UNIVERZITA KARLOVA

Lékařská fakulta v Hradci Králové

Vliv vybraných léků na kostní metabolismus

Iva Karešová

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program: Klinická biochemie

Hradec Králové

2023

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Klinická biochemie na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Iva Karešová
Ústav klinické biochemie a diagnostiky
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., Dr.h.c.
Ústav klinické biochemie a diagnostiky
LF HK a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti: prof. MUDr. Milan Bayer, CSc.
Klinika dětí a dorostu
3. LF UK a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady

prof. MUDr. Pavel Horák, CSc.
III. interní klinika – nefrologická, revmatologická a endokrinologická
LF UP a Fakultní nemocnice Olomouc

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Klinická biochemie dne 1.11. 2023 na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, posluchárna č. B 401, 4. patro, areál Fakultní nemocnice Hradec Králové, od 13 hod.

Tato práce vznikla za podpory grantu MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906), granty Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové SVV-2015-260181, SVV-2016-260289, SVV-2022-260544, programem PROGRES Q40/01 a programem Cooperatio, vědní oblasti DIAG.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., Dr.h.c.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Klinická biochemie
Garant studijního programu

Obsah

1. Souhrn ... 4
2. Summary ... 5
3. Úvod do problematiky ... 6
3.1 Osteoporóza a měření kostní minerální denzity (BMD) ... 6
3.2 Epilepsie ... 7
3.2.1 Zonisamid ... 9
3.2.2 Pregabalin a gabapentin ... 9
3.2.3 Levetiracetam ... 9
4. Cíle disertační práce ... 10
5. Experimentální část ... 10
5.1 Experimentální zvířata ... 10
5.2 Antiepileptika ... 11
5.3 Experiment ... 11
5.4 Materiál a analýza ... 12
5.4.1 Kostní homogenát ... 12
5.4.2 Stanovení koncentrace léků v séru ... 13
5.4.3 Měření kostní minerální denzity ... 14
5.4.4 Testování mechanické odolnosti kostní tkáně ... 14
5.4.5 Statistická analýza a vyhodnocení dat ... 15
6. Výsledky ... 15
6.1 Vliv orchidektomie na kostní metabolismus u potkanů ... 15
6.2 Vliv zonisamidu na kostní metabolismus u potkanů ... 16
6.3 Vliv gabapentinu na kostní metabolismus u potkanů ... 16
6.4 Vliv pregabalinu na kostní metabolismus u potkanů ... 17
6.5 Vliv levetiracetamu na kostní metabolismus u potkanů ... 18
7. Diskuze ... 19
7.1 Vliv orchidektomie na kostní metabolismus u potkanů ... 19
7.2 Vliv zonisamidu na kostní metabolismus u potkanů ... 20
7.3 Vliv gabapentinu a pregabalinu (gabapentinoidů) na kostní metabolismus u potkanů ... 21
7.4 Vliv levetiracetamu na kostní metabolismus u potkanů ... 22
8. Závěr ... 24
9. Seznam použité literatury ... 26
10. Přehled publikační činnosti ... 33

1. Souhrn

Vzhledem ke stárnutí populace a prodlužující se délce života představuje osteoporóza závažný celosvětový zdravotní problém. V současné době se odhaduje, že osteoporózou trpí více než 200 milionů lidí. Zlomeniny v důsledku osteoporózy jsou hlavní příčinou morbidity a mortality starších lidí (Compston et al., 2019). Řada důkazů naznačuje souvislost mezi antiepileptiky a kostními abnormalitami. Prevalence osteoporózy a osteopenie u dlouhodobě léčených epileptiků je vysoká. Více než 50 % pacientů s epilepsií má nízkou hodnotu kostní minerální denzity (BMD) (Ko et al., 2020).

Cílem této disertační práce bylo posouzení vlivu orchidektomie a vybraných nových antiepileptik (zonisamid, gabapentin, pregabalin, levetiracetam) na kostní metabolismus u mladých potkanů kmene Wistar.

Byl potvrzen negativní vliv provedené orchidektomie potkanů na kostní tkáň po 12 týdnech. Orchidektomie vedla k statisticky významnému snížení BMD a měla negativní vliv na mechanickou odolnost kostí. Naše výsledky potvrzují, že mladý potkan po provedené orchidektomii může být považován za vhodný zvířecí model pro studium osteopenie.

Po 12 týdnech podávání nových antiepileptik (zonisamid, gabapentin, pregabalin, levetiracetam) nebyl potvrzen statisticky významný vliv na BMD u orchidektomovaných potkanů ani u gonadálně intaktních potkanů. Ve skupině orchidektomovaných potkanů byl po podávání levetiracetamu zjištěn významný vzestup kostních markerů-BALP, CTX-I a RANKL, u gabapentinu a pregabalinu významný vzestup markeru kostního obratu RANKL. U gonadálně intaktních potkanů bylo po užívání levetiracetamu naměřeno statisticky významné zvýšení markerů BALP a CTX-I, u pregabalinu byl zjištěn významný vzestup kostního markeru sklerostinu. U žádného z novějších výše uvedených antiepileptik nebyl potvrzen statisticky významný vliv na mechanickou odolnost kostí u orchidektomovaných potkanů ani u gonadálně intaktních potkanů.

Dlouhodobé podávání novějších antiepileptik (zonisamid, gabapentin, pregabalin, levetiracetam) lze považovat za méně rizikové z hlediska zdraví kostí.

2. Summary

The effect of selected drugs on bone metabolism

With an aging population and increasing life expectancy, osteoporosis represents a major global health problem. Currently it is estimated that more than 200 million people suffer from osteoporosis. Fractures due to osteoporosis are the major cause of morbidity and mortality in the elderly (Compston et al., 2019). A large body of evidence suggests an association between AEDs and bone abnormalities. The prevalence of osteoporosis and osteopenia in long-term treated epileptics is high. More than 50% of patients with epilepsy have low bone mineral density (BMD) (Ko et al., 2020).

The aim of the dissertation was to evaluate the effect of orchidectomy and the effect of selected new antiepileptic drugs (zonisamide, gabapentin, pregabalin, levetiracetam) on bone metabolism in young Wistar rats.

The negative effect on bone tissue after rat orchidectomy was confirmed after 12 weeks. Orchidectomy led to a statistically significant reduction in BMD and had a negative effect on the biomechanical properties of bones. Our results confirm that young rats after orchidectomy can be considered a suitable animal model for the study of osteopenia.

After 12 weeks of administration of new antiepileptic drugs (zonisamide, gabapentin, pregabalin, levetiracetam), there was no statistically significant effect on BMD in orchidectomised rats or gonadally intact rats. In the orchidectomised rat group, a significant increase in bone markers – BALP, CTX-I and RANKL – was confirmed after the use of levetiracetam, and a significant increase in bone turnover marker RANKL was observed after the use of gabapentin and pregabalin. In gonadally intact rats, a statistically significant increase in the markers BALP and CTX-I was measured after the use of levetiracetam, while a significant increase in the bone marker sclerostin was observed with pregabalin. None of the more recent antiepileptic drugs mentioned above has been confirmed to have a statistically significant effect on the biomechanical properties of bone in either orchidectomised rats or gonadally intact rats.

Long-term administration of the newer antiepileptic drugs (zonisamide, gabapentin, pregabalin, levetiracetam) can be considered as less risky for health.

3. Úvod do problematiky

Kost je metabolicky aktivní tkáň, která je neustále přestavována, což umožňuje růst v dětství a obnovu i adaptaci kostry v dospělosti. Během kostní remodelace je kostra dospělého člověka obnovena přibližně jednou za deset let. Homeostáza kostí je složitý proces, na kterém je podílejí dva hlavní typy buněk. Osteoklasty, které mají za funkci resorpci kostní tkáně a osteoblasty tvořící novou kostní tkáň. Diferenciace a aktivita těchto dvou typů buněk musí být přísně koordinována, aby bylo zachováno zdraví a integrita skeletu po celý život (Balogh et al., 2018). Za fyziologických podmínek kostní homeostázy je osteoklastická činnost úzce spjata s osteoblastickou činností tak, aby erodovaná kost byla zcela nahrazena novou kostí. Narušení této homeostatické rovnováhy ve prospěch nadměrné aktivity osteoklastů vede k abnormální remodelaci kosti a rozvoji kostních onemocnění, jako je osteoporóza (Al-Bari et al., 2020).

Osteoporóza je progresivní systémové onemocnění skeletu charakterizované úbytkem kostní hmoty a poškozením mikroarchitektury kostní tkáně vedoucí ke zvýšení křehkosti kostí a následnému zvýšení rizika zlomenin. Zlomeniny v důsledku osteoporózy jsou hlavní příčinou morbidity a mortality starších lidí (Compston et al., 2019). Vzhledem ke stárnutí populace a prodlužující se délce života představuje osteoporóza závažný celosvětový zdravotní problém. V současné době se odhaduje, že osteoporózou trpí více než 200 milionů lidí (Sözen et al., 2017).

Řada důkazů naznačuje souvislost mezi antiepileptiky (AED, antiepileptic drugs) a kostními abnormalitami včetně snížení denzity kostního minerálu (BMD) a s tím spojeného zvýšeného rizika zlomenin. Toto riziko je vyšší u uživatelů AED indukující jaterní enzymy ve srovnání s uživateli AED neindukující jaterní enzymy. Léčba AED je často podávána po dobu několika let nebo celoživotně. Je velmi důležité mít znalosti a porozumět možným metabolickým odchylkám spojeným s užíváním AED, protože většina účinků na kosti zůstává dlouho subklinická a může trvat roky, než se projeví klinicky (Arora et al., 2016; Pack, 2003; Barnsley et al, 2021).

3.1 Osteoporóza a měření kostní minerální denzity (BMD)

Osteoporózou označujeme progredující systémové onemocnění skeletu, charakterizované úbytkem kostní hmoty a poruchami stavby kosti s následným zvýšením křehkosti kostí s navazujícím rizikem zlomenin. Toto asymptomatické onemocnění zůstává často dlouho nediagnostikováno, protože prvním příznakem bývá obvykle až zlomenina. Ke zlomeninám dochází bez předchozího úrazu nebo už při malé zátěži kosti. Typickými osteoporotickými zlomeninami jsou zlomeniny obratlů, distálního předloktí a proximální části stehenní kosti (Chin et al., 2022). Zlomeniny v důsledku osteoporózy jsou hlavní příčinou morbidity a mortality starších lidí (Compston et al., 2019).

V současné době každý diagnostický postup vyžaduje změření hustoty kostního minerálu (BMD) pomocí dvouenergiové rentgenové absorpctiometrie (DXA). Tato metoda využívá slabé rentgenové záření o dvou energetických hladinách, které je pohlcováno kostí. BMD se obvykle měří v oblasti bederní páteře (doporučenými místy měření jsou bederní obratle L1, L2 a L3, resp. L4 a jejich průměr) a proximálního femuru a vyjadřuje množství kostního minerálu v plošné projekci analyzovaného úseku skeletu v g/cm^2. Světová zdravotnická organizace (WHO) v roce 1994 definovala osteoporózu jako hodnotu BMD o 2,5 směrodatné odchylky (SD) nebo více pod průměrnou maximální hodnotou BMD u zdravých jedinců (T-skóre ≤ -2,5

SD). Hodnota T-skóre mezi -2,5 a -1,0 je definována jako osteopenie (Chin et al., 2022). U dětí, mladistvých a u osob starších 70 let je vhodnějším diagnostickým kritériem hodnota Z-skóre udávající počet standardních odchylek od průměrné hodnoty osob stejné věkové kategorie, pohlaví a etnika (Šimko et al., 2013). Naměřené hodnoty BMD jsou považovány za silný nezávislý prediktor rizika zlomenin (Salari et al., 2021).

Vzhledem ke stárnutí populace a prodlužující se délce života představuje osteoporóza závažný celosvětový zdravotní problém. V současné době se odhaduje, že osteoporózou trpí více než 200 milionů lidí. Podle nejnovějších statistik Mezinárodní nadace pro osteoporózu (International Osteoporosis Foundation) dojde celosvětově u každé třetí ženy starší 50 let a u každého pátého muže k osteoporotické zlomenině (Sözen et al., 2017). Osteoporóza způsobuje ročně 8,9 milionů zlomenin po celém světě a vede ke zhoršení fyzického i psychického zdraví, nižší kvalitě života a kratší průměrné délce života. Například ve Spojeném království je hospitalizováno více než 300 000 pacientů s osteoporotickými zlomeninami, což je spojeno s vysokými náklady na zdravotní péči. V roce 2000 si osteoporóza vyžádala ve Spojeném království náklady na zdravotní péči v odhadované výši 1,8 miliardy liber a do roku 2025 se předpokládá nárůst na 2,2 miliardy liber (Barnsley et al., 2021). Léčba osteoporózy a s ní spojených následků je nezbytná nejen pro zlepšení kvality života, ale také pro snížení ekonomické zátěže systému zdravotní péče.

Primární osteoporóza je nejčastější formou onemocnění, rozvíjí se bez zřetelné příčiny a dělí se na dva typy. I. typ osteoporózy (postmenopauzální) je způsobený nedostatkem estrogenů, kdy dochází k zvýšenému odbourávání kosti. U II. typu osteoporózy (tzv. senilní, stařecká) dochází k snížené tvorbě nové kosti a postihuje obě pohlaví s manifestací obvykle po 65. roce věku. Naproti tomu sekundární osteoporóza je způsobena komorbidními onemocněními a/nebo léky (Dobbs et al., 1999; Tu et al., 2018).

Osteoporóza je považována za komplexní multifaktoriální onemocnění, přičemž její patogeneze závisí na přítomnosti endogenních a exogenních rizikových faktorů, které vychylují fyziologickou remodelaci směrem k úbytku kostní hmoty. Mezi rizikové faktory se řadí fyzická inaktivita, nedostatek vitamínu D, špatný životní styl včetně užívání alkoholu a kouření, ženské pohlaví, rasa, rodinná anamnéza osteoporotické zlomeniny a užívání vybrané skupiny léku včetně antiepileptik (Chin et al., 2022). Prevalence osteoporózy a osteopenie u dlouhodobě léčených epileptiků je vysoká. Více než 50 % pacientů s epilepsií má nízkou hodnotu BMD (Ko et al., 2020). Četnost zlomenin u dětských pacientů s epilepsií je 2x až 3x vyšší než u dětí bez epilepsie (Ko et al., 2020). Systematický přehled a metaanalýza 22 studií prokázaly, že užívání AED je spojeno s 86% zvýšením rizika zlomenin v jakémkoli místě a 90% zvýšením rizika zlomenin kyčle (Barnsley et al., 2021). Příčiny nežádoucích účinků jsou pravděpodobně multifaktoriální. V budoucnu je třeba lépe porozumět mechanismům, které tyto nežádoucí účinky antiepileptik způsobují a pokusit se stanovit postupy jejich prevence a léčby.

3.2 **Epilepsie**

Epilepsie je jedním z nejčastějších chronických neurologických onemocnění, postihuje více než 70 milionů lidí na celém světě (Thijs et al., 2019). Toto onemocnění je charakterizováno opakovanými záchvaty mozkového původu. Záchvaty jsou způsobeny náhlou a reversibilní abnormální funkcí mozkové aktivity, která se klinicky projevuje dočasnou změnou motoriky, vědomí či vnímání, chování nebo citlivosti. Projevy epileptických záchvatů jsou

značně mnohotvárné a mohou se lišit případ od případu i u téhož pacienta. Záchvaty bývají obvykle krátké, trvají několik vteřin až několik málo minut a mohou být následovány pozáchvatovým stavem. Ten se projevuje ospalostí, únavou, zmateností nebo přetrvávajícími neurologickými příznaky. Onemocnění často přetrvává mnoho let nebo desetiletí a u mnoha pacientů vyžaduje celoživotní léčbu (Schulze-Bonhage et al., 2020; Gözükızıl et al., 2022). Léky proti epilepsii (AED) jsou hlavní formou léčby lidí s epilepsií. AED jsou však předepisována jako lék první volby také u řady neepileptických stavů, především u poruch bipolárního spektra a chronických bolestivých stavů. Pouze jeden ze tří uživatelů AED užívá tyto léky na epilepsii (Reimers, 2014).

AED lze rozdělit do dvou kategorií: širokospektrá a úzkospektrá. Širokospektrá AED, jak název napovídá, léčí širokou škálu typů záchvatů a jsou dobrou počáteční volbou, zejména pokud je klasifikace typu záchvatu nejistá. Mezi tato AED patří mimo jiné levetiracetam, lamotrigin, zonisamid, topiramát, kyselina valproová, klonazepam, perampanel, klobazam a rufinamid. AED s úzkým spektrem jsou primárně určena k léčbě fokálních nebo parciálních záchvatů. Patří mezi ně lakosamid, pregabalin, gabapentin, karbamazepin, oxkarbazepin, ezogabin, fenytoin a vigabatrin (Subbarao et al., 2022).

Chronické podávání antiepileptik nevede k léčbě epilepsie, ale „pouze“ potlačuje nebo zabraňuje rozvoji epileptického záchvatu. Existují představy o tom, jaká kritéria by mělo splňovat takzvané „ideální antiepileptikum“. V těchto definicích se dovídáme o ideálních fakmakokinetických a farmakodynamických vlastnostech takového „ideálního“ léku, výborné účinnosti na co největší spektrum typů epileptických záchvatů a pokud možno „nulovém“ potenciálu působit nežádoucí účinky. Klinická praxe je ale v současnosti jiná a neexistuje antiepileptikum, které by nemělo vedlejší nežádoucí účinky (Kuba 2006). Léčba antiepileptiky může negativně ovlivnit zdraví kostí a vést k zvýšenému riziku zlomenin. (Koo et al., 2020). Odhaduje se, že pacienti s epilepsií mají 2-3x vyšší riziko zlomenin kostí ve srovnání s běžnou populací (Guo et al., 2020). Nežádoucí účinky antiepileptik na zdraví kostí byly poprvé zaznamenány v 60. letech 20. století a od té doby přibývá důkazů, které ukazují, že pacienti užívající AED jsou vystaveni zvýšenému riziku metabolického onemocnění kostí, včetně změn v kostním obratu, snížení BMD, změn v kvalitě kostí vedoucí k vyššímu riziku zlomenin a rozvoji osteoporózy (Guo et al., 2020; Verrotti et al., 2010).

Tradiční AED, včetně fenobarbitalu, primidonu, fenytoinu a karbamazepinu, indukují enzymy biotransformace (cytochromoxidázový systém, zejména cytochrom P450). Nejpravděpodobnějším mechanismem je aktivace těchto enzymů vedoucí ke zvýšenému jaternímu katabolismu 25-hydroxyvitamínu D, což má za následek rozvoj hypokalcémie, zvýšení hladiny parathormonu (PTH), sekundární hyperparatyroidizmus se zvýšením kostní resorpce a snížením BMD. Další mechanismus narušení kostní mineralizace může přímo souviset se škodlivým účinkem některých AED na kostní minerální denzitu. Některé studie naznačují, že valproát, enzymový inhibitor CYP-450, je spojen s poklesem BMD a úbytkem kostní hmoty (Koo et al.,2020; Gözükızıl et al., 2022). AED "novější generace" nepůsobí jako enzymové induktory/inhibitory. Stále však není jasné, zda AED "novější generace", které byly zavedeny do praxe v posledních dvou desetiletích, včetně gabapentinu, lamotriginu, topiramátu, tiagabinu, oxkarbazepinu, levetiracetamu a zonisamidu, nepříznivě ovlivňují zdraví kostí (Hakami et el., 2016).

U pacientů s epilepsií léčených AED není rutinně vyžadováno sledování biochemických markerů kostního obratu, měření sérové hladiny 25-hydroxyvitamínu D, vápníku, fosfátu, BMD, a to jak před zahájením léčby, tak i během jejího monitorování (Siniscalchi et al.,2020). Studie ukázala, že pouze 41 % dětských neurologů a 28 % neurologů pro dospělé rutinně hodnotí stav kostí u pacientů s epilepsií užívajících AED (Ko et al., 2020). Sledování těchto

biochemických markerů u pacientů s epilepsií by mohlo být nápomocné k zvolení adekvátní terapie a sloužit jako prevence poškození kostního zdraví.

Riziko kostních změn spojených s užíváním AED může zvyšovat několik faktorů: 1) věk 2) použitá dávka 3) délka léčby; 4) polyterapie; 5) ženské pohlaví; 6) expozice slunci. Zohlednění těchto faktorů může představovat možnou strategii prevence kostních alterací plynoucích z užívání AED (Siniscalchi et al.,2020).

3.2.1 Zonisamid

Zonisamid (ZNS) je derivát benzisoxazolu (1, 2- benzisoxazol-3-methanesulfonamid) s jedinečnou chemickou strukturou patřící mezi novou generaci AED (Goel et al., 2021; Kwan et al., 2015). ZNS byl v Evropě schválen jako monoterapie pro léčbu parciálních záchvatů u dospělých s nově diagnostikovanou epilepsií a tento lék je v Evropě a USA schválen také jako přídatná léčba fokálních záchvatů se sekundární generalizací nebo bez ní (Romigi et al., 2015). ZNS se rychle a úplně vstřebává, přičemž vrchol absorpce nastává za 2-6 hodin a metabolismus probíhá především prostřednictvím izoenzymu 3A4 cytochromu P450 (CYP3A4), po němž následuje vylučování ledvinami (Jongeling et al., 2015). Mechanismus účinku ZNS je nejasný. ZNS má široké spektrum mechanismů účinku zahrnující inhibici sodíkových kanálů, redukci vápníkových kanálů typu T, snížení synaptické excitace zprostředkované glutamátem a zvýšení inhibičních účinků skrze kyselinu gama-aminomáselnou (Lee et al., 2015; Goel et al., 2021). ZNS také slabě mění metabolismus acetylcholinu, dopaminu, serotoninu a inhibuje aktivitu karboanhydrázy, i když není jisté, zda tyto účinky přispívají k jeho klinické účinnosti (Kwan et al., 2015).

3.2.2 Pregabalin a gabapentin

Pregabalin a gabapentin, souhrnně gabapentinoidy, jsou strukturně příbuzné sloučeniny, které jsou klasifikovány jako analoga kyseliny gamaaminomáselné (GABA). Gabapentinoidy jsou předepisovány k léčbě epileptických záchvatů, neuropatické bolesti, fibromyalgie, syndromu neklidných nohou, generalizované úzkostné poruchy a také jsou široce předepisována jako medikace off-label (Fernandez-Lopez et al., 2020). Gabapentin a pregabalin mají v podstatě identické farmakodynamické vlastnosti. Ani jeden z těchto léků nemá znatelnou afinitu k receptorům GABA, ačkoli jsou chemicky podobný neurotransmiteru GABA. Spíše inhibují neuronální signalizaci vazbou na podjednotku α2-δ napěťově řízených vápníkových kanálů v centrálním nervovém systému. Tento mechanismus pravděpodobně vysvětluje jejich antikonvulzivní, antinociceptivní a možné anxiolytické vlastnosti (Mathieson et al., 2020). Pregabalin se vstřebává rychleji než gabapentin a vykazuje lineární absorpční kinetiku s více jak 90 % biologickou dostupností v celém doporučeném dávkovacím rozmezí. Naproti tomu gabapentin má nelineární absorpční kinetiku-absorbovaná frakce klesá se zvyšující se dávkou. Obě léčiva se vylučují především renálním vylučováním intaktního léčiva (Greenblatt et al., 2018; Derry et al., 2019).

3.2.3 Levetiracetam

Levetiracetam (LEV) je relativně novým a jedním z nejčastěji předepisovaných antiepileptik se širokým spektrem účinku. Jedná se o analog piracetamu (2S-(oxo-1-pyrrolidinyl) butanamid) často využívaným k léčbě parciálních a generalizovaných záchvatů (Jarvie et al., 2018). LEV je atraktivním AED pro léčbu posttraumatických záchvatů díky svým příznivým farmakokinetickým vlastnostem-vynikající perorální biologické dostupnosti, která není závislá na systému cytochromu P450, lineární kinetice, minimální vazbě na plazmatické bílkoviny a rychlému dosažení ustálené koncentrace (Shetty, 2013; Peyrl et al., 2015). Různé studie naznačují, že reguluje influx vápníku do buněk, přičemž selektivně blokuje kanál typu N, ale nikoli typu T. Váže synaptický vezikulární protein (SV2A) a prostřednictvím modulace funkce SV2A vyvolává neuroprotektivní účinky (Erbaş et al., 2016). Léčivo je bezpečné a obecně dobře snášené (Koo et al., 2013).

4. Cíle disertační práce

Cílem disertační práce bylo posouzení vlivu vybraných nových antiepileptik na kostní metabolismus u mladých potkanů kmene Wistar.

Specifické cíle:

1) Zjistit vliv orchidektomie na kostní metabolismus u potkanů.
   a. Stanovit koncentraci kostních markerů v séru a kostním homogenátu.
   b. Pomocí dvouenergiové rentgenové absorpciometrie změřit kostní minerální hustotu potkana.
   c. Posoudit mechanické vlastnosti kostní tkáně femurů potkana.
   d. Vyhodnocování BMD ve vybraných oblastech skeletu a stavby těla (poměr tělesné tukové a svalové tkáně) potkana.

2) Zjistit vliv nových antiepileptik (zonisamidu, gabapentinu, pregabalinu, levetiracetamu) na kostní metabolismus u potkanů.
   a. Stanovit koncentraci kostních markerů v séru a kostním homogenátu.
   b. Pomocí dvouenergiové rentgenové absorpciometrie změřit kostní minerální hustotu potkana.
   c. Posoudit mechanické vlastnosti kostní tkáně femurů potkana.
   d. Vyhodnocování BMD ve vybraných oblastech skeletu a stavby těla (poměr tělesné tukové a svalové) tkáně potkana.

5. Experimentální část

5.1 Experimentální zvířata

Potkani byli ustájeni v Centrálním viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (UK-LF HK). Protokol experimentů byl schválen Odbornou komisí na ochranu zvířat

proti týrání UK-LF HK. Při pokusech byli použiti osmitýdenní samci potkanů albínů kmene Wistar (Biotest s.r.o., Konárovice, Česká republika). Zvířata byla umístěna ve skupinách po 4 v plastových klecích a chována za standardních podmínek (12 hodin světlo a 12 hodin tma, teplota 22±2 °C, vlhkost vzduchu 30-70 %). Zvířata měla přístup k standardní laboratorní dietě (SLD, VELAS, a.s., Lysá nad Labem, Česká republika) nebo SLD obohacené o léčiva a vodě ad libitum po celou dobu experimentu. V průběhu pokusu byla hmotnost potkanů sledována jednou týdně.

5.2 **Antiepileptika**

a. Zonisamid (Zonisamid, Eisai Ltd.)
b. Gabapentin (Gabapentin, Gedeon Richter Plc.)
c. Pregabalin (Pregabalin, Pfizer Manufacturing Deutschland GmbH)
d. Levetiracetam (Levetiracetam, UCB Pharma)

5.3 **Experiment**

Osmitýdenní potkani byli náhodně rozdělení do 10 skupin po 8 zvířatech a krmeni SLD nebo SLD obohacenou lékem. Délka pokusu byla 12 týdnů.

1. Kontrolní skupina potkaních samců krmená SLD (SHAM)
2. Kontrolní skupina potkaních samců po provedené orchidektomii krmená SLD (ORX)
3. Skupina potkaních samců krmená SLD obohacenou o zonisamid (19 mg/25 g diety; Zonisamid, Eisai Ltd.) (SHAM+ZNS)
4. Skupina potkaních samců po provedené orchidektomii krmená SLD obohacenou o zonisamid (19 mg/25 g dietyě; Zonisamid, Eisai Ltd.) (ORX+ZNS)
5. Skupina potkaních samců krmená SLD obohacenou o gabapentin (28 mg/25 g diety; Gabapentin, Gedeon Richter Plc.) (SHAM+GBP)
6. Skupina potkaních samců po provedené orchidektomii krmená SLD obohacenou o gabapentin (28 mg/25 g diety; Gabapentin, Gedeon Richter Plc.) (ORX+GBP)
7. Skupina potkaních samců krmená SLD obohacenou o prebabalin (12 mg/25 g diety; Pregabalin, Pfizer Manufacturing Deutschland GmbH) (SHAM+PGB)
8. Skupina potkaních samců po provedené orchidektomii krmená SLD obohacenou o pregabalin (12 mg/25 g diety; Pregabalin, Pfizer Manufacturing Deutschland GmbH) (ORX+PGB)
9. Skupina potkaních samců krmená SLD obohacenou o levetiracetam (101 mg/25 g diety; Levetiracetam, UCB Pharma) (SHAM+LEV)
10. Skupina potkaních samců po provedené orchidektomii krmená SLD obohacenou o levetiracetam (101 mg/25 g diety; Levetiracetam, UCB Pharma) (ORX+LEV)

5.4 Materiál a analýza

Na samotném začátku experimentu byla polovině potkanů provedena oboustranná orchidektomie v éterové narkóze (skupina ORX). Potkanům ze skupiny SHAM byl proveden pouze operační řez na šourku, který byl následně zašit. Následující den po operaci se začala podávat kontrolním skupinám pouze SLD a experimentálním potkanům SLD obohacená o léčiva. Přístup k potravě byl ad libitum. Délka pokusu byla 12 týdnů. Podle spotřeby diety byla vypočítána dávka léku na kilogram tělesné hmotnosti potkana. Po 12 týdnech byla zvířata usmrcena odebráním krve z břišní aorty v éterové anestezii, získané sérum bylo alikvotováno a uloženo při -80 °C pro následné biochemické analýzy.

5.4.1 Kostní homogenát

Po usmrcení potkanů byly femury vypreparovány a důkladně očištěny od měkkých tkání, zabaleny do gázy navlhčené fyziologickým roztokem a zamraženy při teplotě -80 °C do doby analýzy. Kostní homogenát byl připraven z femuru. Část diafýzy femuru (0,1 g) byla rozrušena a homogenizována pomocí přístroje TissueLyser II (Qiagen, Nizozemsko). Do nádoby určené pro homogenizaci se na vzorek femuru a drtící kuličky nalil tekutý dusík a bylo přidáno 0,5 ml fosfátového pufru (PBS, PENTA Praha, Česká republika). Tkáň femuru byla rozmělňována při frekvenci 30 Hz po dobu 1 min. Poté bylo ke vzorku přidáno dalších 1,5 ml fosfátového pufru a následovalo další rozmělňování při 10 Hz po dobu 15 s. Vzniklý tkáňový homogenát byl centrifugován při 10 000 g při 4 °C po dobu 10 min a získaný supernatant byl odebrán a uložen při -80 °C. Hladiny markerů sklerostinu (SOST) a kostní alkalické fosfatázy (BALP) byly stanoveny v kostním homogenátu enzymovou imunoanalýzou (ELISA, enzyme-linked immuno sorbent assay). Hladina sklerostinu byla stanovena pomocí kitu od firmy Cloud-Clone Corp., 23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA (SOST, pg/ml) a hladina kostní alkalické fosfatázy byla stanovena pomocí kitu od firmy BlueGene Biotech, Shanghai, Čína (BALP, ng/ml).

Ze séra byly metodou ELISA analyzovány markery kostního obratu: amino-terminální propeptid prokolagenu typu I (PINP), ligand pro aktivátor nukleárního faktoru kappa B (RANKL) a osteoprotegerin (OPG). Použili jsme soupravy od firmy Cloud-Clone Corp., 23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA (PINP, ng/ml; RANKL, pg/ml; OPG, pg/ml).

Pro stanovení kostních markerů u levetiracetamu byly použity kity firmy Uscn Life Science Inc., Wuhan, Čína (PINP, ng/mL; CTX-I, pg/mL; SOST, pg/mL; RANKL, pg/mL) a kit od firmy BlueGene Biotech, Shanghai, Čína (BALP, ng/ml). Posouzení vlivu levetiracetamu na kostní metabolismus bylo uskutečněno o několik měsíců dříve než zbylá výše zmíněná antiepileptika, v rámci jiného probíhajícího pokusu se shodnou metodikou.

5.4.2 Stanovení koncentrace léků v séru

5.4.2.1 Zonisamid

Na konci experimentu byly stanoveny hladiny zonisamidu v krevním séru. Koncentrace zonisamidu ve vzorcích byla stanovena pomocí modifikované metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí na hmotnostním spektrometru typu trojitého kvadrupólu (LC-MS/MS). Příprava vzorků zahrnovala vysrážení proteinů a přídavek vnitřního standardu deuterovaného pregabalinu-D6. Analyt byl separován na koloně Discovery HS F5 (100 mm x 2,1 mm I.D., velikost částic 5 um, Supelco, PA, USA) a detekován pomocí hmotnostního spektrometru typu trojitého kvadrupólu Agilent 6490. Detekce se uskutečnila v pozitivním módu za využití elektrospreje a pro kvantitativní analýzu byly použity přechody iontů 213> 132 pro zonisamid a 166,2> 148,1 pro pregabalin-D6.

5.4.2.2 Gabapentin

Hladiny gabapentinu v séru byly stanoveny na konci pokusu. Koncentrace gabapentinu ve vzorcích byla stanovena pomocí modifikované metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí na hmotnostním spektrometru typu trojitého kvadrupólu (LC-MS/MS). Příprava vzorků zahrnovala vysrážení proteinů a přídavek vnitřního standardu deuterovaného pregabalinu-D6. Analyt byl separován na koloně Discovery HS F5 (100 mm x 2,1 mm I.D., velikost částic 5 um, Supelco, PA, USA) a detekován pomocí hmotnostního spektrometru typu trojitého kvadrupólu Agilent 6490. Detekce se uskutečnila v pozitivním módu za využití elektrospreje a pro kvantitativní analýzu byly použity přechody iontů 172.2> 154.1 pro gabapentin a 166,2> 148,1 pro pregabalin-D6.

5.4.2.3 Pregabalin

Hladiny pregabalinu byly stanoveny v krevním séru na konci pokusu. Koncentrace pregabalinu ve vzorcích byla stanovena pomocí modifikované metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí na hmotnostním spektrometru typu trojitého kvadrupólu (LC-MS/MS). Příprava vzorků zahrnovala vysrážení proteinů a přídavek vnitřního standardu deuterovaného pregabalinu-D6. Analyt byl separován na koloně Discovery HS F5 (100 mm x 2,1 mm I.D., velikost částic 5 um, Supelco, PA, USA) a detekován pomocí hmotnostního spektrometru typu trojitého kvadrupólu Agilent 6490. Detekce se uskutečnila v pozitivním módu za využití elektrospreje a pro kvantitativní analýzu byly použity přechody iontů 160,2 > 55,1 pro pregabalin a 166,2 > 148,1 pro pregabalin-D6.

5.4.2.4 Levetiracetam

Koncentrace levetiracetamu byla stanovena na konci pokusu metodou modifikované vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí fotodiodovým paprskem (Lancelin F, et al., 2007). Po alkalizaci vzorku (0,05 ml 1M hydroxid sodný) byly levetiracetam standard

UCB 17025 extrahovány do dichlormethanu. Po odpaření organického rozpouštědla byl zbytek vzorku rozpuštěn a vstříknut pro HPLC analýzu. Sloučeniny byly separovány na koloně Zorbax SB-C8 (Agilent Technologies, USA) při průtoku 1,1 ml/min mobilní fáze. Mobilní fáze se skládala z 10 % acetonitrilu, 7 % methanolu a 83 % 20 mM fosfátového pufru pH 6,7 s 0,1 % triethylaminem. UV detekce probíhala při vlnové délce 200 nm.

5.4.3 Měření kostní minerální denzity

Na konci pokusu byla měřena kostní minerální hustota potkanů (BMD, g/cm^2) pomocí duální energetické rentgenové absorpciometrie (DXA) na přístroji Hologic Delphi A (Hologic, Waltham, MA, USA) v Osteologickém centru Fakultní nemocnice Hradec Králové. Před měřením byl proveden kalibrační sken s fantomem Hologic pro malé zvíře. V pokusu bylo vyhodnoceno BMD celého těla, v oblasti bederních obratlů a v oblasti femurů. Počítačem byla hodnocena také celková hmotnost svalové a tukové tkáně a procentuální zastoupení tukové tkáně pomocí příslušného softwarového programu pro malá zvířata (DXA; QDR-4500A Elite; Hologic, Waltham, MA, USA). Všechna zvířata byla měřena stejným operátorem.

5.4.4 Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

Na speciálním elektromechanickém testovacím stroji vyrobeném na zakázku (Martin Kosek &Pavel Trnečka, Hradec Králové, Česká republika) bylo provedeno mechanické testování kostní tkáně. K experimentu byly použity femury, které byly uskladněny v mrazícím boxu při -80 °C a postupně rozmraženy při pokojové teplotě. Materiál byl během testování zabalen v gáze s fyziologickým roztokem, aby byl chráněn před vysycháním. Před vlastním testováním odolnosti femuru v ohybu byla změřena jeho délka. Voděodolným fixem byl vyznačen střed diafýzy femuru a v této oblasti byl změřen průměr. Při testování mechanické odolnosti femuru pomocí tříbodového ohýbání kosti (three-point bending) byla kost umístěna na dva podpůrné body, vzdálené od sebe 18 mm. Nejprve byl femur zatížen malým stabilizačním napětím do 10 N k přesné fixaci polohy během lámání. Třetí bod, kterým byl nerezový váleček o průměru 7 mm, byl umístěn kolmo dolů na vyznačený střed diafýzy femuru. Femur byl testován v anteroposteriorním směru. Pomocí elektromotoru byl snižován nerezový váleček konstantní rychlostí 6 mm/min. Síla potřebná ke zlomení femuru byla zaznamenána pomocí snímací jednotky, která měřila maximální sílu vyvinutou na kost válečkem, než došlo ke zlomení kosti. Následně byla změřena tloušťka kompakty na distální části femuru ve směru lámání pomocí posuvného mikrometru (OXFORD 0-25MM 30DEG POINTED MICROMETER, Victoria Works, Leicester, Velká Británie).

K testování tlakové odolnosti krčku femuru byla využita proximální část femuru. Diafýza femuru byla ponořena do speciální nádobky se samopolymerující adhezivní pryskyřicí, a tím byla kost zafixována v kolmé poloze. Správná poloha kosti byla zajištěna pomocí na zakázku vyrobeného držáku. Vysychání hlavice a krčku femuru bylo zabráněno použitím navlhčené gázy fyziologickým roztokem. Pro vyvíjení tlaku na hlavici femuru byla využita na zakázku vyrobená nerezová tyčka se zakulaceným koncem o průměru 4 mm. Tato tyčka se pohybovala dolů konstantní rychlostí 6 mm/min. Pro zajištění stabilní polohy kosti byla opět zatížena hlavice femuru malým stabilizačním napětím do 10 N. Následně byla pomocí snímače změřena maximální síla (N) potřebná ke zlomení krčku femuru a tato hodnota byla zaznamenána na zobrazovací jednotce (Snímač tahové a tlakové síly BURSTER 8435-6005; Procesní

zobrazovací jednotka 9180-V3000, Burster praezisiosmesstechnik gmbh & co kg, Gernsbach, Německo).

5.4.5 Statistická analýza a vyhodnocení dat

Statistická analýza dat byla provedena na Oddělení výpočetní techniky pomocí programu NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, Utah, USA). Při porovnávání dvou skupin byl použit dvouvýběrový t-test s případnou Bonferroniho modifikací. V případě zamítnutí normality neparametrické testy Mann-Whitney test nebo Kolmogorov-Smirnov test. Výsledky jsou naměřeny po 12 týdnech pokusu a jsou vyjádřeny jako medián a 25. a 75. percentil. Hodnoty $p < 0,05$ a nižší byly považovány za signifikantní. Hladina významnosti byla zvolena $\alpha = 0,05$.

6. Výsledky

6.1 Vliv orchidektomie na kostní metabolismus u potkanů

Hmotnost, tělesná skladba

Nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly ve hmotnosti a zastoupení tukové a svalové tkáně mezi skupinou potkanů po podstoupené orchidektomii (ORX) versus skupinou potkanů, u kterých byl proveden pouze operační řez (SHAM).

Hladiny kostních markerů

Po 12 týdnech pokusu nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny markerů kostního obratu mezi skupinami.

Měření kostní minerální denzity

Hustota kostního minerálu byla měřena po 12 týdnech pokusu metodou DXA. Bylo zjištěno statisticky významné snížení BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů i obou femurů ve skupině potkanů po provedené orchidektomii (ORX).

Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

Při testování mechanické odolnosti kostní tkáně bylo zjištěno statisticky významné snížení průměru levého i pravého femuru u orchidektomovaných potkanů. Bylo potvrzeno statisticky významné snížení mechanická odolnosti levého a pravého femuru při tříbodovém ohýbání kosti.

6.2 Vliv zonisamidu na kostní metabolismus u potkanů

Hmotnost, tělesná skladba a hladina zonisamidu v séru

Hmotnost skupiny SHAM+ZNS byla snížena, ale statisticky nevýznamně oproti skupině SHAM. Po 12 týdnech podávání ZNS nedošlo k významnému zvýšení hmotnosti skupiny ORX+ZNS ve srovnání se skupinou ORX. DXA ukázala, že u skupiny SHAM+ZNS nedošlo k významnému snížení svalové tkáně (g) a tukové tkáně (%) oproti skupině SHAM. Ve skupině ORX+ZNS bylo zjištěno nevýznamnému zvýšení svalové tkáně (g) a snížení tukové tkáně (%) oproti skupině ORX.

Koncentrace ZNS odpovídala terapeutické hladině léčiva u člověka (10-40 mg/l).

Hladiny kostních markerů

Nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny kostních markerů mezi skupinou SHAM+ZNS oproti skupině SHAM a skupinou ORX+ZNS oproti skupině ORX.

Měření kostní minerální denzity

Po 12 týdnech podávání ZNS byla stanovena hustota kostního minerálu pomocí DXA. Ve skupině SHAM+ZNS nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl v hodnotách BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů nebo obou femurů oproti skupině SHAM. Ve skupině ORX+ZNS také nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v hodnotách BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů ani obou femurů oproti skupině ORX.

Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

Podávání ZNS po dobu 12 týdnů nevedlo k statisticky významnému rozdílu v hodnocených parametrech mezi skupinou SHAM+ZNS oproti skupině SHAM a skupinou ORX+ZNS oproti skupině ORX.

6.3 Vliv gabapentinu na kostní metabolismus u potkanů

Hmotnost, tělesná skladba a hladina gabapentinu v séru

Nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny hmotnosti, zastoupení tukové tkáně a svalové tkáně ve skupině SHAM+GBP versus skupinou SHAM. Nebyl pozorován statisticky významný rozdíl ve hmotnosti, zastoupení tukové tkáně a svalové tkáně ve skupině ORX+ GBP oproti skupině ORX.
Koncentrace gabapentinu ve skupině SHAM+GBP a ORX+GBP odpovídala terapeutickému rozmezí pro člověka 2-20 mg/l.

Hladiny kostních markerů

K posouzení vlivu léčby GBP na kostní obrat byly měřeny kostní markery. Ve skupině SHAM+GBP jsme nezjistili žádné statisticky významné změny markerů kostního obratu oproti skupině SHAM. Ve skupině ORX+GBP došlo k statisticky významnému zvýšení hladiny RANKL oproti skupině ORX. Ostatní hladiny kostních markerů ve skupině ORX+GBP nebyli statisticky významné.

Měření kostní minerální denzity

Po 12 týdnech podávání GBP byla stanovena hustota kostního minerálu pomocí DXA. Ve skupině SHAM+GBP nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů ani obou femurů oproti skupině SHAM. Ve skupině ORX+GBP nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů nebo obou femurů oproti skupině ORX.

Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

Bylo provedeno mechanické testování odolnosti levého a pravého femuru po podávání GBP po dobu 12 týdnů. Testování nevedlo k statisticky významnému rozdílu v hodnocených parametrech mezi skupinou SHAM+GBP oproti skupině SHAM a skupinou ORX+GBP oproti skupině ORX.

6.4 Vliv pregabalinu na kostní metabolismus u potkanů

Hmotnost, tělesná skladba a hladina pregabalinu v séru

Bylo pozorováno statisticky nevýznamné snížení hmotnosti ve skupině SHAM+PGB oproti skupině SHAM a ORX+PGB ve srovnání se skupinou ORX. Nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny v zastoupení tukové tkáně a svalové tkáně ve skupině SHAM+PGB a ORX+PGB oproti kontrolním skupinám.

Koncentrace pregabalinu v obou skupinách odpovídala terapeutickému rozmezí pro člověka 2-8 mg/l.

Hladiny kostních markerů

Po 12 týdnech byly měřeny markery kostního obratu. Ve skupině SHAM+PGB jsme zaznamenali statisticky významně zvýšenou hladinu sklerostinu oproti skupině SHAM. Ve skupině ORX+PGB došlo k statisticky významnému zvýšení hladiny RANKL oproti skupině ORX. Ostatní hladiny kostních markerů nevykazovaly statistickou významnost.

Měření kostní minerální denzity

Hustota kostního minerálu byla měřena po 12 týdnech podávání PGB. Ve skupině SHAM+PGB nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů ani obou femurů oproti skupině SHAM. Ve skupině ORX+PGB nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů nebo obou femurů oproti skupině ORX.

Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

Podávání PGB po dobu 12 týdnů nevedlo k statisticky významnému rozdílu v hodnocených parametrech mezi skupinou SHAM+PGB oproti skupině SHAM a skupinou ORX+PGB oproti skupině ORX.

6.5 Vliv levetiracetamu na kostní metabolismus u potkanů

Hmotnost, tělesná skladba a hladina levetiracetamu v séru

Hmotnost potkanů užívajících SLD s LEV byla na konci pokusu snížená, ale statisticky nevýznamně oproti kontrolním skupinám. Ve skupině SHAM+LEV bylo zjištěno statisticky významné snížení tukové tkáně (g, %), ne však svalové tkáně, oproti kontrolní skupině SHAM. Ve skupině ORX+LEV došlo k nevýznamnému poklesu svalové tkáně a snížení tukové tkáně oproti skupině ORX.

Koncentrace LEV odpovídala v obou skupinách terapeutickému rozmezí u člověka (35,3 – 235 μmol/l).

Hladiny kostních markerů

K posouzení vlivu léčby LEV na kostní obrat byly měřeny kostní markery. U skupiny potkanů SHAM+LEV došlo po 12 týdnech k staticky významnému zvýšení BALP a CTX-I. U skupiny ORX+LEV byly pozorovány statisticky významně zvýšené hladiny BALP, CTX-I a RANKL oproti kontrolní skupině orchidektomovaných potkanů (ORX).

Měření kostní minerální denzity

Hustota kostního minerálu byla měřena po 12 týdnech podávání LEV. Bylo zjištěno statisticky významné zvýšení BMD celého těla, a to jak ve skupině SHAM+LEV, tak i ve skupině ORX+LEV oproti kontrolním skupinám. Hodnoty BMD bederních obratlů, pravého a levého femuru nebyly statisticky významně změněné ve skupině SHAM+LEV a ORX+LEV oproti kontrolním skupinám.

Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

Podávání LEV po dobu 12 týdnů nevedlo k statisticky významnému rozdílu v hodnocených parametrech mezi skupinou SHAM+LEV oproti skupině SHAM a skupinou ORX+LEV oproti skupině ORX.

7. Diskuze

U pacientů užívajících AED "starší generace", zejména induktory enzymů cytochromu p450 (CYP450): karbamazepin, fenytoin, fenobarbital a primidon, bylo pozorováno snížení kostní minerální denzity (BMD), která je nejvýznamnějším prediktorem rizika zlomenin (Ko et at, 2020). U pacientů léčených novějšími AED, které neindukují enzymy, je méně pravděpodobné, že u nich bude diagnostikována osteoporóza. Většina studií o AED je průřezová. Existuje pouze několik longitudinálních studií s novějšími AED a jejich vlivem na kosti.

Sledování kvality kostní tkáně u lidí je do značné míry problematické, protože výsledky studií mohou být ovlivněny řadou rozličných faktorů, mezi které se řadí fyzická aktivita, strava, frekvence záchvatů, rozdíly ve výchozích hodnotách BMD mezi hodnocenými subjekty a užívání jiných AED v minulosti. Naproti tomu nám zvířecí model poskytuje systém, který je izolován od nemoci, životního stylu, léků a dalších matoucích faktorů.

7.1 Vliv orchidektomie na kostní metabolismus u potkanů

Byli porovnávány výsledky dvou skupin potkanů kmene Wistar, kdy jedna skupina potkanů podstoupila orchidektomii (ORX) a u druhé skupiny byl proveden pouze operační řez (SHAM). V důsledku orchidektomie jsme u potkanů po 12 týdnech porozovali statisticky významné snížení BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů, pravého a levého femuru. Provedená orchidektomie měla vliv na průměr pravého a levého femuru a způsobila sníženou mechanickou odolnost těchto kostí. Po provedené orchidektomii dochází k poklesu hladiny androgenů, které jsou nezbytné nejen pro vývoj kostí, ale i pro udržení kostní hmoty. Naše výsledky jsou v souladu se studií provedenou na myších, které byly vystaveny blokaci androgenních receptorů, což se projevilo výrazným poškozením mikrostruktury kostí a poklesem BMD (Chen et al, 2019). Také jiná studie na potkanech ukazuje, že deficience androgenů negativně ovlivňuje stavbu těla snížením celkové hmotnosti, nárůstem tělesného tuku a snížením BMD (Vanderschueren et al., 2000). Nejdůležitější androgeny jsou především testosteron a 5α-dihydrotestosteron (DHT), které ovlivňují lidskou kostru u mužů i žen. Testosteron působí na skelet anabolicky prostřednictvím přenosu signálu vazbou na androgenní receptor nebo přeměnou na 17- beta estradiol prostřednictvím enzymu aromatázy (z rodiny cytochromů P450), který se pak váže na estrogenové receptory. Jak estrogeny, tak testosteron mají receptory na všech kostních buňkách, přičemž androgenní receptory dominují na osteoblastech a osteocytech. Androgeny zvyšují proliferaci, diferenciaci osteoblastů a podílejí se na regulaci mineralizace kostní tkáně. Androgeny také regulují aktivitu osteoklastů (Leder et al., 2020). U dospělých jsou stavy androgenní deprivace spojeny s významným snížením minerální kostní hustoty. Se stárnutím dochází k poklesu biologicky dostupných hladin testosteronu i estradiolu, částečně v důsledku zvýšené produkce globulinu vázajícího pohlavní hormony. Pokles hladin androgenů je paralelní s poklesem kortikální i trabekulární hustoty kostního minerálu, s čímž souvisí zvýšení rizika zlomenin ve srovnání s běžnou populací (Leder et al., 2020).

Naše výsledky potvrzují dostupná fakta, že deficit androgenů u rostoucích potkanů negativně ovlivňuje vývoj kostí. Mladý potkan ve vývinu po provedené orchidektomii může být považován za vhodný zvířecí model pro studium osteopenie.

7.2 **Vliv zonisamidu na kostní metabolismus u potkanů**

V tomto pokusu nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny BMD ve skupině ORX+ZNS versus skupina ORX a skupina SHAM+ZNS ve srovnání se skupinou SHAM. Důkazy týkající se vlivu ZNS na BMD a kostní metabolismus jsou omezené. V literatuře je zatím uvedeno jen málo a rozporuplných údajů o této problematice. Ve studii Takahashi et al., vedlo podávání ZNS v dávce 80 mg/kg denně subkutánně po dobu 5 týdnů k významnému snížení hodnoty BMD tibie i femuru u potkanů. Jejich výsledky naznačují, že ZNS může způsobovat úbytek kostní hmoty u zvířecího modelu. Na rozdíl od předchozích výsledků, nebyl v naší studii zjištěn negativní vliv ZNS na hodnotu BMD. Na konci našeho pokusu byla hladina ZNS ve skupině ORX+ZNS 24,00 mg/l a ve skupině SHAM+ZNS 25,13 mg/l, což odpovídá terapeutickým hladinám léku (10-40 mg/l). Možnost porovnání výsledků obou studií je omezená, protože neznáme jejich sérovou koncentraci ZNS. V literatuře se popisuje, že AED mají bifázický účinek na kosti v závislosti na dávce. Snížená biomechanická pevnost trabekulární kosti a snížené hladiny sérového osteokalcinu, markeru tvorby kosti, byly pozorovány při nízké dávce levetiracetamu (koncentrace 122 ± 41 μmol/l), ale nikoliv při podávání vysoké dávky levetiracetamu (koncentrace 277 ± 65 μmol/l) (Nissen-Meyer et al., 2008). Také fenytoin (PTH) vykazuje na dávce závislý účinek na kost. Zatímco terapeutické dávky PHT jsou spojeny s urychlením úbytku BMD, nízké dávky tohoto léku mají osteogenní účinek (Pack, 2008). Nelze vyloučit, že i ZNS může ovlivňovat kost v závislosti na jeho dávce. V naší studii jsou výsledky v souladu se studií Koo et al., která byla hodnocena na lidech (Koo et al, 2020). Byly zkoumány účinky ZNS na BMD a biomarkery kostního metabolismu po 13 měsících léčby u pacientů s epilepsií. Monoterapie ZNS neměla škodlivé účinky na zdraví kostí. Zkoumali jsme také vliv ZNS na mechanickou odolnost kostní tkáně. Po 12 týdnech podávání ZNS jsme nezaznamenali statisticky významný rozdíl v parametrech mezi skupinou ORX+ZNS oproti skupině ORX a skupinou SHAM+ZNS oproti skupině SHAM. Výsledky našeho pokusu naznačují, že ZNS nemá negativní vliv na pevnost kostí. Studie Koo et al. rovněž prezentuje, že monoterapie ZNS nemá negativní vliv na kostní metabolismus a pevnost kostí (Koo et al, 2020).

Mechanismus účinku působení ZNS na kost je stále nejasný. ZNS je slabým inhibitorem karboanhydrázy, což vede k renální acidóze, která může mít za následek sekundární abnormality na kosti (Pack et al., 2008). TPM stejně jako ZNS je inhibitorem karboanhydrázy. Ve studii Simko et al. bylo prokázáno, že monoterapie TPM po dobu 12 týdnů u orchidektomovaných potkanů měla negativní vliv na BMD a snižovala mechanickou pevnost kosti (Simko et al, 2014). Existují i další studie, které podporují riziko vlivu TPM na kostní tkáň a abnormální BMD (Zhang et al., 2010, Coppola et al., 2009).

V předchozí studii Takahashiho et al., léčba ZNS významně zvýšila sérovou hladinu pyridinolinu, markeru kostní resorpce, zatímco sérová hladina osteokalcinu, markeru kostní formace, nebyla ovlivněna. Tato zjištění naznačují, že na modelu potkanů může ZNS způsobovat úbytek kostní hmoty spíše urychlením kostní resorpce než inhibicí kostní formace (Takahashi et al., 2003). V jiné studii na lidech se však markery kostní formace (BALP a OC) a marker kostní resorpce (C-telopeptid) po 13 měsících léčby ZNS významně nezměnily (Koo et al, 2020). V tomto pokusu jsme stanovili několik markerů kostní formace a kostní resorpce.

Zjištěné výsledky naznačují, že léčba ZNS gonadálně intaktních potkanů a potkanů po orchidektomii po dobu 12 týdnů vedla k statisticky nevýznamným změnám v markerech kostní formace a kostní resorpce.

Závěrem lze říci, že experimentální výsledky našeho pokusu naznačují, že dlouhodobé podávání ZNS u orchidektomovaných potkanů a gonadálně intaktních potkanů nemá negativní vliv na hodnoty BMD, markery kostního metabolismu ani mechanickou odolnost kostní tkáně.

7.3 Vliv gabapentinu a pregabalinu (gabapentinoidů) na kostní metabolismus u potkanů

Po 12 týdnech podávání GBP a PGB nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny BMD ani mechanické odolnosti pravého a levého femuru u gonadálně intaktních potkanů, ani u orchidektomovaných potkanů. Nebyly pozorovány žádné změny markerů kostního obratu s výjimkou RANKL, markeru odrážejícího aktivitu osteoklastů, ve skupině ORX+GBP a ORX+PGB. Ve skupině SHAM+PGB byl zjištěn statisticky významně zvýšený sklerostin oproti skupině SHAM. V případě GBP se naše zjištění shodují se studií Kandy et al., která neprokázala žádné významné změny v BMD, mechanické pevnosti kostí nebo kostních markerech u zvířat vystavených nižším dávkám GBP (30 mg/ kg) (Kanda et al., 2017). Bohužel v této studii nedošlo ke stanovení sérových hladin GBP. V naší studii byly sérové hladiny GBP relativně nízké. Medián a mezikvartilové rozmezí sérových hladin GBP u gonadálně intaktních a orchidektomovaných potkanů byly 8,9 (8,5-9,6) mg/l, resp. 7,8 (7,0-8,4) mg/l. Na základě farmakokinetických údajů získaných po perorálním podání GBP (Aryal et al., 2011) lze předpokládat, že hladiny GBP zjištěné v naší studii nebyly vyšší než hladiny dosažené po perorálním podání GBP v dávce 30 mg/kg a výsledky obou studií jsou srovnatelné. Účinek GBP na kosti je pravděpodobně závislý na dávce. Vystavení vyšším dávkám GBP (150 mg/kg) vedlo k významnému snížení osteokalcinu (marker kostní formace) a zvýšení tartrát-rezistentní kyselé fosfatázy 5b (marker kostní resorpce). BMD a mechanická pevnost kosti nebyly v této studii ovlivněny, ale histomorfometrické analýzy ukázaly negativní změny, včetně snížení objemu kosti, objemu osteoidu a zvýšení počtu osteoklastů (Kanda et al., 2017).

Naše výsledky, které ukazují posun v hladinách RANKL u potkanů po orchidektomii, naznačují, že riziko negativních účinků GBP nebo PGB na kost může záviset na hormonálním stavu zvířat. Nedostatek pohlavních hormonů má škodlivé účinky na kostní tkáň. Ačkoli základní mechanismy negativního vlivu GBP a PGB na kost jsou nejasné. O účincích gabapentinoidů na hladinu sklerostinu nejsou k dispozici žádné údaje. V naší studii jsme u gonadálně intaktních zvířat pozorovali zvýšení sklerostinu ve skupině PGB. Sklerostin je důležitým parakrinním regulátorem kostní hmoty a může mít katabolické účinky prostřednictvím inhibice funkce osteoblastů a zároveň stimulace funkce osteoklastů (Delgado-Calle et al., 2017). V naší studii však změna hladiny sklerostinu nebyla spojena s významnými změnami BMD nebo mechanické pevnosti kosti. Můžeme pouze spekulovat, že změny obou výše zmíněných biochemických markerů předcházejí pozdějším změnám BMD a mechanické odolnosti kosti. Vzhledem k nekonzistentnosti účinků AED na markery kostního obratu a špatné nebo neexistující korelaci mezi BMD a mechanickou pevností kosti je histomorfometrická analýza kosti jedním z relevantních diagnostických nástrojů pro správné a komplexní posouzení rizika antiepileptik pro zdraví kostí (Kanda et al., 2017; Nissen-Meyer et al., 2007).

Vyvstává otázka, zda je 12 týdnů dlouhá expozice gabapentinoidům dostatečná k tomu, aby došlo k změnám BMD nebo mechanické pevnosti kostí. Kanda et al. (Kanda et al., 2017) považovali tento interval za příliš krátký a diskutovali o něm jako o jednom z omezení své studie. Na základě údajů od Sengupty (Sengupta, 2013) však jeden měsíc života potkana přibližně odpovídá třem lidským rokům. Doba sledování v naší studii a ve studii Kanda et al. (Kanda et al., 2017) byla tedy srovnatelná s přibližně devíti lidskými roky. Usoudili jsme, že interval 12 týdnů podávání GBP a PGB by měl být dostatečný k posouzení vlivu AED na BMD nebo mechanickou pevnost kostí na modelu potkanů. Vzhledem k tomu, že ani nízké, ani vysoké dávky GBP neměly vliv na BMD nebo mechanickou pevnost kostí, lze GBP považovat za léčivo s nižším rizikem pro zdraví kostí ve srovnání s AED, která jsou induktory jaterních enzymů.

Námi zjištěné výsledky ohledně PGB jsou v souladu se studií Akin et al., která nezaznamenala negativní vliv PGB na kostní metabolismus a BMD. Do studie bylo zahrnuto 40 jedinců užívajících PGB déle než 6 měsíců a výsledky byly porovnány se 40 zdravými lidmi. Byly měřeny kostní markery-ALP, osteokalcin a CTX-I a BMD pomocí DXA. Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v BMD bederní páteře a krčku femuru ani žádné rozdíly v biochemických markerech mezi těmito dvěma skupinami. Pacienti užívající PGB méně než 24 měsíců, měli nižší hodnoty T a Z skóre v oblasti bederní páteře než pacienti, kteří PGB užívali déle než 24 měsíců. Tento efekt byl výraznější u pacientů mužského pohlaví (Akin et al., 2022).

V naší studii GBP ani PGB neovlivňovaly BMD ani mechanickou pevnost kostí, lze je považovat za léky s nižším rizikem pro zdraví kostí. Na základě hodnocení hladin RANKL, je možné naznačit, že účinek GBP a PGB na aktivitu osteoklastů může být závislý na hormonálním stavu zvířat. Nelze vyloučit, že u zvířat s nedostatkem pohlavních hormonů existuje vyšší riziko ztráty kostní hmoty po expozici GBP a PGB.

7.4 **Vliv levetiracetamu na kostní metabolismus u potkanů**

Na modelu orchidektomovaných potkanů bylo zjištěno, že dlouhodobá léčba LEV významně zvýšila BMD celého těla. Dále byl zjištěný významný vzestup kostních markerů-BALP, CTX-I a RANKL. Nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v mechanické odolnosti kosti. Během pokusu došlo k nevýznamnému snížení absolutní i relativní hodnoty tukové tkáně a svalové tkáně. Na modelu potkanů, u kterých byl proveden pouze operační řez bylo po 12 týdnech užívání LEV naměřeno statisticky významné zvýšení BMD celého těla. Naměřili jsme statisticky významné zvýšení markeru kostní formace-BALP, tak i markeru kostní resorpce CTX-I. Nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny v odolnosti kosti oproti skupině SHAM. Bylo potvrzeno významné snížení tukové tkáně v porovnání se skupinou SHAM.

Naše výsledky jsou v souladu se studií na zvířatech provedenou Anwarem et al., ve které nebyl zjištěn žádný vliv LEV na BMD u myších samic po 4 měsících perorálního podávání léku (Anwar et al., 2014). Ve studii Kanda et al, perorální podávání LEV potkanům po dobu 12 týdnů neovlivnilo BMD a kostní metabolismus (Kanda et al, 2017). Naměřené hodnoty BMD jsou také srovnatelné s další studií Nissen-Meyer et al. Jejich výsledky naznačují, že LEV by mohl mít na kosti dvoufázový účinek. Při nízké dávce LEV (koncentrace 122 ± 41 µmol/l) byla pozorována snížená mechanická odolnost trabekulární kosti a snížené hladiny sérového osteokalcinu, ale nikoliv při podání vysoké dávky LEV (koncentrace 277 ± 65 µmol/l) (Nissen-Meyer et al., 2008). V našem experimentu byla sérová hladina LEV 225,35 µmol/l (215, 23 - 235,25 µmol/l) ve skupině SHAM+LEV a 197,75 35 µmol/l (188,4- 210,23 µmol/l) ve skupině ORX+LEV, což je srovnatelné s vysokou dávkou LEV ve studii Nissena-Meyera. Také některé

studie u lidí naznačují, že expozice LEV nemá negativní vliv na BMD. Pacienti užívající novější AED neindukující enzymy (včetně LEV) mají vyšší hodnoty T-skóre (hodnotila se oblast kyčle, krčku stehenní kosti a bederní páteře) a menší pravděpodobnost vzniku osteoporézy (Artemiadis et al., 2016). Phabphal et al. uvádí, že u všech pacientů, kteří přešli z užívání fenytoinu na LEV, došlo k významnému zlepšení BMD (Phabphal et al., 2013). Jiná studie naopak naznačila, že pacienti dlouhodobě léčení LEV mají vyšší riziko poklesu BMD; validita této studie je však omezená, protože chybí měření výchozí hodnoty BMD před léčbou LEV (Beniczky et al., 2012). Zajímavé výsledky přinesla i průřezová studie Gozükızıl et al., která hodnotila u 47 lidí vliv LEV na BMD v oblasti bederní páteře v závislosti na délce užívání tohoto léku. Jejich studie navrhuje, že LEV může mít negativní vliv na kostní denzitu v bederní oblasti při krátkodobém podávání, po dobu kratší než jeden rok. Při dlouhodobé léčbě nebyl pozorován žádný negativní vliv na kostní metabolismus. Vyhodnocení výsledků po jednoročním a více než pětiletém užívání LEV neprokázaly žádný statisticky významný rozdíl (Gozükızıl et al., 2022). Naše výsledky odpovídají dlouhodobému užívání LEV, protože jeden měsíc života potkana lze přirovnat k třem lidským rokům (Sengupta, 2013).

V obou skupinách ORX+LEV a SHAM+LEV bylo pozorováno významné zvýšení markerů kostní formace i markeru kostní resorpce, což svědčí o zrychleném kostním obratu, který neměl vliv na mechanickou odolnost kosti. Ohledně vlivu LEV na markery kostního obratu (BTM), jsou údaje nejednotné. Studie Koo et al. prezentuje, že po monoterapii LEV po dobu 1 roku nebyly pozorovány žádné rozdíly v biochemických parametrech (BALP, C-telopeptid, inzulinu podobný růstový faktor-1, vápník, fosfor, parathormon, osteokalcin, 25-hydroxyvitamin D) (Koo et al., 2013). Podobně ve studii Anwar et al. nebyly zjištěny žádné významné změny BTM u myších samic (Anwar et al., 2014). Další studie testovala, zda má substituce LEV menší nežádoucí účinky na kosti než starší generace AED (valproát, karbamazepin). U pacientů léčených starší generací AED došlo ke snížení sérových hladin CTX-I a PINP, u pacientů užívajících LEV došlo ke snížení sérových hladin CTX-I, což svědčí o snížené kostní resorpci (Hakami et al., 2016).

LEV je považován za hmotnostně neutrální AED (Gidal et al., 2003). Je obtížné vysvětlit významný absolutní a relativní pokles tukové tkáně, který jsme pozorovali u skupiny potkanů SHAM+LEV. Výsledek je překvapivý, literární údaje uvádějí významný pokles hladiny estradiolu po podání LEV (Svalheim et al.,2008; Cincioğlu-Palabiyik et al., 2017). Za očekávaný důsledek nedostatku estrogenů bychom měli očekávat přírůstek hmotnosti v důsledku akumulace tukové tkáně, který je pozorován u lidí i hlodavců (Kim et al., 2014). Nelze vyloučit, že námi zjištěné snížení tukové tkáně mohlo být způsobeno sníženým množstvím přijímané stravy u skupiny SHAM+LEV. Spotřeba krmiva mezi skupinami se významně nelišila, ale nemůžeme vyvrátit, že zbytky neúplně zkonzumovaných granulí v podestýlce nebyly vyšší u skupiny SHAM+LEV v porovnání se skupinou SHAM.

Dlouhodobé podávání LEV u modelu gonadálně intaktních potkanů a u potkanů po orchidektomii nemělo negativní vliv na BMD a mechanickou odolnost kosti. Významné zvýšení BMD může naznačovat dokonce pozitivní vliv na vlastnosti kostí.

8. Závěr

Cílem disertační práce bylo posouzení vlivu vybraných nových antiepileptik na kostní metabolismus u mladých potkanů kmene Wistar.

1) Posoudit vliv orchidektomie na kostní metabolismus u potkanů.

Zjistili jsme negativní vliv provedené orchidektomie potkanů na kostní tkáň po 12 týdnech. U orchidektomovaných potkanů bylo pozorováno statisticky významné snížení BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů, pravého a levého femuru. Provedená orchidektomie měla vliv na mechanickou odolnost kostí.

Mladý potkan po provedené orchidektomii může být považován za vhodným zvířecí model pro studium osteopenie.

2) Posoudit vliv nových antiepileptik (zonisamidu, gabapentinu, pregabalinu a levetiracetamu) na kostní metabolismus u potkanů.

Zonisamid

Po 12 týdnech podávání ZNS orchidektomovaným potkanům a gonadálně intaktním potkanům nebyl potvrzen žádný negativní vliv na BMD, markery kostního metabolismu ani mechanickou odolnost kostní tkáně.

Dlouhodobé podávání ZNS lze považovat za méně rizikové z hlediska zdraví kostí.

Gabapentin

Po 12 týdnech podávání GBP potkanům po provedené orchidektomii byl zjištěn významný vzestup markeru kostního obratu RANKL. U gonadálně intaktních potkanů nebyly potvrzeny žádné významné změny kostních markerů. Nebyl zjištěn žádný statisticky významný vliv GBP na BMD ani mechanickou odolnost kostí u gonadálně intaktních potkanů, ani u orchidektomovaných potkanů.

Dlouhodobé podávání GBP lze považovat za méně rizikové z hlediska zdraví kostí.

Pregabalin

Po 12 týdnech podávání PGB potkanům po provedené orchidektomii byl zjištěn významný vzestup markeru kostního obratu RANKL. Bylo pozorováno statisticky významné zvýšení kostního markeru sklerostinu u gonadálně intaktních potkanů. Nebyl potvrzen žádný statisticky významný vliv PGB na BMD ani mechanickou odolnost kostí u gonadálně intaktních potkanů a u orchidektomovaných potkanů.

Dlouhodobé podávání PGB lze považovat za méně rizikové z hlediska zdraví kostí.

Levetiracetam

Po 12 týdnech podávání LEV potkanům po provedené orchidektomii byl zjištěn významný vzestup kostních markerů-BALP, CTX-I a RANKL. U gonadálně intaktních potkanů bylo po 12 týdnech užívání LEV naměřeno statisticky významné zvýšení kostních markerů BALP a CTX-I. Nebyl zjištěn vliv LEV na BMD a mechanickou odolnost kostí u modelu gonadálně intaktních potkanů ani u potkanů po orchidektomii. Významné zvýšení BMD celého těla v obou skupinách může naznačovat dokonce pozitivní vliv na vlastnosti kostí.

Dlouhodobé podávání LEV lze považovat za méně rizikové z hlediska zdraví kostí.

9. Seznam použité literatury

Akin B, Kelle B, Kozanoglu E. The Effect of Pregabalin on Bone Metabolism. J Clin Densitom. 2022 Apr-Jun;25(2):223-229. doi: 10.1016/j.jocd.2021.05.001. Epub 2021 May 12. PMID: 34120834.

Al-Bari AA, Al Mamun A. Current advances in regulation of bone homeostasis. FASEB Bioadv. 2020;2(11):668-679. Published 2020 Sep 19. doi:10.1096/fba.2020-00058

Anwar MJ, Radhakrishna KV, Vohora D. Phenytoin and sodium valproate but not levetiracetam induce bone alterations in female mice. Can J Physiol Pharmacol. 2014;92(6):507-511. doi:10.1139/cjpp-2013-0504

Appelman-Dijkstra NM, Papapoulos SE. Modulating Bone Resorption and Bone Formation in Opposite Directions in the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. Drugs. 2015;75(10):1049-1058. doi:10.1007/s40265-015-0417-7

Arora E, Singh H, Gupta YK. Impact of antiepileptic drugs on bone health: Need for monitoring, treatment, and prevention strategies. J Family Med Prim Care. 2016;5(2):248-253. doi:10.4103/2249-4863.192338

Artemiadis AK, Lambrinoudaki I, Voskou P, et al. Preliminary evidence for gender effects of levetiracetam monotherapy duration on bone health of patients with epilepsy. Epilepsy Behav. 2016;55:84-86. doi:10.1016/j.yebeh.2015.12.025

Aryal B, Tae-Hyun K, Yoon-Gyoon K, Hyung-Gun K. A comparative study of the pharmacokinetics of traditional and automated dosing/blood sampling systems using gabapentin. Indian J Pharmacol. 2011 May;43(3):262-9. doi: 10.4103/0253-7613.81512. PMID: 21713088; PMCID: PMC3113376.

Balogh E, Paragh G, Jeney V. Influence of Iron on Bone Homeostasis. Pharmaceuticals. 2018; 11(4):107.

Barnsley J, Buckland G, Chan PE, et al. Pathophysiology and treatment of osteoporosis: challenges for clinical practice in older people. Aging Clin Exp Res. 2021;33(4):759-773. doi:10.1007/s40520-021-01817-y

Beniczky SA, Viken J, Jensen LT, Andersen NB. Bone mineral density in adult patients treated with various antiepileptic drugs. Seizure. 2012;21(6):471-472. doi:10.1016/j.seizure.2012.04.002

Brady JJ, McGoldrick D, O'Callaghan K, et al. Bone alkaline phosphatase on the IDS-iSYS automated analyser; cross-reactivity with intestinal ALP. Clin Chem Lab Med. 2019;57(8):e186-e188. doi:10.1515/cclm-2018-0991

Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. Cell Signal. 2011;23(4):609-620. doi:10.1016/j.cellsig.2010.10.003

Brandi ML. Microarchitecture, the key to bone quality. Rheumatology (Oxford). 2009;48 Suppl 4:iv3-iv8. doi:10.1093/rheumatology/kep273

Buck DW 2nd, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. Plast Reconstr Surg. 2012;129(6):1314-1320. doi:10.1097/PRS.0b013e31824eca94

Cincioğlu-Palabiyik M, Üner M, Ertoy-Baydar D, Sara Y, Karahan H, Kelicen-Uğur P. Chronic levetiracetam decreases hippocampal and testicular aromatase expression in normal but not

kainic acid-induced experimental model of acute seizures in rats. Neuroreport. 2017;28(14):903-909. doi:10.1097/WNR.0000000000000843

Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Osteoporosis. Lancet. 2019;393(10169):364-376. doi:10.1016/S0140-6736(18)32112-3

Coppola G, Fortunato D, Auricchio G, et al. Bone mineral density in children, adolescents, and young adults with epilepsy. Epilepsia. 2009;50(9):2140-2146. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02082.x

Cowan PT, Kahai P. Anatomy, Bones. [Updated 2022 Jul 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan.

Delgado-Calle J, Sato AY, Bellido T. Role and mechanism of action of sclerostin in bone. Bone. 2017 Mar;96:29-37. doi: 10.1016/j.bone.2016.10.007. Epub 2016 Oct 12. PMID: 27742498; PMCID: PMC5328835.

Derry S, Bell RF, Straube S, Wiffen PJ, Aldington D, Moore RA. Pregabalin for neuropathic pain in adults. Cochrane Database Syst Rev. 2019;1(1):CD007076. Published 2019 Jan 23. doi:10.1002/14651858.CD007076.pub3

Dobbs MB, Buckwalter J, Saltzman C. Osteoporosis: the increasing role of the orthopaedist. Iowa Orthop J. 1999;19:43-52.

Eastell R, Szulc P. Use of bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis. Lancet Diabetes Endocrinol. 2017;5(11):908-923. doi:10.1016/S2213-8587(17)30184-5

Erbaş O, Oltulu F, Yılmaz M, Yavaşoğlu A, Taşkıran D. Neuroprotective effects of chronic administration of levetiracetam in a rat model of diabetic neuropathy. Diabetes Res Clin Pract. 2016;114:106-116. doi:10.1016/j.diabres.2015.12.016

Feng J, Meng Z. Insulin growth factor-1 promotes the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through the Wnt/β-catenin pathway. Exp Ther Med. 2021;22(2):891. doi:10.3892/etm.2021.10323

Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. Annu Rev Pathol. 2011;6:121-145. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130203

Fernandez-Lopez L, Mancini R, Pellegrini M, Concetta Rotolo M, Luna A, Falcon M. Postmortem analysis of quetiapine and pregabalin in human bone. Leg Med (Tokyo). 2020;46:101717. doi:10.1016/j.legalmed.2020.101717

Gidal BE, Sheth RD, Magnus L, Herbeuval AF. Levetiracetam does not alter body weight: analysis of randomized, controlled clinical trials. Epilepsy Res. 2003;56(2-3):121-126. doi:10.1016/j.eplepsyres.2003.08.009

Gillett MJ, Vasikaran SD, Inderjeeth CA. The Role of PINP in Diagnosis and Management of Metabolic Bone Disease. Clin Biochem Rev. 2021;42(1):3-10. doi:10.33176/AACB-20-0001

Goel A, Sugumaran R, Narayan SK. Zonisamide in Parkinson's disease: a current update. Neurol Sci. 2021;42(10):4123-4129. doi:10.1007/s10072-021-05550-2

Gözükızıl ST, Aydın Z, Yalçın AD. Relationship between bone density and levetiracetam monotherapy in epilepsy patients. Clin Neurol Neurosurg. 2022;218:107270. doi:10.1016/j.clineuro.2022.107270

Grabowski P. Physiology of bone. Endocr Dev. 2009;16:32-48. doi:10.1159/000223687

Greenblatt HK, Greenblatt DJ. Gabapentin and Pregabalin for the Treatment of Anxiety Disorders. Clin Pharmacol Drug Dev. 2018;7(3):228-232. doi:10.1002/cpdd.446

Guo Y, Lin Z, Huang Y, Yu L. Effects of valproate, lamotrigine, and levetiracetam monotherapy on bone health in newly diagnosed adult patients with epilepsy. Epilepsy Behav. 2020;113:107489. doi:10.1016/j.yebeh.2020.107489

Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. Ann N Y Acad Sci. 2006;1092:385-396. doi:10.1196/annals.1365.035

Hakami T, O'Brien TJ, Petty SJ, et al. Monotherapy with Levetiracetam Versus Older AEDs: A Randomized Comparative Trial of Effects on Bone Health. Calcif Tissue Int. 2016;98(6):556-565. doi:10.1007/s00223-016-0109-7

Hakami T, O'Brien TJ, Petty SJ, Sakellarides M, Christie J, Kantor S, Todaro M, Gorelik A, Seibel MJ, Yerra R, Wark JD. Monotherapy with Levetiracetam Versus Older AEDs: A Randomized Comparative Trial of Effects on Bone Health. Calcif Tissue Int. 2016 Jun;98(6):556-65. doi: 10.1007/s00223-016-0109-7. Epub 2016 Feb 3. PMID: 26842957.

Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. Ann Clin Biochem. 2014;51(Pt 2):189-202. doi:10.1177/0004563213515190

Chappard D, Baslé MF, Legrand E, Audran M. Trabecular bone microarchitecture: a review. Morphologie. 2008;92(299):162-170. doi:10.1016/j.morpho.2008.10.003

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. Growth Factors. 2004;22(4):233-241. doi:10.1080/08977190412331279890

Chen JF, Lin PW, Tsai YR, Yang YC, Kang HY. Androgens and Androgen Receptor Actions on Bone Health and Disease: From Androgen Deficiency to Androgen Therapy. Cells. 2019;8(11):1318. Published 2019 Oct 25. doi:10.3390/cells8111318

Chin KY, Ng BN, Rostam MKI, et al. A Mini Review on Osteoporosis: From Biology to Pharmacological Management of Bone Loss. J Clin Med. 2022;11(21):6434. Published 2022 Oct 30. doi:10.3390/jcm11216434

Jarvie D, Mahmoud SH. Therapeutic Drug Monitoring of Levetiracetam in Select Populations. J Pharm Pharm Sci. 2018;21(1s):149s-176s. doi:10.18433/jpps30081

Jongeling AC, Richins RJ, Bazil CW. Safety and tolerability of an oral zonisamide loading dose. Seizure. 2015;32:69-71. doi:10.1016/j.seizure.2015.09.012

Kanda J, Izumo N, Kobayashi Y, Onodera K, Shimakura T, Yamamoto N, Takahashi HE, Wakabayashi H. Effects of the Antiepileptic Drugs Phenytoin, Gabapentin, and Levetiracetam on Bone Strength, Bone Mass, and Bone Turnover in Rats. Biol Pharm Bull. 2017;40(11):1934-1940. doi: 10.1248/bpb.b17-00482. PMID: 29093341.

Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Melton LJ 3rd, Khaltaev N. A reference standard for the description of osteoporosis. Bone. 2008;42(3):467-475. doi:10.1016/j.bone.2007.11.001

Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016;8(6):a021899. Published 2016 Jun 1. doi:10.1101/cshperspect.a021899

Kelly RR, Sidles SJ, LaRue AC. Effects of Neurological Disorders on Bone Health. Front Psychol. 2020;11:612366. Published 2020 Nov 30. doi:10.3389/fpsyg.2020.612366

Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. Ann Clin Biochem. 2018;55(3):308-327. doi:10.1177/0004563218759371

Kim JH, Cho HT, Kim YJ. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. Endocr J. 2014;61(11):1055-1067. doi:10.1507/endocrj.ej14-0262

Kim JH, Liu X, Wang J, Chen X, Zhang H, Kim SH, Cui J, Li R, Zhang W, Kong Y, Zhang J, Shui W, Lamplot J, Rogers MR, Zhao C, Wang N, Rajan P, Tomal J, Statz J, Wu N, Luu HH, Haydon RC, He TC. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. Ther Adv Musculoskelet Dis. 2013 Feb;5(1):13-31. doi: 10.1177/1759720X12466608. PMID: 23514963; PMCID: PMC3582304.

Ko A, Kong J, Samadov F, et al. Bone health in pediatric patients with neurological disorders. Ann Pediatr Endocrinol Metab. 2020;25(1):15-23. doi:10.6065/apem.2020.25.1.15

Koo DL, Joo EY, Kim D, Hong SB. Effects of levetiracetam as a monotherapy on bone mineral density and biochemical markers of bone metabolism in patients with epilepsy. Epilepsy Res. 2013;104(1-2):134-139. doi:10.1016/j.eplepsyres.2012.09.002

Koo DL, Nam H. Effects of zonisamide monotherapy on bone health in drug-naive epileptic patients. Epilepsia. 2020;61(10):2142-2149. doi:10.1111/epi.16678

Kuba R. Nová antiepileptika v klinické praxi. Neurol. pro praxi, 2006;1: 36–42.

Kwan SY, Chuang YC, Huang CW, Chen TC, Jou SB, Dash A. Zonisamide: Review of Recent Clinical Evidence for Treatment of Epilepsy. CNS Neurosci Ther. 2015;21(9):683-691. doi:10.1111/cns.12418

Lademann F, Hofbauer LC, Rauner M. The Bone Morphogenetic Protein Pathway: The Osteoclastic Perspective. Front Cell Dev Biol. 2020;8:586031. Published 2020 Oct 16. doi:10.3389/fcell.2020.586031

Langdahl B, Ferrari S, Dempster DW. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. Ther Adv Musculoskelet Dis. 2016;8(6):225-235. doi:10.1177/1759720X16670154

Leder, B. Z., & Wein, M. N. (Eds.). (2020). Osteoporosis. Contemporary Endocrinology. doi:10.1007/978-3-319-69287-6

Lee HJ, Son JM, Mun J, Kim DW. Safety and Efficacy of Zonisamide in Patients with Epilepsy: A Post-Marketing Surveillance Study. J Epilepsy Res. 2015;5(2):89-95. Published 2015 Dec 31. doi:10.14581/jer.15015

Lee JY, Yang JY, Kim SW. Bone Lining Cells Could Be Sources of Bone Marrow Adipocytes. Front Endocrinol (Lausanne). 2021;12:766254. Published 2021 Dec 3. doi:10.3389/fendo.2021.766254

Lee SC, Hsiao JK, Yang YC, et al. Insulin-like growth factor-1 positively associated with bone formation markers and creatine kinase in adults with general physical activity. J Clin Lab Anal. 2021;35(8):e23799. doi:10.1002/jcla.23799

Lewiecki EM. Role of sclerostin in bone and cartilage and its potential as a therapeutic target in bone diseases. Ther Adv Musculoskelet Dis. 2014;6(2):48-57. doi:10.1177/1759720X13510479

Lin X, Patil S, Gao YG, Qian A. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. Front Pharmacol. 2020;11:757. Published 2020 May 26. doi:10.3389/fphar.2020.00757

Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Monnouchi S, Akamine A. Prospective potency of TGF-β1 on maintenance and regeneration of periodontal tissue. Int Rev Cell Mol Biol. 2013;304:283-367. doi:10.1016/B978-0-12-407696-9.00006-3

Mathieson S, Lin CC, Underwood M, Eldabe S. Pregabalin and gabapentin for pain. BMJ. 2020;369:m1315. Published 2020 Apr 28. doi:10.1136/bmj.m131

Moser SC, van der Eerden BCJ. Osteocalcin-A Versatile Bone-Derived Hormone. Front Endocrinol (Lausanne). 2019;9:794. Published 2019 Jan 10. doi:10.3389/fendo.2018.00794

Nissen-Meyer LS, Svalheim S, Taubøll E, Gjerstad L, Reinholt FP, Jemtland R. How can antiepileptic drugs affect bone mass, structure and metabolism? Lessons from animal studies. Seizure. 2008;17(2):187-191. doi:10.1016/j.seizure.2007.11.024

Nissen-Meyer LS, Svalheim S, Taubøll E, Reppe S, Lekva T, Solberg LB, Melhus G, Reinholt FP, Gjerstad L, Jemtland R. Levetiracetam, phenytoin, and valproate act differently on rat bone mass, structure, and metabolism. Epilepsia. 2007 Oct;48(10):1850-60. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01176.x. Epub 2007 Jul 18. PMID: 17634065.

Noirrit-Esclassan E, Valera M-C, Tremollieres F, Arnal J-F, Lenfant F, Fontaine C, Vinel A. Critical Role of Estrogens on Bone Homeostasis in Both Male and Female: From Physiology to Medical Implications. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(4):1568. https://doi.org/10.3390/ijms22041568

Office of the Surgeon General (US). Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville (MD): Office of the Surgeon General (US); 2004.

Pack A. Bone health in people with epilepsy: is it impaired and what are the risk factors?. Seizure. 2008;17(2):181-186. doi:10.1016/j.seizure.2007.11.020

Pack AM. The Association Between Antiepileptic Drugs and Bone Disease. Epilepsy Curr. 2003;3(3):91-95. doi:10.1046/j.1535-7597.2003.03306.x

Peyrl A, Weichert N, Kühl JS, Ebell W, Hernáiz Driever P. Levetiracetam as a possible cause of secondary graft failure after allogenic hematopoietic stem cell transplantation. Eur J Paediatr Neurol. 2015;19(1):75-77. doi:10.1016/j.ejpn.2014.10.004

Phabphal K, Geater A, Limapichat K, Sathirapanya P, Setthawatcharawanich S, Leelawattana R. Effect of switching hepatic enzyme-inducer antiepileptic drug to levetiracetam on bone mineral density, 25 hydroxyvitamin D, and parathyroid hormone in young adult patients with epilepsy. Epilepsia. 2013;54(6):e94-e98. doi:10.1111/epi.12162

Reimers A. New antiepileptic drugs and women. Seizure. 2014;23(8):585-591. doi:10.1016/j.seizure.2014.05.004

Richards JB, Zheng HF, Spector TD. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. Nat Rev Genet. 2012;13(8):576-588. Published 2012 Jul 18. doi:10.1038/nrg3228

Romigi A, Femia EA, Fattore C, Vitrani G, Di Gennaro G, Franco V. Zonisamide in the management of epilepsy in the elderly. Clin Interv Aging. 2015;10:931-937. Published 2015 Jun 8. doi:10.2147/CIA.S50819

Salari N, Ghasemi H, Mohammadi L, et al. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis. J Orthop Surg Res. 2021;16(1):609. Published 2021 Oct 17. doi:10.1186/s13018-021-02772-0

Salih DA, Mohan S, Kasukawa Y, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-5 induces a gender-related decrease in bone mineral density in transgenic mice. Endocrinology. 2005;146(2):931-940. doi:10.1210/en.2004-0816

Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. Int J Prev Med. 2013;4(6):624-630.

Shetty AK. Prospects of levetiracetam as a neuroprotective drug against status epilepticus, traumatic brain injury, and stroke. Front Neurol. 2013;4:172. Published 2013 Nov 4. doi:10.3389/fneur.2013.00172

Shetty S, Kapoor N, Bondu JD, Thomas N, Paul TV. Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. Indian J Endocrinol Metab. 2016;20(6):846-852. doi:10.4103/2230-8210.192914

Shi C, Wu T, He Y, Zhang Y, Fu D. Recent advances in bone-targeted therapy. Pharmacol Ther. 2020;207:107473. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107473

Schulze-Bonhage A, Hamer H, Krämer G. Neue Klassifikation epileptischer Anfälle : Eine kritische Bewertung der Änderungen [New classification of epileptic seizures : A critical evaluation of the changes]. Nervenarzt. 2020 Feb;91(2):114-121. German. doi: 10.1007/s00115-019-00800-3. PMID: 31506778.

Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. Physiology (Bethesda). 2016;31(3):233-245. doi:10.1152/physiol.00061.2014

Simko J, Fekete S, Gradosova I, et al. The effect of topiramate and lamotrigine on rat bone mass, structure and metabolism. J Neurol Sci. 2014;340(1-2):80-85. doi:10.1016/j.jns.2014.02.032

Simko J., et al. Osteopatie u epileptiků. Olomouc: Solen, 2013, 29 s. ISBN 978-80-7471-034-6.

Siniscalchi A, Murphy S, Cione E, Piro L, Sarro G, Gallelli L. Antiepileptic Drugs and Bone Health: Current Concepts. Psychopharmacol Bull. 2020;50(2):36-44.

Sözen T, Özışık L, Başaran NÇ. An overview and management of osteoporosis. Eur J Rheumatol. 2017;4(1):46-56. doi:10.5152/eurjrheum.2016.048

Subbarao BS, Silverman A, Eapen BC. Seizure Medications. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; July 11, 2022.

Svalheim S, Taubøll E, Surdova K, et al. Long-term levetiracetam treatment affects reproductive endocrine function in female Wistar rats. Seizure. 2008;17(2):203-209. doi:10.1016/j.seizure.2007.11.018

Takahashi A, Onodera K, Kamei J, Sakurada S, Shinoda H, Miyazaki S, Saito T, Mayanagi H: Effects of chronic administration of zonisamide, an antiepileptic drug, on bone mineral density and their prevention with alfacalcidol in growing rats. J Pharmacol Sci. 2003;91(4):313-318.

Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. Lancet. 2019 Feb 16;393(10172):689-701. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32596-0. Epub 2019 Jan 24. PMID: 30686584.

Tu KN, Lie JD, Wan CKV, et al. Osteoporosis: A Review of Treatment Options. P T. 2018;43(2):92-104.

Ueland T. GH/IGF-I and bone resorption in vivo and in vitro. Eur J Endocrinol. 2005;152(3):327-332. doi:10.1530/eje.1.01874

Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R. An aged rat model of partial androgen deficiency: prevention of both loss of bone and lean body mass by low-dose androgen replacement. Endocrinology. 2000;141(5):1642-1647. doi:10.1210/endo.141.5.7472

Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. Osteoporos Int. 2011;22(2):391-420. doi:10.1007/s00198-010-1501-1

Vasikaran SD. Utility of biochemical markers of bone turnover and bone mineral density in management of osteoporosis. Crit Rev Clin Lab Sci. 2008;45(2):221-258. doi:10.1080/10408360801949442

Verrotti A, Coppola G, Parisi P, Mohn A, Chiarelli F. Bone and calcium metabolism and antiepileptic drugs. Clin Neurol Neurosurg. 2010;112(1):1-10. doi:10.1016/j.clineuro.2009.10.011

Wang JS, Mazur CM, Wein MN. Sclerostin and Osteocalcin: Candidate Bone-Produced Hormones. Front Endocrinol (Lausanne). 2021 Mar 10;12:584147. doi: 10.3389/fendo.2021.584147. PMID: 33776907; PMCID: PMC7988212.

Wang RN, Green J, Wang Z, et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. Genes Dis. 2014;1(1):87-105. doi:10.1016/j.gendis.2014.07.005

Wang XF, Zhang YK, Yu ZS, Zhou JL. The role of the serum RANKL/OPG ratio in the healing of intertrochanteric fractures in elderly patients. Mol Med Rep. 2013;7(4):1169-1172. doi:10.3892/mmr.2013.1335

White WL. Erratum to: Why I hate the index finger. Hand (N Y). 2011;6(2):233. doi:10.1007/s11552-011-9321-0

Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. Spine (Phila Pa 1976). 2002 Aug 15;27(16 Suppl 1):S2-8. doi: 10.1097/00007632-200208151-00002. PMID: 12205411.

Zhang J, Wang KX, Wei Y, et al. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. 2010;12(2):96-98.

10. Přehled publikační činnosti

Vědecké práce v impaktovaném časopise

Karesova I, Simko J, Fekete S, Zimcikova E, Malakova J, Zivna H, Pavlikova L, Palicka V. The Effect of Zonisamide on Rat Bone Mass, Structure, and Metabolism [published online ahead of print, 2023 May 22]. Pharmacology. 2023;1-9. doi:10.1159/000529970 **IF$_{2022}$: 3,100**

Simko J, **Karesova I**, Kremlacek J, Zimcikova E, Horacek J, Fekete S, Malakova J, Zivna H, Palicka V. The effect of gabapentin and pregabalin on bone turnover and bone strength: A prospective study in Wistar rats. Pharmacol Rep. 2019;71(6):1213-1218. doi:10.1016/j.pharep.2019.08.004 **IF$_{2019}$: 2,754**

Adamcova M, Baka T, Dolezelova E, Aziriova S, Krajcirovicova K, **Karesova I**, Stanko P, Repova K, Simko F. Relations between markers of cardiac remodelling and left ventricular collagen in an isoproterenol-induced heart damage model. J Physiol Pharmacol. 2019;70(1):10.26402/jpp.2019.1.08. doi:10.26402/jpp.2019.1.08 **IF$_{2019}$: 2,644**

Karesova I, Simko J, Fekete S, Zimcikova E, Malakova J, Zivna H, Pavlikova L, Palicka V. The effect of levetiracetam on rat bone mineral density, bone structure and biochemical markers of bone metabolism. Eur J Pharmacol. 2018;824:115-119. doi:10.1016/j.ejphar.2018.02.010 **IF$_{2018}$: 3,170**

Kupsa T, Vanek J, Vasatova M, **Karesova I**, Zak P, Jebavy L, Horacek J. Evaluation of cytokines and soluble adhesion molecules in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: the role of TNF-alpha and FLT3-ITD. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2016;160(1):94-99. doi:10.5507/bp.2015.036 **IF$_{2016}$: 0,894**

Simko J, **Karesova I**, Kremlacek J, Fekete S, Zimcikova E, Malakova J, Zivna H, Valis M, Palicka V. The effect of lamotrigine and phenytoin on bone turnover and bone strength: A prospective study in Wistar rats. Epilepsy Res.2016;128:113-118. doi:10.1016/j.eplepsyres.2016.10.005 **IF$_{2016}$: 2,367**

Fekete S, Simko J, Mzik M, **Karesova I**, Zivna H, Pavlikova L, Palicka V. Effect of mirtazapine on rat bone tissue after orchidectomy. Pharmacology. 2015;95(3-4):166-172. doi:10.1159/000380953 **IF$_{2015}$: 1.533**

Fekete S, Simko J, Mzik M, **Karesova I**, Zivna H, Zivny P, Pavlikova L, Palicka V. Negative effect of serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor therapy on rat bone tissue after orchidectomy. Eur J Pharmacol. 2015;761:65-69. doi:10.1016/j.ejphar.2015.04.029 **IF$_{2015}$: 2,730**

Vasatova M, Pudil R, Buchler T, **Karesova I**, Safka V, Fejfar T, Hulek P. Glycogen phosphorylase BB levels are associated with haemodynamic parameters in cirrhotic patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunt insertion. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2015;159(3):437-441. doi:10.5507/bp.2014.020 **IF$_{2015}$: 0,924**

Vědecké práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise

Zimcikova E, Simko J, **Karesova I**, Kremlacek J, Malakova J. Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: Are the effects on mood and behavior detectable in open-field test?. Seizure. 2017; 52:35-40. doi:10.1016/j.seizure.2017.09.015

Kupsa T, Vasatova M, **Karesova I**, Zak P, Horacek JM. Baseline serum levels of multiple cytokines and adhesion molecules in patients with acute myeloid leukemia: results of a pivotal trial. Exp Oncol. 2014 Dec;36(4):252-7. PMID: 25537219.

Vasatova M, Holeckova M, **Bartoskova I**, Tichy M, Friedecky B. Kardiální troponin T ultrasenzitivní metodou – porovnání metod. Klin. Biochem. Metab., 18 (39), 2010, No. 4, p. 196–199.