UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
DĚTSKÁ KLINIKA

# IMUNOSUPRESIVNÍ LÉČBA CROHNOVY NEMOCI U DĚTÍ

DISERTAČNÍ PRÁCE V DOKTORSKÉM STUDIJNÍM PROGRAMU PEDIATRIE

**MUDr. Jan MALÝ**

Hradec Králové
2009

# OBSAH


| | stránka |
|---|---|
| Poděkování | 3 |
| Obecný úvod | 4 |
| A. Experimentální část | 8 |
| **1. Úvod experimentální části** | 9 |
| **2. Terapeutický efekt 6-thioguaninu na myším modelu experimentální kolitidy** | 13 |
| 2.1. Cíl studie | 13 |
| 2.2. Materiál a metoda | 13 |
| 2.3. Protokol | 14 |
| 2.4. Výsledky | 15 |
| 2.5. Závěry | 20 |
| **3. Farmakokinetika azathioprinu po zahájení léčby nespecifických střevních zánětů u dětí** | 21 |
| 3.1. Cíl práce | 21 |
| 3.2. Materiál a metoda | 21 |
| 3.3. Výsledky | 24 |
| 3.4. Závěry | 29 |
| B. Klinická část | 30 |
| **4. Terapie Crohnovy nemoci u dětí se zaměřením na léčbu azathioprinem a kortikosteroidy** | 31 |
| 4.1. Úvod do problematiky systémové aplikace glukokortikosteroidů | 31 |
| 4.2. Cíl práce | 33 |
| 4.3. Materiál a metoda | 34 |
| 4.4. Výsledky | 38 |
| 4.5. Závěry | 53 |
| C. Diskuse | 54 |
| D. Závěry a doporučení pro praxi | 61 |
| E. Literatura | 63 |
| F. Seznam nejčastěji používaných zkratek | 71 |
| G. Publikace autora | 72 |

## PODĚKOVÁNÍ

Rád bych na tomto místě poděkoval svým kolegům a učitelům, jejichž cenné rady nebo pomoc přispěly k dokončení disertační práce.

Velký dík patří kolegům z každodenní práce u lůžek nemocných dětí a panu primáři doc. MUDr. Zdeňku Kokšteinovi, CSc. za vstřícnost a podporu při dokončování disertace. Paní profesorce MUDr. Heleně Tlaskalové-Hogenové, DrSc. a MUDr. Miloslavu Kverkovi, PhD. bych velmi rád poděkoval za laskavý přístup a péči, kterou věnovali klinikovi v experimentální části disertační práce, dr. Kverkovi pak ještě navíc za pomoc při statistickém zpracování výsledků. Kolegům z Farmakologického ústavu Lékařské fakulty UK v Hradci Králové – panu doc. ing. Jaroslavu Chládkovi, PhD. a panu ing. Miloši Hrochovi patří díky za spolupráci při analýze farmakokinetiky azathioprinu. Panu ing. Josefu Bukačovi, CSc. děkuji za pomoc při statistickém zpracování výsledků a cenné rady, ing. Tomáši Mikoláškovi patří velký dík za výpočet kumulativní dávky kortikosteroidů podle Newtonova-Cotesova vzorce. Majce Špryňarové bych rád poděkoval za dobrou náladu a ochotu pomoci kdykoliv i s těmi nejsložitějšími úkoly. Za cenné rady, pečlivou revizi celého textu a důležité komentáře patří velký dík panu MUDr. Petrovi Dědkovi, PhD.

Největší díky patří panu docentu MUDr. Oldřichu Pozlerovi, CSc.. Za vstřícnost, podporu, vytrvalost a nezlomnost ducha v situacích, kdy já jsem již v záplavě čísel nevěřil, za pochopení, důvěru, za ochotu vést a dovést, za nemilosrdnou ale konstruktivní kritiku i za metodu slepých uliček. Za to, že jsem se díky němu stal lepším lékařem.

Část disertační práce vznikla za podpory grantu IGA MZd 9255-3.

## Obecný úvod

Nespecifické střevní záněty představují skupinu onemocnění trávicí trubice s chronickým a v dětském věku často agresivním průběhem. Možné epizody relapsů, chronicky aktivní onemocnění, nutnost dlouhodobé kombinované léčby nebo opakovaných chirurgických zákroků znamená pro dítě i jeho rodinu velmi nepříznivé informace. Bohužel, většina pacientů čelí každodenní nutnosti užívání léků, což vede především u adolescentů k frekventní non-compliance. Samotné onemocnění a vedlejší účinky některých léků mohou být dalším důvodem odrážejícím se nepříznivým způsobem v psychickém stavu dětí, navíc jen zřídkakdy s možností definitivního zvládnutí choroby.

Od prvního popisu regionální ileitidy (16) brzy uplyne 80 let, přesto neznáme přesnou patofyziologii Crohnovy nemoci a nemáme možnost kauzálně terapeuticky zasáhnout. Obecně přijímaným faktem je, že v důsledku genetické predispozice a zatím neznámých zevních vlivů dochází ke kaskádovité aktivaci imunitního systému střeva s poruchou rozpoznání vlastních antigenů a namíření zánětlivé odpovědi organismu proti vlastním tkáním trávicí trubice. Léčba nespecifických střevních zánětů prodělala v posledních letech významný rozvoj v podobě začlenění biologické terapie do instrumentária gastroenterologa pečujícího o pacienty s mnohdy velmi komplikovaným chronickým onemocněním trávicího traktu. Terapie dětí se dnes neliší významněji od léčby dospělých a i zde hrají dominantní úlohu kortikosteroidy společně s imunosupresivní léčbou (12). První z uvedených jsou velmi účinným nástrojem pro navození remise a zvládnutí následných relapsů nemoci, druhé pak přispívají k udržení navozené remise s podstatně menšími nežádoucími účinky pro pacienta, než by s sebou přinášela dlouhodobá aplikace vysokých dávek kortikosteroidů, která je z hlediska medicínského i z hlediska pacienta nepřijatelná. Přestože jsou systémové kortikoidy používány k léčbě akutního vzplanutí nespecifických střevních zánětů u dětí více než 30 let, jsou literární zdroje sledující průběh nemoci po indukci remise kortikosteroidy velmi sporé a navíc ne nevýznamná část sledovaných pacientů se stává v průběhu nemoci kortikodependentní nebo kortikorezistentní (38, 92, 116). Kortikodependence bývá definována jako relaps nemoci do 30 dnů po vysazení léčby nebo po pokusu o snížení dávky kortikosteroidů. Kortikorezistence pak jako stav, kdy i zvyšování dávek kortikosteroidů nevede k navození remise. Mezi obecně známá doporučení patří snaha o co nejčasnější snižování dávek kortikosteroidů, alternativní podávání ob den, nepodávání kortikosteroidů při udržovací léčbě a další. Vzhledem k tomu, že dětský gastroenterolog pečuje o pacienty s růstovým potenciálem, vyvstává potřeba vědět o léčbě nespecifických střevních zánětů kortikosteroidy o to naléhavěji. Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida se manifestují až v 25% případů u dětí. Společným rysem odlišující dětské NSZ od forem známých v dospělosti je tendence k závažnému průběhu onemocnění s rozsáhlým postižením GIT, menší vliv faktorů prostředí na vznik onemocnění a naopak významnější až zásadní vliv genetické predispozice (12). Při stoupající incidenci Crohnovy nemoci (3, 4, 6, 8, 9, 15, 52, 58, 59, 69, 96, 98, 105, 117) a výše uvedených skutečnostech je velmi žádoucí vědět, jak naši pacienti reagují na léčbu kortikosteroidy, jak tato léčba ovlivňuje následující průběh nemoci a lze-li vystopovat prediktivní faktory následného nepříznivého průběhu – např. kortikodependence, kortikorezistence, nutnosti operace, biologické léčby apod.

Konzervativní léčba bývá členěna do skupiny nutričních intervencí, dále skupiny léků vedoucích k indukci remise a konečně do skupiny léků navozenou remisi udržující a relaps předcházející. Vzhledem k tomu, že prioritou péče o dítě s nespecifickým střevním zánětem musí být kromě minimalizace aktivity vlastní choroby dosažení normálního růstu a vývoje, získávají všechny tyto tři podskupiny zcela jiné rozměry, než je tomu u pacientů dospělých. Dalším odlišným faktem je průměrná doba, po kterou bude dítě pro nespecifický střevní zánět léčeno. Možné negativní vlivy takovéto až desítky let trvající léčby jsou velkou neznámou. Naneštěstí jen velmi málo z těchto postupů bylo u dětí prověřeno v řádně provedených dostatečně velkých a randomizovaných studiích.

Mezi nutriční postupy je obvykle řazeno podávání výhradní nebo částečně definované enterální výživy a parenterální výživa. Do skupiny léků velmi účinně navozující remisi lze s určitými výhradami zařadit kortikosteroidy, infliximab, cyklosporin a deriváty kyseliny 5-aminosalicylové a do skupiny léků používaných především pro udržení remise imunomodulační léky – thiopuriny (azathioprin, 6-merkaptopurin, 6-thioguanin), methotrexát, a znovu infliximab. Kromě těchto běžně používaných léků existuje řada dalších přípravků, které patří spíše do kategorie léčiv pomocných (antibiotika, probiotika...), nebo jde o nově zaváděné velmi účinné přípravky (adalimumab...) event. jde o záchrannou – „rescue" a víceméně experimentální medikaci při selhání léčiv výše uvedených (např. thalidomid, takrolimus). Hlavním tématem disertační práce byla problematika v klinické praxi nejčastěji používaných kortikosteroidů a imunosupresív – thiopurinů, která bude dále detailně rozvedena. Do skupiny imunomodulačních léčiv blízkých thiopurinům však patří i některé další.

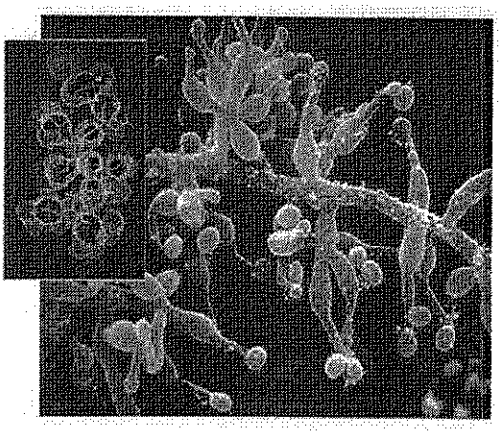
**Metotrexát**

Ač původně cytostatikum s antimetabolickým účinkem představující nedílnou součást léčby akutních hemoblastóz, je dnes metotrexát široce používaný pro léčbu autoimunních onemocnění jako je juvenilní idiopatická atritida, psoriáza nebo právě nespecifické střevní záněty. Mechanismus účinku metotrexátu spočívá v kompetici s folváty o průnik do dělící se buňky (např. lymfocytu) a následně blokaci reakce katalyzované dihydrofolátreduktázou. Tím je znemožněna přeměna kyseliny listové a dihydrolistové na kyselinu tetrahydrolistovou, která je nezbytná pro následnou syntézu nukleových kyselin. Největší zkušenosti s aplikací metotrexátu v neonkologické indikaci přinesli revmatologové, kteří prokázali, že se jedná o efektivní a bezpečnou léčbu. U dospělých pacientů léčených pro Crohnovu nemoc (ale nikoliv pro ulcerózní kolitidu) je metotrexát považován za lék redukující dávky kortikosteroidů a udržující remisi, zvláště při parenterálním podávání (negativní ovlivnění resorpce při postižení tenkého střeva). V pediatrické literatuře byla zaznamenána obdobná zkušenost u dvou třetin pacientů. Obvyklé dávkování metotrexátu je 15 mg/m$^2$ jedenkrát týdně ve formě podkožní injekce. Nejzávažnějšími nežádoucími účinky je nevolnost, nechutenství, bolesti hlavy a únavnost. Při nízkých dávkách metotrexátu je hematologická toxicita (leukopenie, trombocytopenie) neobvyklá a lze jí předcházet (rovněž i dalším nežádoucím účinkům) současnou aplikací kyseliny listové. Rozvoj závažné jaterní dysfunkce je při dávkách metotrexátu používaných v gastroenterologii vzácný. Oproti azathioprinu a 6-merkaptopurinu má metotrexát rychlejší nástup účinku a teoreticky lze použít i pro indukci remise onemocnění. Přesto vzhledem k otazníkům nad dlouhodobou bezpečností podkožně aplikovaného metotrexátu by měl být indikován až po selhání/intoleranci konvenční terapie

kortikosteroidy a azathioprinem nebo 6-merkaptopurinem u pacientů s chronicky aktivní Crohnovou nemocí.

**Cyklosporin**

Jedná se o cyklický polypeptid složený z 11 aminokyselin izolovaný z houby *Tolypocladium inflatum* nebo *Tolypocladium terricola*. Mechanismem účinku je především inhibice časné odpovědi T lymfocytů na antigenní podněty blokádou kalcineurinu, fosfatázy zodpovědné za regulaci aktivace T lymfocytů. Původně byl cyklosporin vyvinut k prevenci rejekce po orgánových transplantací.



**Obr. 1.** *Tolypocladium inflatum* (124)

Jeho použití v léčbě nespecifických střevních zánětů je omezeno na pacienty s ulcerózní kolitidou, kteří jsou refrakterní ke konvenční léčbě. Výhodou je velmi rychle nastupující efekt a možnost podání i.v. Nevýhodou je nutnost monitorace hladin léku s velkou interindividuální variabilitou. Cyklosporin nicméně umožňuje oddálit/předejít akutní kolektomii u pacientů s refrakterní ulcerózní kolitidou. Nežádoucí účinky cyklosporinu jsou velmi časté a na dávce závislé.

Až u 50% pacientů se objevuje reverzibilní hypertrichóza, dále parestézie a hyperplázie gingiv. Pokles glomerulární filtrační rychlosti prakticky u všech pacientů představuje společně s pravidelně nastupující hypertenzí velmi vážné riziko permanentního renálního postižení. Infekční komplikace při léčbě cyklosporinem nejsou časté především pro zachování protilátkové odpovědi.

**Mykofenolát mofetil**

Mezi novější imunosupresíva ze skupiny antiproliferativních látek patří produkt fermentace některých kmenů rodu *Penicillium*. Vlastní účinnou látkou je kyselina mykofenolová, která inhibuje inosinmonofosfátdehydrogenázu, klíčový enzym syntézy guanosinových nukleotidů. Selektivní inhibice CD4+ i CD8+ lymfocytů je možná právě inhibicí syntézy purinových nukleotidů, neboť lymfocyty ke své aktivaci vyžadují (na rozdíl od ostatních buněk) de novo nasyntetizovaný guanosintrifosfát. Mykofenolát mofetil dále způsobuje down-regulaci adhezivních molekul jak na leukocytech i endotelu a inhibuje produkci prozánětlivých molekul jako je TNFα a interferon χ. Na rozdíl od cyklosporinu nemá mykofenolát mofetil vliv na časné fáze aktivace lymfocytů ale na fáze pozdní, proto se v transplantologii s výhodou s cyklosporinem nebo takrolimem kombinuje. Další možností použití je prevence reakce štěpu proti hostiteli po transplantaci kostní dřeně. Obdobně jako u ostatních imunosupresiv byl pozitivní efekt mykofenolát mofetilu zaznamenán u autoimunitních chorob jako je

revmatoidní artritida, pyoderma gangrenosum, dermatomyositida, SLE i nespecifických střevních zánětů. Jeho zařazení do standardních terapeutických protokolů však vyžaduje další studie.

**Takrolimus (FK 506)**

Patří mezi makrolidová antibiotika se silným imunosupresivním účinkem. Jeho použití je omezeno prakticky výhradně k prevenci rejekcí po solidních orgánových transplantacích. Předpokládaný mechanismus účinku je obdobný jako v případě cyklosporinu. Takrolimus se po vstupu do buňky váže na plazmatickou bílkovinu – imunofilin a tento komplex blokuje kalcineurin, fosfatázu regulující transkripci faktorů vyžadovaných k aktivaci T lymfocyty. Dalším mechanismem účinku je přímá inhibice transkripce prozánětlivých cytokinů, např. interleukinu 2 nebo na kalcineurinu závislá inhibice inaktivátoru NF-κB. Mezi další mechanismy účinku takrolimu patří inhibice adheze, indukce apoptózy T lymfocytů a zřejmě i ovlivnění maturace B lymfocytů a cytokinové produkce dendritických buněk. Zkušenosti s použitím takrolimu v léčbě nespecifických střevních zánětů jsou v současnosti pouze v rovině klinického experimentu. Pozitivní efekt léčby byl popsán u pacientů s fistulující Crohnovou nemocí i pacientů s ulcerózní kolitidou. Nežádoucími účinky takrolimu jsou poruchy jaterních a renálních funkcí, hypertenze a inzulínová hyposenzitivita.

# A. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. **Úvod experimentální části**
2. **Terapeutický efekt 6-thioguaninu na myším modelu experimentální kolitidy**
3. **Farmakokinetika azathioprinu po zahájení léčby nespecifických střevních zánětů u dětí**

## 1. Úvod experimentální části

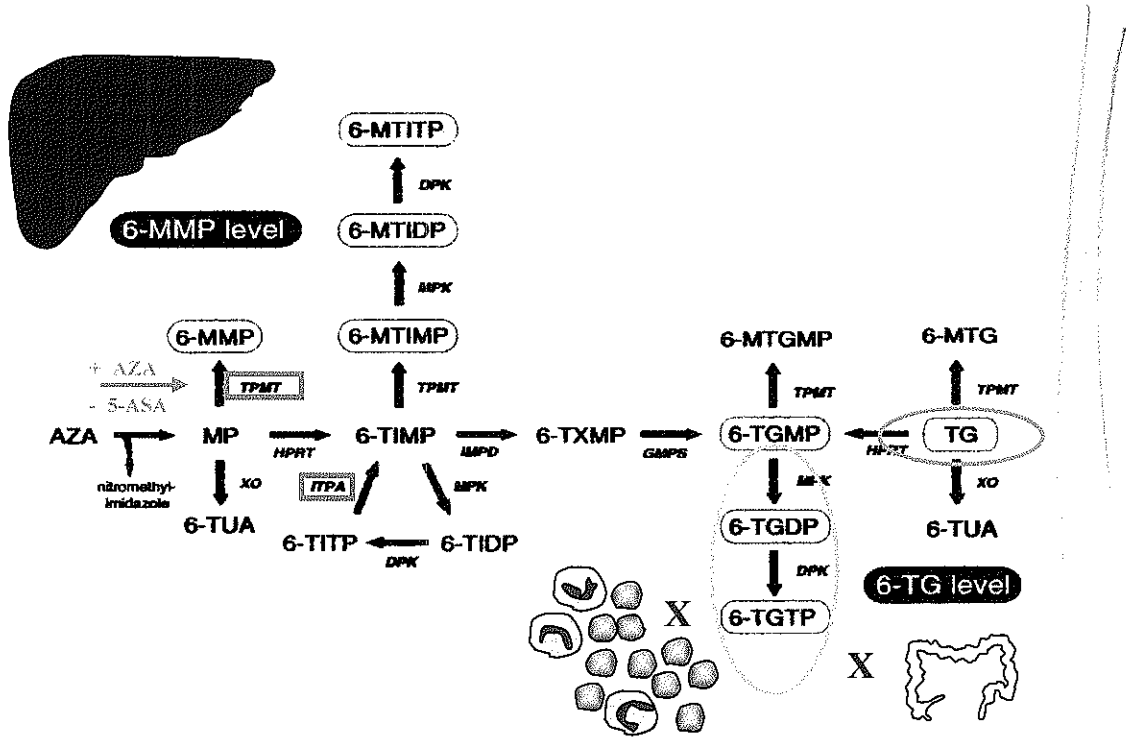
Antimetabolity jsou skupinou cytostatik, které interferují s metabolismem nádorových buněk a svou podobností s fyziologickými metabolity tak alterují buď vlastní syntézu (inhibicí enzymu) nebo funkci výsledného produktu (nejčastěji vestavěním se do syntetizované nukleové kyseliny). Absence funkčně zdatných enzymů nebo nukleových kyselin postihuje v prvé řadě buňky rychle proliferující, tedy buňky nádorové. Do skupiny antimetabolitů řadíme analoga kyseliny listové (metotrexát), dále purinová, pyrimidinová a adenosinová analoga a hydroxyureu. Jejich možná toxicita souvisí se skutečností, že i klidové buňky potřebují materiál na opravy poruch DNA či de novo syntézu degradovaných proteinů a tudíž i tyto buňky jsou vystaveny působení funkčně defektních produktů. Jsou to především buňky kostní dřeně, buňky slizniční výstelky trávicí trubice a hepatocyty. Z hlediska gastroenterologie je významný fakt, že především purinová analoga mají kromě cytostatického potenciálu i efekt imunosupresivní, čehož se využívá v léčbě nespecifických střevních zánětů dětí i dospělých, zvláště při extenzivním postižení trávicího traktu a u agresivních forem nemoci (37).

6-merkaptopurin (6-MP) a azathioprin (AZA) postihují zánětlivý proces selektivněji než kortikosteroidy a pro rostoucí organismus dítěte znamená jejich použití relativně mírnější riziko než dlouhodobě podávané vysoké dávky kortikosteroidů. Hlavním mechanismem jejich účinku je inhibice tvorby purinových nukleotidů vyvolaná kumulací nukleotidů 6-thioguaninu (6-TGN) v buňkách a potlačení imunitní odpovědi zprostředkované především T-lymfocyty. AZA je farmakologicky neúčinné proléčivo, které je lépe vstřebáváno ve střevě než 6-MP (28, 118). Neenzymovou hydrolýzou AZA vzniká 6-MP s S-methyl-4-nitro-5-thioimidazol. V paralelních metabolických cestách, které navzájem soutěží o 6-MP, jsou na jedné straně tvořeny neúčinné metabolity 6-methylmerkaptopurin (6-MMP, účinkem enzymu thiopurinmethyltransferázy - TPMT) a thiomočová kyselina (účinkem xantinoxidázy přítomné ve střevě i játrech) a na druhé straně anabolickou cestou prostřednictvím hypoxantinfosforibosyltransferázy vzniká účinný 6-thioguanin (6-TG). Prvním aktivním intermediárním metabolitem po intracelulární aktivaci 6-MP je thioinosinmonofosfát (TiMP), který je dále rychle přeměněn na 6-thioguaninové nukleotidy. Za hlavní mechanismus účinku je považována inhibice proliferace lymfocytů po inkorporaci 6-TGN do buněčných nukleových kyselin. Ke klinickému účinku ale přispívá rovněž finální produkt anabolické cesty – 6-thioguanintrifosfátové nukleotidy podílející se na indukci apoptózy lymfocytů (114).

Biotransformace 6-MP v paralelních cestách účinkem TPMT je kvantitativně rozhodující pro množství 6-TG a jeho nukleotidů (6-TGN), které se kumulují v buňkách po opakovaném podávání AZA. Aktivita TPMT je geneticky polymorfní a je děděna autozomálně kodominatní cestou. V běžné populaci je možné nalézt 3 fenotypy: s vysokou aktivitou enzymu, který je nejčastější (rychlí metabolizátoři, 88%), dále se střední aktivitou (intermediární metabolizátoři, 11%) a konečně s velmi nízkou aktivitou enzymu (pomalí metabolizátoři, 0.3%), který je relativně vzácný (66). U těchto pacientů jsou pak při běžně podávaných dávkách léku vysoké koncentrace 6-MP v plazmě, který je dále bioaktivován „žádoucí" metabolickou cestou, čímž dochází k velmi vysoké kumulaci a navození myelotoxických koncentrací 6-TG a 6-TGN. Důsledkem je intoxikace s potenciálně fatálním útlumem kostní dřeně. Vztah mezi aktivitou TPMT a 6-TGN byl poprvé popsán při léčbě dětských leukémií a

následně prokázán i u pacientů s nespecifickým střevním zánětem (32, 77). Nemocné s nízkou aktivitou TPMT je možné identifikovat před zahájením léčby AZA vyšetřením aktivity TPMT v erytrocytech event. genetickým testováním (88). U rychlých a intermediárních metabolizátorů převyšují erytrocytární koncentrace metylovaných derivátů merkaptopurinu (zvl. MeTIMP) 10- až 30-krát koncentrace nukleotidů 6-TG. Aktivita TPMT v populaci těchto dvou fenotypů je interindividuálně variabilní a vlivem dalších faktorů zvyšujících farmakokinetickou variabilitu (funkční stav střeva, absorpce AZT, neenzymová biodegradace AZA, lékové interakce – zvl. diuretika a kyselina 5-aminosalicylová) je korelace mezi dávkou AZA a hladinou 6-TG a 6-TGN komplikovaná (43, 83, 118). V případě pacientovy non-compliance jsme bez znalosti farmakokinetiky zcela bezradní. Vyšetření aktivity TPMT v erytrocytech před zahájením léčby umožňuje určit metabolický fenotyp nemocného a eliminovat riziko rozvoje potenciálně fatální myelotoxicity. Monitorování kumulace hladin metabolitů v erytrocytech (6-MMP, MeTIMP, 6-TG, 6-TGN) je další nástroj, jak v časné fázi farmakoterapie určit, který nemocný bude pravděpodobně rezistentní na léčbu AZA nebo 6-MP ve standardních terapeutických dávkách a u kterého můžeme očekávat příznivý efekt (34).

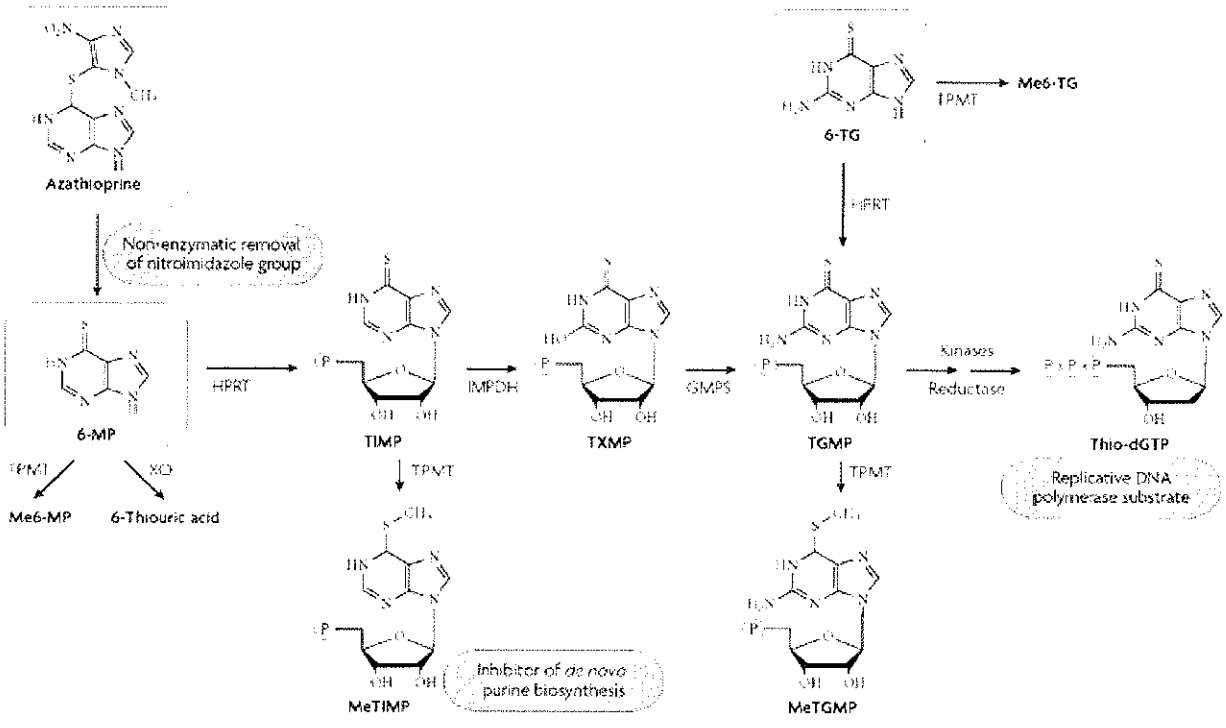
**Obr. 1 Schéma metabolismu thiopurinů** (upraveno dle *Gilissen LPI, Bierau J, Derijks LJJ, et al. The pharmacokinetic effect of discontinuation of mesalazine on mercaptopurine metabolite levels in inflammatory bowel disease patients. Aliment Pharmacol Ther 2005; 22: 605-611.*)




Hladina 6-TG v erytrocytech >230 pmol/8.10$^8$ RBC a poměr koncentrací 6-MMP/6-TGN <11 byly v některých klinických studiích spojeny s vyšší pravděpodobností remise Crohnovy choroby (17, 18, 32, 34, 74, 94, 101). Na druhé straně existují velké práce poukazující slabou korelaci mezi klinickou remisí a hodnotami nukleotidů 6-thioguaninu (45, 49, 83). Příliš vysoká hladina 6-

MMP+MeTIMP (>5.7 nmol/8.$10^8$ RBC) byla zaznamenána u nemocných s projevy hepatotoxicity (33, 34), velmi nízká hladina 6-TGN a 6-MMP umožní odhalit pacienta s nízkou compliance a zajistit patřičnou intervenci (35, 41, 44). Tím se zvýší pravděpodobnost příznivého efektu farmakoterapie a omezení dalších zbytečných vyšetření, resp. zahajování jiné, potenciálně nebezpečnější léčby. Dle studie Levina et al. považuje 87,5% dětských gastroenterologů za důležité možnost měřit 6-TGN u dětí s NSZ, přičemž hlavní indikací pro monitorování je především selhání terapie (80). Nástup účinku azathioprinu je v klinickém pozorování oddálen od zahájení léčby o 3 – 6 měsíců (64). Předpokládá se, že tato prodleva odpovídá kumulaci 6-TGN a dosažení relativní rovnováhy, byť s velkou interindividální variabilitou v důsledku faktorů uvedených výše.

**Obr. 2 Schéma metabolismu thiopurinů** (dle *Karran P, Attard N. Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. Nature Reviews Cancer 2008; 8: 24-36.*)




Třetím cytostatikem řazeným mezi thiopuriny je 6-thioguanin (6-TG). Jeho metabolická přeměna je kratší, ale může se obdobně jako v případě AZA a 6-MP odebírat různými cestami. Anabolickou představuje přímá přeměna 6-TG na 6-TGN. Kompetitivní katabolická pak vede k produkci minimálního množství methylovaných nukleotidů (6-MTG), což je výhodné především s ohledem na fakt, že methylované metabolity jsou pravděpodobně zodpovědné za jaterní toxicitu purinových analog (33, 34). Předpoklad kratší metabolické cesty, tudíž i možného rychlejšího nástupu účinku a dobré zkušenosti dětských hematologů s použitím 6-thioguaninu v léčbě akutní lymfatické leukémie vedly u pacientů s nespecifickým střevním zánětem k zahájení pilotních studií s velmi

dobrými výsledky, nicméně s upozorněním na možnou jaterní toxicitu pozorovanou u pacientů s onkologickými onemocněními (27, 30, 31, 54). Ta spočívá v rozvoji na dávce závislé a kombinací cytostatik potencované venookluzivní jaterní nemoci v časné fázi léčby a pozdějším rozvoji „idiopatické" portální hypertenze provázené regenerativní nodulární hyperplázií a/nebo periportální sklerózou (109). Vzhledem k těmto faktům byli pacienti s NSZ, jimž byl podáván 6-TG, podrobeni přísnému sledování (33, 53) se závěrem, že rozvoj nodulární regenerativní hyperplázie je běžným nálezem u pacientů s NSZ léčených 6-thioguaninem (až u 76% pacientů se zvýšenými hladinami jaterních enzymů a u 33% pacientů s biochemicky zcela normálními jaterními funkcemi). Přes pozitivní data v počátečních fázích studií a nízkou krátkodobou toxicitu byla léčba 6-TG víceméně opuštěna (55).

Vzhledem k nadějným výsledkům a nepochybnému benefitu alespoň pro některé pacienty s NSZ, jsme přistoupili k ověření akutní toxicity 6-thioguaninu v animální studii (2.Terapeutický efekt 6-thioguaninu na myším modelu experimentální kolitidy) a v druhém oddílu experimentální části práce jsme sledovali metabolismus azathioprinu po zahájení léčby nespecifických střevních zánětů u dětí ve snaze o potvrzení klinické zkušenosti s prodlevou v nástupu účinku (3. Farmakokinetika azathioprinu po zahájení léčby nespecifických střevních zánětů u dětí).

## 2. Terapeutický efekt 6-thioguaninu na myším modelu experimentální kolitidy

### 2.1. Cíl studie

Posouzení efektivity a jaterní toxicity 6-thioguaninu a azathioprinu na myším modelu experimentální kolitidy.

### 2.2. Materiál a metoda

50 laboratorních myší (BALb/c F) ve stáří 17-ti týdnů bylo rozděleno do 5 skupin po 10 zvířatech. Experimentální kolitida byla indukovaná dextransulfátem (DSS) podávaném ad libitum celkem 9 dní. Současně s podáváním DSS byla zahájena léčba. Skupina 1 – kontrolní – byla léčená 100μl fyziologického roztoku pufrovaném fosfátem (PBS) podávaném každý den intragastricky, skupina 2 byla léčena 10μg 6-TG ve 100μl PBS, skupina 3 a 4 byla léčena 20μg respektive 40μg 6-TG ve 100μl PBS každodenně intragastricky aplikovaného. Skupina 5 byla léčena 30μg azathioprinu ve 100μl PBS podávaného každý den. Zvířata byla pravidelně vážena, každodenně byl sledován charakter stolice a pátráno po známkách krvácení z trávicího traktu. Stav zvířat byl hodnocen prostřednictvím indexu klinické aktivity experimentální kolitidy. Body za jednotlivé kategorie byly sečteny a výsledné skóre bylo získáno po vydělení třemi (14, 51). Po 14-ti dnech byl pokus ukončen, zvířata byla usmrcena. Po fixaci vzorků ve 4% roztoku formaldehydu bylo provedeno histologické vyšetření tlustého střeva každého zvířete v základním barvení hematoxylinem-eosinem. K histologickému vyšetření byl odebrán 8mm dlouhý vzorek z colon descendens (1cm orálně od anu). Histologické hodnocení aktivity bylo provedeno použitím skórovacího systému akutní DSS kolitidy vyvinuté dr. Rossmannem z Mikrobiologického ústavu Akademie věd ČR (tab. 2.). K analýze se používají nezávisle na sobě 4 příčné řezy vzdálené od sebe 500μm, výsledné skóre je získáno vypočtením aritmetického průměru ze studovaných vzorků. Dále byly vyšetřeny vzorky jaterní tkáně náhodně vybraných 3 myší z každé sledované skupiny (celkem 15 vzorků). Jaterní vzorky byly vyšetřované v základním barvení hematoxylinem-eosinem (HE) a následně impregnací retikulinu stříbřením podle Gomoriho. Nálezy byly hodnoceny nezávisle na sobě dvěma experty na patologii myší (dr. Rossmann, MBÚ AV ČR; prof. T. Kate, Academic Medical Center, Dept. Of Pathology, Amsterdam, The Netherlands).

**Tab. 1.** Index klinické aktivity (celkové skóre získáme přiřazením příslušného počtu bodů a vydělením součtu bodů třemi).

| Parametr | | skóre |
|---|---|---|
| Úbytek na váze | >5% | 0 |
| | 5-10% | 2 |
| | 10-20% | 3 |
| | >20% | 4 |
| Konzistence stolice | dobře formovaná stolice | 0 |
| | kašovitá a poloformovaná stolice, která nelpí ke konečníku | 2 |
| | řídké stolice zůstávající v okolí konečníku | 4 |
| Krvácení | negativní zkouška na okultní krvácení (Okult viditest rapid, Vidia s.r.o.) | 0 |
| | pozitivní zkouška na okultní krvácení | 2 |
| | jasně patrné krvácení | 4 |

**Tab. 2.** Skórovací systém akutní DSS kolitidy

| Stupeň | Popis |
|---|---|
| 0 – normální | normální colon, krypty bez defektu s hlenotvorbou, submukóza úzká, muskularis normální |
| 0,5 – blízko hranice normálu | malá ložiskovitá – disperzní celularita proprie (při bázi), bez defektu sliznice |
| 1,0 – lehký | zánětlivá infiltrace proprie (převažuje nebo splývá), bez defektu sliznice, lehký edém proprie, snížená hlenotvorba, mírné oploštění krypt, submukóza normální nebo diskrétní rozšíření a celularita, muskularis normální |
| 1,5 | infiltrace proprie značná až splývavá, edém proprie, malé (sporadické) defekty (ulcerace <10% obvodu), poškozené krypty, oploštění epitelu, zúžení sliznice, ložisková celularita – rozšíření submukózy |
| 2,0 – střední | jako 1,5 + větší souvislé defekty (ulcerace <50% obvodu), regrese krypt, útlum hlenotvorby, hnisavý exsudát v lumen |
| 2,5 | jako 2,0 + ulcerace >50% obvodu, výrazné rozšíření – celularita proprie, regrese event. pseudoabscesy (městnání) zbylých krypt, edém a rozšíření submukózy, četné polymorfonukleáry, leukostáza a adheze venul/kapilár, perivaskulární edém – celularita v medii. |
| 3,0 – těžký | jako 2,5 + (sub)totální defekt sliznice, zánik hlenotvorby, event. malé zbytky poškozených krypt |

## 2.3. Protokol studie

| | Materiál | Věk | DSS | Léčba | H-E | Ag |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Skupina 1** | 10x BALB/c F | 17 týdnů | 9 dní ad libitum | 100 µl PBS (placebo) | 10 | 3 |
| **Skupina 2** | 10x BALB/c F | 17 týdnů | 9 dní ad libitum | 10 µg 6-TG ve 100 µl PBS | 10 | 3 |
| **Skupina 3** | 10x BALB/c F | 17 týdnů | 9 dní ad libitum | 20 µg 6-TG ve 100 µl PBS | 10 | 3 |
| **Skupina 4** | 10x BALB/c F | 17 týdnů | 9 dní ad libitum | 40 µg 6-TG ve 100 µl PBS | 10 | 3 |
| **Skupina 5** | 10x BALB/c F | 17 týdnů | 9 dní ad libitum | 30 µg AZA ve 100 µl PBS | 10 | 3 |

## 2.4. Výsledky

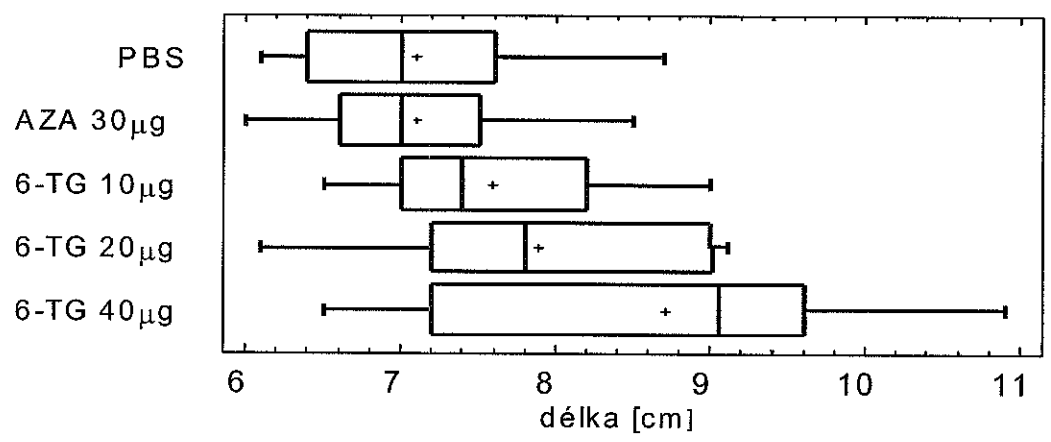
### 2.4.1. Délka tlustého střeva

| Délka colon | Počet | Průměrná délka | Variance | SD | Minimum | Maximum | Rozptyl |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PBS | 10 | 7,09 | 0,652111 | 0,807534 | 6,1 | 8,7 | 2,6 |
| 6-TG 10μg | 10 | 7,59 | 0,718778 | 0,847808 | 6,5 | 9,0 | 2,5 |
| 6-TG 20μg | 10 | 7,89 | 1,14989 | 1,07233 | 6,1 | 9,1 | 3,0 |
| 6-TG 40μg | 10 | 8,71 | 2,02544 | 1,42318 | 6,5 | 10,9 | 4,4 |
| AZA 30μg | 10 | 7,1 | 0,562222 | 0,749815 | 6,0 | 8,5 | 2,5 |
| Celkem | 50 | 7,676 | 1,30513 | 1,14242 | 6,0 | 10,9 | 4,9 |

Mnohočetná analýza

| porovnání | rozdíl | p | +/- limity |
|---|---|---|---|
| PBS – AZA 30μg | -0,01 | 0,9774 | 0,910452 |
| PBS - 6-TG 10μg | -0,5 | 0,1936 | 0,910452 |
| PBS - 6-TG 20μg | -0,8 | 0,0757 | 0,910452 |
| **PBS - 6-TG 40μg** | ***-1,62** | **0,0058** | **0,910452** |
| AZA 30μg - 6-TG 10μg | -0,49 | 0,1878 | 0,910452 |
| AZA 30μg - 6-TG 20μg | -0,79 | 0,0723 | 0,910452 |
| **AZA 30μg - 6-TG 40μg** | ***-1,61** | **0,0054** | **0,910452** |
| 6-TG 10μg - 6-TG 20μg | -0,3 | 0,4965 | 0,910452 |
| 6-TG **10μg** - 6-TG **40μg** | ***-1,12** | **0,0465** | **0,910452** |
| 6-TG 20μg - 6-TG 40μg | -0,82 | 0,1628 | 0,910452 |

**Graf 1.** Délka tlustého střeva



### 2.4.2. Porovnání indexu klinické aktivity

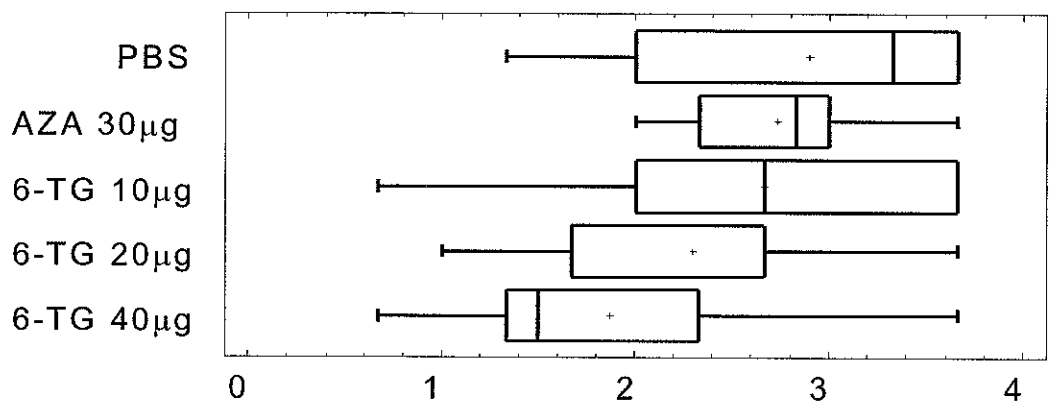
| Skupina | Počet | Průměr | Variance | SD | Minimum | Maximum | Rozptyl |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PBS | 10 | 2,9001 | 0,840911 | 0,917012 | 1,333 | 3,667 | 2,334 |
| 6-TG 10ug | 10 | 2,6669 | 1,06183 | 1,03045 | 0,667 | 3,667 | 3,0 |
| 6-TG 20ug | 10 | 2,3002 | 0,752015 | 0,867188 | 1,0 | 3,667 | 2,667 |
| 6-TG 40ug | 10 | 1,8667 | 1,16559 | 1,07963 | 0,667 | 3,667 | 3,0 |
| AZA 30ug | 10 | 2,7333 | 0,242128 | 0,492065 | 2,0 | 3,667 | 1,667 |
| Celkem | 50 | 2,49344 | 0,885584 | 0,941055 | 0,667 | 3,667 | 3,0 |

Mnohočetná analýza

| porovnání | rozdíl | p | +/- limity |
|---|---|---|---|
| PBS – AZA 30ug | 0,1668 | 0,6184 | 0,81191 |
| PBS – 6-TG 10ug | 0,2332 | 0,5995 | 0,81191 |
| PBS – 6-TG 20ug | 0,5999 | 0,1502 | 0,81191 |
| **PBS - 6-TG 40ug** | ***1,0334** | **0,0332** | **0,81191** |
| AZA 30ug - 6-TG 10ug | 0,0664 | 0,8562 | 0,81191 |
| AZA 30ug - 6-TG 20ug | 0,4331 | 0,1864 | 0,81191 |
| **AZA 30ug - 6-TG 40ug** | ***0,8666** | **0,0330** | **0,81191** |
| 6-TG 10ug - 6-TG 20ug | 0,3667 | 0,4006 | 0,81191 |
| 6-TG 10ug - 6-TG 40ug | 0,8002 | 0,1072 | 0,81191 |
| 6-TG 20ug - 6-TG 40ug | 0,4335 | 0,3353 | 0,81191 |

* statisticky významný rozdíl

**Graf 2.** Index klinické aktivity



### 2.4.3. Histologické hodnocení aktivity

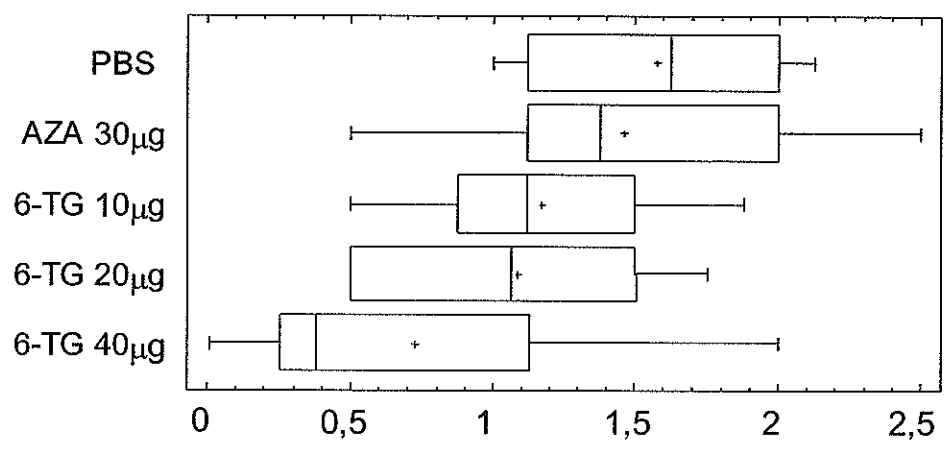
| | Počet | Průměr | Variance | SD | Minimum | Maximum | Rozptyl |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PBS | 10 | 1,575 | 0,205556 | 0,453382 | 1,0 | 2,125 | 1,125 |
| 6-TG 10ug | 10 | 1,175 | 0,205556 | 0,453382 | 0,5 | 1,875 | 1,375 |
| 6-TG 20ug | 10 | 1,0875 | 0,239757 | 0,48965 | 0,5 | 1,75 | 1,25 |
| 6-TG 40ug | 10 | 0,725 | 0,530556 | 0,728392 | 0,0 | 2,0 | 2,0 |
| AZA 30ug | 10 | 1,4625 | 0,455035 | 0,674563 | 0,5 | 2,5 | 2,0 |
| Celkem | 50 | 1,205 | 0,392066 | 0,626152 | 0,0 | 2,5 | 2,5 |

Mnohočetná analýza

| porovnání | rozdíl | p | +/- limity |
|---|---|---|---|
| PBS – AZA 30ug | 0,1125 | 0,6668 | 0,515306 |
| PBS - 6-TG 10ug | 0,4 | 0,0641 | 0,515306 |
| **PBS - 6-TG 20ug** | ***0,4875** | **0,0329** | **0,515306** |
| **PBS - 6-TG 40ug** | ***0,85** | **0,0057** | **0,515306** |
| AZA 30ug - 6-TG 10ug | 0,2875 | 0,2780 | 0,515306 |
| AZA 30ug - 6-TG 20ug | 0,375 | 0,1719 | 0,515306 |
| **AZA 30ug - 6-TG 40ug** | ***0,7375** | **0,0304** | **0,515306** |
| 6-TG 10ug - 6-TG 20ug | 0,0875 | 0,6833 | 0,515306 |
| 6-TG 10ug - 6-TG 40ug | 0,45 | 0,1145 | 0,515306 |
| 6-TG 20ug - 6-TG 40ug | 0,3625 | 0,2080 | 0,515306 |

* statisticky významný rozdíl

**Graf 3.** Histologické skóre



**Obr. 3** Normální nález (HE, 1:50)

**Obr. 4** Rozsáhlá ulcerace (HE, 1:200)

### 2.4.4. Hodnocení jaterní toxicity

2.4.4.1. Barvení hematoxylin – eosin

a) kontrolní skupina (PBS)

Nacházíme minimální fibrózu s malým počtem mononukleárů v pericholangiálních prostorech, bez parenchymových nebo epiteliálních změn, nález interpretujeme jako fyziologický stav. Přítomný jemný polymorfismus and vakuolizace hepatocytů rovněž ve fyziologickém rozmezí.

b) popisy vzorků léčených zvířat (6-TG 10-40 μg)

Nenacházíme žádné podstatné změny v parenchymu u 9 vyšetřovaných vzorků ze skupiny léčených zvířat. U jednoho vzorku (6-TG 20μg) jsme zaznamenali lehce zvýšenou fibrózu v pericholangiálních prostorech a lehce snížený počet mononukleárů v pericholangiálních prostorech u 2 vzorků (oba 6-TG 10μg). Nicméně všechny změny byly hodnoceny v rámci normálního obrazu.

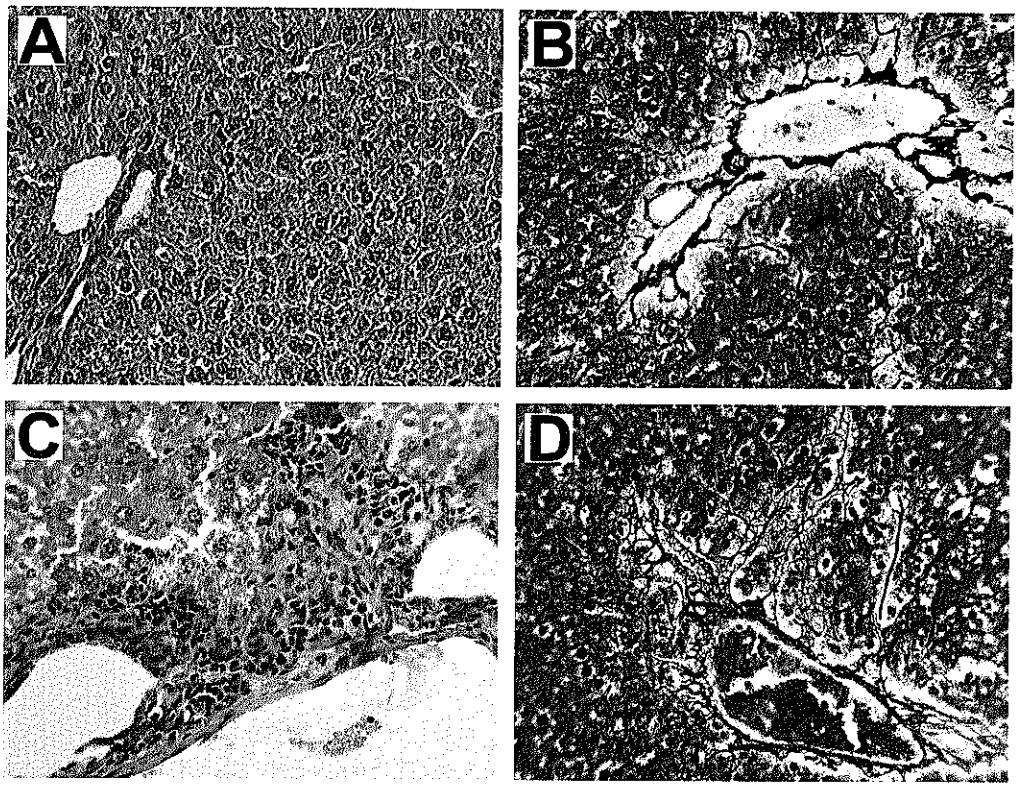
c) popisy vzorků léčených zvířat (AZA 30μg)

Nacházíme mírné, nicméně evidentní patologické změny ve všech 3 vyšetřovaných vzorcích – ohraničující peribiliární fibrózu v pericholangiálních prostorech. Dále nacházíme roztroušeně okrsky poškozených hepatocytů v jednom vzorku.

2.4.4.2. Impregnace retikulinu stříbřením dle Gomoriho

V žádném z vyšetřovaných vzorků nenacházíme známky nodulární regenerativní hyperplazie, veno-okluzivní nemoci, cirhózy, steatózy či nekrózy. Nález u myší léčených AZA (zvýrazněná fibróza periportálního prostoru a její penetrace do okolí) ač jasně patologický, patří z hlediska patologie jater k nálezům mírnějším.

**Obr. 5.** (A – normální periportální prostor a kus lalůčku, bez známek fibrózy, HE 1:200; B – normální nález jemného retikula, Gomori 1:200; C – infiltrace a fibróza v periportálním prostoru, HE 1:200; D – zvýrazněná fibróza periportálního prostoru a penetrace do okolí, Gomori, 1:200)



## 2.5. Závěry

6-thioguanin je efektivní v léčbě myší experimentální kolitidy vyvolané dextransulfátem. Lék byl aplikován každodenně intragastricky od prvního dne podávání DSS. Pozorovaná efektivita byla na dávce závislá. 6-TG v nejvyšší dávce 40 μg je efektivnější ve všech sledovaných parametrech experimentální kolitidy při porovnání jak s placebem (PBS), tak s azathioprinem v dávce 30 μg. Histologické vyšetření potvrdilo, že 6-TG v dávce 20 μg je účinnější než azathioprin v dávce 30 μg. Terapeutický efekt azathioprinu nebyl větší než léčba placebem (PBS), jeho hepatoxický efekt byl jasně patrný při histologickém vyšetření tkání v barvení hematoxylin-eosin i v impregnaci retikulinu stříbřením dle Gomoriho. Uvedená pozorování svědčí pro nevhodnost léčby azathioprinem v akutní fázi kolitidy pro latenci mezi zahájením aplikace azathioprinu a nástupem terapeutického účinku. Naopak, 6-TG se zdá být lékem vhodným i pro akutní zhoršení zánětu střeva. Při impregnaci stříbřením dle Gomoriho nebyla prokázána mikronodulární přestavba jater ani žádné známky venookluzivní nemoci jater, tedy zvažované toxické účinky 6-TG. U myší léčených AZA byly prokázány mírné známky hepatotoxicity (fibróza periportálních prostorů).

## 3. Farmakokinetika azathioprinu po zahájení léčby nespecifických střevních zánětů u dětí

### 3.1. Cíl studie

Cílem práce bylo zjištění doby do nástupu ustálených hladin (time to steady state) nukleotidů 6-thioguaninu při kontrolovaném podávání azathioprinu a zajištěné compliance.

### 3.2. Materiál a metoda

Vstupními kritérii studie byl věk 0-19 let a diagnóza nespecifického střevního zánětlivého onemocnění. Diagnóza byla stanovena použitím tzv. "Portských" kritérií (65). Terapie nespecifických střevních zánětů probíhala dle standardních doporučovaných postupů vypracovaných pracovní skupinou pro dětskou gastroenterologii a výživu České pediatrické společnosti (122). Azathioprin byl indikován a dávkován v souladu s SPC.

Metabolity azathioprinu (6-MMP, 6-TGN) byly vyšetřovány u nově diagnostikovaných pacientů po zahájení léčby azahioprinem v týdnu 0, 1, 2, 5 a 8 a dále 5., 8., a 11. měsíci. Analytická vyšetření byla prováděna na Farmakologickém ústavu Lékařské fakulty UK v Hradci Králové metodou high-performance liquid chromatography, která byla vyvinuta rovněž pro monitorování udržovací léčby ALL 6-merkaptopurinem (36, 66). Stanovení koncentrací metabolitů byly prováděno v erytrocytech in vitro. Farmakokinetické analýzy a grafické vyjádření výsledků (přímo přenesené do disertační práce) bylo realizováno použitím software GraphPad Prism 4 (San Diego, CA). Zařazení pacienta do studie nebylo důvodem k dodatečnému vyšetření a odběru krve.

Studie byla schválena etickou komisí Lékařské fakulty UK a FN v Hradci Králové.

#### 3.2.1. Čas do dosažení rovnovážné koncentrace

Čas do dosažení rovnovážné koncentrace (time to steady-state) se udává jako čas dosažení 90% rovnovážné koncentrace podle vzorce $\mathbf{t_{90\%} = ln(0.1)/-K}$, kde K je rychlostní konstanta ekvilibrace, která odpovídá rychlostní konstantě eliminace a tedy poločasu eliminace ($\mathbf{t_{1/2} = ln(2)/K}$). Za 4 poločasy po zahájení dávkování nebo po změně dávky je dosaženo asi 93% ustálené koncentrace.

#### 3.2.2. Příprava vzorků

Pro vyšetření byl proveden odběr 5 ml krve do Li-heparinizovaných zkumavek, vzorky byly uchovány při teplotě 4-10°C a během 24 hodin dále zpracovány. Pro separaci a promývání erytrocytů byly používány pouze izotonické pufry, vzorky byly centrifugovány při 800 g po dobu 10 minut při 4°C. Odseparované erytrocyty bez „buffy coatu" byly dvakrát promyty 3 ml pufru PBS (odstředění za stejných podmínek jako při separaci erytrocytů). Promyté erytrocyty byly resuspendovány ve 2 ml PBS a stanoven hematokrit.

3.2.3. Metodika analýzy HPLC

3.2.3.1. Chemikálie

| | | |
|---|---|---|
| 6-(methylthio)purin (Acros) | | $M_r(C_6H_6N_4S)$= 166,205 g.mol$^{-1}$ |
| 6-thiopurin (Sigma) | | $M_r(C_5H_4N_4S)$= 152,178 g.mol$^{-1}$ |
| 6-thioguanin (Sigma) | | $M_r(C_5H_5N_5S)$= 167,193 g.mol$^{-1}$ |
| Methanol (LabScan) | | |
| Dihydrogenfosforečnan sodný | | $M_r(NaH_2PO_4.H_2O)$= 137,998 g.mol$^{-1}$ |
| Dihydrogenfosforečnan sodný | | $M_r(NaH_2PO_4.2H_2O)$= 156,01 g.mol$^{-1}$ |
| Hydroxid sodný | | $M_r(NaOH)$= 40,00 g.mol$^{-1}$ |
| Kyselina chloristá (konc.) | $\rho$ = 1,67 g.ml$^{-1}$ | $M_r(HClO_4)$= 100,46 g.mol$^{-1}$ |

3.2.3.2. Parametry metody

| | |
|---|---|
| Systém: | Shimadzu |
| Kolona: | MERCK, Purospher STAR RP-18e (4x250 mm, 5 μm), |
| Předkolona: | Purospher RP-18e (4x4 mm, 5 μm) |
| Nástřik: | 30 μl |
| Průtok: | 1,0 ml/min |
| Teplota na koloně: | 30 °C |
| Detektor: | UV/VIS $\lambda$ = 342 nm (6-MP, 6-TG), 304 nm (6-MeMP) |
| Doba analýzy: | 14 minut |

3.2.3.3. Mobilní fáze

A: Na-fosfátový pufr 0,1 M (pH=2,7)

B: Methanol (MeOH) + Na-fosfátový pufr 0,1 M pH=3,5 (pufr + MeOH v poměru 1:1)

Pro přípravu fosfátového pufru navážit 15,60 g $NaH_2PO_4.H_2O$ (14 g $NaH_2PO_4.2\ H_2O$), rozpustit v 1 litru vody MiliQ a zfiltrovat (0,1 M). Pro přípravu 1 litru mobilní fáze (B) odměřit 500 ml MeOH a 500 ml fosfátového pufru 0,1M s pH=3,5.

| | |
|---|---|
| Gradient: | 0-4 min : 0-40% B |
| | 4-8,9 min : 40% B |
| | 9-10 min : 100% B |
| | 11 min:0% B |

| | |
|---|---|
| Detekce ($\lambda$): | 0 – 7,23 min : 342 nm |
| | 7,23 - 14 min : 304 nm |

3.2.3.4. Pomocné roztoky

0,1 M NaOH připravit rozpuštěním 1 g hydroxidu ve 250 ml vody MilliQ.

0,5 M DTT připravit rozpuštěním 0,77 g dithiothreitolu v 10 ml vody MilliQ.

3.2.3.5. Deproteinační činidlo

Kyselina chloristá (koncentrovaná)

3.2.3.6. Příprava standardů

3,01 mg 6-thioguaninu rozpustit ve 25 ml 0,1 M NaOH (c= 720 μM).

2,74 mg 6-thiopurinu rozpustit ve 25 ml 0,1 M NaOH (c= 720 μM).

2,99 mg 6-(methylthio)purinu rozpustit ve 25 ml 0,1 M NaOH (c= 720 μM).

3.2.3.7. Příprava vzorků a kalibrační řady

Kalibrační řada

Do vzorkovnice eppendorf napipetovat roztok thioguaninu (c=720 μM), thiopurinu (c=720 μM) a methylthiopurinu (c=720 μM), od každého 200 μl. Výsledná koncentrace látek ve směsi je 240 μM. Ze vzniklého roztoku připravit pomocné roztoky o koncentracích 120 – 60 – 30 – 15 – 7,5 μM ředěním 0,1 M NaOH.

Dále do 6 vzorkovnic eppendorf napipetovat 25 μl dithiothreitolu (c=0,5 M), 180 μl promytých erytrocytů zředěných PBS v poměru 1:1, 20 μl příslušného pomocného roztoku standardů (120 – 60 – 30 – 15 – 7,5 μM). Směs poté opatrně zavortexovat při nízkých otáčkách a řádně deproteinovat 50 μl kyseliny chloristé (konc.). Po odstředění (10 min. při 13 000 ot./min) se odebere supernatant a nechá se hydrolyzovat 90 minut při 98 °C. Po dokončení hydrolýzy se vzorky nechají zchladit v lednici při 4°C a nastřikuje se 30 μl na kolonu Merck Purosphere RP-18. Koncentrace výsledných kalibrátorů je 0,75 – 24 μM.

Přípravu vzorků

Do připravených vzorkovnic eppendorf napipetovat 25 μl dithiothreitolu (c=0,5 M), 200 μl erytrocytů z jednotlivých vzorků, promytých a zředěných PBS v poměru (1:1). Směs se opatrně zavortexuje při nízkých otáčkách a řádně deproteinuje 50 μl kyseliny chloristé (konc.). Další postup je zcela identický jako při přípravě kalibračních vzorků.

3.2.3.8. Analýza

| | | |
|---|---|---|
| Doba analýzy: | 14 minut | |
| Retenční čas: | 6-thioguanin | $t_r$= cca 6,0 min |
| | 6-thiopurin | $t_r$= cca 6,5 min |
| | 6-(methylthio)purin | $t_r$= cca 8,3 min |

3.2.3.9. Odezva detektoru

Očekávaná odezva UV/VIS detektoru pro 6-(methilthio)purin v koncentračním rozmezí 1-20 μmol.l$^{-1}$ odpovídá přibližně vztahu A = 30*C, pro 6-thioguanin A = 33*C (A - plocha peaku, C - koncentrace v μmol.l$^{-1}$)

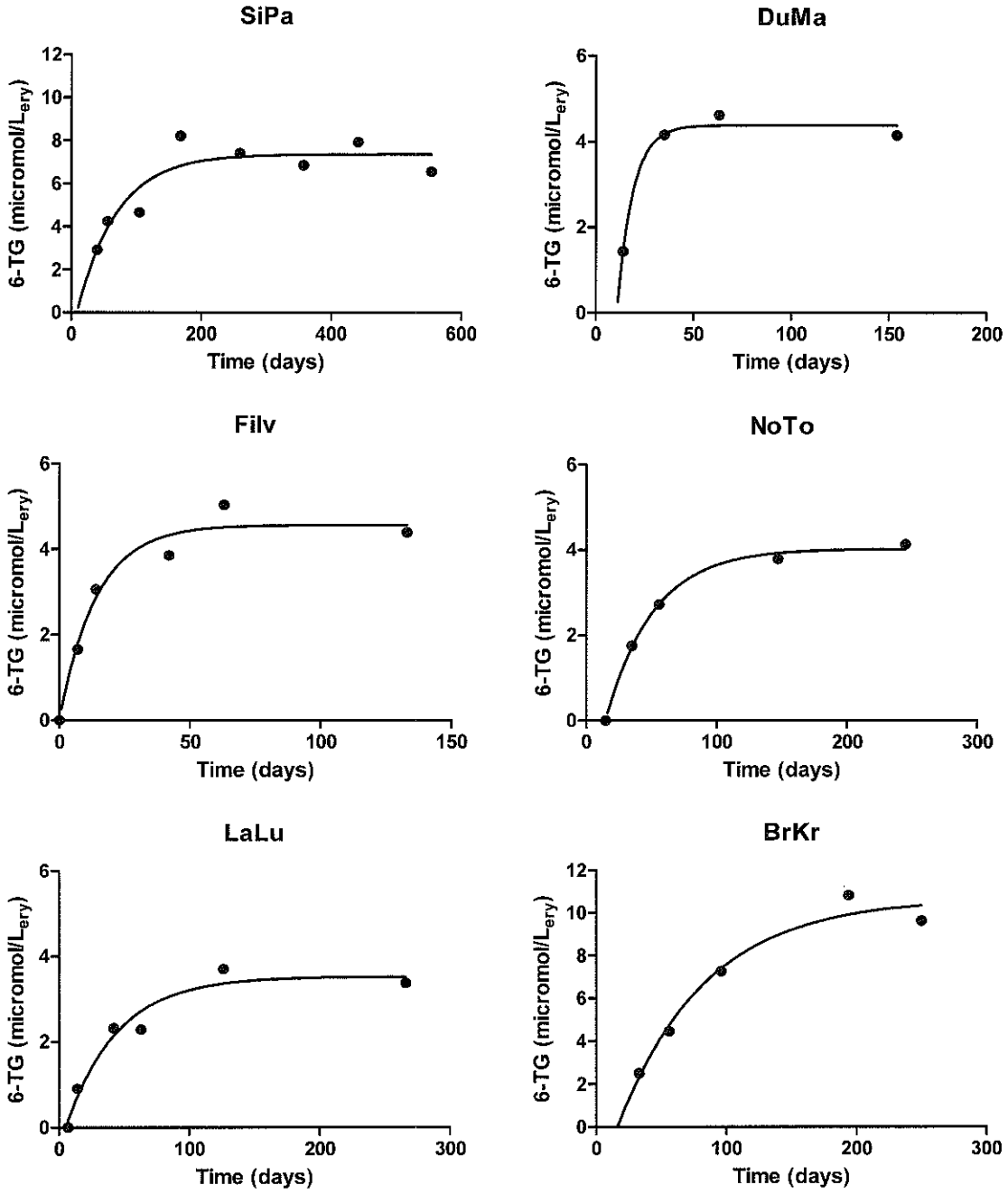
### 3.3. Výsledky

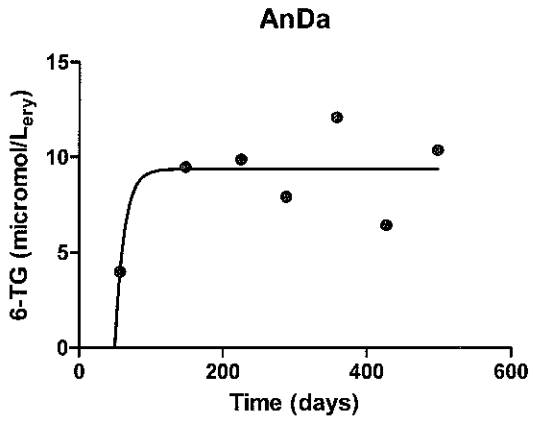
Vstupní kritéria studie splnilo 14 pacientů, medián věku při stanovení diagnózy byl 14 let. Dávka azathioprinu u těchto pacientů nebyla v prvních týdnech po zahájení léčby zvyšována ani snižována, což je nutné pro vyloučení negativního vlivu takovéto změny na čas do dosažení rovnovážné koncentrace metabolitů azathioprinu.

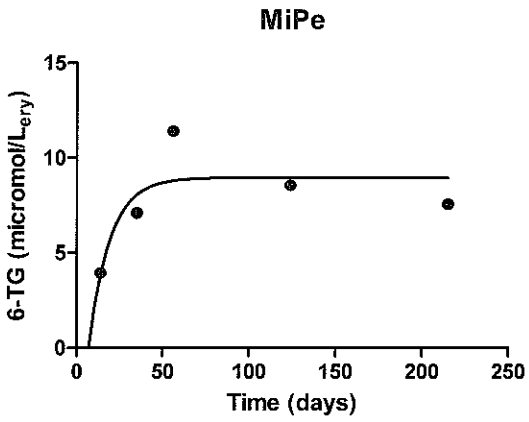
Výsledková tabulka udává dávku, rychlostní konstantu ustalování rovnovážné koncentrace ($C_{ss}$ ), poločas ustalování rovnovážné koncentrace, čas do dosažení rovnovážné koncentrace, rovnovážnou koncentraci nukleotidů 6-thioguaninu v erytrocytech.

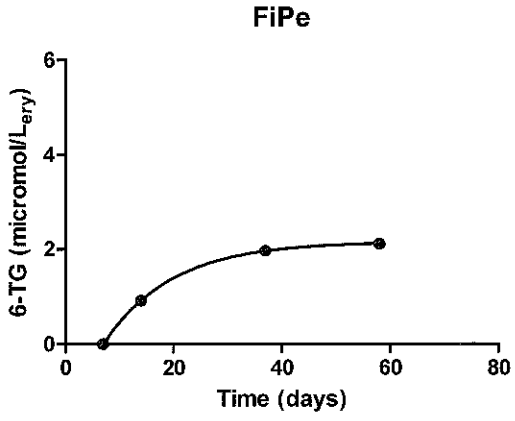
| ID | **dávka (mg)** | **K ($den^{-1}$)** | **$t_{1/2}$ (dny)** | **$t_{90\%}$ (dny)** | **Css ($mikromol/l_{ery}$)** |
|---|---|---|---|---|---|
| FiIv | 50 | 0.07038 | 9.85 | 32.72 | 4.56 |
| LaLu | 100 | 0.02547 | 27.21 | 90.40 | 3.52 |
| SiPa | 75 | 0.01638 | 42.32 | 140.57 | 7.37 |
| NoTo | 100 | 0.02743 | 25.27 | 83.94 | 4.03 |
| DuMa | 125 | 0.128 | 5.42 | 17.99 | 4.38 |
| BrKr | 50 | 0.01478 | 46.90 | 155.79 | 10.7 |
| AnDa | 75 | 0.08058 | 8.60 | 28.58 | 9.38 |
| MiPe | 50 | 0.08183 | 8.47 | 28.14 | 8.95 |
| FiPe | 50 | 0.0797 | 8.70 | 28.89 | 2.16 |
| BoRe | 75 | 0.1149 | 6.03 | 20.04 | 15.6 |
| BeMa | 75 | 0.2727 | 2.54 | 8.44 | 8.48 |
| DaLu | 100 | 0.07565 | 9.16 | 30.44 | 7.37 |
| SuMa | 100 | 0.1619 | 4.28 | 14.22 | 2.69 |
| VeKl | 100 | 0.04624 | 14.99 | 49.80 | 5.34 |
| | | | | | |
| minimum | | 0.0148 | 2.54 | 8.44 | 2.16 |
| **medián** | | **0.0777** | **8.93** | **29.7** | **6.36** |
| maximum | | 0.2727 | 46.9 | 156 | 15.6 |
| 25. perc. | | 0.0321 | 6.64 | 22.1 | 4.12 |
| **75. perc** | | **0.1066** | **22.7** | **75.4** | **8.83** |

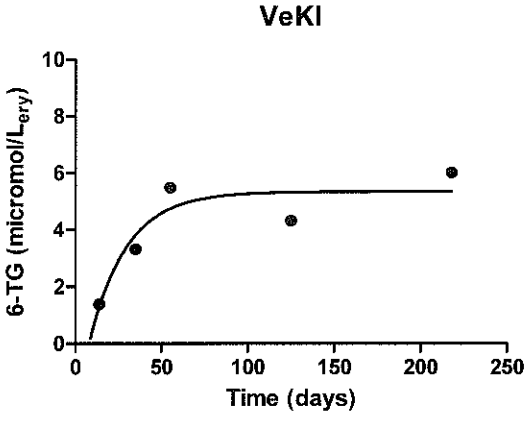
**Grafické vyjádření času do nástupu ustálených hladin nukleotidů 6-thioguaninu u jednotlivých pacientů.**

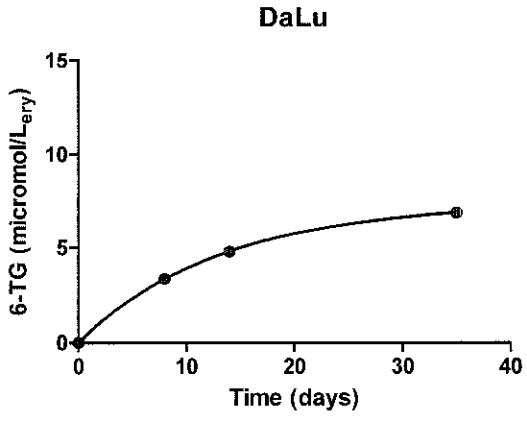


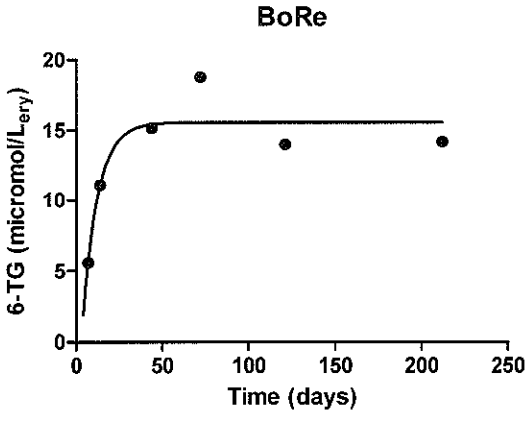

AnDa
6-TG (micromol/L$_{ery}$)
Time (days)
0
5
10
15
0
200
400
600

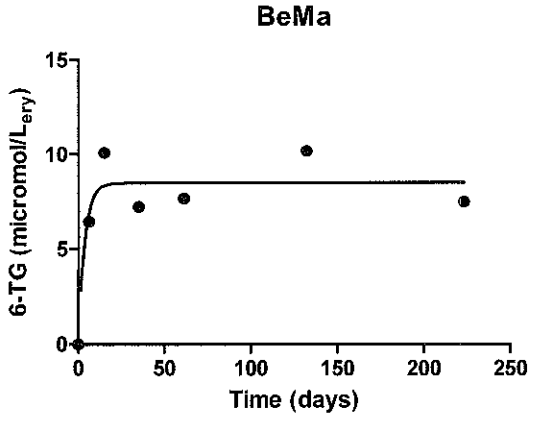

MiPe
6-TG (micromol/L$_{ery}$)
Time (days)
0
5
10
15
0
50
100
150
200
250

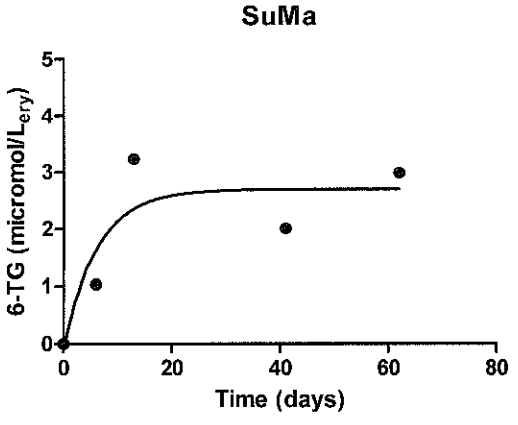

FiPe
6-TG (micromol/L$_{ery}$)
Time (days)
0
2
4
6
0
20
40
60
80


VeKl
6-TG (micromol/L$_{ery}$)
Time (days)
0
2
4
6
8
10
0
50
100
150
200
250


DaLu
6-TG (micromol/L$_{ery}$)
Time (days)
0
5
10
15
0
10
20
30
40

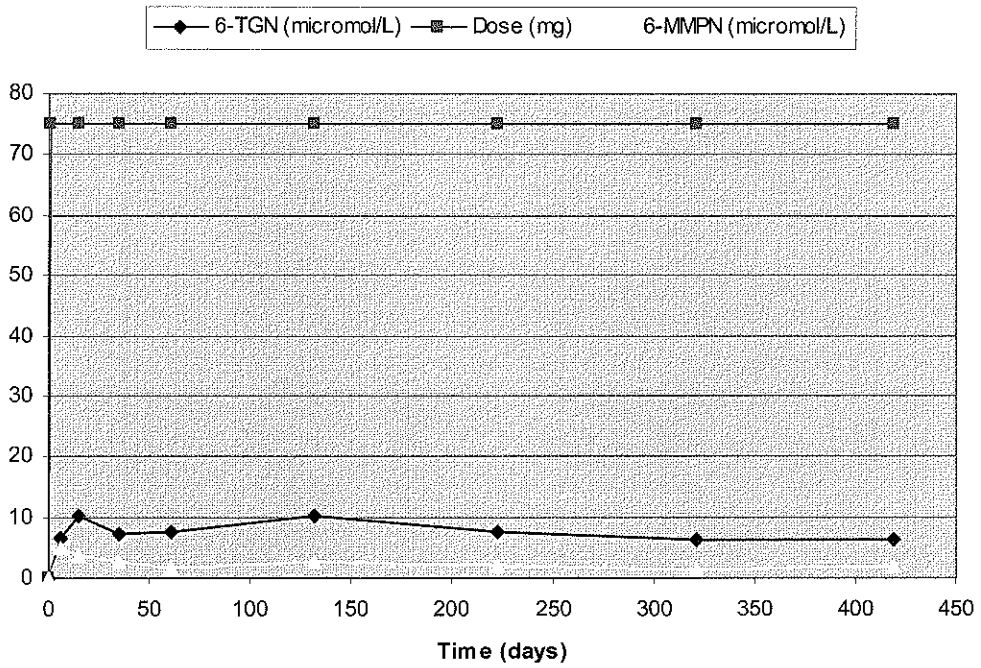

BoRe
6-TG (micromol/L$_{ery}$)
Time (days)
0
5
10
15
20
0
50
100
150
200
250


BeMa
6-TG (micromol/L$_{ery}$)
Time (days)
0
5
10
15
0
50
100
150
200
250

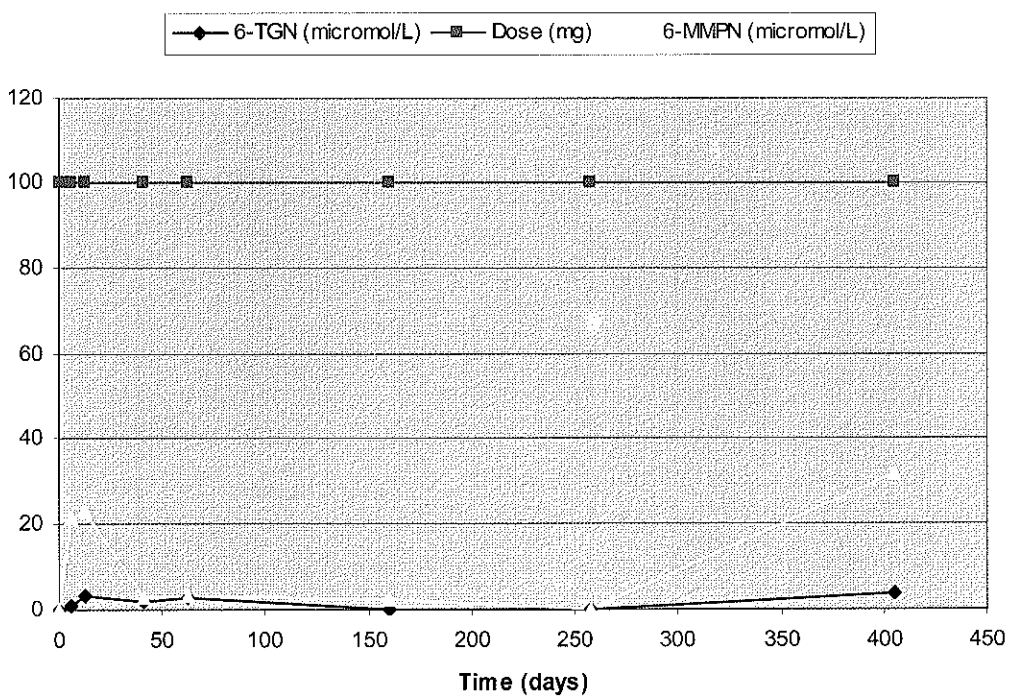

SuMa
6-TG (micromol/L$_{ery}$)
Time (days)
0
1
2
3
4
5
0
20
40
60
80

**Příklady individuálních grafů znázorňujících vztah mezi 6-TGN, 6-MMPN a dávkou azathioprinu.**

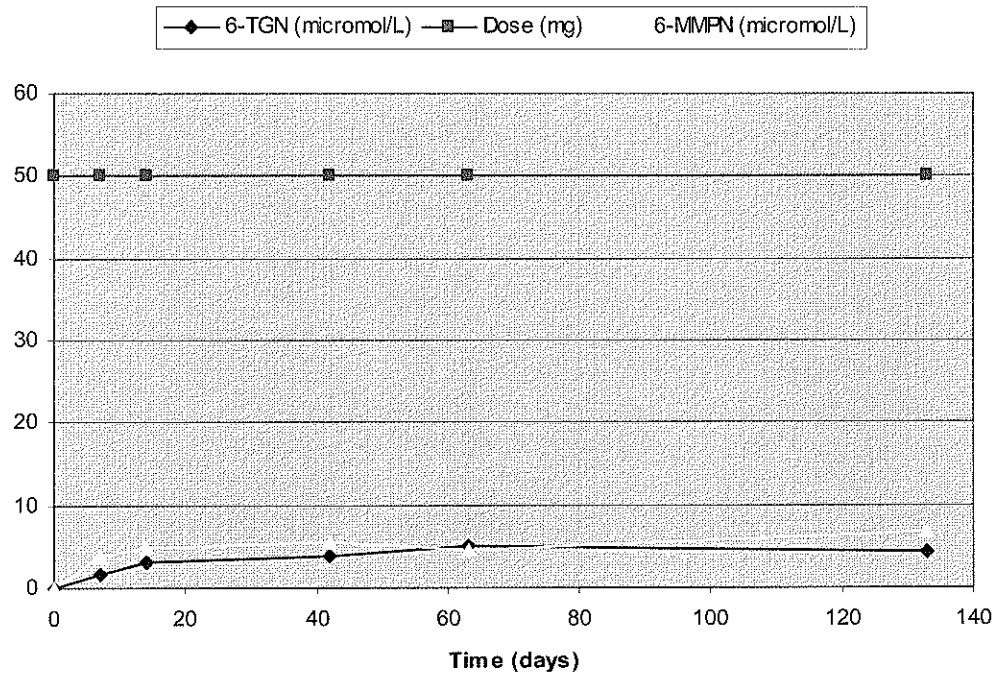
**BeMa**



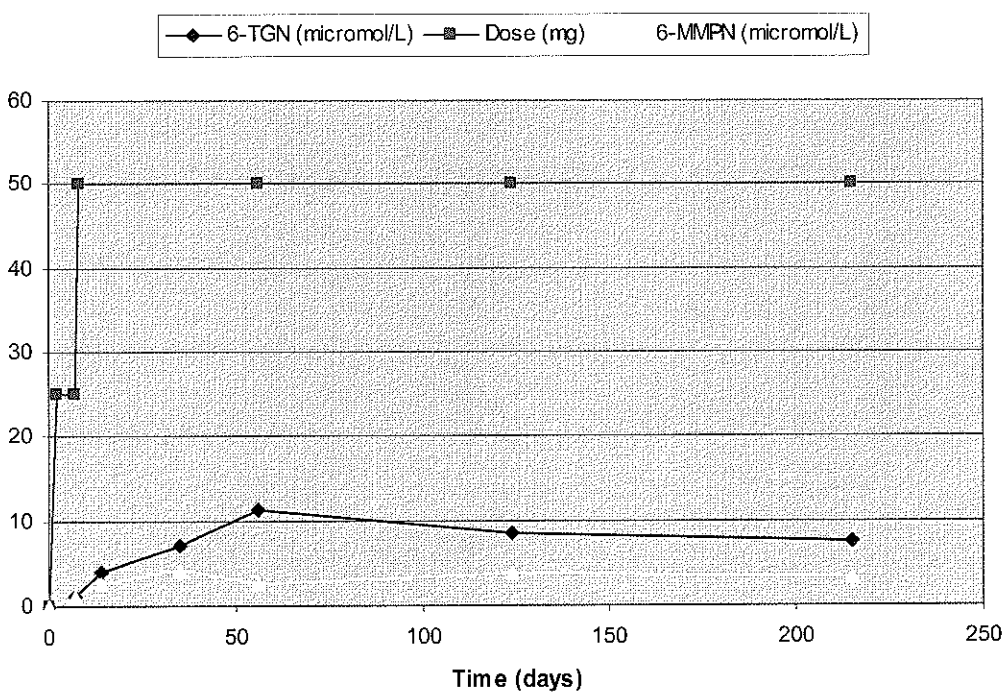

**SuMa**



**FilV**


6-TGN (micromol/L)
Dose (mg)
6-MMPN (micromol/L)
60
50
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Time (days)

**MiPe**


6-TGN (micromol/L)
Dose (mg)
6-MMPN (micromol/L)
60
50
40
30
20
10
0
0
50
100
150
200
250
Time (days)

### 3.4. Závěry

Kumulace nukleotidů 6-thioguaninu a dosažení rovnovážných hladin podléhá velké interindividuální variabilitě. I při konstantním dávkování se ještě vyšší variabilitou vyznačují hladiny 6-methylmerkaptopurinových nukleotidů. Medián času do dosažení rovnovážné koncentrace byl 29,7 dní (8,4 – 156), 75. percentil času do dosažení rovnovážné koncentrace pak představoval 75,4 dne. Uvedené výsledky jsou pak důkazem klinicky známé zkušenosti o nástupu plného účinku azathioprinu během 2-3 měsíců od zahájení léčby. Přibližně u čtvrtiny pacientů je však nutné očekávat ještě delší prodlevu.

## B. KLINICKÁ ČÁST

### 4. Terapie Crohnovy nemoci u dětí se zaměřením na léčbu azathioprinem a kortikosteroidy

## 4. Terapie nespecifických střevních zánětů u dětí se zaměřením na léčbu AZA a kortikosteroidy

### 4.1. Úvod do problematiky systémové aplikace glukokortikosteroidů

Jako nespecificky zasahující vysoce účinné protizánětlivé látky byly kortikosteroidy testovány snad u všech akutních i chronických onemocnění s patofyziologicky nejasným původem. V léčbě nespecifických střevních zánětů jsou systémové kortikosteroidy používány více než 50 let (115) a jejich benefit pro pacienta spočívá především v imunomodulačním účinku.

Kortikosteroidy jako lipofilní látky přestupují přes cytoplazmatickou mebránu a v cytoplazmě buňky se váží na receptor pro glukokortikoidy. Tyto receptory patří do velké rodiny jaderných receptorů regulovaných vazbou ligandů. Receptor pro glukokortikoidy obsahuje ve své struktuře domény s odlišnými funkcemi (reakce s DNA, vazba ligandu a transaktivační aktivita receptoru). V nepřítomnosti ligandů je receptor pro glukokortikoidy lokalizován v cytoplazmě v inaktivním multimolekulovém komplexu. Sestává se ze dvou molekul stresových proteinů hsp90 a dalších bílkovin, např. imunofilinu a kalretikulinu. Po vazbě glukokortikoidu na receptor dochází ke konformačním změnám receptoru. Multimolekulový komplex se rozpadá a nukleární část se translokuje do jádra. V jádře se glukokortikoid váže na sekvence jaderné DNA označované jako GRE (glucocorticoid response elements). Vazba na tyto sekvence vede k aktivaci transkripce genů, které jsou sekvencemi GRE regulovány (tzv. transaktivace). Protože sekvence GRE mají charakter palindromu, působí na ně homodimery receptorů pro glukokortikoidy, které vznikají dimerizací monomerních jednotek. Působením glukokortikoidů je zesílena transkripce lipokortinu, který tlumí tvorbu kyseliny arachidonové, dále je zesílena transkripce pro $\beta_2$-adrenoreceptory a receptor pro interleukin 1 – II.typu, který tlumí prozánětlivé účinky IL-1. Imunomodulační účinek glukokortikoidů je spíše než pozitivními regulacemi při přepisu genů způsoben regulacemi negativními. Tento mechanismus však není zcela objasněn. Část genů, jejichž translačními produkty jsou proteiny s prozánětlivou funkcí, je tlumena glukokortikoidy prostřednictvím regulačních nukleárních faktorů NFκB a AP-1. V promotorech genů kódujících prozánětové molekuly se obvykle nenacházejí sekvence GRE, receptory s navázanými glukokortikoidy proto nemohou ovlivňovat DNA přímo. Jsou však schopny interagovat s transkripčními faktory NFκB a AP-1. Tímto způsobem je zabráněno funkci uvedených nukleárních faktorů. Exprese genu je regulována na několika úrovních – transkripční (míra přepisu genu), posttranskripční (stabilita mRNA), translační (syntéza) a posttranslační (zpracování, modifikace nebo degradace vzniklého proteinu). O funkčním působení bílkoviny dále rozhoduje její lokalizace uvnitř buňky, případně kontrolovaný transport extracelulárně. V současnosti máme k dispozici ještě ne zcela ucelené poznatky o funkci glukokortikoidů i na těchto úrovních exprese genů regulujících prozánětovou aktivitu. Glukokortikoidy inhibují produkci prozánětových cytokinů a cytokinů uplatňujících se v regulacích imunitní odpovědi. K nejvýznamnějším patří IL-1$\alpha$, IL-1$\beta$, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, interferon $\chi$, TNF $\alpha$ a GM-CSF (stimulační faktor granulocytárních a makrofágových kolonií). Dále glukokortikoidy tlumí produkci autoprotilátek, blokují aktivaci makrofágů, brání aktivaci neutrofilů a jejich adhezi, inhibují rozpoznání antigenu, tlumí produkci prozánětlivých mediátorů vznikajících štěpením kyseliny arachidonové, omezují aktivitu inducibilní formy NO syntázy. V neposlední řadě indukují apoptózu v buňkách zánětu (70). Tento velmi účinný, ale i velmi nespecifický účinek v patofyziologii zánětu je vykoupen řadou vedlejších účinků. Dopad negativního

působení kortikosteroidů je velmi individuální, proto je žádoucí zvolit u každého jednotlivého nemocného optimální formu protizánětové terapie kortikosteroidy, ve které je dosaženo maximálního pozitivního účinku s minimálními negativními vlivy léčby (pulsní léčba, lokální podávání, alternativní podávání...). Mezi vedlejší účinky kortikoidní léčby patří vznik otoků a vzestup hmotnosti, rozvoj hypokalémie až závažné metabolické alkalózy, hyperacidita s možností vzniku nebo zhoršení vředové choroby gastroduodenální a ztráta kostního minerálu vedoucí k osteopenii. Negativní bilance dusíku vede k růstovému opoždění, dále se objevují změny kožní (akné, hirsutismus, strie) a poruchy chování (euforie, deprese, psychóza), pacienti mají zvýšený sklon k rozvoji trombotických komplikací nebo infekcí se závažným průběhem. Dále by měli být pravidelně vyšetřováni oftalmologem pro riziko rozvoje zadní subkapsulární katarakty. V případě vysokodávkované pulsní léčby se do popředí dostává riziko akutní minerálové dysbalance, těžké hyperglykémie, kortikosteroidy indukované akutní pankreatitidy nebo vzácně rozvoj aseptické kostní nekrózy. Mezi nejzávažnější komplikace dlouhodobého podávání patří atrofie kůry nadledvin při supresi adrenokortikotropního hormonu produkovaného hypofýzou vedoucí při náhlém vysazení léčby k akutní adrenální insuficienci. Z tohoto důvodu je při předchozím dlouhodobém podávání nutné ukončovat léčbu kortikosteroidy postupně v průběhu týdnů až měsíců.

### 4.2. Cíle práce

1) zhodnocení aplikované dávky kortikosteroidů včetně kalkulace kumulativní dávky v 8., 12. a 52.týdnu léčby ve vztahu k aktivitě nemoci
2) analýza steroidy šetřícího efektu azathioprinu v 52.týdnu léčby
3) analýza vedlejších a nežádoucích účinků azathioprinu
4) analýza průběhu choroby po 1. roce léčby
    a. trvání remise do prvního následného relapsu po 12. měsíci od stanovení diagnózy
    b. počet relapsů po dobu sledování pacienta
5) zhodnocení chirurgického řešení nemoci před 19.rokem života

## 4.3. Materiál a metoda

### 4.3.1. Materiál

V letech 1988-2006 bylo na dětské klinice FN a LF UK v Hradci Králové léčeno 176 dětí s nespecifickými střevními záněty. U 114 dětí byla diagnostikována Crohnova choroba, u 52 ulcerózní a 10 indeterminantní kolitida. V roce 1996 bylo prospektivně zahájeno rutinní sledování aktivity nemoci. Předmětem studie byli pacienti, kteří splňovali všechna vstupní kritéria:

1) věk 0-19 let
2) diagnóza Crohnova choroba
3) prospektivní hodnocení aktivity nemoci
4) follow-up umožňoval získat veškeré potřebné informace, které vyžadovala metodika studie

V letech 1996-2006 byla stanovena diagnóza Crohnovy nemoci u 54 pacientů. Vstupním kritériím vyhovělo 48 pacientů ve věkovém rozmezí 5 – 18 let při stanovení diagnózy, šest zbývajících nebylo do studie zařazeno (předání na jiné pracoviště, ztráta ze sledování apod.). Průměrná délka sledování činila 48 měsíců (13-117).

### 4.3.2. Definice pojmů a metody

4.3.2.1. Crohnova nemoc

Diagnóza Crohnova nemoc byla stanovena na základě kritérií České koordinační skupiny pro studium chronických onemocnění trávicího traktu u dětí (97, 98, 122, tab. 1) v letech 1996-2004 a v letech 2005-2006 na základě na základě tzv. Portských kritérií (65).

**Tab. 1.** Diagnostická kritéria ČKSGE pro nespecifické střevní záněty

| | **Crohnova nemoc** | **Ulcerózní kolitida** | **Indeterminate kolitida** |
|---|---|---|---|
| **Podmínky pro stanovení diagnózy** | **2 a více kritérií splněno** | **obě kritéria splněna** | **všechna 3 kritéria splněna** |
| Ileoskopie (+ event. gastroskopie, kapslová endoskopie) | segmentární zánětlivé postižení terminálního ilea a/nebo tlustého střeva event. orálnějších částí GIT ve formě aftoidních vředů, serpiginózních ulcerací, pseudopolypů, stenóz, píštělí | endoskopický obraz hemoragicko-ulcerózního zánětu sliznice rekta, který se kontinuálně šíří v různém rozsahu proximálním směrem v tlustém střevě | zánětlivé postižení tlustého střeva neumožňující jednoznačné zařazení, tenké střevo a další partie GIT intaktní |
| Histologie | obraz zánětu v celé šíři bioptického vzorku s intenzivním smíšeným zánětlivým infiltrátem, event. s nálezem patognomonických epiteloidních granulomů | histologický obraz difúzního zánětu sliznice s hyperémií, smíšeným zánětlivým infiltrátem a s nálezem příp. kryptových abscesů | histologický obraz nespecifického střevního zánětu neumožňující bližší zařazení do kategorie Crohnovy nemoci nebo ulcerózní kolitidy |
| Enteroklýza (MR enterografie) | změny na terminálním ileu kompatibilní s dg. Crohnovy nemoci | není nutná | normální nález na tenkém střevě při zobrazovacích vyšetřeních |

4.3.2.2. Iniciální terapie

Medikace aplikovaná prvních 12. týdnů od stanovení diagnózy s cílem navození remise.

4.3.2.3. Dávka kortikosteroidů

Aplikované dávky systémových kortikosteroidů byly zaznamenávány v týdenních intervalech jako dávka prednisonu nebo prednison ekvivalentu při použití methylprednisolonu v miligramech na kilogram tělesné hmotnosti pacienta. Převod protizánětlivé dávky methylprednisolonu na prednison ekvivalent byl proveden dle obecně známých kritérií (90, tab. 2). V dalším textu je termín prednison ekvivalent použitý pro pacienty léčené prednisonem nebo ekvivalentem prednisonu dle uvedeného přepočtu. Pacienti léčení budesonidem (celkem 5 pacientů – 10,2% souboru) nebyli zařazeni do analýzy dávek kortikosteroidů a byli hodnoceni zvlášť.

**Tab. 2.** Tabulka pro kalkulaci protizánětlivé dávky glukokortikoidů ve formě prednison ekvivalentu (upraveno dle Miller WL. The adrenal cortex. in Sperling MA. (ed) Pediatric endocrinology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2002: 385-438.)

| přípravek | dávka v miligramech | přepočítávací faktor na prednison ekvivalent |
|---|---|---|
| hydrocortison | 100 | dávka/4 |
| prednison | 25 | dávka/1 |
| methylprednisolon | 20 | dávka/0,8 |
| dexamethason | 4 | dávka/0,16 |

Kumulativní dávka kortikosteroidů byla vypočítána pomocí Newtonova-Cotesova kvadraturního vzorce (tzv. lichoběžníkové pravidlo) jako integrál spojité funkce definované týdenními dávkami prednison ekvivalentu v mg/kg tělesné hmotnosti během 52 týdnů sledování.

$$\int_a^b f(x)dx = h[\frac{1}{2}f(a_0) + f(a_1) + ... + f(a_{m-1}) + \frac{1}{2}f(a_m)] + E(f)$$

kde

$h = (b-a)/m,$

$a_j = a + jh$ pro $j = 0, ..., m$ a

$$E(f) = -\frac{(b-a)}{12}h^2 f''(\xi)$$

4.3.2.4. Kortikodependence

Relaps onemocnění do 30 dnů po vysazení léčby nebo po pokusu o snížení dávky kortikosteroidů.

4.3.2.5. Kortikorezistence

Zvyšování dávek kortikosteroidů (k maximální dávce prednisonu 2 mg/kg/den) nevede k dosažení remise.

4.3.2.6. Remise, parciální terapeutická odpověď, relaps

Aktivita Crohnovy choroby byla hodnocena pomocí pediatrického indexu aktivity Crohnovy nemoci (PCDAI) (62, tab. 3 ). Kalkulace PCDAI byla realizována při stanovení diagnózy a dále ve 12., 26., 38., a 52. týdnu léčby, event. kdykoli při podezření na relaps onemocnění. PCDAI > 30 bodů byl považován za marker středně těžké až těžké aktivity nemoci, naopak PCDAI $\leq$ 10 bodů byl hodnocen jako remise onemocnění. PCDAI v rozmezí 11 – 30 bodů byl hodnocen jako mírná aktivita nemoci. Jako parciální terapeutická odezva byl hodnocen pokles PCDAI o 12,5 a více bodů a nebyla splněna kritéria remise (63, 73). Jako relaps onemocnění byl hodnocen vzestup PCDAI nad 15 bodů po předcházející remisi, nebo vzestup PCDAI o více než 10 bodů. Obdobná kritéria již byla použita dříve (79).

4.3.2.7. Hodnocení následného průběhu

Hodnocení následného průběhu nemoci po prvním roce léčby bylo realizováno ambulantními kontrolami v intervalu 3-6 měsíců a kalkulací PCDAI při klinických obtížích pacienta nebo laboratorních markerech aktivity onemocnění.

**Tab. 3.** Pediatrický Index aktivity Crohnovy nemoci

| ANAMNÉZA (1 TÝDEN) | | BODY | FW (MM/H) | BODY |
|---|---|---|---|---|
| BOLEST BŘICHA | | | ≤ 20 | 0 |
| Žádná | | 0 | 21-50 | 2,5 |
| Mírná, neruší denní aktivity | | 5 | >50 | 5 |
| Silná – denní, déle trvající, ruší životní aktivity, noční bolest | | 10 | ALBUMIN (G/L) | |
| STOLICE/DEN | | | ≥ 35 | 0 |
| 0-1 průjmová stolice bez krve | | 0 | 31-34 | 5 |
| Až 2 kašovité stolice s malým množstvím krve nebo 2-5 průjmových stolic | | 5 | <30 | 10 |
| Výrazné krvácení nebo ≥ 6 průjmových stolic nebo průjem během noci | | 10 | **KLINICKÉ VYŠETŘENÍ** | |
| PACIENTOVA AKTIVITA BĚHEM POSLEDNÍHO TÝDNE | | | TĚLESNÁ HMOTNOST | |
| Žádné omezení, cítí se dobře | | 0 | Hmotnostní přírůstek přiměřený věku a výšce | 0 |
| Občasné problémy s tělesnou aktivitou odpovídající věku | | 5 | Neúmyslně stabilní hmotnost, úbytek hmotnosti 1-9% | 5 |
| Časté omezení aktivity, cítí se špatně | | 10 | Úbytek hmotnosti ≥ 10% | 10 |
| **LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ** | | | Pokles v percentilovém grafu oproti výchozí výšce < o 1 percentilové pásmo | 0 |
| HEMATOKRIT (%) | | | Pokles v percentilovém grafu oproti výchozí výšce >o 1 ale < o 2 percentilová pásma | 5 |
| < 10 let | ≥ 33 | 0 | Pokles v percentilovém grafu oproti výchozí výšce > o 2 percentilové pásma | 10 |
| | 28 – 32 | 2,5 | BŘICHO | |
| | < 28 | 5 | Žádná palpační citlivost, žádná rezistence | 0 |
| dívky 11-19 let | ≥ 34 | 0 | Palpační bolestivost nebo infiltrát bez bolestivosti | 5 |
| | 29-33 | 2,5 | Bolestivost, rezistence | 10 |
| | <29 | 5 | PERIREKTÁLNÍ ONEMOCNĚNÍ | |
| chlapci 11-14 let | ≥ 35 | 0 | Žádné nebo asymptomatické výrůstky v okolí konečníku | 0 |
| | 30-34 | 2,5 | 1-2 nebolestivé píštěle s malou sekrecí, žádná bolestivost | 5 |
| | <30 | 5 | Aktivní píštěl se sekrecí, bolestivost nebo absces | 10 |
| chlapci 15-19 let | ≥ 37 | 0 | EXTRAINTESTINÁLNÍ PROJEVY (teplota ≥ 38,5°C po dobu 3 dnů v minulém týdnu, artritida, uveitida, erythema nodosum, gangrenózní pyodermie | |
| | 32-36 | 2,5 | Žádný z uvedených symptomů | 0 |
| | <32 | 5 | 1 z uvedených symptomů | 5 |
| | | | 2 nebo více z uvedených symptomů | 10 |

### 4.3.3. Statistická analýza

Ke statistickému zhodnocení výsledků byly použity standardní statistické metody – testy k posouzení normality souboru, párové i nepárové testy (dvouvýběrový test, Wilcoxonův test, Mann-Whitneyův test, párový T-test, ) Fisherův přesný test, pro kalkulaci kumulativní pravděpodobnosti chirurgického řešení potom Kaplan – Meierova metoda pravděpodobnosti přežití. Hodnota $p < 0,05$ byla použita jako kritérium pro zamítnutí nulové hypotézy a stanovení statisticky významného rozdílu.

## 4.4. Výsledky

Soubor tvořilo 48 pacientů ve věku 5-18 let s diagnózou Crohnova nemoc. Charakteristika souboru je znázorněna v tabulce 4.

**Tab. 4.** Vstupní charakteristika souboru.

| **CN (n = 49)** | |
|---|---|
| průměrný věk (medián věku) při stanovení diagnózy | 13,7 (15) let |
| průměrný PCDAI (medián) při stanovení diagnózy | 29,4 (27,5) bodů |
| průměrná délka (medián délky) sledování | 47,9 (42) měsíců |
| **chlapci** | **27 (56,3%)** |
| průměrný věk (medián věku) při stanovení diagnózy | 12,8 (14)* |
| **dívky** | **21 (43,8%)** |
| průměrný věk (medián věku) při stanovení diagnózy | 14,8 (15)* |

* p = 0,01

Lokalizace onemocnění a frekvenci postižení jednotlivých částí trávicí trubice jsou uvedeny v tabulce č. 5 a grafu č. 1. Iniciální léčba je uvedena v tabulce č. 6.

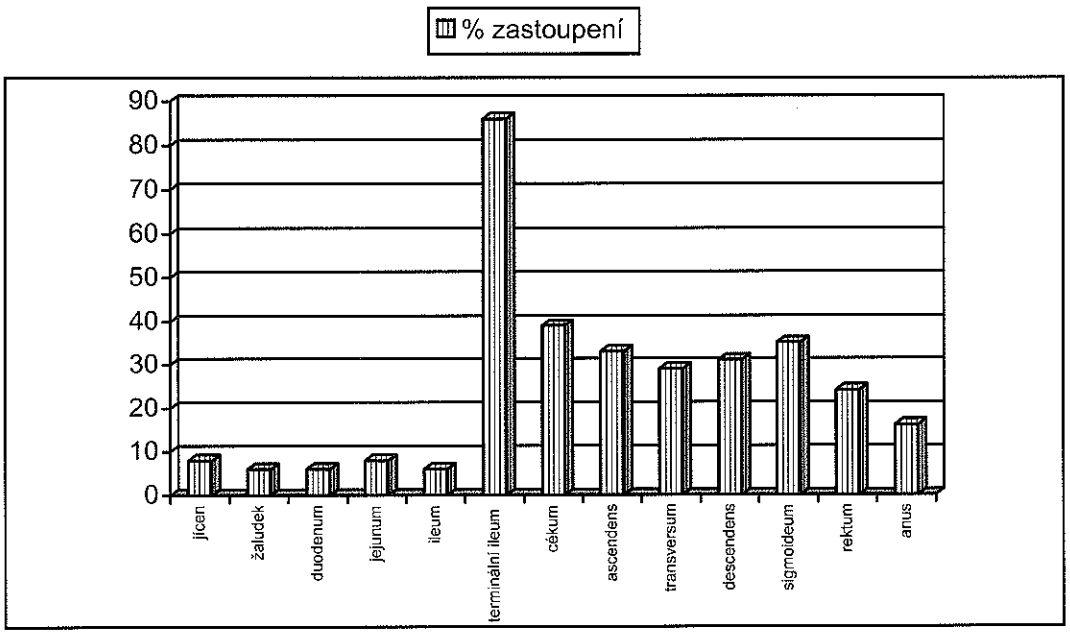
**Tab. 5.** Lokalizace onemocnění při stanovení diagnózy

| **Lokalizace nemoci (n = 48)** | **Absolutní počet (%)** |
|---|---|
| Izolované terminální ileum | 11 (22,9) |
| Izolované postižení kolon | 5 (10,4) |
| Ileokolická forma (terminální ileum + kolon) | 27 (54,2) |
| Pankolitida (postižení ≥ 3 oddílů kolon) | 19 (40) |
| Postižení GIT nad terminálním ileem | 13 (27) |
| Pozitivní nález při horní endoskopii **(n = 25)** | 7 (28) |
| Análni forma | 7 (14,6) |

**Tab. 6.** Iniciální léčba.

| **Druh medikace** | **Absolutní počet (%)** |
|---|---|
| Prednison/methylprednisolon | 34 (70,8) |
| Budesonid | 4 (8,3) |
| Azathioprin | 31 (64,6) |
| Enterální výživa | 10 (21) |
| Infliximab | 0 (0) |
| Antibiotika | 17 (35,4) |
| Pouze 5-ASA nebo sulfasalazin | 7 (14,6) |

**Graf 1.** Frekvence postižení jednotlivých částí GIT v době stanovení diagnózy.




Diagramy 1, 2 a 3 znázorňují rozdělení souboru na analyzované skupiny. Výsledky studie jsou dále uváděny ve vazbě na toto rozdělení. Skupina I zahrnuje pacienty léčené kortikosteroidy (v diagramu 1 šedá pole), skupina II pak zahrnuje pacienty, u kterých nebyla léčba kortikosteroidy v 1.roce sledování indikována (černé pole v diagramu 1). Vnitřní dělení skupiny I (diagram 2) pak zahrnuje 38 pacientů, kteří byli léčeni kortikosteroidy v rámci iniciální terapie a 2 pacienty, jimž byly kortikosteroidy ordinovány v průběhu prvního roku sledování.

**Diagram 1.** Základní rozdělení souboru.

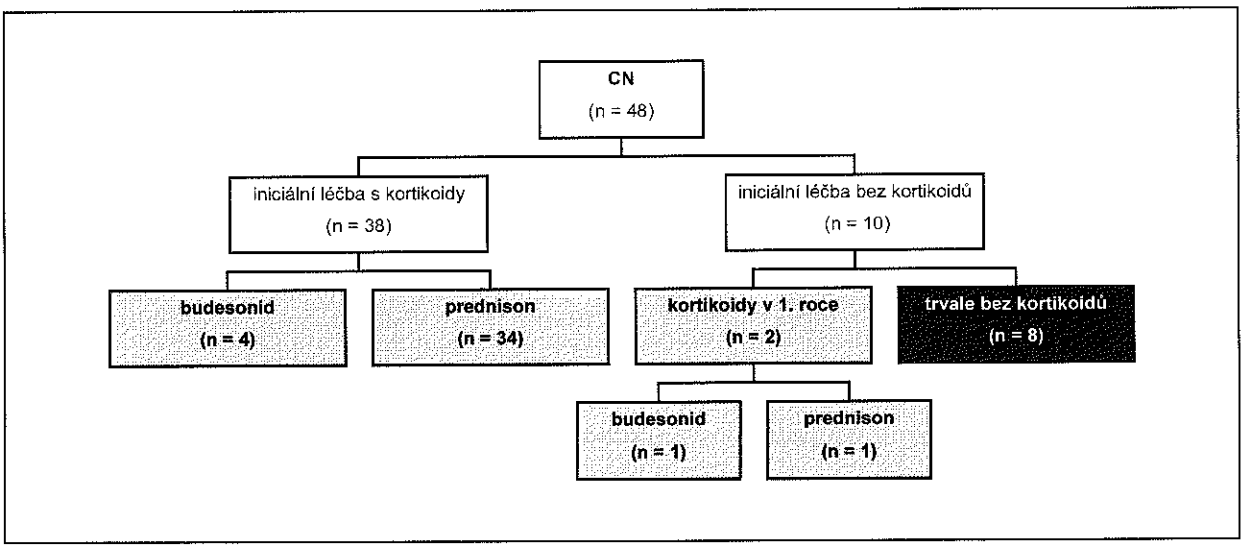


**Diagram 2.** Follow-up v prvním roce.

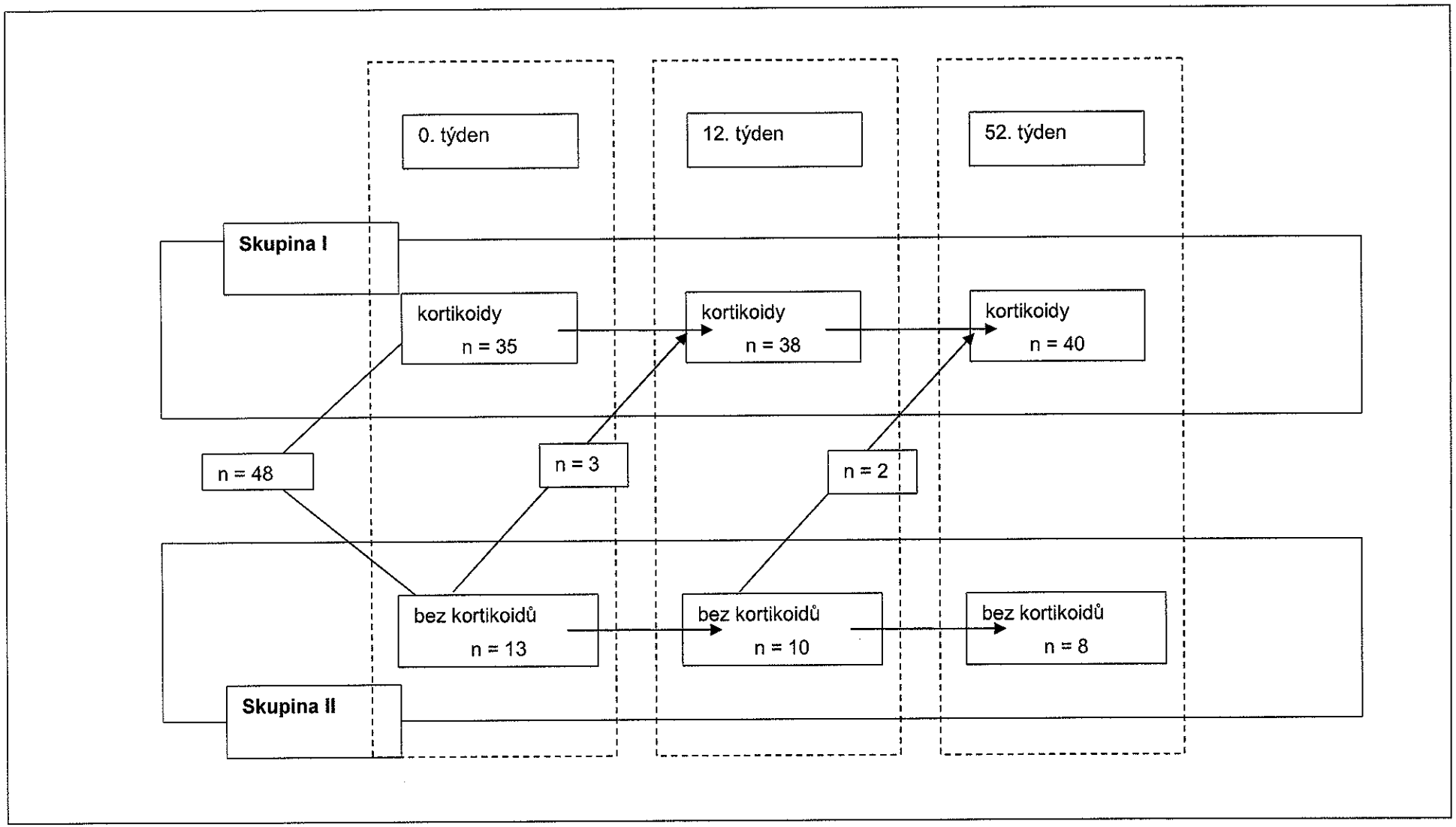
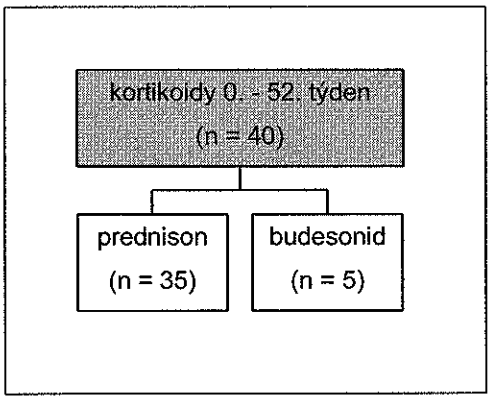


**Diagram 3.** Rozdělení pacientů podle léčby kortikosteroidy v 1.roce sledování.



### 4.4.1. Zhodnocení aplikované dávky kortikosteroidů včetně kalkulace kumulativní dávky v 8., 12.týdnu a 52. týdnu léčby ve vztahu k aktivitě nemoci.

#### 4.4.1.1. Skupina I

Léčba systémovými kortikosteroidy byla v týdnu 0 zahájena u 35 pacientů (72,9% celého souboru – I + II), medián PCDAI této skupiny při stanovení diagnózy byl 30 bodů (5 – 52,5 bodu). Prednisonem nebo methylprednisolonem bylo léčeno 32 (91,4%) pacientů s mediánem iniciální dávky prednison ekvivalentu 1 mg/kg (0,8 – 2) a s mediánem PCDAI 32,5 bodů (5 – 52,5 bodu). Budesonid byl použitý u 3 (8,6 %) pacientů v dávce 9 mg/den, medián PCDAI u těchto pacientů činil 30 bodů (22,5 – 50 bodů). Iniciální léčba kortikosteroidy byla do 12.týdne sledování rozšířena o další 3 pacienty (2 ve skupině prednisonu a 1 ve skupině budesonidu).

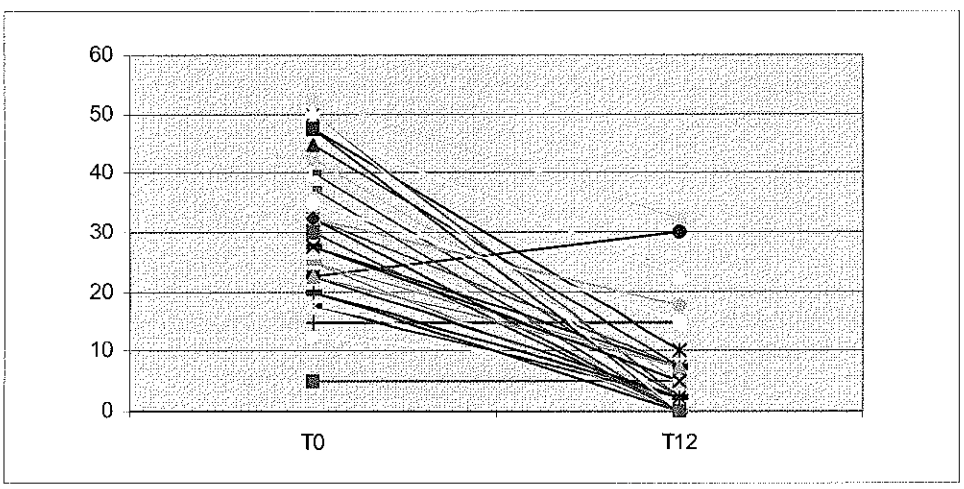
Ve 12.týdnu bylo hodnoceno 38 pacientů, kteří byli léčeni kortikoidy v rámci iniciální terapie. Medián iniciální dávky prednison ekvivalentu klesl z 1,0 na 0,21 mg/kg/den. Medián kumulativní dávky prednisonu ve 12. týdnu léčby byl 46,6 mg/kg (tabulka 7; graf 3). Remise bylo dosaženo u 33 (86,8%), parciální terapeutické odpovědi u 4 (10,5%) pacientů a u 1 pacienta nebylo dosaženo ani parciální terapeutické odpovědi. Medián PCDAI ve 12.týdnu sledování byl 5 bodů (0 – 32,5 bodu). Vývoj PCDAI v průběhu prvních 12-ti týdnů sledování je uveden v grafu 2 a grafu 5.

U dalších 2 pacientů byla léčba systémovými kortikosteroidy zahájena po 12. týdnu sledování (13. a 39. týden) – diagram 1 a 2.

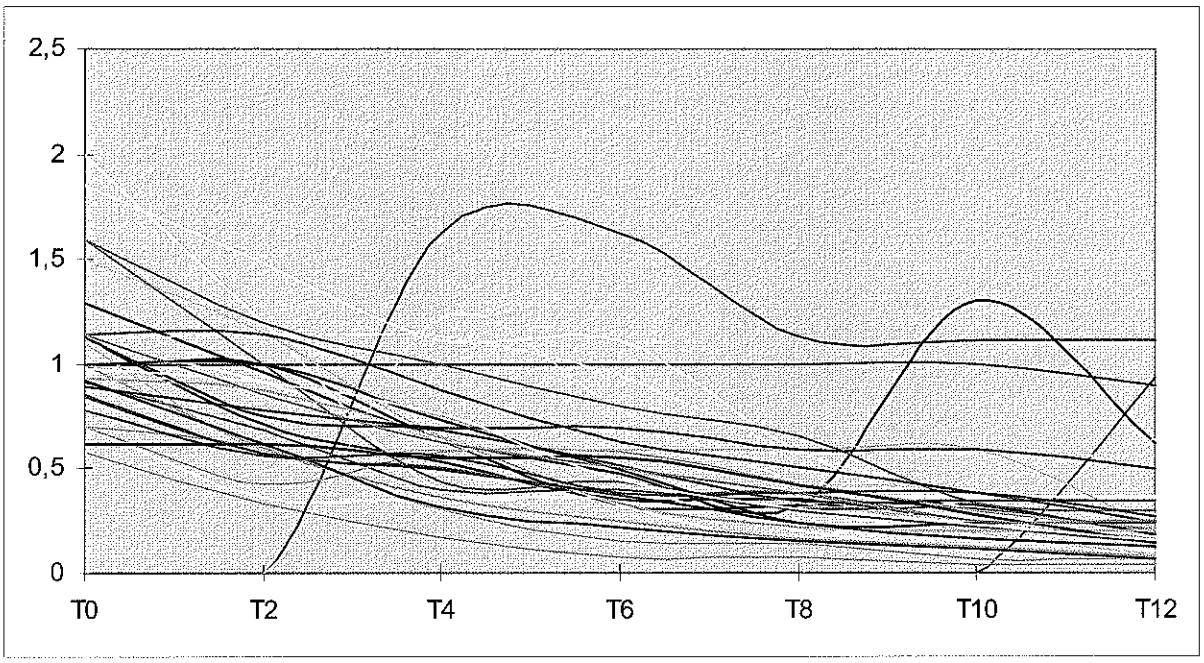
**Tab. 7.** Medián dávky kortikosteroidů v 1. roce léčby.

| | 0. týden | 4. týden | 8. týden | 12. týden | 52. týden |
|---|---|---|---|---|---|
| absolutní dávka (mg/kg/den) | 1 | 0,64 | 0,34 | 0,21 | 0 |
| kumulativní dávka (mg/kg) | 0 | 27,9 | 39,9 | 46,6 | 70,1 |
| podíl roční kumulativní dávky (%) | 0 | 39,8 | 56,9 | 66,5 | 100 |

**Graf 2.** Vývoj PCDAI v prvních 12-ti týdnech léčby (osa X – čas v týdnech, osa Y – PCDAI).



**Graf 3.** Vývoj dávky kortikosteroidů v prvních 12-ti týdnech léčby (osa X – čas v týdnech, osa Y – dávka kortikosteroidů v prednison ekvivalentu/kg/den).



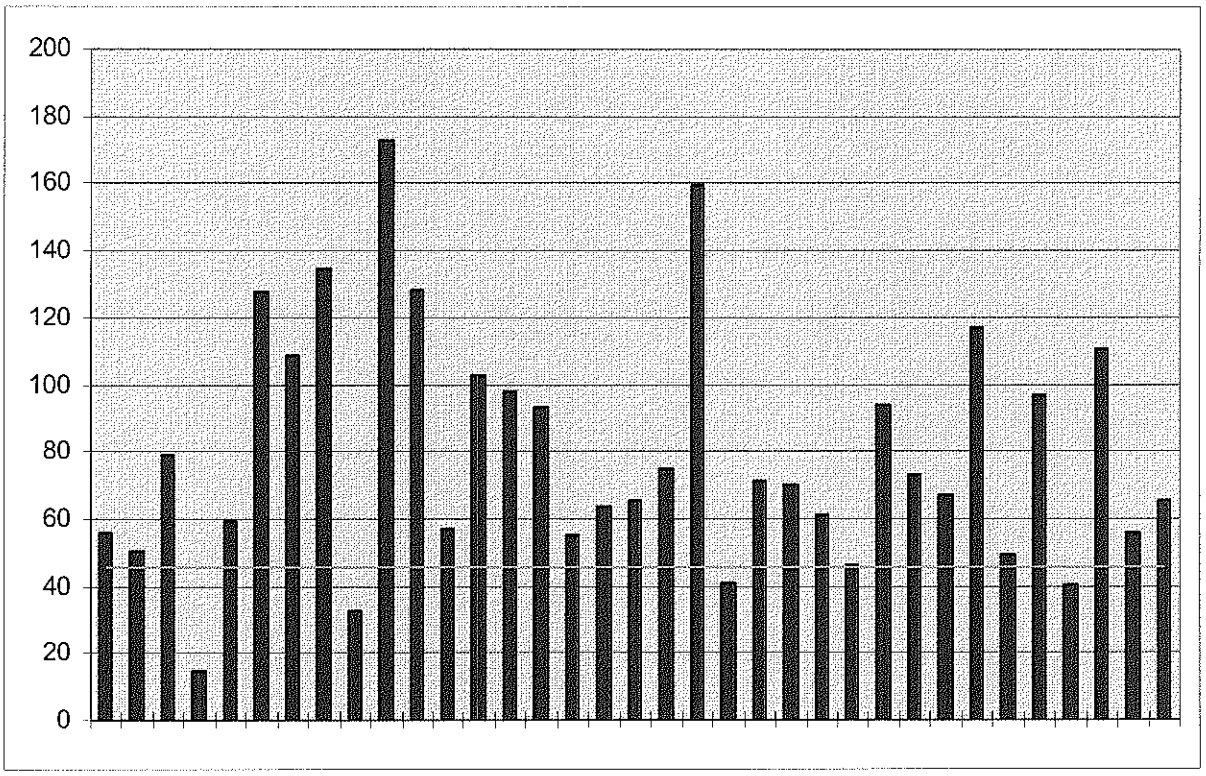

Systémové kortikosteroidy byly použity během prvního roku léčby u 40 pacientů (81,6% celého souboru – I + II), kteří byli hodnoceni v 52. týdnu. U 35 (87,5%) dětí se jednalo o prednison nebo methylprednisolon, ve zbývajících 5 (12,5%) případech šlo o budesonid (diagram 2, tab. 8).

**Tab. 8.** Iniciální léčba kortikosteroidy a v průběhu 1.roku sledování

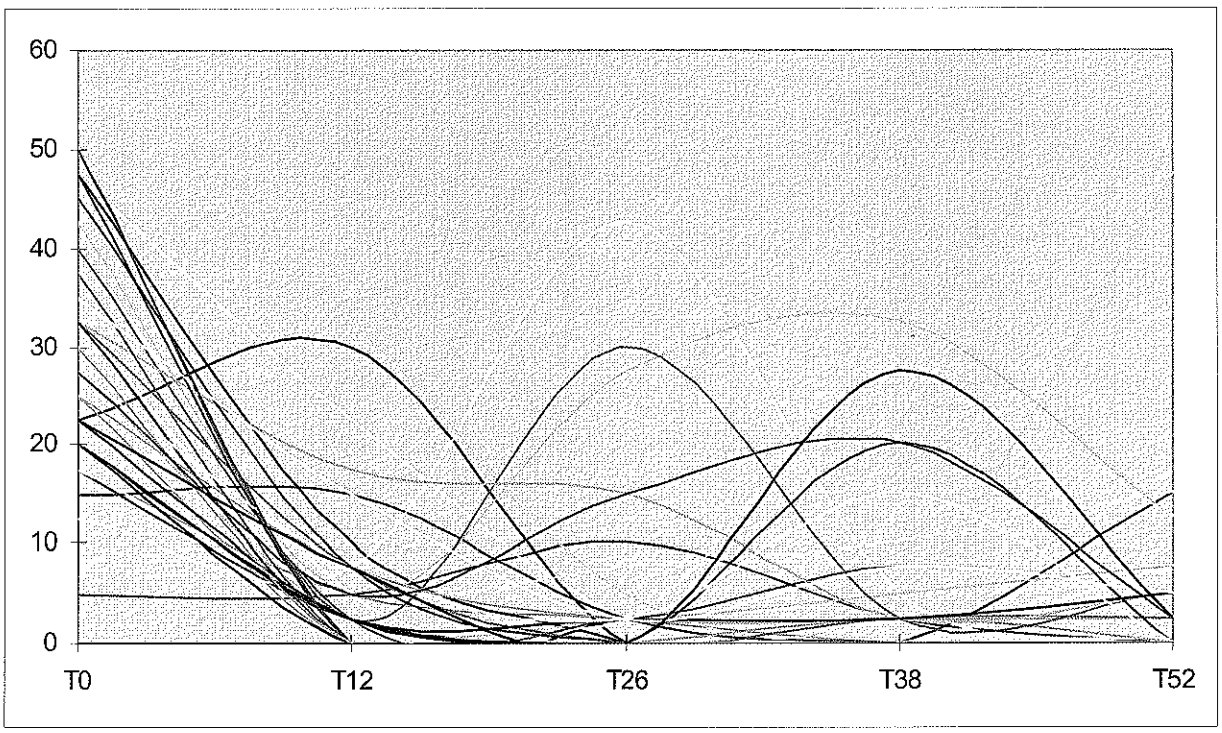
| Druh medikace | Iniciální léčba (% celého souboru) | V průběhu 1. roku (% celého souboru) | Kortikodependence (% z léčených) | Kortikodependence (% z celého souboru) |
|---|---|---|---|---|
| Prednison/Methylprednisolon | 34 (70,8) | 35 (72,9) | 4 (11,4) | 6 (12,5) |
| Budesonid | 4 (8,3) | 5 (10,4) | 2 (40) | |

V 52. týdnu sledování bylo systémovými kortikosteroidy léčeno 20 pacientů, přičemž 16 dětí patřilo do skupiny prednisonu a 4 děti do skupiny budesonidu. Minimální dávkou prednison ekvivalentu ≤ 0,09 mg/kg/den bylo léčeno 11 (68,8%) pacientů prednisonové skupiny. Medián roční kumulativní dávky byl 70,1 mg/kg/rok (15,0 – 159,6) prednison ekvivalentu, tj. 0,19 mg/kg/den (graf č. 4). Medián PCDAI v 52. týdnu byl 0 bodů (0 – 47,5 bodu), v remisi bylo 35 (87,5%) pacientů. Jako kortikodependentní bylo označeno 6 (15%) ze 40 pacientů– tabulka 8. K relapsu v průběhu 1.roku sledování došlo u 7 (20%) pacientů léčených prednisonem nebo methylprednisolonem a u 3 (60%) pacientů léčených budesonidem. Rozdíl ve frekvenci relapsů nebo ve frekvenci kortikodependence ve skupině prednisonu nebo budesonidu nebyl statisticky významný (p= 0,089 resp. 0,154). Vývoj pediatrického indexu aktivity Crohnovy nemoci je znázorněn v grafech č. 2, 5, 6 a 7.

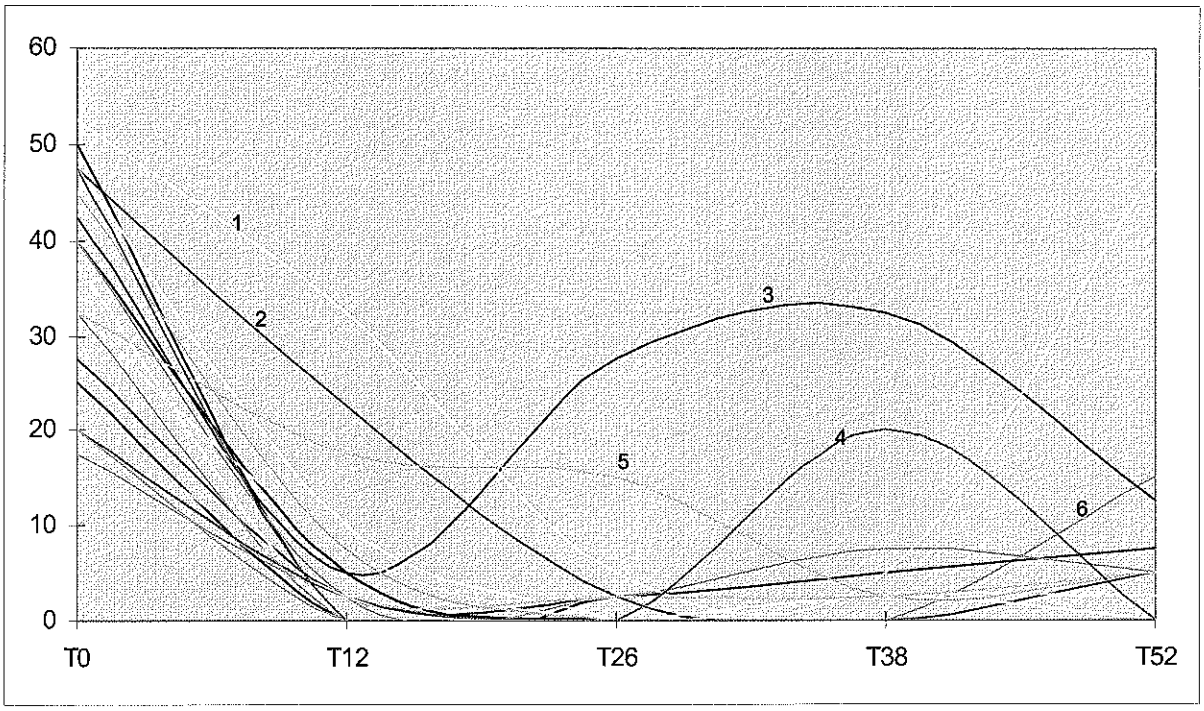
**Graf 4.** Kumulativní dávka kortikosteroidů v 1. roce léčby (osa X – jednotlivé subjekty, osa Y – dávka kortikosteroidů v mg/kg/rok prednison ekvivalentu, vložený graf – hypoteticky kalkulovaná kumulativní „fyziologická" substituční dávka prednisonu v mg/kg/rok – viz níže).




**Graf 5.** Vývoj PCDAI v 1.roce léčby (osa X – čas v týdnech, osa Y – PCDAI).



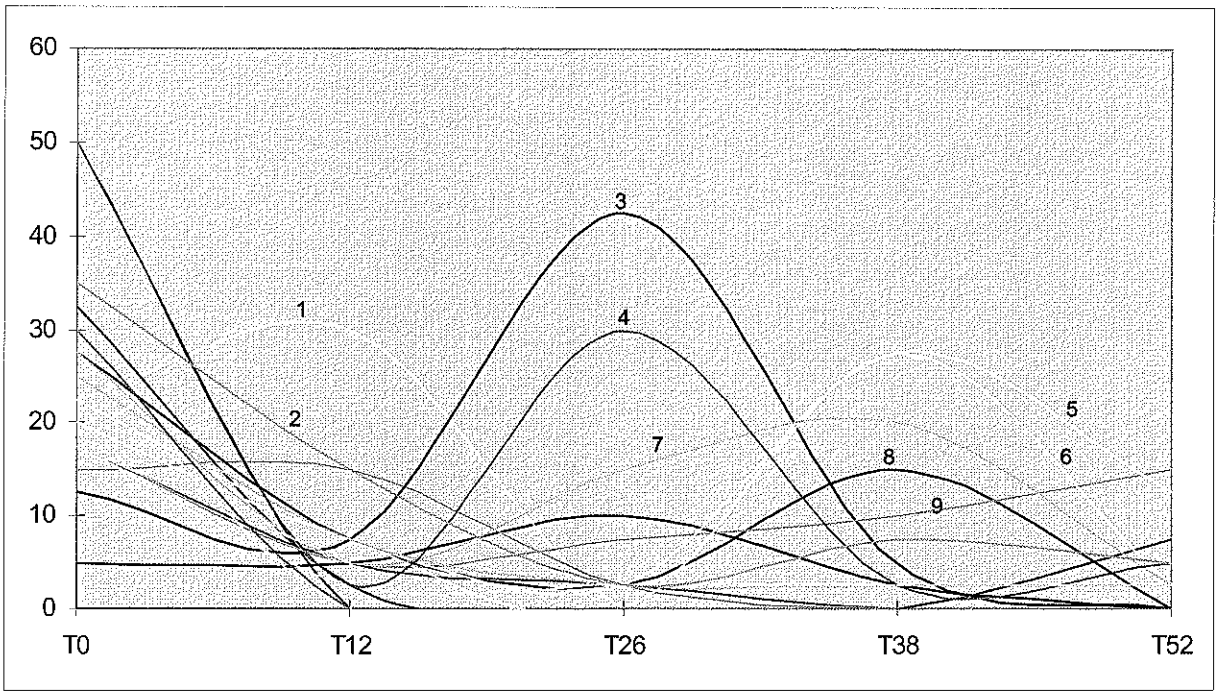
**Graf 6.** Vývoj PCDAI ve skupině iniciálně léčených kombinací prednison/methylprednisolon + azathioprin. Komentáře v tab. 9. (osa X – čas v týdnech, osa Y – PCDAI).




**Tab. 9.** Charakteristika 6 pacientů ze skupiny iniciálně léčených kombinací prednison/methylprednisolon + azathioprin, u kterých došlo v průběhu 1. roku sledování k relapsu nebo neočekávané odpovědi na léčbu (číslo – číslo PCDAI křivky; dg. – věk stanovení diagnózy; IFX – léčba infliximabem; AZA – léčba azathioprinem; lab.- laboratorní).

| číslo | Průběh |
|---|---|
| 1 | Dg. 12 let, agresivní průběh, ,spontánní perforace kolon při udržovací léčbě IFX, kolektomie, non-compliance |
| 2 | Dg. 5 let, stenozující postižení term. ilea, 4 měsíce od dg. operace s optimálním výsledkem |
| 3 | Dg. 8 let, ileokolická forma, cca 5 měsíců od stanovení dg. odmítá veškeré léky, non-compliance |
| 4 | Dg. 14 let, pankolitida, relaps v 9.měsíci po stanovení dg. při chybném užívání AZA, non-compliance |
| 5 | Dg. 15 let, ileokolická forma, klinické obtíže mírné, závažné nálezy – lab. remise nedosaženo 3 roky, non-compliance |
| 6 | Dg. 12 let, term.ileum, remise, dr.Jonáš z „celostní medicíny" doporučil vysadit naši léčbu… non-compliance |

**Graf 7.** Vývoj PCDAI ve skupině iniciálně neléčených kombinací prednison/methylprednisolon + azathioprin. Komentáře v tab. 10. (osa X – čas v týdnech, osa Y – PCDAI).




**Tab. 10.** Charakteristika 9 pacientů se skupiny neléčených iniciálně kombinací prednison/methylprednisolon + azathioprin, u kterých došlo v průběhu 1. roku sledování k relapsu nebo neadekvátní odpovědi na léčbu (číslo – číslo PCDAI křivky; dg. – věk stanovení diagnózy; EV – léčba definovanou enterální výživou; AZA – léčba azathioprinem; 5-ASA – léčba deriváty kyseliny 5-aminosalicylové; lok. léčba – topická léčba klyzmaty; P – léčba prednisonem; )

| číslo | Průběh |
|---|---|
| 1 | Dg. 11 let, ileocékální forma, kortikodependence, 5 měsíců od stanovení dg. operace s optimálním výsledkem |
| 2 | Dg. 16 let, ileokolická forma, kortikodependence |
| 3 | Dg. 17 let, ileocékální forma, kortikodependence s extraintestinální symptomatologií, spontánní perforace, absces |
| 4 | Dg. 15 let, ileum, těžká růstová retardace, proto EV a časně operace, 6 měsíců od dg. relaps; + AZA = remise |
| 5 | Dg. 15 let, rektosigma, (5-ASA, lok. léčba) následně extraintestinální symptomy (+ P, AZA), remise |
| 6 | Dg. 15 let, ileokolická forma, budesonid, kortikodependence, operována 15 měsíců od stanovení dg., remise |
| 7 | Dg. 17 let, ileokolická forma, + budesonid, stav se horší, vysazení budesonidu = beze změny, P + AZA = remise |
| 8 | Dg. 11 let, term.ileum; budesonid, lab. aktivita, klinicky relativně ok, 34 měsíců od dg. operace, následně remise |
| 9 | Dg. 17 let, term.ileum, klinicky ok, vysoká laboratoř, v čase zlepšení při monoterapii 5-ASA |

#### 4.4.1.2. Skupina II

U 10 pacientů, kteří nebyli iniciálně léčeni systémovými kortikosteroidy, byl PCDAI (medián 17,5 bodu) při stanovení diagnózy v porovnání se skupinou I statisticky významně nižší (p = 0,01; 5 – 32,5 bodu).

Ve 12. týdnu byl u těchto pacientů medián PCDAI 2,5 bodu (0 – 17,5), remise dosáhlo 8 (80%) dětí, parciální terapeutickou odpověď jsme nezaznamenali.

V 52. týdnu sledování bylo hodnoceno 8 dětí (2 pacienti přestoupili do skupiny I – 1x pro relaps, 1x pro progresi postižení tenkého střeva). Medián PCDAI byl 2,5 bodu (0 – 12,5 bodu). Remise bylo dosaženo v 7 případech (87,5%), 1 pacientka byla léčena infliximabem pro fistulující formu CN s optimálním efektem. Částečná terapeutická odpověď byla zaznamenána u 1 pacienta. U žádného z těchto osmi pacientů nedošlo k relapsu.

V průběhu 1.roku byli chirurgicky léčeni 2 pacienti (1x ošetření píštěle, 1x ileocékální resekce), u žádného z těchto dvou nedošlo k relapsu.

### 4.4.2. Skupina I a II do 52. týdne

Při hodnocení celého souboru pacientů (skupina I a II; n = 48) byla ve 12.týdnu sledování remise dosažena u 40 (83,4%) a parciální terapeutická odpověď u 4 (8,3%) pacientů.

V 52. týdnu bylo remise dosaženo u 42 (87,5%) souboru. Relaps onemocnění byl zaznamenán během prvního roku léčby u 10 (20,8%) pacientů.

Operaci podstoupilo do 52. týdne 6 (12,5%) pacientů z celého souboru. Ve 2 případech byla operace realizována do 2 měsíců od stanovení diagnózy – v prvním případě šlo o těžkou stenózu v oblasti ileocékální chlopně, ve druhém případě šlo o závažné postižení terminálního ilea v kombinaci s těžkou růstovou retardací, opožděním puberty a prokázanou osteoporózou.

### 4.4.3. Analýza steroidy šetřícího efektu azathioprinu v 52. týdnu léčby

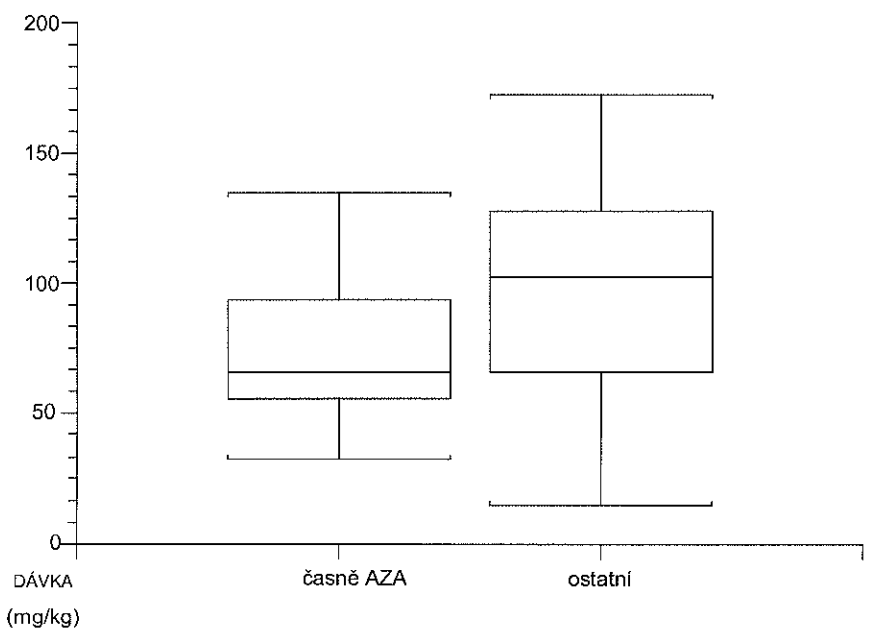
Léčba azathioprinem byla zahájena při stanovení diagnózy u 28 (58,3%) pacientů, v rámci iniciální léčby (do 12.týdne sledování) byla dále rozšířena na 31 (64,6%) pacientů. Do 52. týdne sledování byl azathioprin indikován u 33 (68,8%) pacientů, o rok později (tj. 24 měsíců od stanovení diagnózy) procentuální zastoupení použití azathioprinu dosáhlo 85,4%. Průměrná iniciální dávka resp. medián dávky azathioprinu byla 1,8 mg/kg/den (1,9 mg/kg/den), s rozptylem 0,7 – 2,9 mg/kg/den.

Kortikosteroidy šetřící efekt azathioprinu je graficky znázorněn v grafech ilustrujících společně s tabulkami klinický průběh u jednotlivých pacientů. Graf 6 představuje vývoj PCDAI v 1.roce sledování u skupiny pacientů, kteří byli iniciálně léčeni kombinací prednison/methylprednisolon a azathioprin. Tabulka 9 pak blíže dokresluje kazuistiky jednotlivých pacientů, u nichž do 52.týdne sledování došlo k relapsu nebo nebylo dosaženo remise. Obdobně je znázorněn průběh u pacientů, kteří nebyli iniciálně léčeni kombinací prednisonu/methylprednisolonu a azathioprinu (graf 7). Těmto pacientům byla ordinována jiná iniciální léčba – např. budesonid + azathioprin, 5-ASA + prednison aj. Tabulka 10 potom opět dokresluje jednotlivé kazuistiky v závislosti na vývoji PCDAI.

Průměr resp. medián kumulativní dávky prednison ekvivalentu v závislosti na zahájené léčbě (prednison + azathioprin vs. jinak než uvedeným algoritmem –...) nebyl rozdílný (76,3 vs. 81,1 resp. 68,7 vs. 68,4 mg/kg/rok, p = 0,273). Získaný rozdíl nebyl statisticky významný ani při odfiltrování pacientů s potvrzenou non-compliance (65,4 vs. 81,1 resp. 63,5 vs. 68,4 mg/kg/rok, p = 0,060).

Roční kumulativní dávka prednisonu skupiny časně léčené azathioprinem (do 12. týdne od stanovení diagnózy) byla 66,3 mg/kg/rok. U skupiny dětí, která nebyla léčena azathioprinem časně dosáhla roční kumulativní dávka 102,8 mg/kg/rok. Tento rozdíl nebyl ve sledovaném souboru statisticky významný – p = 0,089 (graf 8).

**Graf 8.** Rozdíl v kumulativní dávce kortikosteroidů (skupina léčených azathioprinem časně a ostatních).



### 4.4.4. Analýza nežádoucích účinků azathioprinu

Terapie azathioprinem byla použita u 42 (87,5%) pacientů, u kterých byl hodnocen výskyt vedlejších a nežádoucích účinků léku. Střední délka podávání byla 37 měsíců (6 – 93). Medián dávky azathioprinu při zahájení léčby byl 1,9 mg/kg/den, medián minimální udržovací dávky azathioprinu poklesl na 1,6 mg/kg/den. Maximální použitá dávka azathioprinu byla 2,9 mg/kg/den, minimální dávka pak 0,7 mg/kg/den.

Pokles hladin leukocytů po zahájení léčby azathioprinem byl vysoce statisticky významný při všech kontrolách ($p<0,01$), překvapivě ale hodnoty leukocytů nebyly významně nižší než ve skupině dětí azathioprinem neléčených. V průběhu dalšího sledování dávka azathioprinu kolísala (snižování event. zvyšování dávky v závislosti na klinickém stavu a laboratorních parametrech). Výsledky laboratorních hodnot při léčbě jsou uvedeny v tabulkách 11, 12, 13 a 14. V průběhu prvních 2 let léčby azathioprinem byla leukopenie (< $4.10^9$/L) zaznamenána v 11 případech (9 různých pacientů), tj. 21,4% pacientů, při použití kritérií National Institutes of Health (125) byla leukopenie (<$3.10^9$/L) při léčbě azathioprinem zaznamenána v 7,1%. Absolutní lymfopenie (<$0,8.10^9$/L) byla zaznamenána u 22 pacientů (52,4%), těžká lymfopenie (<$0,5.10^9$/L) u 7 pacientů (16,7%). Asociace leukopenie (<$4.10^9$/L) a lymfopenie (<$0,8.10^9$/L) v některém z vyšetření byla zaznamenána ve 3 případech z 11 (27,3%), asociace leukopenie a těžké lymfopenie dokonce jen v 1 případě (14,2%). Izolovaná lymfopenie bez leukopenie byla zaznamenána u 22 pacientů. Léčba azathioprinem byla přerušena ve 2 případech pro středně těžkou leukopenii (po 22 a 61 měsíci léčby) při dávce azathioprinu 1,2 mg/kg/den, ve 2 dalších případech pro EB virózu (po 9 a 13 měsících léčby). Leukopenie ani lymfopenie nebyla zaznamenána u pacientů azathioprinem neléčených.

Vzestup středního objemu erytrocytů dle některých prací (25, 113) může sloužit jako marker efektivní léčby azathioprinem. V našem souboru byl vzestup MCV během léčby vysoce statisticky významný během 24 měsíců sledování ($p=0,000$), nicméně jsme neprokázali, obdobně jako v případě leukocytů, rozdíl ve středním objemu erytrocytů mezi skupinou dětí azathioprinem léčených a neléčených.

**Tab. 11.** Medián leukocytů a lymfocytů v prvních 2 letech po zahájení léčby azathioprinem.

| | zahájení léčby | 2 měsíce | 6 měsíců | 12 měsíců | 24 měsíců |
|---|---|---|---|---|---|
| Leu (.$10^9$/L) | 10,6 | 9,1 | 5,8 | 6,2 | 5,5 |
| Lymfo (.$10^9$/L) | 2,6 | 1,4 | 1,4 | 1,3 | 1,1 |

**Tab. 12.** Leukopenie a lymfopenie při léčbě azathioprinem.

| | zahájení léčby | 2 měsíce | 6 měsíců | 12 měsíců | 24 měsíců |
|---|---|---|---|---|---|
| Leu < $4.10^9$/L | 0 | 1 | 3 | 2 | 2 |
| Leu < $3.10^9$/L | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| Lymfo < $0,8.10^9$/L | 2 | 8 | 6 | 5 | 8 |
| Lymfo < $0,5.10^9$/L | 0 | 2 | 4 | 2 | 1 |

**Tab. 13.** Medián MCV (střední objem erytrocytu) v prvních 2 letech po zahájení léčby azathioprinem.

| | zahájení léčby | 2 měsíce | 6 měsíců | 12 měsíců | 24 měsíců |
|---|---|---|---|---|---|
| MCV (fL) | 74,7 | 83,2 | 86,55 | 86,2 | 85,45 |

**Tab. 14.** Medián ALT a AST (alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza) v prvních 2 letech po zahájení léčby azathioprinem

| | zahájení léčby | 2 měsíce | 6 měsíců | 12 měsíců | 24 měsíců |
|---|---|---|---|---|---|
| ALT (μkat/L) | 0,25 | 0,27 | 0,27 | 0,26 | 0,26 |
| AST (μkat/L) | 0,36 | 0,39 | 0,43 | 0,40 | 0,42 |

### 4.4.5. Analýza průběhu choroby po 1. roce léčby

Průměrná délka sledování pacientů po 52. týdnu byla 35,9 měsíců (1-105) s mediánem 30 měsíců. Průměrná doba do konsekutivního relapsu po 52.týdnu léčby byla 23,8 měsíců s mediánem 21 měsíců (1 – 81 měsíců). Průměrný počet relapsů po 1.roce léčby do konce sledování činil 0,85/pacienta (0 – 7), s mediánem 0.

### 4.4.6. Analýza chirurgického řešení před 19.rokem

Celkem bylo operováno 20 pacientů z celého souboru. Medián sledování pacientů od stanovení diagnózy do operativního řešení byl 32 měsíců (1 – 75 měsíců).

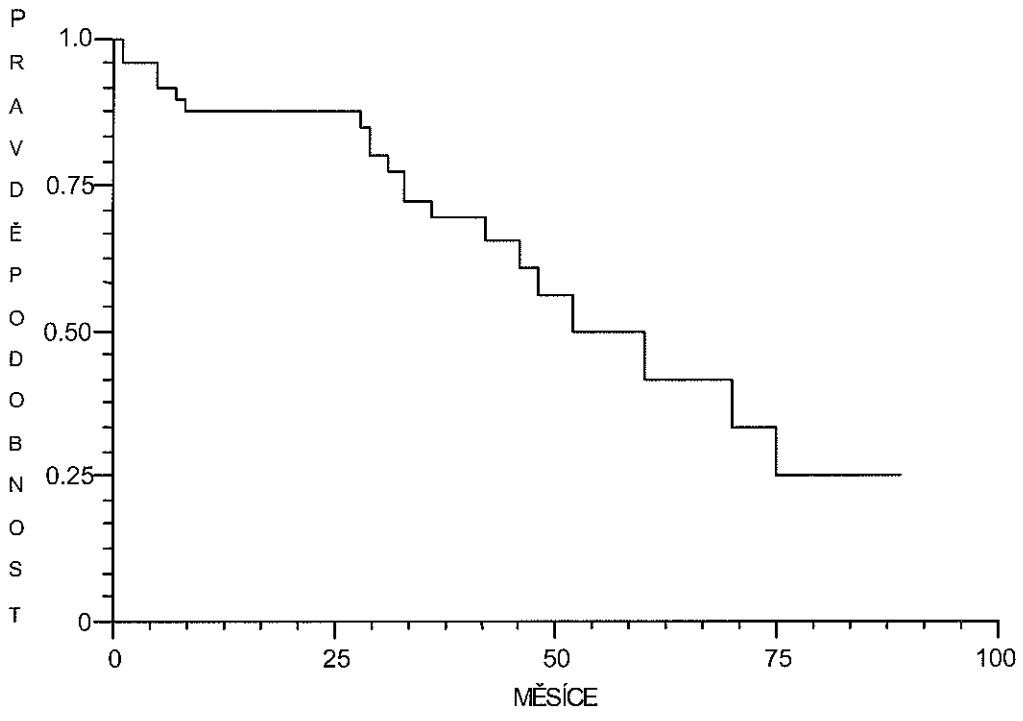
Do 52. týdne operaci podstoupilo 6 (12,5%) pacientů z celého souboru. U 2 dětí byla operace realizována do 12. týdne od stanovení diagnózy – v prvním případě šlo o těžkou stenózu v oblasti ileocékální chlopně, ve druhém případě šlo o závažné postižení terminálního ilea v kombinaci s těžkou růstovou retardací, opožděním puberty a prokázanou osteoporózou.

Po 52. týdnu bylo operováno 14 dalších pacientů (celkem 41,7% souboru). V 90% případů šlo o elektivní resekci terminálního ilea s ileoascendentoanastomózou v jedné době. Zbývající 2 případy zahrnovaly chirurgické ošetření perianální píštěle a resekci ileocéka po perforaci při tupém úrazu břicha. Stomická derivace trávicího traktu byla nutná u 1 pacientky po subtotální resekci tračníku. Ve všech případech měla chirurgická resekce GIT pozitivní terapeutický vliv.

16 pacientů (80%) bylo současně s operací léčeno azathioprinem, u 1 pacienta byla léčba zahájena po 6 měsících od operace. Doba od zahájení léčby azathioprinem do operace kolísala u 15 pacientů v rozmezí (1 – 60 měsíců, medián 30). Zbývající 3 pacienti nebyli azathioprinem léčeni. Endoskopicky verifikovaná recidiva onemocnění byla potvrzena u 5 pacientů (25%), reoperace pro recidivu onemocnění nebyla realizována ani jednou, v 1 případě byl pacient reoperován pro mechanický ileus na základě adhezí po předchozí laparotomii. Ke klinické nebo endoskopické recidivě onemocnění došlo u 6 pacientů – u 3 ze 4 pacientů bez léčby azathioprinem (75%) a u 3 ze 16 pacientů azathioprinem léčených (18,8%). Průměrná doba sledování po operaci byla 25,1 měsíců (1 – 65) s mediánem 22,5 měsíce. Kumulativní incidence chirurgického řešení od stanovení diagnózy (graf 9) dosáhla po 2 letech 12,5%, po 3 letech 15% a po 5 letech 50%.

Léčba infliximabem byla použita v průběhu sledování u 4 pacientů (8,3%): 2x pro fistulující formu choroby, 2x pro selhání konzervativní léčby. Kromě prvních 2 případů (fistulující forma) byla definitivním řešením zmíněných pacientů chirurgická resekce.

**Graf 9.** Kaplan-Meierův graf kumulativní incidence chirurgického řešení



### 4.5. Závěry

Kumulativní dávka aplikovaných kortikosteroidů v prvním roce léčby Crohnovy nemoci na dětské klinice FN a LF UK v Hradci Králové nedosáhla hodnot negativním způsobem ovlivňujícím růstovou rychlost. Kortikosteroidy jsou vysoce efektivním nástrojem pro zvládnutí relapsu onemocnění, nicméně u ne nevýznamné části pacientů byla léčba ponechána déle než bývá doporučováno. Léčba azathioprinem je nedílnou vysoce efektivní součástí léčby nespecifických střevních zánětů u dětí. Aplikace azathioprinu přispívá ke snížené expozici kortikosteroidům a vyšší pravděpodobnosti udržení remise. Procentuální zastoupení relapsů onemocnění je velmi nízké. 40% pacientů s Crohnovou nemocí je operováno před 18.rokem života, kumulativní incidence chirurgického řešení mezi třetím a pátým rokem sledování vzroste více než dvojnásobně. Intestinální resekce není spjata se závažnými per a pooperačními komplikacemi a přispívá k udržení dlouhodobé remise.

## C. DISKUSE

Práce představuje čistě pediatrickou studii zaměřenou na léčbu kortikosteroidy a následný průběh onemocnění. Ve všech sledovaných případech šlo o děti s nepochybnou diagnózou Crohnovy nemoci splňující kritéria jak ČKSGE, tak tzv. Portská kritéria. Jediným rozdílem mezi zmiňovanými kritérii je doporučení provést horní endoskopii (esofagogastroduodenoskopii) v základním algoritmu vyšetřování dítěte s podezřením na nespecifický střevní zánět. Význam tohoto požadavku s postupujícím poznáním narůstá (1, 13, 76) a naše pracoviště akceptovalo Portská kritéria (65, 123).

Rozsah onemocnění byl hodnocen jako endoskopicky nebo radiologicky definované postižení příslušné části trávicího traktu. Výsledky potvrzují závažné nálezy, obdobně jako PCDAI při stanovení diagnózy. Izolované postižení terminálního ilea měla jen pětina dětí ze sledovaného souboru a 55,1% souboru mělo postižení ileokolické. Nález pankolitidy definované jako postižení 3 a více segmentů tlustého střeva byl zaznamenán u 40,8% pacientů. Nálezy potvrzují do určité míry výsledky studie realizované na britských ostrovech (106). Citovaná práce nebyla cílená na rozsah onemocnění a pacienti nebyli diagnostikovaní jednotnými kritérii. To je zřejmě důvod pro nezvykle vysoké zastoupení aktivní nemoci v horních částech GIT i vysoké postižení tlustého střeva. Metodický rozdíl obou studií spočívá v definici lokalizace aktivní nemoci, které bylo v naší studii endoskopicky nebo radiologicky jasně definováno, zatímco v citované práci bylo možné do skupiny aktivní nemoci zařadit histologické nálezy aktivního zánětu, byť makroskopicky neznatelné. Recentní studie (116) s designem podobným předkládané práci nachází vyšší výskyt izolovaného postižení ilea (38%), což je nález spíše překvapivý. Rozdíl mezi manifestací nespecifického střevního zánětu u dětí a dospělých spočívá v tendenci k agresivnímu průběhu, extenzivnímu postižení trávicí trubice a k frekventní alteraci růstu u postižených dětí s převahou ileokolického postižení (12, 106). Vyrovnané postižení ilea a ileokolické, lze zřejmě vysvětlit analýzou malého souboru – celkem 26 dětí s Crohnovou nemocí. Autoři detailnější popis lokalizace onemocnění neuvádí. Ileokolické postižení v našem sledování převažovalo (55,1%) a bylo téměř 2,5 násobně častější než izolované postižení terminálního ilea. Naproti tomu izolované postižení tlustého střeva bylo nízké – 5 pacientů (10%). Tung et al. uvádí izolované postižení tlustého střeva v 23% případů, Punati et al. v 28%, Jaspers et al. dokonce ve 43% (67, 100, 116). Důvodem pro nízký výskyt izolovaného postižení kolon v předkládané práci je velmi pravděpodobně precizně provedená diagnostika včetně dokumentované intubace terminálního ilea a realizace zobrazovacího vyšetření (enteroklýzy event. MR enterografie) jako podmínky pro stanovení diagnózy. Vysoké procento úspěšných ileoskopií (123) je zřejmě dosaženo rovněž díky možnosti provádění endoskopií u dětí v celkové anestézii. Význam zobrazovacího vyšetření GIT a horní endoskopie při stanovení diagnózy Crohnovy nemoci podtrhuje skutečnost, že u 26,5% pacientů bylo zjištěno postižení GIT orálně nad terminálním ileem. Endoskopický nález suspektní z diagnózy Crohnovy nemoci při esofagogastroduodenoskopii byl zaznamenán u 28% endoskopovaných dětí, nicméně v žádném z vyšetřovaných bioptických vzorků se nedodařilo zachytit epiteloidní granulomy. Frekvence nálezu epiteloidních granulomů při esofagogastroduodenoskopii je dle recentní literatury vzácně vyrovnaná a pohybuje se mezi 24-28% (1, 13, 76). Výskyt anální formy onemocnění v našem sledování je plně srovnatelný (16 a 15%) s nálezy nizozemských autorů (67).

Indukce remise systémovou léčbou kortikosteroidy je hlavním nástrojem navození remise u pacientů se středně těžkou až těžkou formou nemoci (37, 12). V předkládaném souboru byla remise indukována systémovými kortikosteroidy v 73% případů, což je výsledek vyšší v porovnání s publikovanými výsledky z dalších evropských států – 50% resp. 57% (104, 67). Rozdíl uvedeného přístupu je jistě možné spatřovat v začlenění definované enterální výživy do algoritmu indukce remise CN u dětí. Zatímco ve Velké Británii a Nizozemí je aplikace výlučné enterální výživy terapeutickým nástrojem při indukci remise aplikovaným 19 – 47% pacientů s nově diagnostikovanou Crohnovou nemocí (104, 67) s vynikajícími výsledky (22, 57), v našem souboru byla enterální výživa použita výhradně v kombinaci s další léčbou ve snaze o co nejrychlejší možné navození remise a současně zlepšení nutričního stavu pacientů. Tento postup je překvapivě bližší strategii známé z USA (80) a odráží snahu spíše o „top-down" přístup – tedy co nejrychlejší zmírnění projevů onemocnění a zlepšení kvality života pacientů s následným snížením a vysazením kortikosteroidů, a ponecháním udržovací léčby azathioprinem (50, 85). Důkazem o uvedeném přístupu je vysoká frekvence současně aplikovaného azathioprinu (58% případů CN). Markowitz et al. v metodicky dobře provedené a dostatečně velké studii prokázali, že tento postup vede k nižší expozici kortikosteroidů a nižší frekvenci kortikosteroid-dependence (86). Na druhé straně je vhodné zmínit skutečnost, že v citované studii 50% sledovaných pacientů dosáhlo ve 12.měsíci remise, přestože neměli imunomodulační léčbu 6-merkaptopurinem. Byť jsou výsledky citované práce obecně známé, přístup k pacientům s CN není zdaleka tak jednoznačný. V nedávné době publikovaných retrospektivních multicentrických studiích byl azathioprin indikován v průběhu prvního měsíce sledování jen u 2 – 5% pacientů s nově diagnostikovanou Crohnovou nemocí (67, 104). Opět rozdílný přístup je znám z USA, kde imunomodulační léky během poslední dekády získaly velmi silnou pozici v léčbě NSZ (85) a kde již diagnózu CN považuje 20% amerických gastroenterologů za indikaci k zahájení léčby imunomodulačními léky. Podávání azathioprinu/6-merkaptopurinu je v západní Evropě, USA a Israeli zvažováno při nutnosti steroidní léčby u aktivní nemoci ve 45% případů, v případě relabující nemoci se k tomuto postupu přiklání 93% gastroenterologů (80). Vzhledem k tomu, že je azathioprin používán v léčbě nespecifických střevních zánětů více než 30 let a je povšechně považován za účinnou a bezpečnou léčbu (2, 35, 39), domníváme se, že je zcela legitimním krokem časné zahájení léčby u středně těžké a těžké Crohnovy nemoci. Pacientova adherence k léčbě totiž může být významně narušena prodlevou v nástupu účinku v důsledku specifické farmakokinetiky azathioprinu a 6-merkaptopurinu. Tudíž se jeví optimální současně s indukcí remise kortikosteroidy event. enterální výživou zahájit podávání azathioprinu a do doby plného nástupu účinku (2 – 3 měsíce) snižovat a event. vysadit systémovou léčbu kortikosteroidy.

V předkládaném souboru byla léčba azathioprinem zahájena u 58% pacientů při stanovení diagnózy a u 69% pacientů v průběhu prvního roku léčby. Uvedený postup v mírně modifikované formě, vedl v prospektivně vedené recentní multicentrické studii ke snížené expozici kortikosteroidů a snížené frekvenci hospitalizací. Autoři zaznamenali aplikaci azathioprinu/6-merkaptopurinu v souboru dětí se středně těžkou a těžkou Crohnovou nemocí (PCDAI $\geq$ 30 bodů) během prvních 3, 12 a 24 měsíců v 61, 80 a 86% případů (100). Data získaná naší práce jsou plně srovnatelná – 65, 69 a 86%. Přestože je skupina „kontrolních" – tedy azathioprinem neléčených pacientů velmi malá, zaznamenali

jsme značné rozdíly. Ve skupině léčených kortikosteroidy a azathioprinem od stanovení diagnózy nebo velmi časně (do 3 měsíců) byl medián 66,3 mg/kg/rok prednison ekvivalentu, ve skupině léčených kortikosteroidy bez azathioprinu byl medián 102,8 mg/kg/rok prednison ekvivalentu. Tento výsledek nebyl statisticky významný, především v důsledku značné variability a malé velikosti souboru, efekt kortikosteroidy šetřícího efektu azathioprinu je patrný (graf 8) a naznačuje důvod časné aplikace imunomodulačních léků u středně těžkých a těžkých forem Crohnovy nemoci u dětí.

Nežádoucí účinky léčby azathioprinem jsou dle současných znalostí farmakokinetiky a farmakodynamiky obvykle děleny na dávkově závislé (myelotixicita, hepatotoxicita) a idiosynkratické – dávkově nezávislé (alergické kožní reakce, nauzea, únavnost, nechutenství, pankreatitida). V obou případech se může jednat o reakce, které vedou k ukončení léčby až u 25% pacientů. Fraser et al. dokumentovali výskyt leukopenie u 4,6% pacientů, sepsi v důsledku imunosupresivní léčby zaznamenali u 1,5% pacientů. Stejní autoři analyzovali i nežádoucí účinky, které vedly k ukončení léčby u 152 pacientů,. Ve 45% byla důvodem nausea, v 11% abnormální výsledky jaterních testů a ve 14% případů byla léčba ukončena pro leukopenii (39). V porovnání s touto prací byla frekvence nežádoucích účinků v předkládaném souboru nízká. U tří pacientů (7,1%) byla zaznamenána mírná leukopenie během 2 let sledování. Frekvence těžké lymfopenie byla pozorována u 7 pacientů (16,7%), nicméně jsme neprokázali vztah mezi pozorovanou lymfopenií a leukopenií. Pancytopenie nebyla zaznamenána u žádného z pacientů, stejně tak jsme nezaznamenali rozvoj sepse. Léčba azathioprinem byla ukončena pro nežádoucí účinky léku pouze dvakrát – v obou případech pro středně těžkou leukopenii při nízké dávce azathioprinu – 1,2 mg/kg/den. Nezaznamenali jsme závažnější poruchu jaterních funkcí.

Rovněž aplikace systémových kortikosteroidů je provázená obavami z adverzních účinků léčby, především z rozvoje Cushingova syndromu a zpomalení růstu. Hodnocení růstu a růstové rychlosti je jednou z nejsnáze sledovatelných nicméně velmi obtížně interpretovatelných oblastí pediatrie. Přestože jsou kortikosteroidy používány v klinické praxi přes 50 let, exaktní informace o ovlivnění růstu dětí s nespecifickými střevními záněty nemáme. Drtivá většina známých dat o růstu nebo růstové rychlosti pacientů byla získána z retrospektivních sledování, přičemž porucha růstu byla zaznamenána u 19-88% pacientů (46, 60, 68, 91, 106, 107). Markowitz et al. zjistili vztah mezi kumulativní dávkou systémových kortikosteroidů, závažností onemocnění a zpomalením růstu u dětí s CN (87). Souvislost mezi aplikací kortikosteroidů a růstovým selháním u dětí s nespecifickými střevními záněty byla však záhy zpochybněna (46, 91) se závěrem, že porucha růstu souvisí spíše se závažností a aktivitou vlastního onemocnění než s aplikovanou léčbou a v průběhu sledování pacientů se růstový deficit při zahájené léčbě přinejmenším částečně upravuje (46, 60). Další studie nepotvrdily spojitost s postižením určité části GIT nebo výskytem NOD2 genotypu (121) a byl zpochybněn i vztah mezi kumulativní dávkou kortikosteroidů a zpomalením růstu u Crohnovy nemoci (86). Ovlivnění růstové rychlosti při aplikaci vysokých dlouhodobých dávek kortikosteroidů je však jednoznačné. Leonard et al. prokázali u pacientů s relabujícím kortikosteroid-senzitivním nefrotickým syndromem významné negativní ovlivnění Z-skóre pro výšku (78). Střední délka expozice kortikosteroidům činila 53,5 měsíce se střední celkovou kumulativní dávkou prednison ekvivalentu 907 mg/kg (p=0,03) a ještě

významnějším výsledkem po přepočtu na denní dávku 0,65 mg/kg/den prednison ekvivalentu (p = 0,003).

Cílem disertační práce nebyla analýza růstové rychlosti pacientů léčených kortikosteroidy, nebyly detailně analyzovány antropometrické údaje rodinných příslušníků, růstová predikce jednotlivých pacientů atd. Hlavním záměrem bylo zjištění, za jak dlouho po stanovení diagnózy snižujeme dávku kortikosteroidů na dávku, která dle dostupných údajů nemá negativní efekt na růstovou rychlost, tudíž ji lze považovat za relativně bezpečnou i pro dětský organismus. V 8.týdnu po zahájení léčby byl medián dávky kortikosteroidů 0,34 mg prednison ekvivalentu/kg – tedy na horní hranici rozmezí nízké dávky kortikosteroidů (89). Ve 12.týdnu pak 0,21 mg prednison ekvivalentu/kg, což přibližně odpovídá dávce (0,18 ± 0,07 mg), která při dlouhodobém podávání (14,4± 7,2 měsíce) neměla negativní vliv na růstovou rychlost převážné většiny pacientů (93). Aplikovaná dávka prednisonu v prvním roce léčby dětí s Crohnovou nemocí přesáhla o 53% hypoteticky kalkulovanou průměrnou kumulativní „fyziologickou" substituční dávku perorálně podávaného prednisonu 36,5 – 54,8 mg/kg/rok (19, 90). Medián použité dávky – 0,19 mg/kg/den – pak relativně dobře koresponduje s prací citovaných autorů, zvláště, pokud se jedná o léčbu v prvním roce sledování, tedy indukci a udržení remise (93).

Literární odkazy popisující léčbu kortikosteroidy v prvním roce po stanovení diagnózy jsou velmi sporé, pouze jedna retrospektivní práce analyzuje dětský soubor pacientů (nicméně částečně s podobným designem). Tung et al. hodnotili úspěšnost indukční léčby kortikosteroidy na souboru 26 dětí s Crohnovou nemocí a stav pacientů po 1 roce léčby (116). Definice jednotlivých cílů jsou uvedeny v tabulce 15. Po 30-ti dnech léčby prednisonem dosáhlo 62% pacientů klinické remise, 27% pacientů částečné klinické remise, 1 pacient (4%) neodpověděl na zahájenou léčbu a 2 pacienti (8%) byli do 1 měsíce od stanovení diagnózy operováni. V našem souboru byla remise hodnocena ve 12.týdnu léčby a byla dosažena u 34 pacientů (85%), pozitivní terapeutická odpověď byla zaznamenána u 38 pacientů (95%). Rovněž 2 pacienti (4% souboru) byli operováni během prvního měsíce po stanovení diagnózy. V práci amerických autorů byla dlouhodobá remise po 1 roce sledování dosažena ve 42% případů, kortikodependence byla zaznamenána v 31% případů a chirurgická resekce GIT byla provedena u 27% pacientů. V našem souboru bylo operováno 12,5% pacientů v prvním roce léčby, po 12 měsících léčby bylo 85% pacientů v remisi a 59% pacientů nebylo léčeno kortikosteroidy. Z 20 (41%) pacientů léčených kortikosteroidy v 52.týdnu léčby, byl používán prednison nebo methylprednisolon v 16 případech a 4 pacienti byli léčeni topickým steroidem budesonidem. Kortikodependence byla stanovena u 6 pacientů (12,2%) souboru, ve shodném zastoupení skupiny prednisonu (3 pacienti) i budesonidu (3 pacienti). U pacientů, kteří nesplňovali kritéria kortikodependence (n = 14) a byli léčeni v 52. týdnu systémovými kortikosteroidy jsme zjistili, že všech pacientů v prednisonové skupině (n=13) nebyly SKS během prvního roku sledování ukončeny, byť 11 z nich dostávalo dávku prednison ekvivalentu ≤ 0,09 mg/kg/den. Důvodem pro neukončení léčby systémovými kortikosteroidy byly např. mírná perzistující aktivita, subjektivní stesky pacienta, nebo obava pacienta či rodiny z recidivy při úplném vysazení SKS. Jsme si vědomi, že tento fakt do určité míry zkresluje frekvenci kortikodependence ve smyslu falešné negativity. Práce Tung et al. byla cílena na identifikaci kortikodependence a kortikorezistence. Ačkoliv autoři neuvádí detailní

rozbor léčby systémovými kortikosteroidy (trvání, dávky, atd.) a metodika obou prací je částečně odlišná, jedná se o jedinou srovnatelnou studii v pediatrické literatuře. Výsledky obou studií jsou přehledně uvedeny v tabulce 16. Statisticky významnou převahu konkomitantní medikace azathioprinem v naší práci je nutné považovat za hlavní důvod vysvětlující statisticky významně vyšší frekvenci dosažení remise onemocnění po 1 roce od zahájení léčby (90% vs. 42%), nižší frekvenci kortikodependence (31 vs. 12%) a nižší frekvenci chirurgických resekcí GIT (12 vs. 27%) v průběhu prvního roku léčby dětí s CN.

**Tab. 15.** Hodnocení cílů v práci Tung J., et al. A population-based study of the frequency of corticosteroid resistance and dependence in pediatric patients with Crohn´s disease and ulcerative colitis (Inflamm Bowel Dis 2006; 12: 1093-1100).

| | |
|---|---|
| kompletní remise | úplné vymizení klinických symptomů během 30 dní, ≤ 2 stolice/den, bez bolesti, horečky nebo úbytku váhy |
| částečná klinická remise | vymizení klinických symptomů během 30 dní, ≤ 4 stolice/den, méně bolesti, bez horečky a bez úbytku váhy |
| chybění odpovědi na léčbu | žádné zlepšení během 30 dní |
| post - chirurgická remise | úplné vymizení klinických symptomů dosažené chirurgickou resekcí |
| dlouhodobá remise | udržení dosažené kompletní remise anebo částečné remise po dokončení léčby prednisonem |
| kortikodependence | relaps v průběhu 30-ti dní po ukončení léčby prednisonem nebo relaps po pokusu o snížení dávky prednisonu |
| post - chirurgická remise | úplné vymizení klinických symptomů dosažené chirurgickou resekcí |

**Tab. 16.** Porovnání výsledků s prací Tung J., et al. A population-based study of the frequency of corticosteroid resistance and dependence in pediatric patients with Crohn´s disease and ulcerative colitis (Inflamm Bowel Dis 2006; 12: 1093-1100)

| | **Tung et al. (n = 26)** | **Malý et al. (n = 40)** | **Fisherův přesný test** |
|---|---|---|---|
| remise po 30 dnech léčby | 16 (62%) | nehodnoceno | |
| pozitivní odpověď po 30 dnech léčby | 23 (89%) | nehodnoceno | |
| resekce v 1. měsíci léčby | 2 (8%) | 2 (5%) | |
| remise po 12 týdnech léčby | nehodnoceno | 34 (85%) | |
| pozitivní odpověď po 12 týdnech léčby | nehodnoceno | 38 (95%) | |
| | | | |
| remise po 1 roce léčby | 11 (42%) | 36 (90%) | p = 0,000 |
| kortikodependence po 1 roku léčby | 8 (31%) | 6 (12%) | p = 0,139 |
| resekce v 1.roce léčby | 7 (27%) | 6 (12%) | p = 0,343 |
| konkomitantní imunosuprese (6-MP/AZA) | 6 (23%) | 25 (63%) | p = 0,002 |

Aplikace biologické léčby byla v našem souboru nízká – při stanovení diagnózy nebyl infliximab (anti TNF α chimerická protilátka) aplikován ani jednou. Poprvé byl infliximab použitý na našem pracovišti v roce 2002 a i v následujích letech jsme postupovali ve snaze používat infliximab jako „rescue" medikaci při selhání konzervativně dostupné léčby s maximálním důrazem na dosažení

pacientovy compliance (56). Opakovaně publikované údaje o velmi lákavém až zásadním ovlivnění následného průběhu nemoci časnou léčbou infliximabem – tedy k dokonalosti dovedená top-down strategie – částečně naráží na několik faktů. Byť se jeví infliximab účinnější u pacientů s krátkou anamnézou Crohnovy nemoci (72, 82), jeho podání dětem je spojeno s nižším výskytem nežádoucích reakcí (71) a vede k nižší expozici kortikosteroidům (108), má prokázaný hojivý efekt na sliznici střeva (11) a vede ke zlepšení růstu (11, 119, 120), byl v recentní studii nizozemských autorů byl popsán rozvoj závislosti na infliximabu téměř u 60% případů (24). Centocor Inc., výrobce infliximabu, upozornil na záchyt zvýšeného výskytu hepatosplenického T-buněčného lymfomu u pacientů léčených infliximabem a imunomodulačními léky (84, 102, 112). Rovněž z těchto důvodů považujeme za vhodné indikovat léčbu infliximabem při neúspěchu konzervativní léčby. Výjimkou z uvedeného je prokázaný benefit infliximabu u fistulující formy CN (23, 61, 99, 103, 110).

Frekvence operačního řešení Crohnovy nemoci u dětí kolísá a v závislosti na věku pacientů a pracovišti se pohybuje v rozmezí 20-70% případů (5, 7, 10, 29, 95, 111). Nutnost operačního řešení onemocnění pravděpodobně stoupá s mladším věkem při stanovení diagnózy, byť byla popsána i obrácená asociace (48). Pravděpodobnost rekurence po provedené resekci je nejvyšší v případě rozsáhlého postižení různých etáží GIT a postižení tlustého střeva, naopak frekvence nejnižší postchirurgické rekurence je při izolovaném ileálním nebo ileocékálním postižení (5, 21, 47). V předkládaném souboru bylo operováno 20 (41,7%) pacientů při průměrné délce sledování 48 měsíců, což je v souladu s citovanými zdroji. Benefit časné operace pro pacienty se závažnými nálezy spočívá v pozitivním ovlivnění růstu a navození dlouhodobější remise, než je možné docílit u pacientů indikovaných k operačnímu řešení pro selhání konzervativní terapie (7, 47). V průběhu prvních 12 měsíců od stanovení diagnózy bylo operováno 6 dětí (1x chirurgické ošetření píštěle) a ve 2 případech byla operace realizována do 2 měsíců. Medián sledování pacientů do provedení operačního řešení byl 32 měsíců. Všichni pacienti kromě jednoho (perforace při tupém úraze břicha) byli operováni elektivně, u 90% z nich byla provedena ileoascendentoanastomóza v jedné době s resekcí ileocéka. Provedení stomických derivací GIT je dle literárních odkazů realizováno v 6 – 30% případů dětí operovaných pro Crohnovu nemoc (5, 21, 29, 47, 95). V našem souboru byla ileostomie vyvedena v 1 případě (5%) a společně s prací Griffiths et al. tak představuje nejnižší údaj v dostupné literatuře (47). Takto pozitivní výsledek je umožněn elektivním přístupem s preoperativní přípravou, správnou indikací a vynikající spoluprácí s dětskými chirurgy. Frekvence reoperací dle literárních údajů výrazně kolísá mezi 32 - 61% (10, 29, 95). Pro klinickou nebo endoskopickou recidivu nebyl v našem souboru reoperován žádný pacient. Důvodem je zřejmě opět vysoká frekvence současně podávaného azathioprinu (80%). Ve skupině dětí, kteří po operaci nebyli léčeni azathioprinem byla frekvence klinické nebo endoskopické recidivy výrazně vyšší (75 vs. 19%). Teoreticky možným dalším důvodem vysvětlujícím možnost nízkého výskytu recidivy by mohlo být relativně kratší období sledování u některých pacientů po operaci – průměrná doba follow-up po operaci byla 25,1 měsíců (1 – 65) s mediánem 22,5 měsíce.

Patel et al. publikovali výsledky kumulativní incidence chirurgického řešení Crohnovy nemoci u dětí, přičemž zaznamenali nutnost operace ve 29% po 3 letech sledování a ve 47% po 5 letech sledování (95). Gupta et al. v recentní multicentrické práci uvádí kumulativní incidenci jen 17% po 5 letech sledování a významně protektivní vliv infliximabu na nutnost operačního řešení Crohnovy

nemoci (48). Bohužel, studie neuvádí frekvenci použití infliximabu. Kumulativní incidence operačního řešení v předkládaném souboru dosáhla po 2 letech 12,5%, po 3 letech 15% a po 5 letech 50%. Výrazný nárůst incidence mezi třetím a pátým rokem sledování lze vysvětlit příklonem k chirurgickému řešení po dokončení růstu mezi 17.-18. rokem života u pacientů bez významného růstového opoždění, negativním vnímáním relapsů nemoci (a léčby kortikosteroidy) adolescenty s žádostí o „definitivní" řešení jejich problému, relativně rezervovaným postojem našeho pracoviště k biologické léčbě nespecifických střevních zánětů a do značné míry také velmi dobrými zkušenostmi s chirurgickými výsledky u našich pacientů.

## D. ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ PRO PRAXI

### 1. Terapeutický efekt 6-thioguaninu na myším modelu experimentální kolitidy

a. 6-thioguanin je efektivní v léčbě experimentální kolitidy vyvolané dextransulfátem na myším modelu.

b. 6-thioguanin v dávce 40 μg je v léčbě experimentální kolitidy efektivnější ve všech sledovaných parametrech při porovnání s placebem i s azathioprinem v dávce 30 μg.

c. Při impregnaci stříbřením dle Gomoriho nebyla prokázána mikronodulární přestavba jater ani žádné známky venookluzivní nemoci jater, tedy zvažované toxické účinky 6-thioguaninu.

### 2. Farmakokinetika azathioprinu po zahájení léčby nespecifických střevních zánětů i dětí

a. Kumulace nukleotidů 6-thioguaninu a dosažení rovnovážných hladin podléhá velké interindividuální variabilitě.

b. Medián času do dosažení rovnovážné koncentrace nukleotidů 6-thioguaninu byl 29,7 dní (8,4 – 156), 75. percentil pak představoval 75,4 dne.

c. Výsledky podporují klinicky známou zkušenost, že nástup plného účinku azathioprinu lze očekávat během 2-3 měsíců od zahájení léčby.

### 3. Terapie Crohnovy nemoci u dětí se zaměřením na léčbu azathioprinem a kortikosteroidy

a. Systémová léčba kortikosteroidy byla použita u 73% pacientů se středně těžkou až těžkou formou nemoci v rámci iniciální léčby.

b. Remise ve 12.týdnu léčby bylo dosaženo u 85% pacientů, pozitivní terapeutická odpověď byla zaznamenána u 95% pacientů.

c. V 8.týdnu po zahájení léčby byl medián dávky kortikosteroidů 0,34 mg prednison ekvivalentu/kg. Ve 12.týdnu 0,21 mg prednison ekvivalentu/kg, což přibližně odpovídá dávce (0,18 ± 0,07 mg), která dle literárních údajů při dlouhodobém podávání (14,4 ± 7,2 měsíce) neměla negativní vliv na růstovou rychlost převážné většiny pacientů.

d. Průměrná aplikovaná dávka prednisonu v prvním roce léčby přesáhla o 53% hypoteticky kalkulovanou průměrnou kumulativní „fyziologickou" substituční dávku perorálně podávaného prednisonu.

e. Kortikodependence byla stanovena u 12,2% dětí. 14 pacientů nesplňovalo kritéria kortikodependence a přesto byli léčeni v 52. týdnu systémovými kortikosteroidy, byť 11 z nich dostávalo dávku prednison ekvivalentu ≤ 0,09 mg/kg/den. Důvodem pro neukončení léčby systémovými kortikosteroidy byly např. mírná perzistující aktivita, subjektivní stesky pacienta, nebo obava pacienta či rodiny z recidivy při úplném vysazení systémových kortikosteroidů.

f. Léčba azathioprinem byla zahájena u 58% pacientů při stanovení diagnózy a u 69% pacientů v průběhu prvního roku léčby.

g. Ve skupině dětí léčených kortikosteroidy a azathioprinem velmi časně (do 3 měsíců) byl medián 66,3 mg/kg/rok prednison ekvivalentu, ve skupině léčených kortikosteroidy bez azathioprinu byl medián 102,8 mg/kg/rok prednison ekvivalentu. Přestože tento výsledek nebyl statisticky významný, efekt kortikosteroidy šetřícího efektu azathioprinu je patrný a naznačuje důvod časné aplikace imunomodulačních léků u středně těžkých a těžkých forem Crohnovy nemoci u dětí.
h. Frekvence nežádoucích účinků azathioprinu byla nízká. U 7,1% pacientů byla zaznamenána mírná leukopenie, těžká lymfopenie byla pozorována u 16,7% pacientů. Léčba azathioprinem byla ukončena pro nežádoucí účinky léku pouze dvakrát – v obou případech pro středně těžkou leukopenii při nízké dávce azathioprinu – 1,2 mg/kg/den.
i. 40% pacientů s Crohnovou nemocí bylo operováno před 18.rokem života, kumulativní incidence chirurgického řešení mezi třetím a pátým rokem sledování vzroste více než dvojnásobně. Intestinální resekce není spjata se závažnými per a pooperačními komplikacemi a přispívá k udržení dlouhodobé remise.

## E. LITERATURA


1. Abdullah BA, Gupta SK, Croffie JM, et al. The role of oesophagogastroduodenoscopy in the initial evaluation of childhood inflammatory bowel disease: a 7-year study. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2002; 35: 636-640.
2. Al Hadithy AFY, de Boer NKH, Derijks LJJ, et al. Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. Dig Liver Dis 2005; 37: 282-297.
3. Armitage E, Drummond H, Ghosh S, Ferguson A. Incidence of juvenile-onset Crohn's disease in Scotland. Lancet 1999; 353:1496-1497.
4. Armitage E, Drummond HE, Wilson DC, Ghosh S. Increasing incidence of both juvenile-onset Crohn's disease and ulcerative colitis in Scotland. Eur J Gastroenterol Hepatol 2001; 13:1439-1447.
5. Aronson DC, van Coevorden F, Heijmans HS, Gooszen HG. Surgical treatment of Crohn disease in children and adolescents: how conservative can the paediatrician be? Eur J Pediatr 1993; 152: 727-729.
6. Askling J, Grahnquist L, Ekbom A, Finkel Y. Incidence of paediatric Crohn's disease in Stockholm, Sweden. Lancet 1999; 354:1179.
7. Baldassano RN, Han PD, Jeshion WC, et al. Pediatric Crohn´s disease: risk factors for postoperative recurrence. Am J Gastroenterol 2001; 96: 2169-2176.
8. Barton JR, Gillon S, Ferguson A. Incidence of inflammatory bowel disease in Scottish children between 1968 and 1983; marginal fall in ulcerative colitis, three-fold rise in Crohn's disease. Gut 1989; 30:618-622.
9. Bentsen BS, Moum B, Ekbom A. Incidence of inflammatory bowel disease in children in southeastern Norway: a prospective population-based study 1990-94. Scand J Gastroenterol 2002; 37:540-545.
10. Besnard M, Jaby O, Mougenot JF, et al. Postoperative outcome of Crohn´s diasease in 30 children. Gut 1998; 43: 634-638.
11. Borrelli O, Bascietto C, Viola F, et al. Infliximab heals intestinal inflammatory lesions and restores growth in children with Crohn´s disease. Dig Liver Dis 2004; 36: 342-347.
12. Caprilli R, Gassull MA, Escher JC, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn´s disease: special situations. Gut 2006; 55: i36-i58.
13. Castellaneta SP, Afzal NA, Greenberg M, et al. Diagnostic role of upper gastrointestinal endoscopy in pediatric inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2004; 39: 257-261.
14. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. Lab Invest 1993; 69: 238–249.
15. Cosgrove M, Al-Atia RF, Jenkins HR. The epidemiology of paediatric inflammatory bowel disease. Arch Dis Child 1996; 74:460-461.

16. Crohn BB, Ginzberg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis, a pathological and clinical entity. JAMA 1932; 99: 1323-1329.
17. Cuffari C, Hunt S, Bayless T. Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimise azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. Gut 2001; 48: 642-646.
18. Cuffari C, Theoret Y, Latour S, Seidman G. 6-mercaptopurine metabolism in Crohn´s disease: correlation with efficacy and toxicity. Gut 1996; 39: 401-406.
19. Cuttler L, Rosenfield RL. Somatic growth and maturation. In: DeGeroot LJ, Jameson JL, DeKretser (eds). Endocrinology, 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005: 697-732.
20. Dalrymple JM, Stamp LK, O´Donnell JL, et al. Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2008; 58: 3299-3308.
21. Davies G, Evans CM, Shand WS, Walker-Smith JA. Surgery for Crohn´s disease in childhood: influence of site of disease and operative procedure on outcome. Br J Surg 1990; 77: 891-894.
22. Day AS, Whitten KE, Lemberg DA, et al. Exclusive enteral feeding as a primary therapy for Crohn´s disease in Australian children and adolescents: a feasible and effective approach. J Gastroenterol Hepatol 2006; 21: 1609-1614.
23. de Ridder L, Benninga MA, Taminiau JAJM, et al. Infliximab use in children and adolescents with inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2007; 45: 3-14.
24. de Ridder L, Rings EHHM, Damen GM, et al. Infliximab dependency in pediatric Crohn´s disease: long-term follow-up of an unselected cohort. Inflamm Bowel Dis 2008; 14: 353-358.
25. Decaux G, Prospert F, Horsmans Y, et al. Relationship between red cell mean corpuscular volume and 6-thioguanine nucleotides in patients treated with azathioprine. J Lab Clin Med 2000; 135: 256-262.
26. Deibert P, Dilger K, Fischer C, et al. High variation of tioguanine absorption in patients with chronic active Crohn´s disease. Aliment Pharmacol Ther 2003; 18: 183-189.
27. Derijks LJ, de Long DJ, Gilissen LP, et al. 6-thioguanine seems promising in azathioprine or 6-mercaptopurine intolerant inflammatory bowel disease patients: a short term safety ssessment. Eur J Gastroenterol Hepatol 2003; 15: 63-67.
28. Ding TL, Benet LZ. Comparative bioavailability and pharmacokinetic study of azathioprine and 6-mercaptopurine in the rhesus monkey. Drug Metab Dispos 1979; 7: 373-377.
29. Dokucu AI, Sarnacki S, Michel JL, et al. Indications and results of surgery in patiens with Crohn´s disease with onset under 10 years of age: a series of 18 patients. Eur J Pediatr Surg 2002; 12: 180-185.
30. Dubinsky MC, Feldman EJ, Abreu MT, et al. Thioguanine: a potential alternate thiopurine for IBD patients allergic to 6-mercaptropurine or azathioprine. Am J Gastroenterol 2003; 98: 1058-1063.
31. Dubinsky MC, Hassard PV, Seidman EG, et al. An open-label pilot study using thioguanine as a therapeutic alternative in Crohn´s disease patients resistant to 6-mercaptopurine therapy. Inflamm Bowel Dis 2001; 7: 181-9.

32. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. Gastoenterology 2000; 118: 705-713.
33. Dubinsky MC, Vasiliauskas EA, Singh H, et al. 6-thioguanine can cause serious liver injury in inflammatory bowel disease patients. Gastroenterology 2003; 125: 298-303.
34. Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, et al. 6-mercaptopurine metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-mercaptopurine resistance in patients with inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2002; 122: 904-915.
35. Dubinsky MC. Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: pharmacology, efficacy and safety. Clin Gastroenterol Hepatol 2004; 2: 731-743.
36. Erb N, Haverland U, Harms DO, et al. High-performance liquid chromatographic assay of metabolites of thioguanine and mercaptopurine in capillary blood. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2003; 796: 87-94.
37. Escher JC, Taminiau JAJM, Nieuwenhuis EE, et al. Treatment of inflammatory bowel disease in childhood: best available evidence. Inflamm Bowel Dis 2003; 9: 34-58.
38. Faubion WA Jr, Loftus EV Jr, Harmsen WS, et al. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. Gastroenterology 2001; 121: 255-260.
39. Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. Gut 2002; 50: 485-489.
40. Ganiere-Monteil C, Medard Y, Lejus C, et al. Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age. Eur J Clin Pharmacol 2004; 60: 89-96.
41. Gearry RB, Barclay ML. Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol Hepatol 2005; 20: 1149-1157.
42. Geller SA, Dubinsky MC, Poordad FF, et al. Early hepatic nodular hyperplasia and submicroscopic fibrosis associated with 6-thioguanine therapy in inflammatory bowel disease. Am J Surg Pathol 2004; 28: 1204-1211.
43. Gilissen LP, Bierau J, Derijks LJJ, et al. The pharmacokinetic effect of discontinuation of mesalazine on mercaptopurine metabolite levels in inflammatory bowel disease patients. Aliment Pharmacol Ther 2005; 22: 605-611.
44. Gilissen LP, Derijks LP, Engels LG, et al. Some cases demonstrating the clinical usefulness of therapeutic drug monitoring in thiopurine-treated inflammatory bowel disease patients. Eur J Gastroenterol Hepatol 2004; 16: 705-710.
45. Goldenberg BA, Rawsthorne P, Bernstein CN. The utility of 6-thioguanine metabolite levels in managing patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2004; 99: 1744-1748.
46. Griffiths AM, Nguyen P, Smith C, et al. Growth and clinical course of children with Crohn's disease. Gut 1993; 34: 939-943.

47. Griffiths AM, Wesson DE, Shandling B, et al. Factors influencing postoperative recurrence of Crohn´s disease in childhood. Gut 1991; 32: 491-495.
48. Gupta N, Cohen SA, Bostrom AG, et al. Risk factors for initial surgery in pediatric patients with Crohn´s disease. Gastroenterology 2006; 130: 1069-1077.
49. Gupta P, Gokhale R, Kirschner BS. 6-mercaptopurine metabolite levels in children with inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001; 33: 450-454.
50. Hanauer SB. Crohn´s disease: step up or top down therapy. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2003; 17: 131-137.
51. Hartmann G, Bidlingmaier C, Siegmund B, et al. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. J Pharmacol Exp Ther 2000; 292: 22–30.
52. Hassan K, Cowan FJ, Jenkins HR. The incidence of childhood inflammatory bowel disease in Wales. Eur J Pediatr 2000; 159:261-263.
53. Herrlinger KR, Deibert P, Schwab M, et al. Remission maintenance by thioguanine in chronic active Crohn´s disease. Aliment Pharmacol Ther 2003; 17: 1459-1464.
54. Herrlinger KR, Kreisel W, Schwab M, et al. 6-thioguanine – efficacy and safety in chronic active Crohn´s disease. Aliment Pharmacol Ther 2003; 17: 503-508.
55. Herrlinger KR, Schwab M, Fellermann K, Stange EF. 6-thioguanine - buried alive? Gastroenterology 2003; 126: 940-941.
56. Heuschkel RB, Beattie RM, Ruemmele FM. A sledgehammer to crack a walnut? J Ped Gastroenterol Nutr 2007; 45: 130-131.
57. Heuschkel RB, Menache CC, Megerian JT, Baird AE. Enteral nutrition and corticosteroids in the treatment of acute Crohn´s disease in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 31: 8-15.
58. Hildebrand H, Brydolf M, Holmquist L, et al. Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in children in south-western Sweden. Acta Paediatr 1994; 83:640-645.
59. Hildebrand H, Finkel Y, Grahnquist L, et al. Changing pattern of paediatric inflammatory bowel disease in northern Stockholm 1990-2001. Gut 2003; 52:1432-1434.
60. Hildebrand H., Karlberg J, Kristiansson B. Longitudinal growth in children and adolescents with inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenetrol Nutr 1994; 18: 165-173.
61. Hyams JS, Crandall W, Kugathasan S, et al. Induction and maintenance infliximab therapy for the treatment of moderate-to-severe Crohn´s disease in children. Gastroenterology 2007; 132: 1167-1170.
62. Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, et al. Development and validation of pediatric Crohn´s disease activity index. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1991; 12: 437-447.
63. Hyams JS, Markowitz J, Otley A, et al. Evaluation of pediatric Crohn disease activity index: a prospective multicenter experience. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 41: 416-421.
64. Hyams JS. Inflammatory Bowel Disease. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF (eds.) Nelson textbook of pediatrics 18th ed. Philadelphia: Saunders; 2007: 1575-1585.

65. IBD working group of the European society of paediatric gastroenterology, hepatology nad nutrition (ESPGHAN). Medical position paper: Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis – The Porto Criteria. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 41: 1-7.
66. Jacqz-Aigrain E, Bessa E, Medard Y, et al. Thiopurine methyltransferase activity in a French population: h.p.l.c. assay conditions and effects of drugs and inhibitors. Br J Clin Pharmacol 1994; 38: 1-8.
67. Jaspers GJ, Verkade HJ, Escher JC, et al. Azathioprine maintains first remission in newly diagnosed pediatric Crohn´s disease. Inflamm Bowel Dis 2006; 12: 831-836.
68. Kanof ME, Lake AM, Bayless TM. Decreased height velocity in children and adolescents before the diagnosis of Crohn´s disease. Gastroenterology 1988; 95: 1523-1527.
69. Kolek A, Janout V, Tichý M, Grepl M. The incidence of inflammatory bowel disease is increasing among children 15 years old and younger in the Czech Republic. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2004; 38:362-363.
70. Krejsek J. Kopecký O. Modulace imunitního systému. In: Krejsek J, Kopecký O. Klinická imunologie. Nucleus HK. 2004; 775-820.
71. Kugathasan S, Levy MB, Saeian K, et al. Infliximab retreatment in adults and children with Crohn´s disease: risk factors for the development of delayed severe systemic reaction. Am J Gastroenterol 2002; 97: 1408-1414.
72. Kugathasan S., Werlin SL, Martinez A, et al. Prolonged duration of response to infliximab in early but not late Crohn´s disease. Am J Gastroenterol 2000; 95: 3189-3194.
73. Kundhal PS. Critch JN, Zachos M, et al. Pediatric Crohn disease activity index: responsive to short-term change. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003; 36: 83-89.
74. Kwan LY, Devlin SM, Mirocha JM, Papadakis KA. Thiopurine methyltransferase activity combined with 6-thioguanine metabolite levels predicts clinical response to thiopurines in patients with inflammatory bowel disease. Dig Liver Dis 2008; 40: 425-432.
75. Langholz E, Munkholm P, Krasilnikoff PA, Binder V. Inflammatory bowel diseases with onset in childhood. Clinical features, morbidity, and mortality in a regional cohort. Scand J Gastroenterol 1997; 32:139-147.
76. Lemberg DA, Clarkson CM, Bohane TD, Day AS. Role of esophagogastroduodenoscopy in the initial assessment of children with inflammatory bowel disease. J Gastroenterol Hepatol 2005; 20: 1696-1700.
77. Lennard L, van Loon JA, Weinshilboum RM. Pharmacogenetics of acute azthioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. Clin Pharmacol Ther 1989; 46: 149-154.
78. Leonard MB, Feldman HI, Shults J, et al. Long-term, high-dose glucocorticoids and bone mineral content in childhood glucocorticoid-sensitive nephrotic syndrome. N Engl J Med 2004; 351: 868-875.
79. Levine A, Broide E, Stein M, et al. Evaluation of oral budesonide for treatment of mild and moderate exacerbations of Crohn´s disease in children. J Pediatr 2002; 140: 75-80.

80. Levine A, Milo T, Buller HA, Markowitz J. Consensus and controversy in the management of pediatric Crohn disease: an international survey. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003; 36: 464-469.
81. Lindberg E, Lindquist B, Holmquist L, Hildebrand H. Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden, 1984-1995. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 30:259-264.
82. Lionetti P, Bronzini F, Salvestrini C, et al. Response to infliximab is related to disease duration in paediatric Crohn´s disease. Aliment Pharmacol Ther 2003; 18: 425-431.
83. Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, et al. Leucopenia resulting from a drug interaction between azathioprine or 6-mercaptopurine and mesalamine, sulphasalazine, or balsalazide. Gut 2001; 49: 393-396.
84. Mackey AC, Green L, Liang L, et al. Hepatosplenic T cell lymphoma associated with infliximab use in young patients treated for inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2007; 44: 265-267.
85. Markowitz J, Grancher K, Kohn N, Daum F. Immunomodulatory therapy for pediatric inflammatory bowel disease: changing patterns of use, 1990-2000. Am J Gastroenterol 2002; 97: 928-932.
86. Markowitz J, Grancher K, Kohn N, et al. A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednison in children with newly diagnosed Crohn´s disease. Gastroenterology 2000; 119: 895-902.
87. Markowitz J, Rosa J, Aiges H, et al. Growth failure in pediatric patients with inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1993; 16: 373-380.
88. Medard Y, Nafa S, Jacqz-Aigrain E. Thiopurine methyltransferase activity: new high-performance liquid chromatographic assay conditions. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997; 700: 275-7.
89. Michels H. What is low-dose corticosteroid therapy in juvenile idiopathic arthritis? A worlwide, questionnaire-based survey. Z Rheumatol 2000; 59: 127-30.
90. Miller WL. The adrenal cortex. In: Sperling MA (ed.) Pediatric endocrinology, 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2002: 385-438.
91. Motil KJ, Grand RJ, Davis-Kraft L, et al. Growth failure in children with inflammatory bowel disease: a prospective study. Gastroenterology 1993; 105: 681-691.
92. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, et al. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn´s disease. Gut 1994; 35: 360-362.
93. Navarro FA, Hanauer SB, Kirschner BS. Effect of long-term low-dose prednisone on height velocity and disease activity in pediatric and adolescent patients with Crohn disease. J Ped Gastroenterol Nutr 2007; 45: 312-318.
94. Paerregaard A, Schmiegelow K. Monitoring azathioprine metabolite levels and thiopurine methyl transferase (TPMT) activity in children with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 2002; 37: 371-372.
95. Patel HI, Leichtner AM, Colodny AH, Shamberger RC. Surgery for Crohn´s disease in infants and children. J Pediatr Surg 1997; 32: 1063 – 1067.

96. Phavichitr N, Cameron DJ, Catto-Smith AG. Increasing incidence of Crohn's disease in Victorian children. J Gastroenterol Hepatol 2003; 18:329-332.
97. Pozler O, Malý J, Bónová O, et al. Idiopatické střevní záněty u dětí a dospívajících v ČR v letech 1990-2001. Čes.- slov. Pediat. 2004; 59: 63-69.
98. Pozler O, Malý J, Bónová O, et al. Incidence of Crohn Disease in the Czech Republic in the years 1990-2001 and assessment of pediatric population with inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2006; 42: 186-189.
99. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, et al. Infliximab fot the treatment of fistulas in patients with Crohn´s disease. N Engl J Med 1999; 340: 1398-1405.
100. Punati J, Markowitz J, Lerer T, et al. Effect of early immunomodulator use in moderate to severe pediatric Crohn disease. Inflamm Bowel Dis 2008; 14: 949-954.
101. Roblin X, Serre-Debeauvais F, Phelip JM, et al. 6-thioguanine monitoring in steroid-dependent patients with inflammatory bowel diseases receiving azathioprine. Aliment Pharmacol Ther 2005; 21: 829-839.
102. Rosh JR, Gross T, Mamula P, et al. Hepatosplenic T-cell lymphoma in adolescents and young adults with Crohn´s disease: a cautionary tale? Inflamm Bowel Dis 2007; 13: 1024-1030.
103. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, et al. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn´s disease. N Engl J Med 2004; 350: 876-885.
104. Sawczenko A, Lynn R, Sandhu BK. Variations in initial assessment and management of inflammatory bowel disease across Great Britain and Ireland. Arch Dis Child 2003; 88: 990-994.
105. Sawczenko A, Sandhu BK, Logan RF, et al. Prospective survey of childhood inflammatory bowel disease in the British Isles. Lancet 2001; 357:1093-1094.
106. Sawczenko A, Sandhu BK. Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland.Arch Dis Child 2003; 88: 995-1000.
107. Spray C, Debelle GD, Murphy MS. Current diagnosis, management and morbidity in paediatric inflammatory bowel disease. Acta Paediatr 2001; 90: 400-405.
108. Stephens MC, Shepanski MA, Mamula P, et al. Safety and steroid-sparing experience using infliximab for Crohn´s disease at a pediatric inflammatory bowel center. Am J Gastroenterol 2003; 98: 104-111.
109. Stork LC, Broxson EH, Sather H, et al. Oral 6-thioguanine causes late-onset splenomegaly and portal hypertension in a subset of children with acute lymphoblastic leukemia. Gastroenterology 2002; 122: 189.
110. Teitelbaum JE, Saeed S, Triantafyllopoulou M, Daum F. Infliximab in pediatric Crohn disease patients with enterovesicular fistulas. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2007; 44: 279-282.
111. Telander RL, Schemeling DJ. Current surgical management of Crohn´s disease in childhood. Seminars in Pediatr Surg 1994; 2: 19-27.

112. Thayu M, Markowitz JE, Mamula P, et al. Hepatosplenic T-cell lymphoma in a an adolescent patient after immunomodulator and biologic therapy for Crohn disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 40: 220-222.
113. Thomas CW Jr., Lowry PH, Franklin CL, et al. Erythrocyte mean corpuscular volume as a surrogate marker for 6-thioguanine nucleotide concentration monitoring in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. Inflamm Bowel Dis 2003; 9: 237-245.
114. Tiede I, Fritz G, Strand S, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. J Clin Invest 2003; 111: 1133-1145.
115. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis: final report on a therapeutic trial. Br Med J 1955; 2: 1041-1044.
116. Tung J, Loftus EV Jr, Freese DK, et al. A population-based study of the frequency of corticosteroid resistance and dependence in pediatric patients with Crohn´s disease and ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 2006; 12: 1093-1100.
117. van der Zaag-Loonen HJ, Casparie M, Taminiau JAJM, et al. The incidence of pediatric inflammatory bowel disease in the Netherlands: 1999-2001. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2004; 38:302-307.
118. van Os EC, Zins BJ, Sandborn WJ, et al. Azathioprine pharmacokinetics after intravenous, oral, delayed release oral and rectal foam administration. Gut 1996; 39: 63-68.
119. Veereman-Wauters G, Hyams J, Olson A, et al. Height of growth delayed children with active Crohn´s disease improves during treatment with infliximab. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2006; 42: 2-19.
120. Walters TD, Gilman AR, Griffiths AM. Infliximab therapy restores normal growth in children with chronically active severe Crohn disease refractory to immunomodulatory therapy. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 40: 2-17.
121. Wine E, Reif SS, Leshinsky-Silver E, et al. Pediatric Crohn´s disease and growth retardation: the role of genotype, phenotype, and disease severity. Pediatrics 2004; 114: 1281-1286.
122. www.gastroped.cz
123. http://www.sophia-bv.nl/Investigation/login.aspx?ReturnUrl=%2fInvestigation%2fDefault.aspx
124. www.iop-berlin.de/geschichte_der_transplantation_2.htm
125. National Institutes of Health. Common terminology criteria for adverse events, version 3.0, 2003

## F. SEZNAM NEJČASTĚJI POUŽÍVANÝCH ZKRATEK

| | |
|---|---|
| 5-ASA | deriváty 5-aminosalicylové kyseliny |
| 6-MMP | 6-methylmerkaptopurin |
| 6-MP | 6-merkaptopurin |
| 6-TG | 6-thioguanin |
| 6-TGN | nukleotidy 6-thioguaninu |
| ALL | akutní lymfatická leukémie |
| AZA | azathioprin |
| CN | Crohnova nemoc |
| DSS | dextransulfát (dextran sodium sulfate) |
| ESPGHAN | Evropská společnost pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu |
| FN | Fakultní nemocnice |
| GIT | gastrointestinální trakt |
| GM-CSF | stimulační faktor granulocytárních a makrofágových kolonií |
| H-E | hematoxylin-eosin |
| HPLC | high-performance liquid chromatography |
| IBD | nespecifický střevní zánět (inflammatory bowel disease) |
| IC | "neurčitá" (indeterminate) kolitida |
| IFX | infliximab |
| IL | interleukin |
| INFχ | interferon gamma |
| LF | Lékařská fakulta |
| MTX | metotrexát |
| NF-κB | nukleární faktor kappa B |
| NSZ | nespecifický střevní zánět |
| obr. | obrázek |
| PBS | fyziologický roztok pufrovaný fosfátem (phosphate buffered saline) |
| PCDAI | pediatrický index aktivity Crohnovy nemoci |
| RBC | erytrocyty (red blood cells) |
| SKS | systémové kortikosteroidy |
| SLE | systémový lupus erythematodes |
| SPC | souhrn údajů o přípravku (summaries of product characteristics) |
| tab. | tabulka |
| TNFα | tumor necrosis factor alfa |
| TPMT | thiopurinmethyltransferáza |
| UC | ulcerózní kolitida |
| UK | Univerzita Karlova |

## G. PŘEHLED PUBLIKACÍ

- Malý J., Pozler O, Králová M, Rejtar P. – Kongenitální membranózní stenóza duodena a její endoskopický obraz. Čes.-slov. Pediat. 2002; 57: 706-709.
- Malý J., Krejsek J., Pozler O. – Biologická léčba nespecifických střevních zánětů. Protilátka proti TNF alfa- infliximab – v dětském věku. Čes.-slov. Pediat. 2003; 58: 507-514.
- Malý J. Diagnostika a následná péče o děti s nespecifickými střevními záněty. Pediatrie pro praxi 2004; 5: 7-9.
- Pozler O, Malý J, Bónová O, et al. Idiopatické střevní záněty u dětí a dospívajících v ČR v letech 1990-2001. Čes.- slov. Pediat. 2004; 59: 63-69.
- Medical position paper: Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis – The Porto Criteria. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 41: 1-7.
- Pozler O, Malý J, Bónová O, et al. Idiopatické střevní záněty u dětí a dospívajících v ČR v letech 1990-2001. Výsledky skupiny 18letých. Čes a Slov Gastroent a Hepatol 2005; 59: 147-150.
- Pozler O, Malý J, Bónová O, et al. Incidence of Crohn Disease in the Czech Republic in the years 1990-2001 and assessment of pediatric population with inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2006; 42: 186-189.
- Malý J., Pozler O., Dědek P. Kortikosteroidy a azathioprin v prvním roce léčby Crohnovy nemoci u dětí. Čes.- slov. Pediat. 2009; 64: 310-315.
- Malý J., Pozler O., Dědek P. Paediatric Crohn´s Disease Activity Index and Corticosteroids Treatment in the First Year After Diagnosis - prospective observational evaluation of the treatment strategy. Single centre experience. - odesláno do tisku (Inflamm Bowel Dis)