AR, Hillmen P, Tam C, et al. Efficacy and Safety of Ibrutinib in Patients with Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia or Small Lymphocytic Leukemia with 17p Deletion: Results from the Phase II RESONATEM-17 Trial. *Blood*. 2014; 124(21): 327–327.
42. Da Roit F, Engelberts PJ, Taylor RP, Breij ECW, Gritti G, Rambaldi A, et al. Ibrutinib interferes with the cell-mediated anti-tumor activities of therapeutic CD20 antibodies: implications for combination therapy. *Haematologica*. 2015; 100(1): 77–86.
43. <https://www.njn.com/news/all/Ibrutinib-IMBRUVICA-HELIOS-Interim-Analysis-Study-Data-Show-Significant-Reductions-in-Risk-of-Progression-or-Death-in-Patients-with-Previously-Treated-Chronic-Lymphocytic-Leukemia>.
44. Wang ML, Blum KA, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, et al. Long-term follow-up of MCL patients treated with single-agent ibrutinib: updated safety and efficacy results. *Blood*. 2015; 126(6): 739–745.
45. Dimopoulos MA, Trotman J, Tedeschi A, Matous JV, Macdonald D, Tam C, et al. Ibrutinib Therapy in Rituximab-Refractory Patients with Waldenström's Macroglobulinemia: Initial Results from an International, Multicenter, Open-Label Phase 3 Substudy (iINNOVATEM). *Blood*. 2015; 126(23): 2745–2745.
46. Fowler N, Nastoupil L, Vos S de, Knapp M, Flinn IW, Chen R, et al. Ibrutinib Plus Rituximab in Treatment-Naive Patients with Follicular Lymphoma: Results from a Multicenter, Phase 2 Study. *Blood*. 2015; 126(23): 470–470.
47. Dunleavy K, Lai CE, Roschewski M, Brudno JN, Widemann B, Pittaluga S, et al. Phase I Study of Dose-Adjusted-Teddi-R with Ibrutinib in Untreated and Relapsed/Refractory Primary CNS Lymphoma. *Blood*. 2015; 126(23): 472–472.
48. Tai Y-T, Anderson KC. Bruton's tyrosine kinase: oncotarget in myeloma. *Oncotarget*. 2012; 3(9): 913–914.

# Dabigatran – klinické důkazy pro léčbu pacientů s TEN

doc. MUDr. Tomáš Kvasnička, CSc

Trombotické centrum, ÚLBLD, VFN a 1. LF UK Praha

Tromboembolická nemoc (TEN) je díky své incidenci, morbiditě a mortalitě významným celosvětovým socioekonomickým problémem. Antitrombotická prevence a léčba představují jednu z nejrozšířenějších oblastí v současné medicíně. TEN patří stále k nejčastějším příčinám mortality i morbidity. V současnosti jsou v této oblasti využívány hepariny, pentasacharidy a warfarin. Ten je i přes svůj nepochybný efekt lékem problematickým, zejména pro svoji interindividuální variabilitu účinku, riziko lékových i potravinových interakcí a úzké terapeutické okno. Vývoj nových, perorálně účinných antikoagulancií (NOAC) se zaměřil zejména na přímé inhibitory trombinu a přímé inhibitory faktoru Xa. Z prvé skupiny je pro klinické užití, v několika indikacích, schválen v České republice (ČR) dabigatran etexilát (Pradaxa).

**Klíčová slova:** Pradaxa, dabigatran etexilát, tromboembolická nemoc, fibrilace síní.

## Dabigatran – clinical evidence for treatment in patients with thromboembolism

Venous thromboembolism (VTE) is due to its incidence, morbidity and mortality an important global socioeconomical problem. Antithrombotic prevention and treatment are one of the most common areas in moderne medicine. TEN is still the frequent causes of mortality and morbidity. We are currently used in this field heparins, pentasaccharide and warfarin. Warfarin despites undoubted effect, especially for its interindividual variability, the risk of drug and food interactions and a narrow therapeutic window. The development of new, effective oral anticoagulants (NOAC) focused mainly on direct thrombin inhibitors and direct factor Xa inhibitor. From the first group is used in several indications in the Czech Republic dabigatran etexilate (Pradaxa).

**Key words:** Pradaxa, dabigatran etexilate, thromboembolic disease, atrial fibrillation.

## Úvod

Tromboembolická nemoc (TEN) je třetí nejčastější příčinou kardiovaskulárního úmrtí, po infarktu myokardu a ischemické cévní mozkové příhodě, a představuje časté a nákladné onemocnění, které je spojené s vysokou morbiditou a mortalitou v zemích Evropské unie a Severní Ameriky. Za normálních okolností vykazuje systém krevního srážení rovnovážný stav a udržuje tok krve v uzavřeném cévním systému. V případě nadměrného srážení se uplatňují antitrombotická opatření, která se liší podle toho, zda jde o postižení tepenného, nebo žilního systému. Správnou léčbou a prevencí můžeme TEN i předcházet (1). Dnes používaná antikoagulancia v ČR můžeme dle jejich účinku dělit na 4 základní skupiny:

1. hepariny (nefrakcionovaný standardní heparin a nízkomolekulární hepariny, LMWH, low molecular weight heparin) a selektivně působící inhibitor aktivovaného F Xa syntetický pentasacharid fondaparinux, aplikované injekčně,
2. kumarinové preparáty (antagonisté vitamínu K), používané per os, u nás warfarin,
3. přímé inhibitory trombinu – hirudin a podobné látky (např. bivalirudin), s injekční nebo perorální formou podání,
4. perorální přímé inhibitory faktoru Xa (rivaroxaban, *Xarelto* a apixaban, *Eliquis*) a trombinu (dabigatran etexilát, *Pradaxa*). Léky ve třetí a čtvrté skupině řadíme mezi přímé inhibitory koagulačních faktorů, protože

ke své aktivitě (s výjimkou idraparinu) nepotřebují kofaktory a působí selektivně v místě koagulační kaskády (2).

## Dabigatran etexilát (Pradaxa)

Dabigatran etexilát (Pradaxa, Boehringer-Ingelheim) byl schválen Evropskou komisí k uvedení na trh 27. 3. 2008. Je v současnosti jediným dostupným perorálním přímým reverzibilním inhibitorem trombinu na trhu (3). Dabigatran etexilát je chemicky ethyl-3-[[[2-[[[4-(N'-[[hexyloxy]karbonyl]karbamimidoyl]fenyl)amino]methyl]-1-methyl-1H-benzimidazol-5-yl]karbonyl] (2-pyridinyl)amino]propanoát. Sumární vzorec:  $C_{34}H_{41}N_7O_5$  (etexilát). Molekulová hmotnost dabigatran etexilátu je 627,734 g/mol a dabigatranu

471,511 g/mol. Jeho účinnost byla porovnáвана s enoxaparinem v programu REVOLUTION, kde měl srovnatelný efekt v primární prevenci a léčbě TEN po náhradách kolenních a kyčelních kloubů. Na základě výše uvedených klinických studií je dabigatran indikován v prevenci žilního tromboembolizmu po elektivní náhradě kolenního a kyčelního kloubu. S přípravkem proběhly i další studie, které jsou pak podkladem dalších indikací (RECOVER – léčba akutní TEN, REMEDY + RESONATE – sekundární prevence TEN). Nejrozšířenější indikací antikoagulancií je profylaxe tromboembolických mozkových příhod u nemocných s fibrilací síní. Více než 18 000 pacientů s fibrilací síní bylo zařazeno do studie RE-LY, kde byl porovnán efekt dvou dávek dabigatranu (110 mg nebo 150 mg dvakrát denně) s warfarinem (4). Na základě výsledků této významné studie pak byl dabigatran 1. 8. 2011 schválen EMA pro indikaci prevence cévní mozkové příhody a systémové embolie u určitých skupin dospělých pacientů s nevalvulární fibrilací síní.

## Mechanismus účinku, farmakodynamika, farmakokinetika

Dabigatran etexilát je proléčivo o malé molekule, které nevykazuje žádnou farmakologickou aktivitu. Po perorálním podání se dabigatran etexilát rychle vstřebává a je v plazmě a v játrech konvertován na dabigatran cestou hydrolyzy katalyzované esterázou. Dabigatran je mocným kompetitivním, reverzibilním a přímým inhibitorem trombinu a je hlavním účinným činitelem v plazmě. Protože trombin (serinová proteáza) umožňuje v koagulační kaskádě přeměnu fibrinogenu na fibrin, jeho inhibice brání vzniku trombu. Dabigatran inhibuje také volný trombin, trombin navázaný na fibrin a agregaci krevních destiček navozenou trombinem (5).

Po perorálním podání je dabigatran etexilát rychle a úplně konvertován na dabigatran, který je účinnou formou v plazmě. Hydrolytické štěpení proléčiva dabigatran etexilátu, které je katalyzováno esterázou, na aktivní dabigatran představuje hlavní metabolickou reakci. Absolutní biologická dostupnost dabigatranu po perorálním podání je přibližně 6–7%. Absorpce dabigatranu je rychlá s dosažením vrcholových plazmatických koncentrací za 2 hodiny po podání léčivého přípravku. Vazba dabigatranu na plazmatické

bílkoviny je nízká (35%), nezávislá na koncentraci. Plazmatické koncentrace dabigatranu vykázaly biexponenciální pokles s průměrným terminálním poločasem 12–17 hodin. Dabigatran podléhá konjugaci, přičemž vznikají farmakologicky aktivní acylglukuronidy (6). Dabigatran je vylučován zejména (cca v 80%) v nezměněné formě močí, zbytek je vylučován biliárním systémem. U pacientů s těžkou poruchou funkce ledvin (ClCr < 30 ml/min) je léčba dabigatranem kontraindikována. U pacientů se středně těžkou poruchou funkce ledvin (ClCr 30–50 ml/min) existuje pouze omezená klinická zkušenost. Tito pacienti by měli být léčeni s opatrností a dávka dabigatranu by měla být ev. adekvátně snížena (7). Nemá interakci zprostředkovanou izoenzymy cytochromu P450, proto interakce s léky je minimální (mimo popsané současné aplikace s verapamilem, amiodaronem a chinidinem). Jen někdy dochází ke zvýšení sérových hladin. Pantoprazol, inhibitor protonové pumpy, naopak jeho účinek snižuje. Nebyla prokázána interakce s diklofenakem ani atorvastatinem. Nebyla potvrzena ani hepatální toxicita

## Indikace Pradaxy v České republice

1. Primární prevence žilních tromboembolických příhod u dospělých pacientů, kteří podstoupili elektivní totální náhradu kolenního kloubu (celková doba terapie 10 dní) nebo kyčelního kloubu (celková doba terapie 28–35 dní). Doporučená dávka Pradaxy je 220 mg jednou denně. Užívají se 2 tobolky po 110 mg. Perorální léčbu je třeba zahájit během 1–4 hodin po ukončení operace podáním jedné 110 mg tobolky, poté je nutno pokračovat 2 tobolkami jednou denně. Pro pacienty se středně těžkou poruchou funkce ledvin (clearance kreatininu /CrCL/ 30–50 ml/min) nebo u těch, co současně užívají slabé až středně silné inhibitory glykoproteinu P (P-gp), jako je amiodaron, chinidin nebo verapamil, nebo pacienti ve věku 75 let nebo starší je doporučována redukováná dávka Pradaxy 150 mg, užívaná jednou denně ve formě 2 tobolek o síle 75 mg. U obou typů operací platí, že pokud není zabezpečena hemostáza, je nutno zahájení léčby odložit. Pokud léčba není zahájena v den operace, pak je třeba ji zahájit podáním 2 tobolek jednou denně (8).

2. Prevence cévní mozkové příhody a systémové embolie u dospělých pacientů s nevalvulární fibrilací síní (NVFS), s jedním nebo více rizikovými faktory, jako je cévní mozková příhoda nebo tranzitorní ischemická ataka (TIA) v anamnéze; věk ≥ 75 let; srdeční selhání (NYHA třída ≥ II); diabetes mellitus; hypertenze. Doporučená denní dávka přípravku Pradaxa je 300 mg, která se užívá ve formě jedné tobolky po 150 mg dvakrát denně. Léčba musí být dlouhodobá. Redukovaná denní dávka přípravku Pradaxa 220 mg ve formě jedné tobolky o síle 110 mg dvakrát denně je doporučována pro pacienty ve věku 80 let nebo vyšším nebo současně užívají verapamil. Pro skupinu pacientů (věk 75–80 let, středně těžká porucha funkce ledvin, gastritida, ezofagitida nebo gastroezofageální reflux) by měla být zvolena denní dávka přípravku na základě individuálního posouzení rizika tromboembolie nebo rizika krvácení. U pacientů s nižším rizikem krvácení (HAS-BLED skóre 0 až 2) je vhodná vyšší a účinnější dávka 150 mg dvakrát denně, při vyšším riziku krvácení (HAS-BLED skóre ≥ 3) bezpečnější nižší dávka 2 × 110 miligramů (8, 9).

3. Léčba hluboké žilní trombózy (DVT) a plicní embolie (PE) a prevence rekurence DVT a PE. Doporučená denní dávka přípravku Pradaxa je 300 mg, která se užívá ve formě jedné 150 mg tobolky dvakrát denně následující po léčbě parenterálním antikoagulačním přípravkem (nejčastěji nízkomolekulárním heparinem, LMWH), která trvala nejméně 5 dní. Délku léčby je nutno stanovit individuálně po pečlivém posouzení přínosu léčby oproti riziku krvácení. Krátké trvání léčby (nejméně 12 týdnů) musí být zdůvodněno přítomností přechodných rizikových faktorů (například nedávným chirurgickým výkonem, traumatem, imobilizací), delší trvání léčby musí být zdůvodněno trvale přítomnými rizikovými faktory nebo diagnózou idiopatické DVT či PE. Pacienti ve věku 75 až 80 let mají být léčeni denní dávkou 300 mg užívanou ve formě jedné tobolky po 150 mg dvakrát denně. Podle rozhodnutí lékaře lze individuálně zvážit dávku 220 mg užívanou ve formě jedné tobolky po 110 mg dvakrát denně pokud je riziko tromboembolie nízké a riziko krvácení vysoké. Pacienti ve věku 80 let nebo vyšším musí být léčeni denní dávkou

220 mg užívanou ve formě jedné tobolky po 110 mg dvakrát denně z důvodu zvýšeného rizika krvácení u této populace (8).

## Laboratorní kontrola léčby dabigatranem

Ovlivnění koagulace dabigatranem lze v mimořádných situacích laboratorně monitorovat, jinak to během běžné léčby opět není třeba. Přibližný údaj o intenzitě antikoagulačního účinku dabigatranu poskytuje test aPTT, který je snadno dostupný. Je užitečný zejména k detekci nadměrné antikoagulační aktivity dabigatranu. Výsledek testu aPTT > 80 sekund nebo dvojnásobek ULN je v okamžiku „minimální“ koncentrace dabigatranu (tj. v okamžiku, kdy má být podána jeho další dávka) spojen se zvýšeným rizikem krvácení. V případě potřeby by měly být provedeny citlivější kvantitativní testy, jako je kalibrovaný ředěný (dilutovaný) trombinový test se setem HemoClot Thrombin Inhibitors® (Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, Francie). Ke stanovení aktivity dabigatranu lze také použít tzv. ekarínový test (ECT), který je považován za poměrně specifický. Více než trojnásobek nor-

mální hodnoty ECT v době „minima“ účinku léku se opět považuje za indikátor hrozícího rizika krvácení.

## Specifické antidotum dabigatranu – Praxbind

Praxbind je specifický přípravek k reverzi účinku dabigatranu a je indikován u dospělých pacientů léčených přípravkem Pradaxa (dabigatran-etexilát) v situacích, kdy je třeba urychleně zvrátit jeho antikoagulační účinky:

1. při naléhavých chirurgických/urgentních výkonech,
2. při život ohrožujícím nebo nekontrolovaném krvácení.

Doporučená dávka přípravku Praxbind je 5 g ( $2 \times 2,5$  g/50 ml). Znovu zahájit antitrombotickou terapii Pradaxou lze 24 hodin po podání přípravku Praxbind, pokud je pacient klinicky stabilní a bylo dosaženo odpovídající hemostázy. Po podání přípravku Praxbind lze kdykoli zahájit jinou antitrombotickou terapii (např. nízkomolekulární heparin), pokud je pacient klinicky stabilní a bylo dosaženo odpovídající hemostázy (10, 11).

## Závěr

V posledních letech došlo k významnému zlepšení diagnostiky, léčby i prevenci TEN, přesto z mnoha příčin (zvýšování průměrného věku pacientů, nekompletní rozpoznání rizikových faktorů, nedostatečná tromboprotekce) přetrvává vysoký výskyt tohoto onemocnění. Zavedení nových perorálních antitrombotik, resp. antikoagulancií, patří k nejvýznamnějším pokrokům v oblasti farmakoterapie v posledních několika letech. Tato antikoagulancia mají přesně definovaný inhibiční účinek v koagulační kaskádě a jednotně stanovené dávkování. Dabigatran představuje perorálně podávaný přímý reverzibilní kompetitivní inhibitor trombinu, jehož předností je pohodlné a pravidelné dávkování. Při dodržování doporučeného dávkování není během léčby nutná laboratorní monitorace. Velkou výhodou jeho podávání v klinické praxi je nyní dostupnost jeho účinného antidota.

*Vypracováno za podpory projektu Ministerstva zdravotnictví RVO-VFN 64165.*

## LITERATURA

1. Kvasnička J, Kvasnička J. jr. Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi. Praha, nakl. Grada Publ., 2003: s. 300.
2. Ahrens I, et al. New oral anticoagulant drugs in cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 2010; 104: 49–60.
3. van Ryn J, Stangier J, Haertter S, et al. Dabigatran etexilate – a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 2010; 103: 1116–1127.
4. Connolly SJ, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009; 361: 1139–1151.

5. Stangier J, Rathgen K, Stähle H, et al. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 64: 292–303.
6. Stangier J, Stähle H, Rathgen K, Fuhr R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the direct oral thrombin inhibitor dabigatran in healthy elderly subjects. *Clin Pharmacokin* 2008; 47: 47–59.
7. Stangier J, Rathgen K, Stähle H, et al. Influence of renal impairment on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of

8. Eliquis. Souhrn údajů o přípravku. [www.sukl.cz](http://www.sukl.cz).
9. Čihák R, Haman L, Táborský M. Praktická doporučení European Heart Rhythm Association pro použití nových perorálních antikoagulancií u pacientů s nevalvulární fibrilací síní. *Cor Vasa* 2014; 56: e42–e56.
10. Schiele F, van Ryn J, Canada K, et al. A specific antidote for dabigatran: functional and structural characterization. *Blood* 2013; 121: 3554–3562.
11. Praxbind. Souhrn údajů o přípravku. [www.sukl.cz](http://www.sukl.cz).

# Koloidní stříbro a jeho biologická aktivita

**Renata Večeřová**

Ústav mikrobiologie LF UP v Olomouci

Práce ve své obecné části stručně shrnuje antimikrobiální potenciál stříbra, včetně historicky známých faktů, a charakterizuje jeho využití ve formě nanočástic v rámci koloidních systémů nebo jako součást nanokompozitů. Dále jsou shrnuty výsledky testů týkající se biologické aktivity koloidního stříbra provedené na Přírodovědecké fakultě a Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci. Konkrétně se jedná o antibakteriální a antifungální aktivitu nanočástic stříbra, testy cytotoxicity, synergický efekt nanočástic stříbra v kombinaci s vybranými antibiotiky, vývoj a testování nanokompozitů pro možné medicínské aplikace.

**Klíčová slova:** koloidní stříbro, nanočástice stříbra, antimikrobiální aktivita.

## Colloid silver and its biological activity

The theoretical part of this article summarizes the antimicrobial potential of silver, including well-known historical facts, and its application in the form of nanoparticles within colloidal systems or as a part of nanocomposites. The outcomes of biological activity of colloidal silver tested at the Faculty of Medicine and Dentistry and Faculty of Science, Palacky University Olomouc, are also summarized in this article. The tests undertaken were focused on silver nanoparticles and their antibacterial and antifungal activity, cytotoxicity and synergic effect with selected antibiotics, and the development and testing of nanocomposites with possible medical application.

**Key words:** colloid silver, silver nanoparticles, antimicrobial activity.

## Úvod

Vzrůstající rezistence bakterií ke stávajícím antimikrobiálním přípravkům představuje závažný problém ve zdravotnictví a infekce způsobené multirezistentními bakteriemi zvyšují nemocnost a úmrtnost pacientů z důvodu selhávání antibiotické léčby (1). Jednou z možností překonání bakteriální rezistence je využití a důkladné studium již známých látek s antibakteriálním účinkem. V současné době je v odborné literatuře velké množství informací zabývajících se účinkem koloidního stříbra. V databázi „Pubmed“ po zadání hesla „silver nanoparticles“ ke dni 22. 10. 2016 bylo nalezeno 10 146 odborných publikací mladších 10 let. Tato práce si neklade za cíl komplexní přehled publikovaných výsledků, cílem sdělení je blíže popsat příspěvek jedné pracovní skupiny z Univerzity Palackého v Olomouci k tomuto tématu.

## Stříbro a historie jeho použití v medicíně

Stříbro (latinsky Argentum, chemická značka Ag) je ušlechtilý kov bílé barvy používaný člověkem pro své antimikrobiální účinky již od starověku. Stříbrné nádoby se používaly k uchování potravin, do mléka a tekutin se vkládaly stříbrné mince pro prodloužení trvanlivosti. Používání stříbrných příborů mělo sloužit pro prevenci chorob. V 15. století se na stolech šlechty dokonce objevovaly slánky s mletým stříbrem, které se přidávalo do jídla. U privilegovaných šlechtických rodin používajících stříbrné nádoby se často vyvinulo šedo-modré zbarvení kůže, odtud označení „modrá krev“. Od konce 19. století se používala metoda tzv. kredeizace, tj. profylaktické opatření k zabránění hnisavé gonokokové konjunktivitidy novorozenců pomocí 1% roztoku  $\text{AgNO}_3$ . Počátkem 20. století se stříbro užívalo jako lék na různé druhy infekcí a chorob, ale také lokálně

na ošetření popálenin a léčení plísňových nákaz. S příchodem antibiotické éry používání stříbra v medicíně ustupovalo a používalo se pouze pro dezinfekci pitné vody nebo pro povrchové lokální ošetření ran přípravky s obsahem sulfo-diazinu stříbrného (2, 3).

Dnešní doba přináší renesanci používání stříbra pro medicínské i průmyslové aplikace. Příkladem jsou lokální přípravky k ošetření ran (náplasti, obvazový materiál), kosmetické přípravky, hygienické potřeby, roušky, textil a obuv, matrace nebo nátěrové hmoty. Biologickým vlastnostem stříbra je věnována velká pozornost. Intenzivně studované jsou zejména antimikrobiální vlastnosti a toxicita koloidního stříbra. Prokázaný antimikrobiální efekt koloidního stříbra je ve svém možném uplatnění omezen nežádoucími vedlejšími účinky. Při lokální aplikaci byly popsány reakce z přecitlivělosti. Dlouhodobé celkové i lokální užívání může vést



k ukládání stříbra a jeho solí do tkání. Výsledkem je nevratné šedomodré zbarvení – argyrie. Tyto nežádoucí účinky byly důvodem zákazu vnitřního užívání koloidního stříbra v rámci EU s platností od 1. 1. 2010 (2, 3, 4).

## Koloidní stříbro

Koloid je označení pro disperzní soustavu, ve které jsou rozptýlené částice o velikosti 1–500 nm. Koloidní částice v tomto rozmezí udělují danému systému unikátní vlastnosti, které se nevyskytují u částic jiných rozměrů. Tyto vlastnosti souvisí s malým rozměrem částic a velkou plochou jejich povrchu, charakterem fázového rozhraní a jeho interakcí s okolním prostředím (4). Koloidní stříbro je vyráběno ve formě vodní disperze. Obvykle se jedná o nanočástice stříbra o velikosti 5–100 nm. Nejužívanějšími metodami přípravy jsou chemické redukční metody, které použitím různých redukčních činidel a jejich koncentrací umožňují ovlivnění konečných vlastností nanočástic stříbra, jako je jejich velikost, tvar a povrchový náboj (5, 6). Nanočástice stříbra lze vyrobit také elektrochemickým procesem za použití stříbrných elektrod nebo syntetizovat pomocí různých mikroorganismů, např. enterobakterií, stafylokoků nebo vláknitých hub, které jsou zdrojem redukčních enzymů. Nevýhodou biologické výroby nanočástic je omezená možnost ovlivnění jejich vlastností (7, 8).

## Antimikrobiální účinky

Nanočástice stříbra jsou všeobecně považovány za látky s vysokým antibakteriálním účinkem (3–21). Antimikrobiální účinek nanočástic stříbra je dán jejich tvarem a velikostí, čím menší částice, tím vyšší antibakteriální efekt (20, 21). Ke stejným závěrům došli autoři studie zaměřené na srovnání antimikrobiálních vlastností nanočástic stříbra připravených chemickou redukcí modifikovaným Tollensovým procesem (5). Nanočástice stříbra o velikosti 25 nm redukované maltózou měly nejnižší hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC), a to v rozmezí 1,69–13,5 mg/l, přičemž aktivita částic redukovaných galaktózou o velikosti 50 nm byla nižší (MIC = > 54 mg/l) (5).

## Stabilita koloidního stříbra

Koloidní disperze stříbra jsou nestabilní a poměrně snadno dochází k jejich nevratné agregaci. Vzhledem k tomu, že velikost částic

má pro antibakteriální účinek i toxicitu klíčový význam, je nutná stabilizace velikosti částic a zábrana jejich agregace. Pro omezení těsného přiblížení jednotlivých částic se osvědčilo do disperze přidat povrchové aktivní látky a polymery, které se adsorbují na povrchu částic a vytváří tenkou povrchovou vrstvu. Z použitých povrchově aktivních látek se pro stabilizaci částic o velikosti 25 nm nejlépe osvědčily SDS (Sodium dodecylsulfát) a Tween v 1% koncentraci. Z polymerů se osvědčil pouze polyvinylpyrrolidon s molekulovou hmotností 360 000 (10). Stabilizace nanočástic stříbra vedla ke snížení hodnot MIC zejména u grampozitivních bakterií (10).

## Antifungální aktivita

Panáček a kol. použili pro stanovení antifungální aktivity nanočástice stříbra o velikosti 25 nm připravené redukcí maltózou a stabilizované různými povrchově aktivními látkami (11). Inhibiční účinek stříbra byl u kvasinek silnější než u bakterií a MIC dosahovaly hodnot 0,1–1,69 mg/l. Ve většině případů se hodnota MIC nanočástic stříbra rovnala hodnotě MIC iontového stříbra (11).

## Nanočástice stříbra v kombinaci s antibiotiky

Za důležitou součást výzkumu lze považovat hodnocení synergického efektu nanočástic stříbra a antibiotik. Panáček a kol. prokázali, že nanočástice stříbra (v koncentraci nižší než jejich vlastní MIC) v kombinaci s jednotlivými antibiotiky snižují hodnotu MIC příslušných antibiotik a zesilují jejich účinnost. Například MIC ampicilinu pro *Escherichia coli* CCM 4225 byla  $\geq 64$  mg/l, MIC nanočástic stříbra 7,5 mg/l. Přidání nanočástic stříbra v koncentraci 2,5 mg/l snížilo MIC ampicilinu na 0,03 mg/l (13). V další studii byly do testování zahrnuty multirezistentní bakterie, včetně ESBL a KPC kmenů a i v tomto případě byl zaznamenán synergický efekt, který ve svém důsledku znamenal obnovení účinku testovaného antibiotika s výrazným snížením jeho MIC (14). Synergický účinek byl potvrzen také při použití fenotypových testů pro průkaz ESBL producentů. Kmen *Klebsiella pneumoniae* produkující ESBL se při kultivaci na agaru obsahujícím 5 mg/l nanočástic stříbra jeví jako citlivý k testovaným antibiotikům a produkce ESBL není zřejmá (14).

Synergické působení antibiotik a koloidního stříbra se jeví jako nadějně pro využití v medicíně. Pracuje s nízkými koncentracemi stříbra a tím minimalizuje rizika spojená s vedlejším toxickým efektem nanočástic.

## Magnetické nanokompozity oxidů železa a stříbra

Snížit možné vedlejší účinky nanočástic umožňuje jejich vazba na další složku. Při vazbě částic do velikosti 100 nm se jedná o nanokompozity (15–17). Magnetické nanokompozity, ve kterých jsou nanočástice stříbra vázány na oxidy železa magnetit a maghemit, si zachovávají antimikrobiální vlastnosti srovnatelné se samotnými nanočásticemi stříbra (15). Zároveň zůstaly beze změny i vynikající magnetické vlastnosti oxidů železa, což je důležité z hlediska aplikace, kdy mohou být připravené nanokompozity využity k cílenému směřování biologických účinků stříbra a následně odstraněny pomocí vnějšího magnetického pole (15).

## Nanokompozit Ag/PDDA-křemelina

Křemelina je běžně používána k filtracím v potravinářském průmyslu. Jedná se o lehký práškový materiál s velkým množstvím pórů o velikosti 10–200  $\mu$ m, které zachytí hrubé nečistoty a kvasinky, ale propustí bakterie. Nanesením nanočástic stříbra na křemelinu byl získán kompozit vhodný k mechanické i biologické filtraci a byla prokázána vysoká inhibiční i baktericidní aktivita (17). Vysoká stabilita nanokompozitu Ag/PDDA-křemelina spolu s výraznou baktericidní aktivitou i proti multirezistentním bakteriím představují dobré předpoklady pro využití nanokompozitu například k čištění kontaminovaných vod (17).

## Toxicita

Testy toxicity nanočástic stříbra na eukaryotické buňky byly provedeny na buněčné linii BJ lidských fibroblastů. Buněčná toxicita byla kvantifikována stanovením indexu LC<sub>50</sub> (lethality concentration), která udává koncentraci látky potřebnou k usmrcení 50% organismů. Nanočástice stříbra byly cytotoxické až při koncentracích převyšujících 30 mg/l, zatímco roztok AgNO<sub>3</sub> vykazoval cytotoxické účinky už při koncentracích 1 mg/l (11).

Test akutní toxicity byl rovněž proveden na eukaryotickém jednobuněčném organismu

trepka velká (*Paramecium caudatum*), který je dobře kultivovatelný v laboratorních podmínkách a vhodný pro mikroskopické pozorování toxických účinků. Test byl vyhodnocen pomocí hodnoty  $LC_{50}/1$  hodina. Nanočástice stříbra nevolaly akutní toxický účinek ani při koncentracích 25 mg/l, při této koncentraci přežily trepky déle než týden. Iontové stříbro usmrtilo všechny trepky okamžitě už při koncentraci 1 mg/l (22).

## In vitro hodnocení hemokompatibility stříbrných nanočástic v lidské krvi

Možným nežádoucím účinkem nanočástic stříbra při kontaktu s plazmou a krevními elementy je ovlivnění hemostázy. V této souvislosti byly hodnoceny hematologické parametry k posouzení kompatibility lidské krve a nanočástic stříbra. Na základě měření základních hematologických parametrů nebyly ve skupině krvi s koncentracemi stříbra 1 a 3 mg/l pozorovány významné změny (23). Koncentrace stříbra 30 mg/l indukovala hemolýzu erytrocytů, sekreci  $\alpha$ -granulí trombocytů, zvýšenou expresi CD11b na granulocytech, zvýšené koagulační faktory trombin-antitrombin IIIa a aktivaci komplementové kaskády (23).

## Závěr

WHO vyčíslila, že finanční náklady na léčbu infekcí způsobených rezistentními bakteriemi

100násobně překračují léčbu infekcí způsobených citlivými kmeny. Data publikovaná ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) odhadují, že každý rok zemře 25 000 lidí následkem infekcí vyvolaných rezistentními kmeny bakterií. Většina používaných antibiotik je známa ze 70.–80. let minulého století, protože vývoj nových antibakteriálních látek se za posledních 25 let výrazně zpomalil (1). Je tedy zřejmá nutnost využití všech možností antimikrobiálního účinku nových i známých látek, čili i stříbra a jeho nanočástic, a to i s rizikem možných vedlejších účinků (24). Antimikrobiální aktivita nanočástic stříbra byla laboratorně potvrzena množstvím publikací (3–21). Mechanismus účinku není přesně definován, předpokládá se postupné uvolňování účinných  $Ag^+$  iontů z povrchu nanočástic a jejich interakce s thiolovými skupinami proteinů, inaktivace bakteriálních enzymů, interakce s bakteriální stěnou (změna permeability), ovlivnění transportu elektrolytů, zábrana replikace DNA a tvorba reaktivních forem kyslíku (3, 12, 20). Koncentrace přesně definovaných nanočástic stříbra, při kterých jsou inhibovány bakterie, nepůsobí cytotoxicky na lidské fibroblasty, krevní elementy, ale ani na jednobuněčné trepky (5, 11, 22–23).

Snížení toxicity pro makroorganismus lze dosáhnout pevným navázáním stříbrných nanočástic na vhodný nosič, jejich cíleným působením a eliminací z organismu např. pů-

sobením magnetického pole v případě magnetických nanokompozitů. Další možností je využití synergického působení nanočástic stříbra s antibiotiky, kdy je antimikrobiální aktivita dosaženo při velmi nízkých koncentracích nanočástic stříbra. Tyto nízké koncentrace jsou při synergickém působení s antibiotiky dostačující a zároveň netoxické pro eukaryotické organismy (13, 14, 25). Synergie koloidního stříbra a antibiotik u multirezistentních bakterií má v medicíně velký potenciál pro využití. Je třeba ale osvětlit mechanismus synergického působení a důkladně studovat toxikologické parametry těchto kombinací.

Koloidní stříbro je příznivci alternativní medicíny označováno za všelék léčící choroby infekční i neinfekční a také je doporučováno jako prostředek preventivní. Do roku 2010 bylo v ČR dostupné jako potravinový doplněk. Proti vnitřnímu užívání koloidního stříbra je však nutné se ohradit, jeho léčebné účinky při vnitřním užívání nebyly žádnou klinickou studií prokázány. Dále je nutné zdůraznit, že biologická aktivita prokázaná v laboratorních podmínkách in vitro se může diametrálně lišit od aktivity in vivo. Detailní znalost účinku nanočástic na živé organismy je nutná pro jejich efektivní aplikaci v medicíně bez negativních dopadů na zdraví i celý ekosystém.

*Práce byla podpořena vnitřním grantem IGA\_LF\_2016\_022.*

## LITERATURA

- Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013; 11: 297–308.
- Alexander JW. History of medical use of silver. *Surg Infect* 2009; 10: 289–292.
- Mijnendonckx K, Leys N, Mahillon J, et al. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biomaterials* 2013; 26: 609–621.
- Filipová Z, Kukutschková J, Mašláň M. Rizika nanomateriálů. 1st ed. Univerzita Palackého v Olomouci; 2012.
- Panáček A, Kvítek L, Pucek R, et al. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B* 2006; 110: 16248–16253.
- Wong KKY, Liu XL. Silver nanoparticles—the real “silver bullet” in clinical medicine? *Med Chem Comm* 2010; 1: 125–131.
- Likus W, Bajor G, Siemianowicz K. Nanosilver – does it have only one face? *Acta biochimica polonica* 2013; 60: 495–501.
- Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci* 2009; 145: 83–96.
- Franci G, Falanga A, Galdiero S, et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agent. *Molecules* 2015; 20: 8856–8874.
- Kvítek L, Panáček A, Soukupová J, et al. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *J Phys Chem C* 2008; 112: 5825–5834.

- Panáček A, Kolar M, Vecerova R, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 2009; 30: 6333–6340.
- Moritz M, Geszke-Moritz M. The newest achievement in synthesis, immobilization and practical application of antibacterial nanoparticles. *Chem Eng J* 2013; 228: 596–613.
- Panáček A, Směkalová M, Kilianová M, et al. Strong and nonspecific synergistic antibacterial efficiency of antibiotics combined with silver nanoparticles at very low concentrations showing no cytotoxic effect. *Molecules* 2016; 21: 26.
- Panáček A, Směkalová M, Večeřová R, et al. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant *Enterobacteriaceae*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2016; 142: 392–399.
- Pucek R, Tucek J, Kilianova M, et al. The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles. *Biomaterials* 2011; 32: 4704–4713.
- Panáček A, Balzerová A, Pucek R, et al. Preparation, characterization and antimicrobial efficiency of Ag/PDDA – diatomite nanocomposite. *Colloid Surf B-Biointerfaces* 2013; 110: 191–198.
- Panáček A, Kilianova M, Pucek R, et al. Preparation and in vitro bactericidal and fungicidal efficiency of NanoSilver/methylcellulose hydrogel. *International Journal of Chemical, Nuclear, Metallurgical and Materials Engineering* 2014; 8:

- Lara HH, Ayala-Nunez NV, Turrent LDI et al. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 2010; 26: 615–621.
- Li WR, Xie XB, Shi QS et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials* 2011; 24: 135–141.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005; 16: 2346–2353.
- Baker C, Pradhan A, Pakstis L, et al. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2005; 5: 244–249.
- Kvítek L, Vaničková M, Panáček A, et al. Initial study on the toxicity of silver nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. *J Phys Chem C* 2009; 113: 4296–4300.
- Krajewski S, Pucek R, Panáček A, et al. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. *Acta Biomaterialia* 2013; 9: 7460–7468.
- Antony JJ, Sivalingam P, Chen B. Toxicological effects of silver nanoparticles. *Environ toxicol pharmacol* 2015; 40: 729.
- Brown AN, Smith K, Samuels TA, et al. Nanoparticles Functionalized with Ampicillin Destroy Multiple Antibiotic-Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78: 2768–2774.

# Léčba neuropatické bolesti se zaměřením na opioidy

Marek Hakl, Olga Haklová

Oddělení léčby bolesti FN Brno

Neuropatická bolest patří mezi obtížně léčitelné bolestivé stavy. Její výskyt se v populaci s prodlužujícím se věkem zvyšuje. Mezi základní léky při léčbě této bolesti patří antikonvulziva a antidepresiva. V případě, že nedochází k adekvátní úlevě od bolesti, postupujeme k lékům druhé volby, které jsou tvořeny především opioidy. Mezi nimi jsou některé, které mají k neuropatické bolesti vyšší afinitu. Především se jedná o oxycodon a tapentadol, některé práce uvádějí i buprenorfin. Terapii začínáme vždy nejnižšími dávkami, které titrujeme až do dávky účinné. V současné době však hovoříme i o stropovém klinickém efektu opioidů, který je dán ekvivalencí 160 mg morfinu denně. Tato dávka by neměla být překračována.

**Klíčová slova:** neuropatická bolest, opioidy, kapsaicin, lidokain.

## Treatment of neuropathic pain with a focus on opioids

Neuropathic pain is among difficult-to-treat pain conditions. Its occurrence in the population increases with increasing age. Anticonvulsants and antidepressants are the fundamental drugs in treating this pain. In case there is no adequate relief of pain, second-choice drugs are the next option, including, in particular, opioids, with some of them having a higher affinity to neuropathic pain. They particularly include oxycodone and tapentadol, with some papers also reporting buprenorphine. Treatment is always initiated with the lowest doses that are titrated to an effective dose. Currently, however, the ceiling effect of opioids is being applied that is equianalgesically equivalent to 160 mg of morphine daily. This dose should not be exceeded.

**Key words:** neuropathic pain, opioids, capsaicin, lidocaine.

Neuropatická bolest vzniká poškozením nebo onemocněním somatosenzorického systému. Podle lokalizace poškození dělíme neuropatickou bolest na centrální, vznikající poškozením centrálního nervového systému, a periferní, vznikající v důsledku periferní nervové léze.

Incidence neuropatické bolesti se u evropské populace udává asi 7–8%, s věkem riziko vzniku neuropatické bolesti exponenciálně narůstá (1).

Léčba neuropatické bolesti před nástupem tzv. „gabapentinoidů“ byla svízelná. Doporučovaná TCA (tricyklická antidepresiva – amitriptylin, klomipramin, imipramin, nortriptylin) byla díky jejich anticholinergnímu efektu (sucho v ústech, srdeční arytmie) zatížena výraznými nežádoucími účinky. Limitující byl i výskyt ospalosti, vertiga a kvalitativních poruch vědomí.

Obdobné nežádoucí účinky můžeme pozorovat i u carbamazepinu, druhého léku používajícího se v léčbě neuropatické bolesti. Malé farmakoterapeutické možnosti ovlivnění neuropatické bolesti vedly k zoufalým pokusům v oblasti ireverzibilních invazivních (lýzy periferních nervů, ganglií, rhizotomie...). Výsledný efekt byl však velmi nejistý a často horší než před prováděnou blokádou. Proto se v současnosti od obdobných zákroků ustoupilo. V případě invazivních zákroků současný technologický rozvoj umožňuje použití reverzibilních léčebných metod, u kterých se v případě jejich selhání lze vrátit k původnímu předzákrokovému stavu. K posunu v oblasti léčby neuropatické bolesti došlo s objevem gabapentinu a pregabalínu, dvou účinných antikonvulziv. Možnosti farma-

koterapeutického ovlivnění dále rozšířily nově přichodící antidepresiva IV. generace (mirtazapin, venlafaxin, duloxetin). Na podkladě nových účinných látek vydala EFNS (Evropská federace neurologických společností) v roce 2006 metodické pokyny, které v roce 2009 inovovala (2, 3). V roce 2012 poté pracovní skupiny pod vedením profesora Bednařika vydala Klinický standard pro farmakoterapii neuropatické bolesti (4). Tyto doporučené postupy léčby neuropatické bolesti jsou dostupné na webových stránkách České neurologické společnosti ČLS JEP [www.czech-neuro.cz](http://www.czech-neuro.cz). V doporučených postupech jsou léky řazeny podle předpokládaného přínosu a rizik na léky 1., 2. a 3. volby.

Obecně lze říci, že lékem první volby v léčbě neuropatické bolesti postihující periferní nebo

centrální nervstvo jsou moderní antikonvulziva a antidepresiva, pouze v léčbě neuralgie nervus trigeminus se mezi léky první volby dostal, resp., spíše zůstal karbamazepin. Léky druhé a třetí volby tvoří opioidy, topická léčiva, lamotrigin a baclofen.

## Opioidy

Tak jako u léčby nociceptivní bolesti tvrdíme, že neexistuje opioid první volby, v případě léčby neuropatické bolesti toto zcela neplatí. Vyšší afinita k neuropatické bolesti byla prokázána u oxycodonu, tapentadolu a některé studie i u buprenorphinu.

## Oxycodon

Oxycodon je silný opioid určený pro léčbu silné chronické, v některých případech i akutní bolesti. Za jeho analgetickou účinnost u neuropatické bolesti pravděpodobně odpovídá jeho agonistické působení na  $\mu$  a  $\kappa$  receptorech. Bohužel velmi dobrý analgetický účinek je často doprovázen zácpou. Ekvianalgeticky je oxycodon 2x silnější než morfin. Tuto nežádoucí vlastnost se podařilo odstranit v kombinovaném preparátu oxycodon–naloxon v poměru 2:1. Opioidy indukovaná zácpa je způsobena vazbou opioidu na opioidní receptory ve střevní stěně. Naloxon při perorálním užívání, jako opioidní antagonist, má schopnost tuto vazbu na úrovni gastrointestinálního traktu (GIT) rušit, zároveň však podléhá z 98–99% efektu prvního průchodu (first pass effect), tedy podléhá jaternímu metabolismu a do systémového řečiště se jej dostává nevýznamné množství (1–2%). Tato dávka není schopna ovlivnit vazbu opioidu na opioidní receptory v centrálním nervovém systému a tím zrušit žádaný analgetický efekt. Léčivo je dostupné v dávkách 10/5, 20/10 a 40/20 mg, interval podávání je 1 tableta po 12 hodinách.

## Tapentadol

Od srpna 2012 je k dispozici nová účinná látka tapentadol s duálním mechanismem účin-

ku (MOR-NRI). Tapentadol se jednak váže na  $\mu$  opioidní receptor, zároveň však i ovlivňuje vychytávání noradrenalinu v centrálním nervovém systému. Pravděpodobně tento princip účinku odpovídá za velmi dobrý efekt jak u nociceptivní, tak u neuropatické bolesti.

Mezi výhody tapentadolu patří vedle analgetického dobrého efektu u neuropatické bolesti i příznivý profil snášenlivosti. Tapentadol není proléčivo a není tedy v účinku odkázán na další metabolickou aktivitu organismu, nemá aktivní metabolity, má nízkou vazbu na plazmatické bílkoviny a jeho metabolismus není vázán na jaterní cytochromatický systém.

Nejnižší dostupná dávka tapentadolu je 50 mg, další dávky jsou 100, 150, 200 a 250 mg v retardovaných tabletách s 12hodinovým účinkem. Tato retardovaná forma tapentadolu byla nedávno doplněna o tablety s rychlým nástupem efektu v dávkách 50 a 75 mg, výhledově se snad počítá i se 100 mg gramáží.

## Náplast 8% capsaicinu

Capsaicin byl identifikován jako hlavní pálivá složka paprik již v polovině 19. století a ve 20. století pak byla zjištěna jeho chemická struktura (8-methyl-N-vanilyl-6-noneamid). Mechanismus účinku přípravku obsahujícího 8% capsaicin je v dlouhodobém reverzibilním znečistlivění nociceptorů exprimujících vanilloidní receptor TRPV1 v epidermis a reverzibilním snížení hustoty nervových vláken v epidermis. Tento účinek vede k úlevě od bolesti do dvou dnů až několika málo týdnů. Kromě postherpetické neuralgie je lék indikován u veškeré periferní neuropatické bolesti s výjimkou diabetické polyneuropatie. Analgetický efekt po jednorázové 60minutové aplikaci přetrvává 3–6 měsíců. Účinnost léku Qutenza u neuropatické bolesti byla prokázána v řadě studií (5) včetně HIV indukované polyneuropatie.

Náplast 8% capsaicinu je určena k lokální léčbě. Po edukaci pacienta je aplikována přímo na bolestivou oblast. Vlastní aplikaci provádí

zaškolený personál, je nutné použít nitrilové ochranné rukavice (jsou součástí balení), protože standardní latexové nemusí poskytnout dostatečnou ochranu před capsaicinem. Náplast lze aplikovat téměř po celém těle, zvýšené opatrnosti je třeba dbát v oblastech blízko sliznic a na hlavě. V průběhu 60minutové aplikace může pacient pociťovat různě intenzivní bolest, v některých případech v mírné intenzitě přetrvávající i dva dny. Analgetický efekt se nejčastěji dostavuje do dvou týdnů, ojediněle až do 12 týdnů. Výrobce udává délku analgetického efektu 3–6 měsíců, při opakovaných aplikacích dochází k postupnému prodloužení délky účinku (5).

## 5% lidokainová náplast

5% lidokainová náplast je měkká hydrogelová náplast o rozměrech 10x15 cm určená k léčbě bolesti při postherpetické neuralgii. Dle SPC je lidokainová náplast určena pouze k léčbě postherpetické neuralgie. Lidokainová náplast se aplikuje na 12 hodin na bolestivé místo, po dalších 12 hodinách se náplast odlepuje. Dle SPC lze aplikovat maximálně 3 náplasti zároveň, zdravotní pojišťovny však v současné době hradí aplikaci pouze 1 náplasti denně. Balení v České republice obsahuje 20 kusů náplastí. Nežádoucí účinky se vzhledem k topické aplikační formě téměř nevyskytují.

Vzhledem k velmi dobré snášenlivosti, široké kompatibilitě s ostatními léky a dobrému analgetickému účinku je 5% lidokainová náplast velmi dobrou volbou v léčbě postherpetické neuralgie. V současné době je stavěn jako lék první až druhé volby.

## Závěr

Přestože pozice antikonvulziv a antidepresiv jako léků první volby v léčbě neuropatické bolesti je nezpochybnitelná, velmi často nezbyvá jiná možnost, než se obrátit na analgetika druhé a třetí volby. V těchto případech s výhodou využijeme silné analgetické potence silných opioidů.

## LITERATURA

1. Bouhassira D, Lanteri-Minet M, Attal N, Laureat B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristic in the general population. *Pain* 2008; 136: 380–387.
2. Atta N, Cruccu G, Baron R, Haanpaa M, Hanson P, Jensen T, Numikko T. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2009 revision. *European Jour-*

- nal of Neurology 2009; 8: 1010–1018.
3. Attal N, Cruccu G, Haanpaa M, et al. EFNS Task Force. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neuro* 2006; 13: 1153–1169. (class I SR).
4. Bedanřík J, Amber Z, Opavský J, Keller O, Rokyta R, Mazanec R, Lejško J, Kozák J, Suchý M, Pátá M, Kožený P. Klinický

- standard pro farmakoterapii neuropatické bolesti. *Cesk Slov Neurol* 2012; 75/108(1): 93–101.
5. Backonja M, Wallace M, Blonsky R, Cutler B, Malan P, Rauck R, Tobiáš J. NGX-4010, a high-concentration capsaicin patch, for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomised, double-blind study. *Lancet Neurol* 2008; 7: 1106–1112.



# Nová antibiotika v klinické praxi a výzkumu

Lenka Součková<sup>1,2,4,5</sup>, Adriana Ruzsíková<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Masarykova Univerzita, Lékařská fakulta, Farmakologický ústav

<sup>2</sup>Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, ICRC

<sup>3</sup>Masarykova Univerzita, Lékařská fakulta, Anesteziologicko-resuscitační klinika

<sup>4</sup>Fakultní nemocnice Brno, Klinika dětské onkologie

<sup>5</sup>Masarykův onkologický ústav

K rozšiřování rezistence dosud citlivých kmenů bakterií vůči antibiotikům, spojené se stále rostoucí spotřebou antibiotik jak v humánní, tak veterinární medicíně, dochází rychleji, než k udělování registrací a zavádění nových molekul antibiotik do klinické praxe. Vývoj nových molekul antibiotik je obtížný, finančně a časově velmi náročný. I přesto za posledních 15 let bylo registrováno 30 nových molekul antibiotik a více jak 10 molekul je v procesu klinického hodnocení fáze III. V nejbližších letech lze očekávat další nové registrace na poli antimikrobiálních léčiv. Článek přehledně popisuje jednotlivá nová antibiotika schválená od roku 2000. Tento přehledový článek také stručně shrnuje aktuální stav v klinickém výzkumu v oblasti antibiotik.

**Klíčová slova:** nová antibiotika, výzkum a vývoj léčiv, registrace léčiv, rezistence.

## New antibiotics in the clinical practise and in the clinical trials

Expanding of resistance of still susceptible strains of bacteria to antibiotics, associated with the increasing consumption of antibiotics in both human and veterinary medicine, is occurring faster than the marketing approvals and the implementation of new antibiotic molecules to clinical practice. The development of new antibiotic molecules is troublesome, expensive and timeconsuming. In spite of this, 30 new antibiotic molecules were registered in the last 15 years and more than 10 molecules are in the process of phase III clinical trials. Therefore we can expect further new marketing approvals in the field of antimicrobial drugs in the upcoming years. The article briefly describes the new antibiotics approved since 2000. This review also summarizes the current status of clinical research in the field of antibiotics.

**Key words:** new antibiotics, research and development of drugs, marketing approval, resistance.

## Vlastní text

Zavedení antibiotik do klinické praxe, počínaje penicilinem (1) a streptomycinem (2), způsobilo zásadní proměnu vnímání léčby infekčních onemocnění, kdy se objevily účinné cílené léky odstraňující příčinu nemoci a významně snižující mortalitu. Od zahájení používání antibiotik v klinické praxi je současně pozorován vývoj bakteriální rezistence. V roce 1945 sám Fleming varoval před neopodstatněným užíváním penicilinu a žádal, aby se používal cíleně a v dostatečných dávkách, aby se předešlo vývoji rezistentních kmenů. Poselství o zamezení zbytečného užívání

antibiotik je dnes ještě více aktuální než kdykoli dříve. V roce 2009 spotřeba antibiotik u lidí přesáhla 3 miliony kg a v roce 2010 bylo použito 13 milionů kg antibiotik u zvířat (3, 4).

V současné situaci dochází k rozšiřování rezistence dosud citlivých kmenů bakterií vůči antibiotikům rychleji než k udělování registrací a zavádění nových molekul antibiotik do klinické praxe, které by byly účinné vůči rezistentním kmenům bakterií. V důsledku toho se antibiotická rezistence v posledních letech začala věnovat větší pozornost jak na národní, tak globální úrovni. Vývoj rezistence

snižuje faktickou životnost antibiotik a vytváří konstantní tlak na zavádění nových antibiotik (5). Nicméně, objev nového antimikrobiálního léku je jednoznačně obtížný a řada velkých farmaceutických společností, až na výjimky, opustila tuto oblast výzkumu vzhledem k vysokému riziku nenávratnosti svých investic (6). V 90. letech 20. století se oblasti výzkumu a aktivního vývoje nových antimikrobiálních léčiv věnovalo 18 velkých farmaceutických společností, z nichž dnes do této oblasti investují pouze 4 z nich (AstraZeneca, Novartis, GSK, Sanofi-Aventis) (7).



Pozornost a očekávání jsou v dnešní době upřeny především na malé a střední biofarmaceutické podniky a akademická pracoviště, které jsou motivovány vládními programy a aktualizovanými pokyny regulačních autorit, s cílem podpořit vývoj nových antibiotik až do udělení registrace a uvedení nového antibiotika na trh. Grantové dotace typu Innovative Medicines Initiative New Drugs for Bad Bugs (IMI ND4BB) nabádají ke spolupráci mezi průmyslovými a akademickými partnery. Klinický výzkum nových antibiotik a základní výzkum penetrace antibiotik do gramnegativních bakterií (G-) je podpořen částkou 280 milionů USD (8). Další podobnou mezinárodní iniciativou je „10 x 20 Initiative“, založená Americkou společností infekčních onemocnění, s cílem objevit do roku 2020 10 nových účinných antibiotik zacílených především na multirezistentní G- patogeny (9).

Od roku 2000 bylo registrováno 30 nových molekul antibiotik, z nichž většina má svou chemickou strukturu odvozenou od již známého, dříve používaného antibiotika. Z hlediska vývoje rezistence je však zcela zásadní zaměřit úsilí na vývoj a výzkum nových tříd antibiotik s novým mechanismem účinku, vůči kterým patogenní bakterie zatím nevyvinuly rezistenci (10). Situace se mírně zlepšila v posledních letech, kdy se rozšířilo portfolio schválených léků na léčbu grampozitivních (G+) infekcí, včetně infekcí způsobených methicilin-rezistentním *Staphylococcus aureus* (MRSA). Oproti tomu při léčbě infekcí způsobených G- patogeny, včetně komplikovaných intraabdominálních infekcí, nozokomiálních a ventilátorových pneumonií, sepsí dochází k situacím, kdy je kultivován multirezistentní kmen bakterií, k jehož eradikaci nemáme žádné účinné antibiotikum (6).

Stále častěji jsou infekce způsobeny patogeny produkujícími širokospektré beta-laktamázy (ESBL) a karbapenamázy, jako jsou kmeny bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, anebo multirezistentní nefermentující G- kmeny bakterií např. *Pseudomonas aeruginosa* či *Acinetobacter baumannii*, kdy je často nezbytné použít rezervní antibiotika. V procesu klinického hodnocení III. fáze se aktuálně nachází 10 molekul a 1 kombinovaná molekula ze skupiny karbapenemů v kombinaci s novým inhibítorem betalaktamázy.

Tento přehledový článek stručně shrnuje aktuální stav v klinickém výzkumu z oblasti antibiotik.

### Nová antibiotika schválená od roku 2000

Od roku 2000 bylo objeveno pouze 5 nových antibiotických tříd:

Tab. 1. Nově schválené molekuly antibiotik od roku 2000

	Rok registrace	Název léčivé látky	Název registrovaného léčivého přípravku /Držitel rozhodnutí o registraci	Antibiotická třída	Typ bakterie
1	2000	linezolid	Zyvox®/Pfizer	oxazolidinony	G+
2	2000	quinupristin/dalfopristin	Synercid®/Pfizer	streptograminy	G+
3	2001	telithromycin	Ketek®/Aventis Pharma S.A.	makrolidy	G+/G-
4	2001	biapenem	Omegacin®/Wyeth	karbapenemy	G+/G-
5	2001	ertapenem	Invanz®/Merck Sharp & Dohme Ltd.	karbapenemy	G+/G-
6	2002	prulifloxacin	Unidrox®/Aziende Chimiche Riunite Angelini Francesco A.C.R.A.F. S.p.A.	fluorochinolony	G+/G-
7	2002	pazufloxacin	Pasil®/Toyama Chemical Co Ltd.	fluorochinolony	G+/G-
8	2002	balofloxacin	B-Cin®/Lupin	fluorochinolony	G+/G-
9	2003	daptomycin	Cubicin® /Novartis Europharm Ltd.	lipopeptidy	G+
10	2004	gemifloxacin	Factive®/Cornerstone Therapeutics Inc.	fluorochinolony	G+/G-
11	2005	doripenem	Doribax®/Janssen Pharmaceuticals, Inc.	karbapenemy	G+/G-
12	2005	tigecyklin	Tygacil®/Wyeth	tetracykliny	G+/G-
13	2007	retapamulin	Altargo®/Glaxo Group Ltd.	pleuromutiliny	G+
14	2007	garenoxacin	Geninax® /Toyama Kagaku	chinolony	G+/G-
15	2008	ceftobiprol medocaril	Zevtera®/Basilea	cefalosporiny	G+/G-
16	2008	sitafloxacin	Gracevit®/Daiichi Sankyo	fluorochinolony	G+/G-
17	2009	tebipenem pivoxil	Orapenem® fine granules 10% for Pediatric/ Meiji Seika Kaisha, Ltd	karbapenemy	G+/G-
18	2009	telavancin	Vibativ® /Theravance Biopharma	lipoglykopeptidy	G+
19	2009	antofloxacin	优朋®/Anhui Globe	fluorochinolony	G+/G-
20	2009	besifloxacin	Besivance®/Bausch & Lomb	fluorochinolony	G+/G-
21	2010	ceftarolinum fosamilum	Zinforo® /AstraZeneca	cefalosporiny	G+/G-
22	2011	fidaxomicin	Difclir®/Astellas Pharma Europe B.V.	tiacumiciny	G+
23	2012	bedachilin	Sirturo® /Janssen-Cilag International N.V.	diarylchinoliny	G+
24	2014	tedizolid	Sivextro®/ Merck Sharp & Dohme Ltd	oxazolidinony	G+
25	2014	dalbavancin	Xydalba® /Durata Therapeutics International B.V.	lipoglykopeptidy	G+
26	2014	oritavancin	Orbactiv®/The Medicines Company UK Ltd.	lipoglykopeptidy	G+
27	2014	ceftolozan+tazobactam	Zerbaxa® /Merck Sharp & Dohme Ltd.	nový cefalosporin s inhibítorem beta-laktamázy	G+/G-
28	2014	ceftazidim+avibactam	Avyza® /Allergan	cefalosporin s novým inhibítorem beta-laktamázy	G+/G-
29	2014	nemonoxacin	Taigexyn® úTaiGen Biotechnology	chinolony	G+/G-
30	2014	delamanid	Delyba®/Otsuka Novel Product GmbH	nitroimidazoly	G+

- oxazolidinonová třída (linezolid – systémové užití, schválen 2000),
- lipopeptidová třída (daptomycin – systémové užití, schválen 2003),
- pleuromutilinová třída (retapamulin – lokální užití, schválen 2007),
- tiacumicinová třída (fidaxomicin – infekce způsobené *Clostridium difficile*, schválen 2010),
- diarylquinolinová třída (bedaquilin – systémové užití, schválen 2012).

Ostatních 25 nově schválených molekul antibiotik představuje zástupce z již dříve známých tříd a jedná se o deriváty a syntetická analoga již objevených molekul (tab. 1).

## Nová antibiotika cílená na léčbu G+ infekcí

**Linezolid**, zástupce nové antibiotické třídy oxazolidinonů, byl poprvé registrován v roce 2000 ve Spojených státech amerických (USA) pod názvem Zyvox®. V České republice je registrován od roku 2002 společností Pfizer pod obchodním názvem Zyvoxid® a patří do skupiny rezervních antibiotik. Selektivně potlačuje syntézu bakteriálních bílkovin jedinečným mechanismem účinku. Linezolid se váže na místo bakteriálního ribozomu (23S podjednotky 50S) a zabráňuje vzniku funkčního 70S iniciačního komplexu, který je nepostradatelnou součástí translačního procesu. Linezolid patří mezi širokospektrá antibiotika s účinností na MRSA, vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE), vankomycin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (VRSA), rezistentní koaguláza-negativní stafylokoky a penicilin-rezistentní pneumokoky (11).

Nově registrovaným zástupcem ze skupiny oxazolidinonů je **tedizolid**, který získal povolení k registraci v roce 2014 pod obchodním názvem Sivextro® (Merck Sharp & Dohme Ltd). Je určen k perorálnímu a parenterálnímu podání a je indikován k léčbě akutních bakteriálních infekcí kůže a kožních struktur způsobených G+ bakterie. Antibakteriální aktivita tedizolidu je zprostředkována vazbou na 50S podjednotku bakteriálního ribozomu, což vede k inhibici proteosyntézy (12).

S objevem nové třídy antibiotik, lipopeptidů, byl do klinické praxe uveden její první zástupce **daptomycin**, jehož mechanismus účinku je založený na vazbě na bakteriální cytoplazmatickou membránu s následnou depolarizací membránového potenciálu, který vede k naru-

šení základních procesů v bakteriální buňce (13). V ČR je daptomycin registrován pod obchodním názvem Cubicin® (Novartis Europharm Ltd) a je indikován k léčbě komplikovaných kožních infekcí a infekcí měkkých tkání (cSSTI), k léčbě pravostranné infekční endokarditidy (RIE) vyvolané *Staphylococcus aureus* a k léčbě infekce krevního řečiště způsobené *Staphylococcus aureus* (SAB) u dospělých pacientů, pokud je doprovázena RIE nebo cSSTI (14).

Možnosti léčby povrchových kožních infekcí (zejména pak impetiga a infikovaných drobných lacerací, abrazí a šitých ran) byla rozšířena o nový léčivý přípravek Altargo® (Glaxo Group Ltd.) s účinnou látkou **retapamulin** z nové antibiotické třídy pleuromutilinů, který získal povolení k registraci v roce 2007. Mechanismus účinku retapamulinu je založen na selektivní inhibici syntézy bakteriálního proteinu působením na specifické místo podjednotky 50S bakteriálního ribozomu, které je odlišné od vazebných míst jiných nonpleuromutilinových antibakteriálních látek působících na ribozomy. Vazebné místo zahrnuje ribozomální protein L3, který se nachází v oblasti ribozomálního místa P a v centru peptidyl-transferázy. V důsledku vazby na toto místo retapamulin inhibuje peptidyl-transferázu, částečně blokuje interakce v místě P a zabráňuje normální tvorbě aktivních ribozomálních podjednotek 50S, což vede k inhibici proteosyntézy. Retapamulin inhibuje syntézu bakteriálních proteinů vícečetnými mechanismy a bakteriostaticky působí zejména vůči *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes* (15).

Ze skupiny makrolidových antibiotik byl na trh v roce 2001 uveden **telithromycin**. Telithromycin působí systémově a podává se perorálně. K závažným nežádoucím účinkům, které se projevily během klinického hodnocení, patří jaterní selhání a prodloužení QT intervalu. V klinickém použití je potřeba uvážit inhibiční potenciál telithromycinu na izoenzym cytochromu P450 (CYP) 3A4 a v kombinaci s ostatními substráty CYP 3A4 může vést k potenciálně závažným lékovým interakcím (16). V České republice je registrován pod obchodním názvem Ketek® (Aventis Pharma S. A.) s indikací komunitní pneumonie mírné závažnosti, akutní exacerbace chronické bronchitidy a akutní sinusitidy (17).

**Fidaxomicin** byl vyvíjen společností Optimer Pharmaceuticals a v roce 2011 byl schválen jak ve Spojených státech amerických (Difidcl®), tak

v Evropě (Difidclir®) k léčbě střevní infekce a průjmů způsobených *Clostridium difficile*. Mechanismus účinku fidaxomicinu je založený na inhibici transkripce bakteriální RNA polymerázy blokováním zahájení syntézy RNA (18). Fidaxomicin patří do nově objevené třídy antibiotik, nazvané tiacumiciny, které mají strukturu odvozenou od lipiarmycinů a clostomicinů (19).

**Bedachilin** je prvním registrovaným zástupcem z další nové antibiotické třídy diarylchinolinů. Je úzce zacílený na léčbu plicní multirezistentní tuberkulózy (MDR-TB) v kombinaci s dalšími antituberkulotiky. Bedachilin specificky inhibuje mykobakteriální adenosin 5'-trifosfát (ATP) syntázu, enzym nezbytný pro tvorbu energie v *Mycobacterium tuberculosis*. Inhibice ATP syntázy vede k baktericidnímu působení na replikující se i nereplikující se tuberkulózní bakterie (20). V České republice je bedachilin registrován pod obchodním názvem Sirturo® (Janssen-Cilag International N.V.) ve formě perorálních tablet (21).

Kromě bedachilinu, byl v roce 2014 k léčbě plicní multirezistentní tuberkulózy (MDR-TB) registrován také léčivý přípravek obsahující účinnou látku **delamanid**, nový zástupce ze skupiny nitroimidazolů, pod obchodním názvem Delyba® (Otsuka Novel Product GmbH) (22, 23).

K léčbě pneumonií, ale také sepse a infekce kůže a měkkých tkání vyvolaných rezistentními G+ koky, je k dispozici od roku 2000 léčivý přípravek s názvem Synercid® (Pfizer) kombinující účinné látky **quinupristin** a **dalfopristin** ze třídy streptograminů. Jejich mechanismus účinku je založený na inhibici syntézy proteinů ireverzibilní vazbou na 50S ribozomální podjednotku bakterií (24). Je účinný vůči MRSA a *Enterococcus faecium* (25). V České republice registrovaný není a lze jej získat pouze na mimořádný dovoz.

**Ceftobiprol**, nový zástupce ze skupiny cefalosporinů, byl vyvinut společností Basilea ve spolupráci se společností Johnson & Johnson k léčbě komunitních a nozokomiálních pneumonií u dospělých pacientů kromě ventilátorových pneumonií (26). V roce 2007 byl ceftobiprol schválen pod obchodním názvem Zevtera® (v Evropě) a Zeftera® (ve Spojených státech amerických) k léčbě pneumonií způsobených penicilin-rezistentními pneumokoky, koaguláza-negativními stafylokoky nebo některými G- bakterie. V roce 2010 byla ovšem zamítnuta registrace v Evropě, vzhledem k to-

mu, že následné inspekce Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) ukázaly, že studie prokazující účinnost, předložené k registraci, nebyly na některých místech provedeny v souladu se správnou klinickou praxí (GCP) (27). Společnost Basilea následně odkoupila práva od společnosti Johnson & Johnson a provedla nové klinické hodnocení s léčivou látkou ceftobiprol v souladu s GCP. V roce 2013 získala schválení k registraci ve 12 zemích Evropy. V průběhu roku 2016 plánuje zahájení klinického hodnocení fáze III ve Spojených státech amerických, kde léčivý přípravek zatím registrován není (28).

V témže roce byla antibiotická třída cefalosporinů rozšířena o léčivý přípravek s názvem Zinforo® (AstraZeneca) s účinnou látkou **ceftarolinum fosamilum**. Přípravek je určen k parenterálnímu podání formou infuze k léčbě komunitní pneumonie a komplikované infekce kůže a měkkých tkání. V roce 2014 byl na trh uveden kombinovaný léčivý přípravek z antibiotické třídy cefalosporinů: Zerbaxa® (Merck Sharp & Dohme Ltd), kde je kombinovaná nová molekula **ceftolozan** s již známým betalaktamázovým inhibitorem tazobaktamem. Léčivý přípravek Avycaz® (Allergan), s fixní kombinací již známé molekuly ceftazidimu s novým betalaktamázovým inhibitorem **avibaktamem**, získal povolení od FDA ve Spojených státech amerických v roce 2015, v Evropě na schvále-

ní od Evropské lékové agentury (EMA) teprve čeká. Účinnost obou přípravků byla potvrzena u komplikovaných intraabdominálních infekcí a komplikovaných infekcí močových cest (29).

V minulém roce byla udělena registrace léčivým přípravkům s obsahem účinných látek **dalbavancinu** a **oritavancinu**. Jedná se o semisyntetické deriváty ze skupiny lipoglykopeptidových analogů. Dalbavancin je v ČR registrován pod názvem Xydalba® (Durata Therapeutics International B.V.), oritavancin pak pod názvem Orbactiv® (The Medicines Company UK Ltd). Oba přípravky jsou určeny pouze k intravenózní infuzi k léčbě akutních bakteriálních infekcí kůže a kožních struktur u dospělých pacientů. Jedná se o „druhou generaci“ glykopeptidů majících lipofilní část ve svých molekulách. Mají prodloužený biologický poločas (200 a 400 hodin resp.) a vyznačují se odlišným mechanismem účinku účinku kromě inhibice syntézy peptidoglykanů, čímž je přerušena syntéza buněčné stěny navázáním se na terminální D-alanyl-D-alanin kmenového peptidu v peptidoglykanu stěny vznikající buňky, čímž se zamezí vzniku křížové vazby (transpeptidaci a transglykosylaci) podjednotek disacharidů a dojde k odumření bakteriální buňky (30, 31).

Do stejné skupiny lipoglykopeptidů patří **televancin**, registrovaný v roce 2009, v ČR pod ná-

zvem Vibativ® (Theravance Biopharma). Je určen pouze k parenterálnímu podání intravenózní infuzí k léčbě nozokomiálních pneumonií. Působí také dvojitým mechanismem účinku, kromě inhibice bakteriální buněčné stěny narušuje funkci cytoplazmatické membrány. Z nežádoucích účinků, které byly nejčastěji popisovány v rámci klinických hodnocení, lze zmínit průjem, nechutenství, nauzeu, zvracení a selhání ledvin (32).

Velmi úspěšnou třídou antibiotik jsou fluoro-ochinolony, kde bylo registrováno od roku 2000 celkem 7 antibiotik: **pazufloxacin, balofloxacin, gemifloxacin, sitafloxacin, antofloxacin, besifloxacin, prulifloxacin**, z nichž pouze **prulifloxacin** je registrovaný v ČR pod obchodním názvem Unidrox® (Aziende Chimiche Riunite Angelini Francesco A.C.R.A.F. S.p.A.). Prulifloxacin je vyroben pouze ve formě perorálních pota-hovaných tablet a je schválen k léčbě akutní nekomplikované infekce dolních močových cest (nekomplikované cystitidy), komplikované infekce dolních močových cest, akutní exacerbace chronické bronchitidy a akutní bakteriální rinosinuitidy. Prulifloxacin má potencovaný účinek vůči pneumokokům a anaerobům s relativně nízkým potenciálem vzniku rezistence (33).

Ostatní zástupci, neregistrovaní v České republice, mají svůj význam v oblastech s vysokými hladinami rezistence k penicilinům a dalším beta-laktámům.

Tab. 2. Sloučeniny ve III. fázi klinického hodnocení

Název hodnocené látky	Antibiotická třída	Mechanismus účinku	Typ bakterie	Testovaná indikace	Výrobce (sponzor)
omadacyklin	tetracykliny	Inhibice syntézy proteinů	G+/G-	Akutní bakteriální infekce kůže a kožních struktur	Paratek
kyselina fusidová (Taksta)	fusidany		G+	Akutní bakteriální infekce kůže a kožních struktur, infekce kloubů; Akutní a chronická léčba infekce MRSA	Cempra
finafloxacin	fluoroochinolony	Inhibice DNA gyrázy a topolzomerázy	G+/G-	Akutní otitida	MerLion
delafloxacin	fluoroochinolony	Inhibice DNA gyrázy a topolzomerázy	G+/G-	Akutní bakteriální infekce kůže a kožních struktur	Rib-X Pharmaceuticals
avarofloxacin	fluoroochinolony	Inhibice DNA gyrázy a topolzomerázy	G+/G-	Komunitní pneumonie	Furiex
zabofloxacin	fluoroochinolony	Inhibice DNA gyrázy a topolzomerázy	G+/G-	Komunitní pneumonie	Dong Wha Pharmace
ozenoxacin	chinolony	Inhibice DNA gyrázy a topolzomerázy	G+	Impetigo, akné	Grupo Ferrer Internacional
surotomycin	lipopeptidy		G+	Průjem způsobený <i>C. Difficile</i>	Cubist Pharmaceuticals
plazomicin	aminoglykosidy		G-	Komplikovaná infekce močových cest, katétreem způsobená sepse, nozokomiální pneumonie, komplikované intra-abdominální infekce	Achaogen
carbavance (RPX709+ meropenem)	karbapenem v kombinaci s novým borovnickým inhibitorem betalaktamázy		G-	Komplikovaná infekce močových cest, katétreem způsobená sepse, nozokomiální pneumonie, komplikované intra-abdominální infekce, febrilní neutropenie	Rempex Pharmaceuticals
cadazolid	oxazolidinony		G+	Průjem způsobený <i>C. Difficile</i>	Actelion Pharmaceuticals

Úspěšnost této skupiny také dokazuje skutečnost, že další 4 molekuly prochází III. fází klinického hodnocení (tab. 2), z nichž **avaro-floxacín** úspěšně ukončil II. fázi klinického hodnocení v léčbě akutních bakteriálních infekcí kůže a kožních struktur a vstoupil do III. fáze klinického hodnocení v indikaci komunitní pneumonie způsobených MRSA (34).

V roce 2007 byl pouze v Japonsku registrován **garenoxacín** pod obchodním názvem Geninax® (Toyama Kagaku), prezentující generaci „des-6F fluorochinolonů“, kde je atom fluoru nahrazen jinou molekulou za účelem omezení nežádoucích účinků (fototoxicity), častých u fluorochinolonů (35).

V roce 2014 byla pak udělena registrace léčivé látky **nemonoxacínu** s obchodním názvem Taigexyn® (TaiGen Biotechnology) v indikaci komunitní pneumonie, který se vyrábí jak v parenterální, tak perorální lékové formě, která je preferovaná při léčbě infekce vředu diabetické nohy a infekce kůže (36).

## Nová antibiotika cílená na léčbu G- infekcí

Infekce vyvolané G- bakteriemi spojené s vysokou mortalitou a morbiditou, která je zapříčiněna především schopností enterobakterií a nefermentujících G- tyčků vytvořit si rezistenci na různých úrovních mechanismu. Léčba těchto infekcí je komplikovaná a antibiotik, která jsou schopná proniknout složitější membránou G- bakterií a působit proti stále odolnějším patogenům, je málo. Výzkum v této oblasti je prioritou mnoha vládních programů (37).

Velmi úspěšnou třídou antibiotik jsou karbapenemy. V roce 1985 byl jako první zástupce představen **imipenem** v kombinaci s cilastinem a od jeho struktury byli odvození další zástupci, jako **meropenem** v roce 1996 a následovali **biapenem** (Omegacín®, Wyeth) a **ertapenem** (Invanz®, Merck Sharp & Dohme Ltd.), oba registrované v roce 2001, v roce 2005 **doripenem**. Kromě léčby nozokomiálních infekcí jsou přípravky určené k léčbě komunitních pneumonií tam, kde je vysoký výskyt penicilin rezistentních pneumokoků. Jako nejmladší zástupce ze skupiny karbapenemů získal povolení k registraci v roce 2009 **tebipenem pivoxil**, kdy se jedná o první proléčivo určené pouze pro perorální podání, ze třídy karbapenemových antibiotik. Jedná se o rezervní léky určené k léčbě závaž-

ných polymikrobiálních infekcí vyvolaných multirezistentními kmeny bakterií, které zapříčiňují závažná onemocnění jako sepse, ventilátorová pneumonie, komplikované infekce orgánů. Jsou účinné vůči bakteriálním kmenům *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, zejména pak producentům širokospektrých betalaktamáz (38).

Antibiotická třída tetracyklinů byla rozšířena v roce 2005 o nový preparát **tigecyklin**, v ČR registrovaný pod obchodním názvem Tygacil® s indikací k léčbě komplikované infekce kůže a měkkých tkání s vyloučením infekcí diabetické nohy a komplikované intraabdominální infekce s účinností proti multirezistentním acinetobakterům, bakteriím produkujícím ESBL, MRSA, VRE a většině anaerobů. V klinickém hodnocení ve srovnání s karbapenem, vankomycinem či aztreonamem vykazoval srovnatelnou účinnost (39). Přípravek je možné podat pouze formou parenterální infuze.

## Nové antibiotické léky, u kterých bylo požádáno o registraci

Úspěšně bylo skončeno klinické hodnocení fáze III s názvem IGNITE 2 hodnotící účinnost **eravacyklinu**, zástupce ze skupiny tetracyklinů, v léčbě komplikovaných infekcí močových cest. Předpokládá se, že společnost Tetrphase podá žádost o udělení registrace k FDA a EMA ještě tento rok jak pro perorální, tak parenterální použití (40).

Stejně tak bylo úspěšně ukončeno klinické hodnocení fáze III, které hodnotilo účinnost nového zástupce z antibiotické třídy makrolidů (fluoroketolidů), **solithromycin**, v léčbě mírně a středně závažné komunitní bakteriální pneumonie, který je vyráběn jak v perorální, tak v parenterální lékové formě. Se solithromycinem v současnosti probíhá klinické hodnocení fáze I u pediatrické populace, kdy se testuje bezpečnost a účinnost podání perorální suspenze. Dále se dokončuje klinické hodnocení fáze III, kdy je hodnocena účinnost solithromycinu u infekční uretritidy. Společnost Cempra plánuje se solithromycinem klinické hodnocení fáze I v indikaci protizánětlivý účinek u nealkoholické steatohepatitidy a chronické obstrukční plicní nemoci (41).

## Nové antibiotické léky v klinickém hodnocení fáze III

Sloučeniny s antimikrobiální účinností, které jsou v současnosti hodnoceny v rámci III. fáze

klinických hodnocení, jsou uvedeny v tabulce 2. V tabulce je zmíněna antibiotická třída, mechanismus účinku, typ bakterie a testovaná indikace.

## Výhled do budoucna ve vývoji nových antibiotik

Většina dosud používaných antibiotik byla produkována screeningem mikroorganismů, které lze kultivovat v laboratorních podmínkách, ale tento omezený zdroj kultivovatelných bakterií byl překonán v 60. letech 20. století. Tento směr vyhledávání a produkce nových molekul antibiotik byl nahrazen syntetickými přístupy, kdy byla objevena řada molekul, jejichž struktura byla odvozena od vůdčí molekuly a tím dala vzniknout bohatým třídám antibiotik, jako jsou například cefalosporiny a peniciliny. Objev dalších takových odvozených molekul ovšem často neřeší zásadní problém rezistence, případně rozšíření antibakteriálního spektra (42).

Velký potenciál se skrývá v bakteriích, které nelze snadno kultivovat v laboratorních podmínkách, které tvoří 99 % bakterií a představují tak nevyužitý zdroj pro vývoj a výzkum nových antimikrobiálních látek. Tým vědců z univerzity Northeastern objevil novou molekulu s antibakteriálním účinkem, **teixobactin**, za použití nové laboratorní metody kultivace bakterií v půdě pomocí izolace chip (iChip) (43). Bakterie rodu *Eleftheria terrae*, které produkují toto nové antibiotikum, totiž nelze kultivovat v běžných laboratorních podmínkách. Kultivace bakterií v půdě umožňuje vědcům vývoj zcela nových antibiotik, na něž není dosud vyvinuta rezistence.

Mechanismus účinku teixobactinu je založen na inhibici syntézy buněčné stěny. V prvním kroku působí navázáním na lipid II, mastnou molekulu, která je prekurzorem pro peptidoglykan. Lipid II je cílem také pro vankomycin. Vazba teixobactinu s lipidovými prekurzory inhibuje produkci peptidoglykanové stěny, což vede k lýze zranitelných bakterií (44).

Přestože máme v rámci klinických hodnocení nové molekuly s novými mechanismy působení, které jsou účinné vůči rezistentním bakteriím, je jen otázkou času, za jak dlouho bakterie na tyto nové preparáty vyvinou rezistenci. Pokud nezměníme způsob nahlížení na léčbu antibiotiky, brzy se můžeme dočkat, že nozokomiální infekce vyvolané bakteriemi produkujícími karbapenemázy nebude čím léčit, protože karbapenemy dnes představují jedinou možnost léčby multirezistentních ente-



robakterií. V rámci nemocničních zařízení se již dnes lze setkat s panrezistentními kmeny pseudomonád, acinetobakterů a *Escherichia coli*, kde jsou vyčerpány rezervy antibiotické léčby. Vzhledem k tomu, že rychlost zavádění nových molekul anti-

biotik do běžné klinické praxe je pomalejší než vývoj a šíření rezistence, nelze spoléhat na objevy nových molekul antibiotik. Jedinou možností, jak zpomalit vývoj rezistence, je racionální používání antibiotik a optimalizace dávkovacích režimů.

*Podpořeno ze státního rozpočtu prostřednictvím MŠMT, projektem velké infrastruktury CZECRIN (Identifikační kód LM2015090) v rámci aktivity Projekty velkých infrastruktur pro VaVal.*

## LITERATURA

- Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Br J Exp Path, X (1929), pp. 3–13.
- Schatz A, Bugie E, Waksman SA. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1944; 55: 66–69.
- Kardos N, Demain AL. Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011; 92: 677–687.
- Tallman G, Brock J. Pipeline or pipe dream: New antibiotics for multidrug-resistant gram-negative bacilli. Infectious Disease News, 2013; 26: 40.
- Spellberg B, Shlaes D. Prioritized current unmet needs for antibacterial therapies. Clin. Pharmacol. Ther. 2014; 96: 151–153.
- Hestekamp T. Antibiotics Clinical Development and Pipeline. Curr Top Microbiol Immunol. 2015; Epub 2015 Jul 11.
- Cooper MA, Shlaes D. Fix the antibiotics pipeline. Nature. 2011; 472: 32.
- So AD. Towards new business models for R&D for novel antibiotics. Drug Resist. Updates. 2011; 14: 88–94.
- Boucher HW. 10x20 Progress- Development of new drugs active against gram negative bacilli: an update from the Infectious Disease of America. Clin Infect Dis. 2013; 56: 1685–1694.
- Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. The Journal of antibiotics. 2013; 66: 571–591.
- Zyvoxid® SPC, file:///D:/Users/270934/Downloads/zyvoxid-2-mg-ml-infuzni-roztok-spc%20(1).pdf, staženo 8. 4. 2016.
- Sivextro® SPC, [http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002846/WC500184802.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002846/WC500184802.pdf), staženo 6. 4. 2016.
- Hayden MK, Reyai K. Development of Daptomycin Resistance in vivo in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microb. 2005; 23: 5285–5287.
- Cubicin® SPC, [http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000637/WC500036049.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000637/WC500036049.pdf), staženo 6. 4. 2016.
- Altargo® SPC, [http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000757/WC500024409.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000757/WC500024409.pdf).
- Lonks JR, Goldmann DA. Telithromycin: A Ketolide Antibiotic for Treatment of Respiratory Tract Infections. Clin Infect Dis. 2005; 40: 1657–1664.
- Ketek® SPC, [http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000354/WC500041895.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000354/WC500041895.pdf), staženo 6. 4. 2016.
- Difclir® SPC, [http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002087/WC500119705.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002087/WC500119705.pdf), staženo 6. 4. 2016.
- Tupin A. The transcription inhibitor lipiarmycin blocks DNA fitting into RNA polymerase catalytic site. EMBOJ. 2010; 29: 2527–2537.
- Haagsma AC. Selectivity of TMC207 towards mycobacterial ATP synthase compared with thst towards the eucaryotic homologue. Antimicrob. Agents Chemother. 2009; 53: 1290–1292.
- Sirturo® SPC, [http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002614/WC500163209.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002614/WC500163209.pdf), staženo 6. 4. 2016.
- Tisková zpráva z 30. 4. 2014 Otsuka Wins European Marketing Authorization for Delytba™ (delamanid), <http://www.businesswire.com/news/home/20140429006457/en/Otsuka-Wins-European-Marketing-Authorization-Delytba%E2%84%A2-delamanid#VdCfmxw9aR>, staženo 21. 9. 2015.
- Delytba® SPC, [http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002552/WC500166232.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002552/WC500166232.pdf), staženo 6. 4. 2016.
- Allington DR. Quinupristin/dalfopristin: a therapeutic review. Clinical Therapeutics. 2001; 23: 24–44.
- Synercid® SPC, [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2008/050748s008,050747s008lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/050748s008,050747s008lbl.pdf), staženo 6. 4. 2016.
- Zeftera® SPC, <http://www.mhra.gov.uk/home/groups/spcpil/documents/spcpil/con1448606619300.pdf>, staženo 6. 4. 2016.
- Tisková zpráva z 24. 6. 2010 – zamítnutí registrace přípravku Zeftera1 (ceftobiprol) [http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/Summary\\_of\\_opinion\\_-\\_Initial\\_authorisation/human/000883/WC500093966.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/000883/WC500093966.pdf), staženo 19. 11. 2015.
- Tisková zpráva, <http://www.basilea.com/chameleon/public/584f9d1e-4298-e47c-0475-a5e5e5288ded/582542>, staženo 6. 4. 2016.
- Tisková zpráva z 25. 2. 2015 Actavis Receives U.S. FDA Approval for AVYCAZ™ (CEFTAZIDIME-AVIBACTAM) <http://www.actavis.com/news/news/thomson-reuters/actavis-receives-u-s-fda-approval-for-avycz-ceft>. (staženo 6. 6. 2015).
- Durata Therapeutics Announces Preliminary, Topline Phase 3 clinical trial Results for Dalbavancin in the treatment of ABSSSI (Press release 25 February 2013) <http://www.duratherapeutics.com/news-media/press-releases/detail/7914/durata-therapeutics-announces-preliminary-topline-phase-3>, staženo 21. 8. 2015.
- Bouza E. Oritavancin: a novel lipoglycopeptide active against Gram positive pathogens including multiresistant strains. Int. J. Antimicrob Agents. 2010; 36: 401–407.
- Nannini EC. Telavancin for the treatment of hospital-acquired pneumonia: findings from the ATTAIN studies. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012; 10: 847–854.
- Unidrox® SPC, <http://www.sukl.cz/download/spc/SPC9418.pdf>.
- Furiex Receives Qualified Infectious Disease Product and Fast Track Designations from the U.S. Food and Drug Administration for Avarofloxacin (JNJ-Q2) (press release 25. 2. 2015) <http://www.businesswire.com/news/home/20130225006680/en/Furiex-Receives-Qualified-Infectious-Disease-Product-Fast>, staženo 21. 8. 2015.
- Tisková zpráva TOYAMA CHEMICAL CO., LTD., <https://www.toyama-chemical.co.jp/eng/news/news1004e.html>, staženo 6. 4. 2016.
- Poole RM. Nemonoxacin: first global approval. Drugs. 2014; 74: 1445–1453.
- Nýč O. Potřeba a perspektivy nových antibiotik. Remed. 2007; 5: 476–480.
- Wang X, et al. Biapenem versus meropenem in the treatment of bacterial infections: a multicenter, randomized, controlled clinical trial. Indian J Med Res. 2013; 138(6): 995–1002.
- Tygacil® SPC, <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0026127&tab=texts>, staženo 6. 4. 2016.
- Tetraphase Pharmaceuticals. FDA Awards Fast Track Status to Tetraphase Pharmaceuticals for IV and Oral Formulations of Eravacycline. (Press release, 2 April, 2014) <http://ir.tphase.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=837185> staženo 6. 4. 2016.
- Waites KB, Crabb DM, Duffy LB. Comparative In Vitro Susceptibilities of Human Mycoplasmas and Ureaplasmas to a New Investigational Ketolide, CEM-101 Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009; 53: 2139–2141.
- Shlaes DM, Spellberg B. Overcoming the challenges to developing new antibiotics. Curr. Opin. Pharmacol. 2012; 112: 522–526.
- Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, et al. Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species”. Appl. Environ. Microbiol. 2010; 76: 2445–2450.
- Losee LL, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. Nature. 2015; 517: 455–459.



# Seps z pohledu klinické mikrobiologie

Milan Kolář

Ústav mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

V předloženém sdělení jsou definovány základní přístupy k pacientům se sepsí nebo možným rozvojem seps z pohledu klinické mikrobiologie. Jsou charakterizovány principy odběru biologického materiálu, jeho transportu a případného uchování. Současně jsou uvedena základní schémata iniciální antibiotické léčby.

**Klíčová slova:** seps, mikrobiologické vyšetření, klinický materiál, antibiotická léčba.

## Sepsis from the clinical microbiology point of view

The paper defines the basic approach to patients with sepsis or potentially developing sepsis from the perspective of clinical microbiology. Also characterized are the principles of collecting biological samples, their transport and potential storage. At the same time, the basic algorithms for initial antibiotic therapy are presented.

**Key words:** sepsis, microbiological examination, clinical specimens, antibiotic therapy.

K významným problémům současné medicíny patří bezesporu septické stavy z důvodu vysoké morbidity, mortality a současně i značných finančních nákladů. Vincent et al. dokumentují výskyt seps u 35 % pacientů v intenzivní péči a 27% mortalitu (1). Martin et al. dokonce uvádějí téměř 50% mortalitu (2). Obecně lze shrnout, že seps se vyskytuje u více jak 35 % pacientů na jednotkách intenzivní péče, mortalita dosahuje 28 % a v případě septického šoku se zvyšuje na 40–60 % (3, 4).

Definice seps se postupně vyvíjí a velmi významně se o ni zasloužil R. C. Bone, který definoval sepsi jako systémovou zánětlivou reakci organismu (SIRS) na infekci (5). Je nutné zdůraznit, že zánětlivou reakci organismu lze primárně chápat jako přirozený obranný mechanismus, který však za určitých okolností vede k rozvoji orgánové dysfunkce. Jednotlivá stadia seps byla definována jako seps, těžká seps a septický šok (5). Definice seps jako SIRS infekční povahy však vykazovala některé nedostatky, především nízkou specifitu (6). U řady pacientů jsou naplněny známky bakteriální SIRS, ale infekce u nich není přítomna. V roce 2016 byla publikována nová definice seps jako

život ohrožující orgánová dysfunkce způsobená aberantní odpovědí makroorganismu na infekci (7). Seps může vyústit do septického šoku, který lze charakterizovat jako sepsi se závažnými cirkulačními, buněčnými a metabolickými abnormalitami významně zvyšujícími smrtnost (7). Důležitou roli v rozvoji seps mají změny základních fyziologických funkcí, především dýchání, koagulace, normální činnosti jater, ledvin, centrálního nervového systému a krevního oběhu, ústící do orgánové dysfunkce (6).

Jako velmi důležitá se jeví rychlá identifikace septických pacientů s rizikem vývoje orgánového selhání. Význam spočívá především v nutnosti okamžitého zahájení adekvátního terapeutického přístupu. Pro tento účel lze použít nový systém skórování, tzv. „quick SOFA“, založený na event. přítomnosti poruchy vědomí, poklesu systolického tlaku a tachypnoe (7):

- alterace vědomí,
- systolický krevní tlak  $\leq 100$  mmHg,
- dechová frekvence  $\geq 22$  dechů/min.

Jako rizikový se hodnotí pacient, který má přítomny alespoň dva ze tří výše uvedených

parametrů. Jakákoliv nevysvětlitelná orgánová dysfunkce musí vzbudit podezření na infekci a je tedy nutné posoudit možný rozvoj seps. Nеспецифická kritéria jako horečka, leukocytóza či vzestup CRP rovněž pomáhají k obecné diagnóze infekce, stejně jako specifické známky infekcí dle místa lokalizace (např. zarudnutí, zánětlivý infiltrát na plicích), popř. další laboratorní známky (hodnoty prokalcitoninu nebo presepsinu).

Důležitým předpokladem úspěšné léčby je včas identifikovat pacienta se sepsí či infekcí s možnou progresí do seps a v případě pozitivní diagnózy v tomto smyslu jsou nezbytné, mimo jiné (především stabilizace orgánové perfuze a oxygenace), odběr adekvátního klinického materiálu a okamžité zahájení antibiotické léčby. Současně je indikováno pečlivé posouzení případné nutnosti izolace pacienta a bariérového ošetřování. Již na oddělení urgentního příjmu je vhodné izolovat a bariérově ošetřovat septické pacienty s podezřením na některé diagnózy, jako například septicky probíhající průjemová onemocnění, invazivní meningokoková onemocnění, susp. chřipková pneumonie, SARS, MERS, podezření na některou z hemoragických

**Tab. 1.** Sepse komunitního charakteru (klinicky prokázána nebo pacient se susp. rozvojem sepse) – zřejmý zdroj sepse

Primární infekce	Režim antibiotické léčby
komunitní infekce horních cest dýchacích komunitní infekce horních cest dýchacích s možnou etiologickou rolí toxinu (např. <i>Streptococcus pyogenes</i> s produkcí streptokokového pyrogenního exotoxinu)	amoxicilin/kys. klavulanová, cefotaxim amoxicilin/kys. klavulanová + klindamycin cefotaxim + klindamycin
komunitní infekce dolních cest dýchacích komunitní abscedující pneumonie	amoxicilin/kys. klavulanová + klaritromycin cefotaxim + klaritromycin cefotaxim + klindamycin
komunitní uroinfekce	amoxicilin/kys. klavulanová + gentamicin piperacilin/tazobaktam
komunitní nitrobrášíň infekce s perforací GIT, komunitní nitrobrášíň infekce – cholecystitida nebo cholangioitida	amoxicilin/kys. klavulanová + gentamicin + metronidazol imipenem + gentamicin
infekce kůže a měkkých tkání infekce kůže a měkkých tkání s možnou etiologickou rolí toxinu (např. <i>Streptococcus pyogenes</i> s produkcí streptokokového pyrogenního exotoxinu, <i>Staphylococcus aureus</i> s produkcí TSST1)	amoxicilin/kys. klavulanová + gentamicin amoxicilin/kys. klavulanová + klindamycin cefazolin + klindamycin linezolid
infekce genitálního traktu	amoxicilin/kys. klavulanová + gentamicin piperacilin/tazobaktam + metronidazol
infekce CNS infekce CNS u starších osob nebo imunosuprimovaných	cefotaxim ceftriaxon cefotaxim + ampicilin ceftriaxon + ampicilin
bakteriální endokarditida	amoxicilin/kys. klavulanová + ampicilin + gentamicin ampicilin/sulbactam + gentamicin oxacilin + ampicilin + gentamicin vankomycin + gentamicin
bakteriální endokarditida po operaci na chlopních, při zavedeném PM nebo ICD	

horeček, podezření na antrax, plynatá sněť, pacienti s TBC, prokázání nositelé multirezistentních kmenů (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, vankomycin-rezistentní enterokoky, multirezistentní gramnegativní tyčinky).

Za velmi významnou lze považovat realizaci následujících kroků bezprostředně po stanovení diagnózy sepse či infekce s možným rozvojem do septického stavu:

- odběr hemokultury před nasazením antibiotik (minimálně dva páry hemokultur v časovém intervalu 20 minut),
- odběr příslušného materiálu souvisejícího s předpokládaným zdrojem infekce (pokud je znám),
- nasazení adekvátní iniciální antibioterapie (do 1 hodiny).

Cílem správného odběru klinického materiálu a jeho mikrobiologického vyšetření je stanovení etiologického agens. Tímto je v řadě případů umožněna následná úprava antibiotické léčby cíleně dle mikrobiálního původce, resp. deescalace širokospektré antibiotické terapie (8). Současně se jedná o jeden z důležitých faktorů prevence vzniku a šíření multirezistentních bakterií (9). Transport materiálu ke kultivačnímu vyšetření musí být co nejrychlejší. Každá prodleva snižuje úspěšnost mikrobiologické diagnostiky, zejména v případě růstově náročných bakterií (10). V klinické praxi je možné definovat tři základní situace:

**Tab. 2.** Sepse komunitního charakteru (klinicky prokázána nebo pacient se susp. rozvojem sepse) – zdroj sepse není znám

Primární infekce – není zřejmá	Režim antibiotické léčby
	amoxicilin/kys. klavulanová + gentamicin cefotaxim + gentamicin meropenem + vankomycin

okamžitý transport klinického materiálu v běžnou pracovní dobu mikrobiologické laboratoře (doba by neměla přesáhnout 30 minut – maximálně 1 hodinu od odběru),  
 ■ uložení materiálu na příslušném oddělení a jeho odložený transport v nejbližší pracovní době mikrobiologie (jedná se především o odběry v průběhu noci),  
 ■ okamžitý transport klinického materiálu v rámci pohotovostní služby mikrobiologického oddělení, tento přístup se týká především:

- infekcí CNS a zpracování likvoru,
- podezření na klostridiovou myonekrozu a zpracování sekretu či výtěru,
- podezření na pneumonii s etiologickou rolí *Staphylococcus aureus* s produkcí Pantanova-Valentinova leukocidinu a zpracování materiálu z dolních cest dýchacích.

Materiál odebíraný k mikrobiologickému vyšetření lze obecně rozdělit do tří základních skupin:

- Tekutý materiál (moč, krev, likvor, hnis, sputum a další tělesné tekutiny či tkáně v tekutém stavu).

Tyto materiály se odebírají do sterilní nádoby v dostatečném množství (minimálně 0,5–1 ml). Velmi důležité je, aby použitá nádoba dobře těsnila a nemohlo dojít ke kontaminaci materiálu či naopak okolí a zdravotnického personálu. Pro krev jsou speciální nádoby s kultivační půdou. Krev na kultivační vyšetření, tzv. hemokulturu, je nutné odebrat ihned po stanovení diagnózy sepse nebo možnosti vzniku sepse, a to minimálně 2 páry hemokultur. Pokud má pacient intravaskulární katétre zavedené více než 24 hodin a není evidentní jiný zdroj infekce, je nutný odběr jednoho páru hemokultur z katétru a jeho následné zrušení nebo výměna. V případě, že klinické materiály nelze odeslat (např. v noci), je nutné jejich adekvátní uchování. Obecně lze stanovit, že optimální je infekční lednice při teplotě 4–8 °C s výjimkou hemokultur, tyto je nutné ponechat do doby transportu při pokojové teplotě. Nízká teplota je nevhodná, protože prodlužuje dobu následné kultivace a tím i čas detekce pozitivní hemokultury. V případě likvoru jakékoliv skladování nepřipadá

**Tab. 3.** *Sepeš nozokomiálního charakteru – zřejmý zdroj sepeš*

Primární infekce	Režim antibiotické léčby
nozokomiální pneumonie časná (vznik 3.–4. den hospitalizace)	amoxicilin/kys. klavulanová (event. ampicilin/sulbaktam) + gentamicin
nozokomiální pneumonie pozdní (vznik od 5. dne hospitalizace)	meropenem + gentamicin (event. amikacin) piperacilin/tazobaktam + gentamicin (event. amikacin)
nozokomiální intraabdominální infekce	piperacilin/tazobaktam + gentamicin (event. amikacin) + metronidazol meropenem + gentamicin (event. amikacin) + metronidazol
nozokomiální uroinfekce	piperacilin/tazobaktam + gentamicin (event. amikacin)
katéetrová infekce	vankomycin + piperacilin/tazobaktam + gentamicin (při renální insuficienci místo vankomycinu linezolid)

v úvahu a jsou nutné okamžitý transport a následné zpracování v rámci pohotovostní mikrobiologické služby.

■ Tuhý materiál (tkáň, stolice atd.).

Pro odběr platí stejná pravidla jako pro tekutý materiál. Případné uchování těchto materiálů před odesláním je nevhodnější při teplotě 4–8 °C.

■ Výtěry (slouží k odběru malého množství materiálu nebo tam, kde není možný odběr jiným způsobem).

Lze použít „výtěrovky“ bez transportního média, delší časový interval do jejich zpracování však podstatným způsobem snižuje pravděpodobnost záchytu původce. Doba od odběru materiálu do zpracování v laboratoři by neměla přesáhnout dvě hodiny. Mnohem výhodnější jsou „výtěrovky“ s transportním médiem (např. Amiesovo transportní médium), které umožňují přežívání většiny bakterií, uplatňujících se v patogenezi bakteriálních infekcí, v závislosti na jejich odolnosti a růstových vlastnostech. Případné uchování je možné při pokojové teplotě (výtěry z horních cest dýchacích a dalších míst s mikrobiální mikroflórou) nebo v ledničce při 4–8 °C (výtěry z genitálního traktu, abscesů a hlubokých ran).

Významným přínosem pro včasnou identifikaci bakteriálních původců septických stavů je systém MALDI-TOF využívající hmotnostní spektroskopii. Tato metodika umožňuje určit bakteriálního původce bezprostředně po primokultivaci, tedy první den po inokulaci klinického materiálu na příslušné kultivační půdy. Přes skutečnost, že není k dispozici fenotypové stanovení citlivosti/rezistence bakteriálního původce k antimikrobním přípravkům, má jeho přesná identifikace velký význam právě pro antibiotickou léčbu. Je totiž možné, a v podstatě nutné, vzít v potaz primární rezistenci, která je u příslušných bakteriálních druhů předem defi-

**Tab. 4.** *Sepeš nozokomiálního charakteru – zdroj sepeš není znám*

Primární infekce – není zřejmá	Režim antibiotické léčby
	piperacilin/tazobaktam + gentamicin (event. amikacin) + vankomycin meropenem + gentamicin (event. amikacin) + vankomycin

**Tab. 5.** *Doporučené iniciační dávkování antibiotik u dospělých pacientů*

Antibiotikum	Iniciační dávka	Poznámka
ampicilin/sulbactam	3 g	
amoxicilin/kys. klavulanová	1,2 g	přidat 2 g ampicilinu i. v. u bakteriální endokarditidy
cefuroxim	1,5 g	
cefotaxim	2 g	
ceftriaxon	2 g	
penicilin G	5 mil. IU	pozor na případnou hyperkalémii
piperacilin/tazobactam	4,5 g	
meropenem	2 g	
imipenem	1 g	
vankomycin	1 g	pomalá infuze jako prevence „red man“ syndromu
linezolid	600 mg	
gentamicin	5 mg/kg tělesné hmotnosti	
klaritromycin	500 mg	
klindamycin	900 mg	
metronidazol	1 g	
ciprofloxacin	400 mg	

nována, a současně aktuální údaje o sekundární rezistenci. Tento postup umožňuje optimalizaci iniciační antibiotické léčby a tím snížit morbiditu i mortalitu pacientů.

Iniciační antibiotická léčba je zahájení antibioterapie bezprostředně po stanovení diagnózy bakteriální infekce. Bakteriální etiologické agens, včetně citlivosti k antibiotikům, většinou není známo. K určení původce je nutné využít mikrobiologické vyšetření (adekvátní mikroskopie, kultivace, průkaz antigenů, stanovení protilátek atd.) příslušných klinických materiálů dle předpokládaného ložiska infekce. Hlavním cílem je včasné nasazení účinných antibiotik. Současně je nezbytné ověřit, zdali pacient nebyl v posledních třech měsících hospitalizován a zdali v nemocničním informačním systému nejsou k dispozici výsledky předcházejících mikrobiologických vyšetření. Pokud tyto jsou k dispozici, je nutné je zkontrolovat na event. přítomnost multirezistentních bakterií. Tento postup umož-

ňuje případné rozhodnutí o izolaci pacienta i bariérovém ošetřování a současně je velmi vhodným podkladem pro iniciační antibioterapii. Za rizikové lze považovat pacienty přicházející z domovů důchodců, ústavů dlouhodobé péče, hospitalizované v průběhu posledních tří měsíců a pacienty s širokospektrou antibiotickou léčbou v posledních třech měsících.

Etiologickými agens sepeš jsou gramnegativní i grampozitivní bakterie. Martin et al. na souboru více jak 11 000 pacientů s těžkou sepsí uvádějí gramnegativní etiologii v 57 %, grampozitivní ve 44 % a mykotickou u 11 % (2). Konkrétní patogen velmi často souvisí se základní bakteriální infekcí, pokud je přítomna. K častým zdrojům patří nozokomiální infekce, především pneumonie, intraabdominální infekce a uroinfekce. Sepeš však může vycházet i z komunitních infekcí, například pneumonií, infekcí gastrointestinálního traktu a měkkých tkání. K nejčastějším bakteriálním původcům sepsí patří enterobakterie (především

kmeny *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp.), nefermentující gramnegativní tyčinky (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* komplex), stafylokoky (především *Staphylococcus aureus*), enterokoky (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*), streptokoky (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*) a rovněž anaerobní bakterie (například *Bacteroides* sp.) u intraabdominálních infekcí. V diferenciálně diagnostické rozvaze o etiologii sepse u konkrétního pacienta je nutné posoudit příčinu, resp. primární infekci. V případě určení základního zdroje sepse lze s větší pravděpodobností předpokládat etiologické agens v souladu se znalostí nejčastějších bakteriálních původců příslušných infekcí. Na zá-

kladě klinického zhodnocení lze pacienty zařadit do následujících skupin:

1. Sepse komunitního charakteru (klinicky prokázaná nebo pacient se susp. rozvojem sepse):
  - a) zřejmý zdroj sepse (tab. 1),
  - b) zdroj sepse není znám (tab. 2).
2. Sepse nozokomiálního charakteru, přičemž do této skupiny patří i pacienti z domovů důchodců, léčeben dlouhodobě nemocných a s aplikací antibiotik v posledních třech měsících:
  - a) zřejmý zdroj sepse (tab. 3),
  - b) zdroj sepse není znám (tab. 4).

Iniciální antibiotická léčba v jednotlivých skupinách je uvedena v tabulkách 1–4. Uvedená schémata však nelze považovat za

jediná možná a je nutné vycházet z výsledků surveillance bakteriální rezistence k antimikrobním přípravkům v konkrétních epidemiologických jednotkách.

Dávkování antimikrobních přípravků u dospělých pacientů je uvedeno v tabulce 5. Ve všech případech se jedná o intravenózní aplikaci prvních dávek uvedených léčiv.

Pokud je podezření na herpetickou infekci, je indikován acyclovir v dávce 10 mg/kg tělesné hmotnosti. U mykotických infekcí je nutné posoudit možné etiologické agens, v případě plísní lze použít vorikonazol (6 mg/kg), u kvasinek mikamin (200 mg i.v.) nebo anidulafungin (200 mg i.v.).

*Podpořeno grantem IGA\_LF\_2016\_022.*

## LITERATURA

1. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006; 34: 344–353.
2. Martin G, Brunkhorst FM, James JM, et al. The international PROGRESS registry of patients with severe sepsis: drotrecogin alfa (activated) use and patients outcomes. *Crit Care* 2009; 13: R103.
3. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign guidelines committee including the pediatric subgroup surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock 2012. *Intensive Care Med* 2013; 39: 165–228.
4. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. *Intensive Care Med* 2003; 29: 530–538.
5. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101: 1644–1655.
6. Průcha M, Fedora M, Kieselevá E, Šrámek V, et al. Sepse. Maxdorf Jeseenius, 2015.
7. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801–810.
8. Kolář M. Volba antibiotik v intenzivní péči. *Postgrad Med* 2012; 14: 510–513.
9. Kolář M. Problematika bakteriální rezistence k antibiotické léčbě. *Postgrad Med* 2013; 15: 817–821.
10. Scharfen J. Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii. *Nucleus HK*; 2013.

# Amiodaron: dobrý sluha, zlý pán.

## Kazuistika amiodaronem indukované tyreotoxikózy s fatálním koncem

Viktor Talafa<sup>1</sup>, Ondřej Zela<sup>1</sup>, Dalibor Pastucha<sup>2</sup>, Petra Šrubařová<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Interní oddělení nemocnice ve Frýdku Místku, p. o.

<sup>2</sup>ReFit Clinic, s. r. o., Olomouc a Ústav rehabilitace lékařské fakulty Ostravské univerzity

V naší kazuistice poukazujeme na komplikaci léčby amiodaronem – indukovanou tyreotoxikózu 2. typu (AIT), která skončila fatálně. Konkrétně pojednáváme o 79letém pacientovi, který byl léčen amiodaronem pro paroxysmální fibrilaci. AIT se u něho projevila velmi netypicky, a to změnou psychického stavu a kvalitativní poruchou vědomí s projevy srdečního selhání ústícího do zástavy oběhu. Byla provedena úspěšná kardiopulmonální resuscitace (KPCR) s napojením na umělou plicní ventilaci (UPV). Od začátku jsme podávali agresivní kombinovanou tyreostatickou terapii spolu s kortikoidy. I přes adekvátně vedenou terapii nedošlo ke klinické ani laboratorní remisi a nadále trvaly známky tyreotoxikózy. Proto byla z vitální indikace provedena totální tyreoidektomie (TTE) s tracheostomií (TS). Po dosažení eufunkce hormonální substituce. V dalším průběhu hospitalizace došlo k řadě komplikací. Dominují recidivující nozokomiální pneumonie v rámci UPV. Laboratorně bylo dosaženo eutyreózy, avšak po úspěšném odpojení od ventilátoru a odtlumení zůstává porucha vědomí na úrovni perzistentního vegetativního stavu (PVS). V průběhu dlouhodobé intenzivní péče dochází k postupnému vyčerpání biologických rezerv s rozvojem multiorgánového selhání, které končí po 72denní hospitalizaci smrtí pacienta.

**Klíčová slova:** amiodaron, hypertyreóza, tyreotoxická krize, tyreostatika.

### Amiodaron: a good servant, but a bad master. Case report of amiodarone induced thyrotoxicosis with fatal outcome

The case report showcases a complication of amiodarone treatment – type 2 amiodarone induced thyrotoxicosis (AIT) with a fatal outcome. A 79-year old patient was being treated with the culprit drug for paroxysmal atrial fibrillation. The treatment was complicated by an atypical clinical presentation of AIT with altered mental status, qualitative change of consciousness and heart failure resulting in cardiac arrest. A successful CPR was performed and the patient was put on mechanical ventilation. An aggressive course of thyrostatic treatment along with corticosteroids was started early on. Due to little to no clinical or laboratory response an urgent thyroidectomy with tracheostomy was performed as a last resort. Having at last reached euthyroid state, the thyroid hormone replacement therapy was started. A series of post-operative complications emerged including relapsing ventilator-associated pneumonia. The patient was ultimately weaned off the ventilator support and sedation but deep impairment of consciousness persisted (persistent vegetative state). Subsequent prolonged intensive care led to progressive deterioration of overall condition and multiple organ dysfunction syndrome developed. Death occurred after a total of 72 days of hospital stay.

**Key words:** amiodarone, hyperthyreosis, thyrotoxicosis, thyreostatics.

### Úvod

Amiodaron je znám již více než 50 let. Jedná se o jodovaný derivát benzofuranu a klasicky

se řadí mezi antiarytmika III. třídy dle Vaughn-Williamse. Je však antiarytmikem s multifunkčním působením. Působí prostřednictvím účinku

na draslíkové, sodíkové a kalciové kanály, má však i alfa a betalytické účinky (1). Snížením draslíkového toku prodlužuje depolarizaci komor

KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA: MUDr. Viktor Talafa, Ph.D., vtalafa@email.cz  
Interní oddělení nemocnice ve Frýdku-Místku, p. o.  
E. Krásnohorské 321, 738 01 Frýdek-Místek

Cit. zkr: Klin Farmakol Farm 2016; 30(3): 33–36  
Článek přijat redakcí: 22. 11. 2016  
Článek přijat k publikaci: 1. 12. 2016



a akční potenciál kardiomyocytu (třída III.). Ve středních dávkách má schopnost blokovat alfa a beta adrenergní receptory (třída II.) a taky v malé míře ovlivňuje i blokaci sodíkových kanálů (třída I.). Dále snižuje automacii sinusového uzlu a atrioventrikulární junkce s prodloužením atrioventrikulárního vedení (2).

Začátkem 60. let minulého století byl primárně používán jako lék na anginu pectoris, až později v roce 1986 se začal používat jako antiarytmikum (3). V dnešní moderní kardiologii a intenzivní péči se jedná o naprosto nepostradatelný lék. Existují důkazy o vlivu na snížení kardiovaskulární mortality (studie: CAMIAT, ATMA atd.), rovněž snižuje riziko náhlé srdeční smrti (studie BASIS, PAT, EMIAT atd.) (2). Má vysokou účinnost v léčbě jak komorových, tak i supra-ventrikulárních arytmií, proto se také hojně využívá v rámci KPCR a v přednemocniční péči při jejich výskytu. Další výhodou jeho působení je snížení spotřeby kyslíku v myokardu s poklesem periferní cévní rezistence. Z jeho farmakokinetického profilu je důležité zdůraznit, že plazmatická hladina dosahuje maxima za 3–7 hodin po p. o. podání. Biologická dostupnost je prakticky 100% z podané dávky a více než 99% se váže na sérové proteiny. Z tohoto jasně vyplývá jeho výrazně dlouhý biologický poločas, který se běžně uvádí mezi 20–60 dny (4).

Kromě výše popsaných nenahraditelných výhod má však bohužel také spoustu nežádoucích účinků. Indikace jeho podávání proto patří do ruky zkušeného lékaře kardiologa nebo intenzivisty, který zná i všechna úskalí této terapie. Tyto plynou z jeho různorodého mechanismu účinku na lidský organizmus. Nejčastější závažné nežádoucí účinky amiodaronu zde přehledně uvádím (zdroj: portál Medscape–Drug info) (5):

1. tyreopatie,
2. intersticiální pneumonie,
3. akumulace korneálních depozit,
4. dermatologické abnormality,
5. hepatopatie,
6. neurologické komplikace,
7. gastrointestinální obtíže.

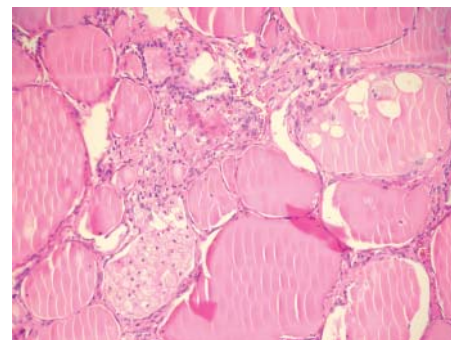
Cílem tohoto sdělení je popis kazuistiky amiodaronem indukované tyreopatie.

### Popis případu

Jedná se 79letého pacienta s anamnézou paroxyzmální fibrilace síní (FS), arteriální hyperten-

ze a diabetu mellitu 2. typu (DM). Pro paroxyzmální FS byl léčen od července 2011 antikoagulační léčbou warfarinem a amiodaronem. V mezidobí podstupoval pravidelné kontroly na kardiologické ambulanci s monitorací antikoagulace. Po nasazení amiodaronem se drží sinusový rytmus, který je potvrzen i 24hodinovou monitorací EKG. Na podkladě tohoto faktu byla v červnu 2012 antikoagulační léčba ukončena s pokračováním antiagregace. V mezidobí byly prováděné kontroly hormonů štítné žlázy (HŠŽ) s konstatováním eutyreózy. Na poslední ambulanci kontrole v červnu 2013 byly HŠŽ také v normě (TSH 2,46 mU/l, FT4 20,1 pmol/l, FT3 4,44 pmol/l). Další kardiologická kontrola byla naplánovaná na leden 2014. Avšak koncem prosince 2013 kolem třetí hodiny ráno byl pacient přivezen rodinou na interní příjmovou ambulanci (IPA) nemocnice ve Frýdku-Místku pro zhoršení stavu. Dle rodiny se uplynulý týden choval neadekvátně, poslední den byl dezorientovaný a nedalo se s ním domluvit. Stav vrcholil synkopou se spontánní regresí stavu vědomí, proto pacienta přivezli akutně. Na IPA dominovala kvalitativní porucha vědomí s dezorientací ve všech kvalitách, psychomotorický neklid a agitovanost. Byl vulgární vůči ošetřujícímu personálu i rodině. Dle sdělení rodiny takový neklid předtím nebyval. Fyzikální vyšetření bylo kromě výše popsaného bez nápadností. Oběhově i tlakově byl stabilní (TK 145/80 mmHg, srdeční akce nepravidelná 125/min), byl bez teploty. Ve fyzikálním nálezu byly vyjádřené známky lehké dehydratace. Na EKG byla zaznamenána recidiva FS s rychlou odpovědí komor. Bylo provedeno akutní nativní CT mozku, které bylo bez verifikace čerstvých ložiskových změn. Patrná byla pouze mozková atrofie, známky arteriosklerotické encefalopatie a starší lakunární infarkty v oblasti bazálních ganglií oboustranně. Byla odebrána moč k toxikologickému vyšetření, které vyloučilo akutní intoxikaci. Hladina etanolu v krvi byla taky nulová. V diferenciativní diagnostice byl zvažován i podíl abstinčního syndromu, dle rodiny byl však pacient bez chronického abúzu etanolu. V základním laboratorním obraze nebyla významnější patologie. Pacient byl hospitalizován na monitorovaném lůžku interního oddělení v 5 hodin ráno s pracovní diagnózou: kvalitativní porucha vědomí s hyperaktivním deliriem nejasné etiologie. Podaná sedativa byla bez odezvy, progredoval psychomotorický neklid, proto byl pacient v 8 hodin ráno stejného dne převzat na JIP. Zde bylo doplněno vyšetření HŠŽ s nálezem tyre-

**Obr. 1.** Difuzní koloidní struma s regresivně-destruktivními změnami



otoxikózy (**TSH pod 0,01 mU/l, FT4 86,6 pmol/l, FT3 11,74 pmol/l**). Protilátky proti tyreoidální peroxidáze (TPO-Ab) a proti tyreoglobulinu (Tg-Ab) byly negativní. Vzhledem k dlouhodobé expozici amiodaronu (29 měsíců) bez předešlé anamnézy tyreopatie jsme stav zhodnotili jako amiodaronem indukovanou tyreotoxikózu (AIT) II. typu. Na JIP byla pacientovi od začátku podávaná vysokodávkovaná tyreostatická léčba (propylthiouracil v dávce 600 mg/den p. o.), dále betablokátor (metoprolol 200 mg/den p. o.) a kortikoidy (hydrokortizon 300 mg/den i. v.). Pro trvající hyperaktivní delirium byla kontinuálně intravenózně podávána sedativa a neuroleptika (klonazepam a chlorpromazin). Preventivně byla nutná kurtace horních i dolních končetin. Pro riziko aspirace byla zavedena nazogastrická sonda k aplikaci enterální výživy, megadávky tyreostatik a betablokátoru. Třetí den hospitalizace v ranních hodinách došlo náhle k progresi stavu s hlubokou poruchou vědomí, bradykardií, apnoickými pauzami s hyposaturací a s následnou bradykardií. Ihned byla zahájena kardiopulmonální resuscitace (KPCR), podpora oběhu analeptiky, byla provedena orotracheální intubace a pacient byl napojen na umělou plicní ventilaci. Celková délka KPCR s obnovením oběhu trvala cca 30 minut. Dále byla zajištěna centrální vena, kterou byla provedena aplikace masivní tekutinové resuscitace krystaloidy. Pro hypotenzi byla nutná podpora oběhu střední dávkou noradrenalinu. Ihned po KPCR bylo doplněno kontrolní EKG, které bylo proti vstupnímu vyšetření bez vývoje, trvala FS. Bedside echokardiografie vyloučila akutní masivní plicní embolii a potvrdila systolickou dysfunkci levé komory srdeční s její dilatací, což svědčí pro akutní srdeční selhání. V rámci poresuscitační péče byla zahájena řízená hypotermie formou povrchového fyzikálního chlazení termodekou, podáváním chlazených infuzí s proplachy močového měchýře chladnými

roztoky za kontinuální monitorace teploty jícno-  
vým čidlem s cílem dosažení teploty těla 34,5 °C.  
Etiologicky jsme stav zhodnotili jako AIT II. typu  
s hyperaktivním deliriem a akutním srdečním  
selháním ústícím do zástavy oběhu. Byl doplněn  
ultrazvuk štítné žlázy, která byla bez ložiskových  
změn, Doppler flow byl bez signálu. Řízená hy-  
potermie probíhala 24 hodin, poté byla ukončena  
s následným rozvojem teplot, vstupně odebrané  
hemokultury byly bez průkazu patogenu. Pro  
signifikantní elevaci CRP (184,3 mg/l), presepsinu  
(1 261 ng/l) byla empiricky nasazena širokospektrá  
antibiotika (ATB) (imipenem/cilastatin v dávce  
500 mg co 6 hodin). Sedmý den od přijetí byla  
provedena konzultace endokrinologa s dopo-  
ručením kombinované tyreostatické léčby, proto  
došlo k titraci dávek propylthiouracilu (450 mg/  
den) a thiamazolu (30 mg/den), dále jsme pokračovali  
v terapii hydrokortizonem (300 mg/den).  
Na JIP kompletní přístup v rámci intenzivní  
péče (UPV, kombinovaná nutrice, parenterální  
a enterální, kontinuální podávání inzulínu atd).  
V průběhu hospitalizace se opakovaně vyskytly  
nozokomiální infekce v oblasti dolních dýcha-  
cích cest (ventilátorová pneumonie) a močového  
traktu polyrezistentními kmeny (*Pseudomonas  
aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ESBL). Po 17  
dnech hospitalizace, i přes kombinovanou ty-  
reostatickou léčbu ve výše uvedeném vysoko-  
dávkovém schématu, trval laboratorní obraz ty-  
reotoxikózy (TSH pod 0,01 mU/l, fT4 74,4 pmol/l,  
fT3 5,84 pmol/l). Vzhledem k tomuto faktu jsme  
se ve spolupráci s endokrinologem a otorinolaryngologem  
rozhodli pro totální tyreoidektomii (TTE) a tracheostomii.  
Operační výkon jsme provedli 18. den hospitalizace, byl bez komplikací.  
Byly odstraněny oba dva laloky štítné žlázy a ode-  
slány k histologickému vyšetření. Po obarvení  
resekátu hematoxylin-eosinem byl patrný obraz  
difúzní koloidní strumy s regresivními změnami  
(obr. 1). Již za tři dny od TTE byl patrný významný  
pokles fT4 (40,3 pmol/l) i fT3 (1,76 pmol/l). Pátý  
pooperační den (PD) bylo nutné řešit masivní  
krvácení z operační rány na krku s nutností hemo-  
terapie krevními transfuzemi a čerstvou mraže-  
nou plazmou. Akutně byla provedena revize se  
zástavou krvácení. Dále byl průběh bez lokálních  
komplikací. Šestý den po TTE se normalizovalo fT4  
(16,8 pmol/l) a fT3 již nižší (1,24 pmol/l). Nasadili  
jsme substituční dávku (Euthyrox 100 µg/den),  
kterou jsme pokračovali do 16. PD, kdy byl za-  
znamenán pokles HŠŽ do lehké hypotyreózy fT4

(11,6 pmol/l) a fT3 (0,86 pmol/l), bylo provedeno  
navýšení substituce euthyroxem na 175 µg/den.  
Tato dávka dále udržovala eutyreózu. Po zvládnutí  
všech zánětlivých komplikací jsme se 33. den hos-  
pitalizace rozhodli k zahájení procesu odpojení od  
ventilátoru. Tento však probíhal velmi obtížně. Na  
redukci analgosedace pacient reagoval vegeta-  
tivním neklidem a neefektivní ventilační aktivitou.  
Nakonec se po třech týdnech podařilo pacien-  
ta odpojit od umělé plicní ventilace s úplným  
vysazením analgosedace a obnovou adekvátní  
spontánní ventilace. Výsledný stav vědomí však  
zůstával na úrovni perzistentního vegetativního  
stavu. V dalším průběhu dominovala dlouhodo-  
bá intenzivní ošetrovatelská péče. Nutrice byla  
zajištěna perkutánní gastrostomií. I v této fázi  
léčby jsme nadále řešili recidivující nozokomiální  
infekty dolních cest dýchacích a urotraktu výše  
uvedenými polyrezistentními kmeny. Postupně  
ale docházelo k vyčerpání biologických rezerv  
organizmu i dalších možností intenzivní péče  
a pacient 72. den hospitalizace na JIP zemřel.

## Diskuze

Amiodaron ovlivňuje štítnou žlázu dvěma  
mechanizmy. Jednak přítomností enormně vel-  
kého množství jodu, jedna jeho tableta o síle  
200 mg ho obsahuje 75 mg. To odpovídá 750  
tabletám léku Jodid 100, který obsahuje 100 mcg  
jódu a běžně se k jeho substituci používají 1–2  
tablety (100–200 mcg/den). Druhým mecha-  
nizmem je přímý cytotoxický vliv amiodaronu  
na buněčné membrány. Vlivem těchto dvou  
mechanizmů dochází ke změnám v regulaci  
produkce hormonů štítné žlázy. Po započetí  
léčby amiodaronem dochází v prvních třech  
týdnech vlivem výrazně zvýšeného přísunu jo-  
du k inhibici hormonální syntézy, následně se  
produkce obnovuje a v některých případech  
dokonce zvyšuje (3). Z tohoto vyplývají násle-  
dující nežádoucí účinky na štítnici:

1. amiodaronem indukovaná hypotyreóza (AIH),
2. amiodaronem indukovaná tyreotoxikóza (AIT).

Vzhledem k výše popsaným mechanismům  
rozdělujeme dva typy AIT:

**AIT I. typu** – vzniká u osob s anamnézou ty-  
reopatie. Buď se jedná o autoimunitní postižení  
štítné žlázy, nebo o tyreoidální autonomii, která  
se projeví až po podání amiodaronu. Klinicky

se tyreopatie doposud nemusela vůbec pro-  
jevit. Jedná se o podmíněnou tyreopatii, a to  
takzvaným mechanismem „jod basedow“, kdy  
se vysokým přívodem jodu potencuje novotvor-  
ba hormonů v autonomní tkáni (6).

**AIT II. typu** – vzniká v dosud zdravé tkáni,  
a to přímým cytotoxickým účinkem amiodaro-  
nu na tyreocyty, který způsobí rozpad folikulů  
s uvolněním velkého množství tyreoidálních  
hormonů do cirkulace (6). Jedná se o stejný  
mechanismus poškození jako u pneumonitidy  
nebo hepatopatie indukované amiodaronem.  
Tento typ se nazývá destruktivní. Klinický obraz  
je stejný jako u klasické hypertyreózy a labora-  
torně jsou výrazně pozitivní známky zánětu.  
Charakteristickým znakem tohoto postižení je  
normální perfuze při dopplerovském vyšetření  
a nepřítomnost strumy. Histologicky nalezně-  
me různý stupeň destrukce folikulů. V labora-  
torním obraze jsou negativní protilátky proti  
tyreoglobulinu, tyreoperoxidáze a tyreotrop-  
ním receptorům (TSH). Jejich pozitivita se může  
později objevit v důsledku sekundární iniciace  
autoimunitního procesu. V případě, že se objeví  
protilátky proti TSH receptorům, tak tyto obvykle  
nemají stimulační aktivitu a nejsou vlastní příči-  
nou AIT (7).

Vzhledem k výrazně dlouhému biologické-  
mu poločasu amiodaronu způsobené kumulací  
jódu ve štítné žláze a tukové tkáni mají obě  
AIT protražovaný průběh a špatně reagují na  
tyreostatickou terapii (8). Téměř vždy je nutná  
hospitalizace pacienta a podávání vysokých  
dávok tyreostatik. Laboratorní a klinická od-  
pověď na zahájenou léčbu nastupuje typicky  
s delší latencí, proto se s výhodou podávají  
tyreostatika s rychlejším nástupem účinku (thia-  
mazol). U AIT II. typu jsou účinné kortikoidy,  
které zabraňují destrukci folikulů s vyplave-  
ním již vytvořených hormonů, což neovlivňuje  
tyreostatika. Při závažném průběhu je nutná  
kombinace tyreostatik. Ohledně AIT I. typu  
je v literatuře opakovaně zmiňovaná dobrá  
odezva na léčbu perchlorátem (chloristanem)  
draselným (KClO<sub>4</sub>) v kombinaci s thiamazolem.  
Toto účinně zablokuje transport jódu z celotě-  
lových zásob směrem intratyreoidálně (9). Velmi  
často se jedná o kombinaci AIT I. a II. typu, proto  
někteří autoři doporučují zahájit kombinova-  
nou tyreostatickou léčbu hned od začátku  
a v případě, že nedochází k adekvátní hormo-  
nální supresi, tak s odstupem pár týdnů do

kombinace přidat kortikoidy. V případě, že se jedná od začátku o těžký průběh, je vhodné tuto trojkombinaci podávat hned (10). Většina pacientů je po dosažení eufunkce indikovaná k totální tyreoidektomii (TTE). Jsou však možné i dlouhodobé farmakologicky navozené remise. Pro významnou akumulaci jódu ve štítné žláze nelze použít léčbu radiojódem, tuto lze aplikovat až po úplné eliminaci jódu z organismu, což může trvat měsíce, ale i roky. Opětovné podání amiodaronu z kardiologické indikace je možné až po provedení TTE (11).

Vzhledem k výše uvedenému je nutné u podávání amiodaronu dodržovat doporučené postupy, které vycházejí z doporučení České endokrinologické společnosti. U každého pacienta je žádoucí před zahájením terapie zjistit, jestli netrpí na tyreopatii on nebo někdo z jeho příbuzných. Laboratorně vyšetříme hodnotu TSH, lépe i fT4. V akutních případech, kdy se amiodaron podává neodkladně intravenózně, je potřeba toto laboratorní vyšetření doplnit s odstupem s vědomím, že výsledek vyšetření bude již s velkou pravděpodobností modifiková-

ván. Pokud je pozitivní anamnéza nebo patologický laboratorní nález, je nutné před podáním léku podrobnější endokrinologické vyšetření. V případě normálního laboratorního nálezu je toto vyšetření nutno opakovat jednou za tři až šest měsíců, a to i rok po vysazení, protože tyreopatie se mohou objevit s latencí několika měsíců (12, 13). V průběhu léčby je nutné sledovat i možné klinické příznaky tyreotoxikózy (váhový úbytek, hypertermie, insomnie, palpitace, dušnost atd.).

### Závěr

Závažné formy AIT nejsou tak vzácné (incidence 5%). Vzhledem k jejich časté rezistenci k podávané léčbě však ohrožují pacienty na životě. Pokud zvažujeme léčbu amiodaronem, je důležité zjistit, jestli pacient netrpí nějakou formou tyreopatie. Pokud možno nepodávat amiodaron osobám s anamnézou jakékoliv tyreopatie. Pokud je tato léčba z kardiologické indikace nutná, tak pravidelně monitorujeme klinický stav pacienta a laboratorní nález TSH a lépe i fT4. V případě, že k jejímu rozvoji do-

jde, amiodaron okamžitě vysadíme. Nasadíme tyreostatika s rychlým nástupem účinku (thiamazol). V případě závažného průběhu pacienta hospitalizujeme a podáváme dvojkombinaci tyreostatik spolu s kortikoidy hned od začátku (10). Nemocné, kteří potřebují pokračovat v léčbě amiodaronem a je u nich riziko recidivy tyreotoxikózy, indikujeme tyreoidektomii nebo po kompletní eliminaci jódu z organismu léčbu radiojódem. Prognóza pacientů se závažným průběhem AIT je nepříznivá.

Autoři předkládají kazuistiku pacienta s AIT II. typu se závažným průběhem, primárně atypickou manifestací hyperaktivním delíriem a dále srdečním selháním rychle ústícím do zástavy oběhu i přes adekvátně vedenou léčbu vysokými dávkami tyreostatik v dvojkombinaci spolu s kortikoidy a správným načasováním TTE z vitální indikace. Náš případ se shoduje s velkou většinou kazuistik v dostupné literatuře v tom smyslu, že pacienti s AIT velmi špatně reagují na adekvátně vedenou léčbu, na které často nedochází ke klinické ani laboratorní odezvě (8).

### LITERATURA

1. Katzung BG. Základní & klinická farmakologie, H&H, 1994: 211 s.
2. Hrczková Y, Sarapatková H, Lukl J. Interní medicína pro praxi 6 /2005.
3. Iudica-Souza C, Burch HB. Amiodarone – induced thyroid dysfunction, *The Endocrinologist*, 1999; 9: 216–227.
4. Jiravská G, Jiravský O, Vavra P, Branny M. *Klin Farmakol Farm* 2004; 18: 171–174.
5. <http://www.medscape.com/druginfo/>
6. Zamrazil V, Nemeč J. Vliv amiodaronu na štítnou žlázu. In:

- Starka et al. *Aktuální endokrinologie*. Praha, Maxdorf-Jessenius, 1999: 415–424.
7. Sato K, Yamazaki K, Kanaji Y, et al. Amiodarone induced thyrotoxicosis associated with thyrotropin receptor antibody. *Thyroid* 1998 8: 1123–1126.
8. Farwel AP, Abend SL, Huang SKS, et al. Thyroidectomy for amiodarone induced thyrotoxicosis. *JAMA* 1990 11: 1526–1528.
9. Bartalena L, Brogioni S, Grasso L, et al. Treatment of amiodarone induced thyrotoxicosis. A difficult challenge: results of a prospective study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81: 2930–2933.
10. Erdogan MF, Gulec S, Tutar E, et al. A stepwise approach to the treatment of amiodarone-induced thyrotoxicosis. *Thyroid* 2003; 13: 205–209.
11. Jiskra J, Limanova Z. *Česká geriatrická revue* 3/2003.
12. Bouvy ML, Heeridink ER, Hoes AW, et al. Amiodarone induced thyroid dysfunction associated with cumulative dose. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2002; 11: 601–606.
13. Caron P. Effects of amiodarone on thyroid function. *Prese Med* 1995; 24: 1747–1751.

