

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za farmacijo*



MATEJA TESTEN

**DOLOČITEV DIAGNOSTIČNE UPORABNOSTI TESTA AKTIVACIJE  
BAZOFILCEV PRI PREOBČUTLJIVOSTI NA ŠIBKE ANALGETIKE**

DETERMINATION OF DIAGNOSTIC USEFULNESS OF BASOPHIL  
ACTIVATION TEST IN DETECTION OF SENSIBILISATION FOR NON-  
OPIOID ANALGESICS

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo UL ter na Kliniki Golnik (Laboratorij za celično imunologijo in molekularno genetiko) pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Kerec Kos, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Mitje Košnika, dr. med.

### **Zahvala**

Iskrena hvala izr. prof. dr. Mojci Kerec Kos, mag. farm. za mentorstvo in prof. dr. Mitji Košniku, dr. med. za somentorstvo pri izdelavi magistrske naloge. Hvala za vso strokovno pomoč in koristne nasvete. Zahvala gre tudi sodelavcem oddelka 300 Klinike Golnik ter vsem zaposlenim v Laboratoriju za celično imunologijo in molekularno genetiko Klinike Golnik ter študentkama Medicinske fakultete UL Niki Sotošek in Heleni Klar za sodelovanje pri projektu. Posebno zahvalo za podporo tekom celotnega študija izrekam svoji družini in prijateljem.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. Mojce Kerec Kos, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Mitje Košnika, dr. med.

Mateja Testen

Ljubljana, julij 2017

## **VSEBINA**

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 ŠIBKI ANALGETIKI</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.1 CIKLOOKSIGENAZE</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.2 MEHANIZEM DELOVANJA ŠIBKIH ANALGETIKOV</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1.4. ŠIBKI ANALGTIKI, UPORABLJENI V EKSPERIMENTALNEM DELU</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 NEŽELENI UČINKI NSAID</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3 PREOBCUTLJIVOST ZA NSAID</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4 DIAGNOSTIČNI TESTI</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4.1 KOŽNI TESTI</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4.2 PERORALNI PROVOKACIJSKI TEST</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4.3 TEST AKTIVACIJE BAZOFILCEV</b> .....	<b>13</b>
<b>2. NAMEN</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 MATERIALI</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1.1 Vključitev pacientov v raziskavo</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1.2 Standardi</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1.3 Reagenti in oprema</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2 METODE</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.1 Priprava raztopin analgetikov</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.2 Priprava raztopin ostalih reagentov</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.3 Priprava končnih koncentracij analgetikov v vzorcu krvi</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.5. BAT protokol</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2.4 Določanje ponovljivosti metode</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2.7 Analiza rezultatov testa aktivacije bazofilcev</b> .....	<b>24</b>
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1 REZULTATI PONOVLJIVOSTI TESTA AKTIVACIJE BAZOFILCEV V ISTEM DNEVU</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2 REZULTATI PONOVLJIVOSTI TESTA AKTIVACIJE BAZOFILCEV PO ENEM MESECU</b> .....	<b>32</b>
<b>4.3 REZULTATI TESTA AKTIVACIJE BAZOFILCEV IN PREDHODNO OPRAVLJENIH PERORALNIH PROVOKACIJSKIH TESTOV</b> .....	<b>36</b>
<b>4.4 REZULATI NEGATIVNIH KONTROL</b> .....	<b>39</b>
<b>5. SKLEPI</b> .....	<b>42</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>44</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Nastanek prostaglandinov po ciklooksigenazni poti presnove arahidonske kisline .....	2
Slika 2: Vloga ciklooksigenaze-1 in ciklooksigenaze-2 v organizmu .....	4
Slika 3: Vrstni red NSAID glede na relativno tveganje za nastanek hudih neželenih učinkov na prebavilih ob uporabi ekvivalentnih odmerkov .....	10
Slika 4: Shema pretočne citometrije.....	23
Slika 5: Rezultat pretočne citometrije .....	24
Slika 6: Pozitiven rezultat pretočne citometrije .....	25
Slika 7: Negativen rezultat pretočne citometrije .....	25

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Strukturne formule in $IC_{50}$ testiranih analgetikov .....	8
Preglednica 2: Navzkrižna reaktivnost med ASA in najpogosteje uporabljenimi šibkimi analgetiki .....	12
Preglednica 3: Končne koncentracije analgetikov v vzorcu krvi .....	21
Preglednica 4: Pacienti glede na fenotip, starost in spol ter zdrave kontrole. ....	27
Preglednica 5: BAT indeksi v istem dnevu za ASA. ....	28
Preglednica 6: Ponovljivosti BAT indeksa pri posamezni testirani koncentraciji ASA, podana s koeficientom variacije (KV) .....	29
Preglednica 7: BAT indeksi v istem dnevu za naproksen .....	29
Preglednica 8: Ponovljivosti BAT indeksa pri posamezni testirani koncentracija naproksena, podana s koeficientom variacije (KV).....	30
Preglednica 9: BAT indeksi v istem dnevu za diklofenak. ....	30
Preglednica 10: Ponovljivosti BAT indeksa pri posamezni testirani koncentracija diklofenaka, podana s koeficientom variacije (KV).....	31
Preglednica 11: Indeksi BAT za ASA ob prvem obisku in po enem mesecu .....	32
Preglednica 12: Indeksi BAT za naproksen ob prvem obisku in po enem mesecu.....	34
Preglednica 13: Indeksi BAT za diklofenak ob prvem obisku in po enem mesecu .....	35
Preglednica 14: Število pacientov, katerim smo opravili BAT za določen analgetik in rezultati pri najvišji testirani koncentraciji analgetika.....	36
Preglednica 15: Rezultati predhodno opravljenih OPT .....	37
Preglednica 16: Število pacientov, pri katerih se rezultati OPT in BAT ujemajo.....	37
Preglednica 17: Rezultati negativnih kontrol za ASA pri vseh treh koncentracijah .....	39

Preglednica 18: Indeks BAT 2 za paciente, izračunan z upoštevanjem povprečne fluorescence označevalca, za ASA pri 1 mg/ml .....	40
Preglednica 19: Rezultati t-testa BAT indeksa 1 in 2 za paciente in negativne kontrole pri ASA 1 mg/ml.....	40

## POVZETEK

Nesteroidne protivnetne učinkovine in paracetamol sodijo med šibke analgetike. Nesteroidne protivnetne učinkovine so med zdravili takoj za protimikrobnimi zdravilnimi učinkovinami drugi najpogostejši povzročitelji reakcij preobčutljivosti.

Test aktivacije bazofilcev (BAT) je *in vitro* diagnostični test za ugotavljanje preobčutljivostnih reakcij. Namen magistrskega dela je bil ugotoviti diagnostično vrednost in klinično uporabnost testa aktivacije bazofilcev za ugotavljanje preobčutljivosti za šibke analgetike ter določiti ponovljivost metode v istem dnevu in po enem mesecu.

V našo raziskavo smo vključili 50 pacientov s predhodno opravljenim peroralnim provokacijskim testom (OPT) ali z visoko verjetnostjo preobčutljivosti za izbrane šibke analgetike in 10 zdravih kontrol. Šibki analgetiki, ki smo jih testirali vsem pacientom, so bili acetilsalicilna kislina (ASA), diklofenak in naproksen, ter ciljano metamizol, ibuprofen in paracetamol. Rezultate BAT smo podajali v obliki dveh indeksov (BAT indeks 1 in BAT indeks 2). Od opravljenih 50 BAT smo pri ASA dobili 45 pozitivnih rezultatov (90 % vseh opravljenih testov), pri diklofenaku 1 (2 %) in pri naproksenu 5 (10 %). Pri analgetikih, ki smo jih testirali ciljano, nismo dobili pozitivnega rezultata. Pri določevanju ponovljivosti metode v istem dnevu smo dobili veliko razpršenost rezultatov (koeficient variacije 35,9 – 78,6 %) in tudi ponovljivost metode po enem mesecu ni sprejemljiva. Najboljše ujemanje rezultatov BAT s predhodno opravljenimi OPT, ki velja za zlati standard diagnosticiranja preobčutljivosti za analgetike, smo dobili pri paracetamolu (71,4 %), a gre le za negativna ujemanja. Sledi diklofenak s 50 %, a je to samo en pacient. Občutljivost BAT najbolj realno pokažejo rezultati ASA, kjer smo dobili 46,2 % ujemanje rezultatov (pozitivnih in negativnih). Za ASA med OPT in BAT ni značilnih razlik v deležu pozitivnih rezultatov (McNemarjev test,  $p=0,424$ ). BAT daje nespecifičen odziv na alergen, saj je bil pri ASA (1 mg/ml) rezultat pozitiven tudi pri 6 kontrolah (60 %; BAT indeks 1) oz. 3 kontrolah (30 %; BAT indeks 2). Med kontrolami in pacienti je značilna razlika v vrednosti BAT indeksa 1 (t-test,  $p=0,033$ ), medtem ko pri BAT indeksu 2 ni statistično pomembnih razlik (t-test,  $p=0,60$ ). Med obema skupinama testirancev je značilna razlika v številu pozitivnih BAT indeksov 1 ( $\chi^2$ ,  $p=0,015$ ), medtem ko je pri BAT indeksu 2 ta razlika neznačilna ( $\chi^2$ ,  $p=0,204$ ). Zaključimo lahko, da je specifičnost BAT slaba in ne moremo podati mejne vrednosti, ki bi klinično pomembno ločila obe skupini testiranih ljudi. BAT ne loči bolnih od zdravih oseb in pri diagnostiki preobčutljivosti za testirane šibke analgetike ni uporaben. Da bi bil BAT primeren za rutinsko uporabo v klinični praksi, ga je potrebno še optimizirati.

**Ključne besede:** šibki analgetiki, preobčutljivostne reakcije, test aktivacije bazofilcev

## ABSTRACT

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and paracetamol belong to mild analgesics. After antibiotics, NSAIDs are the second most common cause of hypersensitivity reactions. Basophil activation test (BAT) is an *in vitro* diagnostic test for determination of hypersensitivity reactions.

The purpose of our study was to determine diagnostic and clinical usefulness of BAT in detection of hypersensitivity reaction to mild analgesics and determination of repeatability of the method on the same day and after one month.

In our study we included 50 patients with previously performed oral provocation test (OPT) or with a high probability of hypersensitivity to selected mild analgesics and 10 healthy controls. We tested all patients for acetylsalicylic acid (ASA), diclofenac and naproxen, while metamizole, ibuprofen and paracetamol were only targeted tested. Results are presented in two different forms - BAT index 1 and BAT index 2. Of the 50 BATs performed, ASA showed 45 positive results (90 %), diclofenac 1 positive result (2%) and naproxen 5 positive results (10 %). Targeted tested analgesics did not show any positive results. When determining the repeatability of the method on the same day, the variability of the results was high (coefficient of variation 35,9 – 78,6 %) and also repeatability after one month is not acceptable. The best match between BAT and previously performed OPT, which is considered to be the golden standard for diagnosis of hypersensitivity to analgesics, was obtained with paracetamol (71,4 %), but only negative matching, followed by diclofenac with 50 % matching, representing only one patient. The results of ASA show the sensitivity of BAT the most realistically, given 46,2 % matching results. With ASA there is no significant difference in the proportion of positive results of BAT and OPT (McNemar test,  $p=0,424$ ). BAT gives a non-specific response to allergen, as for ASA (1 mg/ml) it is positive in 6 controls (60 %, BAT index 1) or 3 controls (30 %, BAT index 2). There is a significant difference between controls and patients in BAT index 1 (t-test,  $p=0,033$ ), but not in BAT index 2 (t-test,  $p=0,60$ ). There is a significant difference between the two tested groups in the number of positive BAT index 1 ( $\chi^2$ ,  $p=0,015$ ), while not in the case of BAT index 2 ( $\chi^2$ ,  $p=0,204$ ).

We concluded that the specificity of BAT is poor and the certain limit of BAT index, which would significantly distinguish both groups of tested people, cannot be determined. BAT does not distinguish patients from healthy people and is not useful as a diagnostic test for detection of hypersensitivity to mild analgesics.

**Key words:** mild analgesics, hypersensitivity reaction, basophil activation test

## **Seznam okrajšav**

NSAID – nesteroidne protivnetne učinkovine (*ang. non-steroidal anti inflammatory drugs*)

COX- ciklooksigenaza

ASA – acetilsalicilna kislina

OPT – peroralni provokacijski test

BAT – test aktivacije bazofilcev (*ang. basophil activation test*)

Anti-FcεRI – protitelo proti visoko afinitetnim IgE receptorjem

IgE – imunoglobulin razreda E

IL -1 – interlevkin 1

CD – označevalec pripadnosti (*ang. cluster of differentiation*)

FcεRI – visoko afinitetni receptor za Fc regijo imunoglobulina E, α-podenota humanega IgE receptorja

fMLP – L-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanin, *angl. L-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine*

PG – prostaglandin

PGH2 – prostaglandin H2



# 1. UVOD

Analgetiki so učinkovine, ki v terapevtskih odmerkih blažijo bolečino, ne da bi povzročali stanje narkoze. Vsem vzrokom bolečine je skupna bodisi poškodba tkiva ali motnja normalnega metabolizma. Pri tem pride do sproščanja mediatorjev bolečine (vodikovi ioni, kalijeve kationi, histamin, serotonin, prostaglandini), ki spodbudijo receptorje za bolečino.

Analgetike delimo na:

- **Opioidne analgetike** (analgetiki prve vrste, centralno delujoči analgetiki)

To so močni analgetiki, ki jih uporabljamo za lajšanje hudih bolečin, predvsem notranjega izvora. Sem spadajo morfin, njegovi derivati in sintezni močni analgetiki.

- **Šibke analgetike** (nenarkotični analgetiki, analgetiki druge vrste)

Ti imajo šibkejši analgetični učinek, uporabljamo jih za lajšanje blažjih bolečin, kot na primer zobobol ali mišična bolečina. Mnogi analgetiki druge vrste imajo še antipiretično delovanje. Delimo jih v naslednje kemijske skupine:

- salicilati (acetilsalicilna kislina)
- derivati anilina oz. *p*-aminofenola (paracetamol, fenacetin) in aminofenilacetne kisline (diklofenak)
- derivati pirazolona (metamizol, fenilbutazon)
- derivati aril ali heteroaril očetne ali propionske kisline (ibuprofen, indometacin, naproksen) (1)
- ostali

## 1.1 ŠIBKI ANALGETIKI

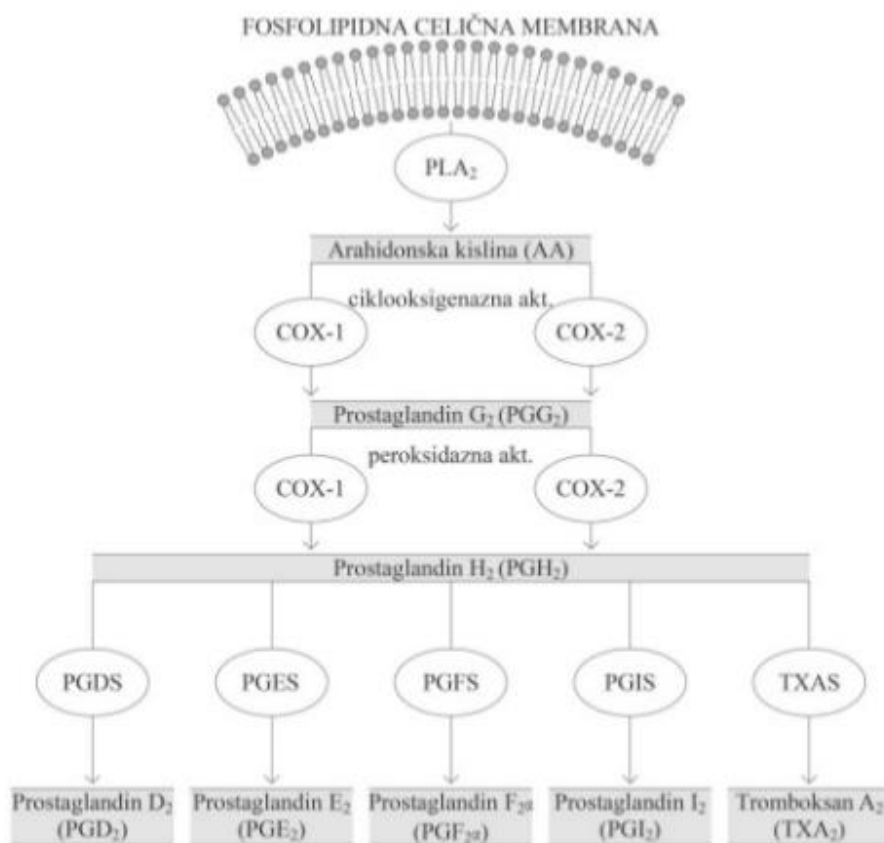
Šibki analgetiki so zdravilne učinkovine, ki jih uporabljamo za zdravljenje bolečine, vnetja in zvišane telesne temperature. Že konec 19. stoletja so uporabljali acetanilid kot analgetik-antipiretik. Zaradi methemoglobinemije, ki jo ta spojina povzroča, so njeno uporabo opustili in ga nadomestili s fenacetinom, za katerega so ugotovili, da se v telesu metabolizira do delujoče spojine, ki jo imenujemo paracetamol. (2). Prvi nesteroidni antirevmatik je sintetiziral kemik nemškega farmacevtskega podjetja Bayer Felix Hoffmann leta 1897. Gre za acetilsalicilno kislino (ASA), katero danes vsi poznamo pod blagovno znamko Aspirin®. (3) Od takrat pa je bilo razvitih še veliko drugih učinkovin s podobnim delovanjem.

Veliko predstavnikov šibkih analgetikov je dostopnih v prosti prodaji, zato se njihova poraba iz leta v leto povečuje in sodijo med najpogosteje uporabljena zdravila. Skupaj s porastom porabe pa narašča tudi število neželenih učinkov, ki se lahko kažejo kot blagi lokalni kožni

izpuščaji ali blago draženje želodca, do resnih generaliziranih simptomov in celo smrtno nevarne anafilaksije. (4, 5)

### 1.1.1 CIKLOOKSIGENAZE

Ciklooksigenaza je pogovorno ime za encim prostaglandin endoperoksid H sintazo. Katalizira pretvorbo arahidonske kisline v prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) kar je prva stopnja pretvorbe vseh prostaglandinov in tromboksana (slika 1). Arahidonska kislina je nenasičena maščobna kislina, ki je osnova za nastanek prostanoidov in se sprošča iz membranskih fosfolipidov s pomočjo fosfolipaz A<sub>2</sub>. Prostaglandin endoperoksid H sintaza je glikozilirani hemoprotein, z dvema katalitičnima podenotama, ciklooksigenazno in peroksidazno. (8)



Slika 1: Nastanek prostaglandinov po ciklooksigenazni poti presnove arahidonske kisline (povzeto po 6)

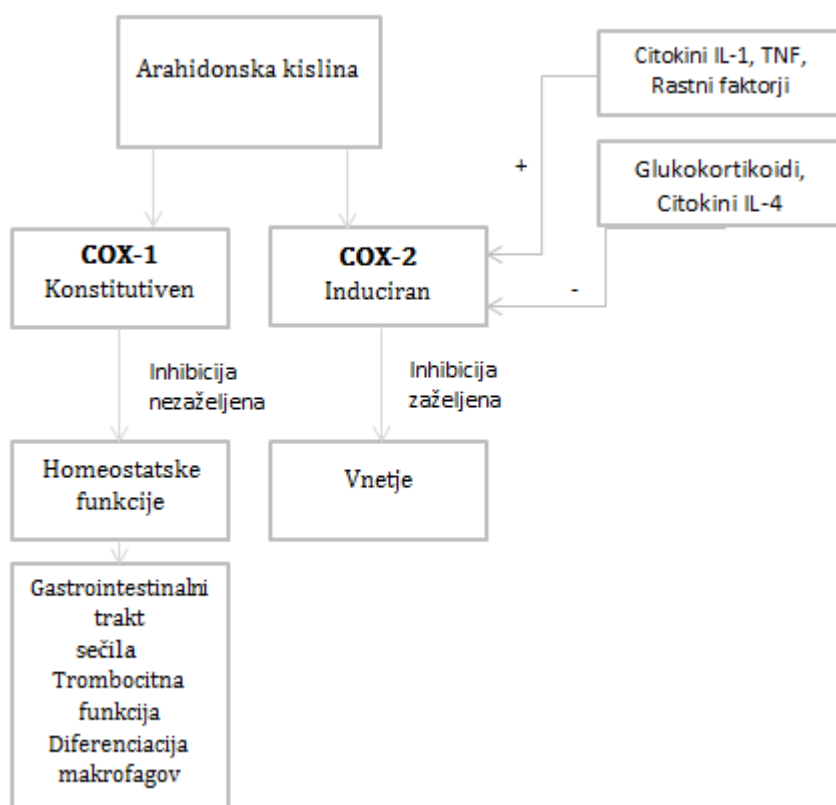
PLA<sub>2</sub> – fosfolipaza A<sub>2</sub>, AA – arahidonska kislina, COX-1 – ciklooksigenaza 1, COX-2 – ciklooksigenaza 2, PGG<sub>2</sub> – prostaglandin G<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> – prostaglandin H<sub>2</sub>, PGDS – encim prostaglandin D sintetaza, PGES – encim prostaglandin E sintetaza, PGFS – encim prostaglandin F sintetaza, PGIS – encim prostaglandin I sintetaza, TXAS – encim tromboksan A sintetaza, PGD<sub>2</sub> – prostaglandin D<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> – prostaglandin E<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> – prostaglandin F<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> – prostaglandin I<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> – tromboksan A<sub>2</sub>

Nastajanje prostaglandinov v celicah se lahko poveča ob delovanju mehanskih dražljajev, rastnih faktorjev in drugih dražljajev, kot so na primer specifični citokini. Vloga citokinov je, da v tarčnih celicah spreminjajo ekspresijo encimov, med katerimi so tudi tisti, ki so udeleženi v metabolizmu arahidonske kisline. Poznamo tri izooblike encima COX: ciklooksigenaza-1 (COX-1), ciklooksigenaza-2 (COX-2) in ciklooksigenaza-3 (COX-3).

**Ciklooksigenaza-1 (COX-1)** je konstitutivna oblika encima in se nahaja v večini tkiv po celem telesu, največ pa se je nahaja v prebavnem traktu in ledvicah, kjer proizvajata prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>). Uravnava normalne celične procese. Njeno nastajanje je povečano pri bolnikih z aktiviranim simpatičnim živčnim sistemom, hipovolemijo, srčnim popuščanjem, cirozo jeter ali ledvično boleznijo. COX-1 je odgovorna tudi za izločanje tromboksana, ki je močna proagregacijska snov. (4)

**Ciklooksigenaza-2 (COX-2)** je konstitutivna in inducibilna oblika encima. COX-2 se izraža konstitutivno v ledvicah in možganih, inducibilno pa v vnetnih celicah ob njihovi aktivaciji pod vplivom proinflammatoryh citokinov in rastnih dejavnikov. Njen nastanek spodbudijo tudi lipopolisaharidi, tumorski faktor nekroze  $\alpha$ , interleukin 1, rastni faktor trombocitov in drugi rastni faktorji. Odgovorna je za nastanek PGE<sub>2</sub>, ki je najpomembnejši posrednik vnetja, zvišuje telesno temperaturo, zmanjšuje pa prag za bolečino in na ta način poveča učinke algogenih substanc, kot sta bradikinin in histamin. (7, 8) COX-1 je zaslužna za ohranitev fizioloških funkcij, za patofiziološko dogajanje pa je odgovorna COX-2, saj pri vnetnem odzivu spodbudi nastanek prostaglandinov, ki so mediatorji vnetja, povzročajo rdečino in bolečino (predstavljeno na sliki 2). (4, 8)

**Ciklooksigenaza-3 (COX-3)** je različica COX-1 in se nahaja konstitutivno v možganski skorji in srcu. Ima strukturne lastnosti COX-1 in COX-2. Njeni zaviralci so poleg paracetamola tudi NSAID v nizkih odmerkih. Zaviralci COX-3 so uporabni pri zniževanju telesne temperature in blaženju bolečine. (9) Novejše raziskave *in vitro* so pokazale, da inhibicija COX-3 v možganih zavira nastajanje prostaglandinov v možganih, s čimer je dosežen antipiretični učinek. (10)



Slika 2: Vloga ciklooksigenaze-1 in ciklooksigenaze-2 v organizmu (povzeto po 6)

### 1.1.2 MEHANIZEM DELOVANJA ŠIBKIH ANALGETIKOV

Mehanizem delovanja NSAID je leta 1971 odkril John Vane ter dokazal, da vse učinkovine iz te skupine delujejo na isti način in sicer z zaviranjem sinteze prostaglandinov. Danes je znano, da NSAID v večjih koncentracijah delujejo tudi imunomodulatorno preko indukcije apoptoze, zaviranja ekspresije adhezijskih molekul, izražanja provnetnih citokinov ipd, ni pa še znano ali so pri koncentracijah, ki jih dosežemo *in vivo*, ti učinki klinično pomembni (8). NSAID so zaviralci encimov skupine ciklooksigenaz (COX), s čimer zmanjšajo pretvorbo arahidonske kisline v prostaglandine, prostacikline in tromboksane. (4) Antipiretično delovanje NSAID poteka s centralnim učinkom na hipotalamični center za uravnavanje temperature ob hkratnem večjem perifernem oddajanju toplote. (11) Citokini (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) inducirajo sintezo PGE<sub>2</sub>, posledično se v hipotalamusu sproži nastavitev termoregulacijskega centra na višjo telesno temperaturo, Tako se poveča nastanek in zmanjša izguba telesne temperature. Analgetiki zavirajo COX, zato je prekinjena pot nastanka citokinov in telesna temperatura pade. (8)

NSAID zavirajo le ciklooksigenazno podenoto encima. Predstavlja jo kanal, obdan s hidrofobnimi aminokislinami, v katerega se namesti substrat - arahidonska kislina. Z ionizirano karboksilno kislino interagira z argininom na mestu 120 in na to mesto se z ionizirano karboksilno kislino vežejo tudi NSAID. NSAID so namreč šibke organske kisline, zato so v fiziološkem okolju ionizirane. NSAID so kompetitivni zaviralci COX, ki za vezavo tekmujejo s fiziološkim substratom. Vezava je reverzibilna. Izjema je ASA, saj deluje tako, da acetilira serin na mestu 530 (oz. 516 na COX-2), ki se nahaja v hidrofobnem delu encima in tako prepreči vezavo arahidonske kisline v aktivno mesto encima. Vezava je ireverzibilna. (8) Zaviranje COX-1 povzroča neželene učinke na prebavilih. Razvoj NSAID je bil zato nekaj časa usmerjen v sintezo selektivnih zaviralcev COX-2, ki naj bi bili manj toksični za sluznico zgornjih prebavil (želodca in dvanajstnika). Selektivni NSAID so močni zaviralci encima COX-2 in šibki zaviralci COX-1, zato jih nekateri pacienti lahko prenašajo, saj ne povzročajo poškodb želodčne sluznice. (7) Kasneje so ugotovili stalno prisotnost COX-2 v nekaterih tkivih, zato imajo tudi selektivni zaviralci COX-2 v nekaterih organih (na primer ledvicah) podobne neželene učinke kot neselektivni NSAID. (4)

Med šibke analgetike sodi tudi paracetamol, ki je zelo pogosto uporabljena zdravilna učinkovina in sestavni del mnogih kombiniranih pripravkov. Natančen mehanizem delovanja še ni povsem pojasnjen. Podobno kot NSAID naj bi tudi paracetamol zaviral encime COX, predvsem COX-2 in COX-3 in na ta način preprečil metabolizem arahidonske kisline v PGH<sub>2</sub>. Analgetično delovanje paracetamola lahko razložimo z aktivacijo descendentnih serotonergičnih poti. (4) Paracetamol je lipofilne narave, zato dobro prehaja krvno-možgansko bariero. Koncentracija, ki jo doseže v možganih, je enakega velikostnega razreda kot koncentracija v plazmi ( $\approx 100 \mu\text{M}$ ). V možganih pride do inhibicije COX-3, s čimer sta zmanjšani bolečina in vročina. Njegovo antipiretično delovanje je posledica neposrednega delovanja na center za uravnavanje telesne temperature v hipotalamusu. Deluje tako, da prepreči delovanje endogenih pirogenov, verjetno z zaviranjem sinteze prostaglandinov (12, 2)

Mehanizem delovanja metamizola ni podrobno pojasnjen. Vključuje zaviranje sinteze PGE<sub>1</sub> in PGE<sub>2</sub> in reverzibilno zaviranje agregacije trombocitov. Sočasno je po vsem sodeč prisotno tudi centralno delovanje. Domnevajo, da je kot element analgetičnega delovanja vključeno tudi zaviranje centralnega zaznavanja bolečine preko aktivacije nevronov v sistemu za zaviranje bolečin. Protivnetni učinek metamizola je posledica njegovih antieksudativnih in vazokonstriktorskih lastnosti, ki so vsaj deloma lahko posledica zavrtja endogene sinteze PG. (11)

### 1.1.3. INDIKACIJE ŠIBKIH ANALGETIKOV

NSAID v terapevtskih odmerkih delujejo protibolečinsko, protivnetno in antipiretično, nimajo pa splošnega narkotičnega delovanja. (8) Uporabljamo jih pri naslednjih diagnozah:

- vnetne revmatične bolezni: revmatoidni artritis, juvenilni kronični artritis
- degenerativni revmatizem sklepov in hrbtenice
- s kristali povzročeni artritis
- bolečine po porodu, v primeru, da mati ne doji
- bolečine pri poškodbi mehkih tkiv
- bolečine pri raznih operacijah (13)

Paracetamol se prav tako uporablja za zdravljenje srednje močne bolečine in zniževanje telesne temperature, njegova protivnetna aktivnost pa je, v primerjavi z ASA in ostalimi NSAID, šibka.

### 1.1.4. ŠIBKI ANALGETIKI, UPORABLJENI V EKSPERIMENTALNEM DELU

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili naslednje šibke analgetike: **diklofenak, naproksen, ibuprofen, ASA, metamizol in paracetamol**. Glede na jakost inhibicije encima COX-1 in COX-2 se testirani analgetiki med seboj zelo razlikujejo. Inhibitorne koncentracije, pri katerih pride do 50 % inhibicije encima ( $IC_{50}$ ), so podane v preglednici 1, kjer so predstavljene tudi strukturne formule za vse uporabljene učinkovine.

**Diklofenak** se uporablja za blaženje bolečine pri jutranji otrplosti sklepov pri lažjih oblikah revmatičnih bolezni ter blaženje bolečine in edema po poškodbah in operacijah. Za odpravljanje tovrstnih bolečin se običajno svetuje dnevni odmerek 100 mg. (13) Bolj previdni pa moramo biti pri dolgotrajnem zdravljenju z diklofenakom, predvsem pri visokih odmerkih (150 mg dnevno). Epidemiološki in klinični podatki namreč kažejo, da se lahko pri pacientih s srčnimi boleznimi poveča tveganje za miokardni infarkt ali možgansko kap. (13)

**Naproksen** je derivat 2-arilpropionske kisline. Dokazano je, da ima manj neželenih učinkov na prebavila od nekaterih drugih učinkovin iz skupine NSAID, prav tako predstavlja najmanjše tveganje za kardiovaskularne zaplete. Največkrat se nahaja v obliki natrijeve soli. (14) V obliki kisline je brez vonja in bele barve, netopen v vodi in topen v lipidih. Običajni odmerek je 500 mg do 1000 mg na dan, pri bolnikih, ki dobro prenašajo manjše odmerke in v anamnezi nimajo obolenj prebavil, lahko po potrebi za nekaj časa odmerek povečamo do 1500 mg na dan, vendar ne dlje kot dva tedna. (15)

**Ibuprofen** je derivat propionske kisline, ki ga uporabimo pri blagi do zmerni bolečini, še posebej če je prisotno vnetje, ki se lahko poslabša, na primer po zobnih in drugih operacijah. (16) Pogosto se predpisuje za lajšanje bolečin pri artritisu. Ibuprofen so prvič dali na trg leta 1969. (17) Najvišji dovoljen dnevni odmerek za odrasle znaša 3200 mg, pri otrocih pa 40 mg/kg telesne teže. Ibuprofen ni priporočljiv za zdravljenje otrok, s telesno maso, manjšo od 7 kg. (18)

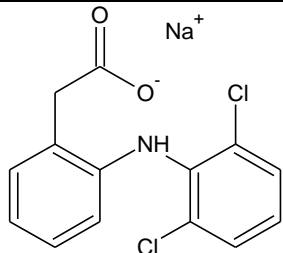
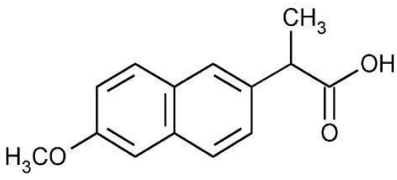
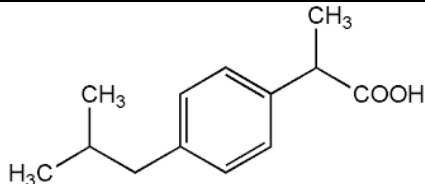
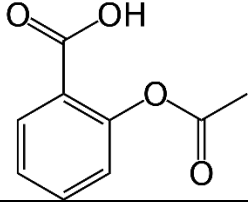
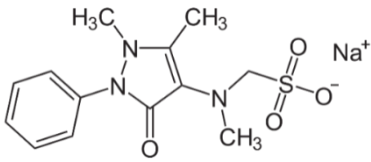
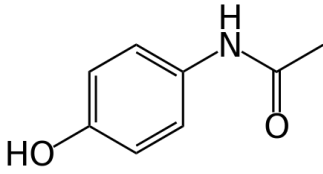
**ASA** je ena izmed najbolj pogosto uporabljenih zdravilnih učinkovin na svetu. Salicilna kislina je derivat naravnega produkta, izoliranega iz skorja vrbe, ki so ga z acetiliranjem spremenili v ASA. ASA zavira tudi agregacijo trombocitov in se uporablja za preprečevanje arterijske in venske tromboze. (19, 20) Deluje antipiretično, protivnetno in protibolečinsko in je med vsemi NSAID edina, ki COX zavira z ireverzibilnim acetiliranjem encima. Na encim se veže s kovalentno vezjo, zato je vezava ireverzibilna. (17, 9) Najvišji dnevni odmerek ASA za odrasle je 4000 mg, za otroke, starejše od 12 let, pa je priporočen dnevni odmerek 60 mg/kg telesne teže, razdeljen na 4 do 6 posameznih odmerkov (15 mg/kg telesne teže vsakih 6 ur ali 10 mg/kg telesne teže vsake 4 ure). (21)

**Metamizol** so jo odkrili že leta 1922, vendar je bila zaradi znanih neželenih učinkov drugih učinkovin iz družine pirazonov (oslabljena zavest ali celo koma, krči, aritmije, poškodbe jeter) njegova uporaba zelo omejena. (22) Kasneje so ugotovili, da je metamizol zelo učinkovit analgetik in antipiretik, nima pa protivnetnega delovanja. Metamizol ne povzroča odvisnosti, znanih je malo interakcij z drugimi zdravili, zato je varen za uporabo tako pri odraslih kot tudi pri otrocih. (23) Najvišji dovoljeni dnevni odmerek metamizola je 2 g za osebe med 32 kg in 53 kg ter 4 g za osebe nad 53 kg telesne teže. (24)

**Paracetamol**, tudi acetaminofen, za razliko od NSAID, ne deluje protivnetno. Spada med šibke analgetike in ne povzroča odvisnosti, fiziološke tolerance ali težav pri odtegnitvi. (10, 12) Povzroča manj neželenih učinkov od NSAID, saj ne draži želodčne sluznice, ne povzroča krvavitev prebavnega traku in ne vpliva na strjevanje krvi. Kljub naštetim prednostim pa je paracetamol med vodilnimi zdravilnimi učinkovinami, ki povzročajo poškodbe jeter. Ima namreč zelo ozko terapevtsko okno, kar pomeni, da je razlika med terapevtskim in toksičnim odmerkom majhna. Njegova varnost postane vprašljiva, če so odmerki visoki, če se uporablja dolgo in v kombinaciji z nekaterimi drugimi zdravili. (25) Maksimalen dnevni odmerek

paracetamola za odrasle in otroke, starejše od 12 let, je 4 g (8 500 mg tablet). Akutni toksični učinki pri odraslih se pokažejo že pri 12 zaužitih tabletah, hepatotoksičen enkratni odmerek pri odraslih pa je 150 mg/kg telesne teže. (26)

Preglednica 1: Strukturne formule in IC<sub>50</sub> (minimalna inhibitorna koncentracija) testiranih analgetikov

Analgetik	Strukturna formula	IC <sub>50</sub> (μM)		Vir
		COX-1	COX-2	
Diklofenak		0,26; 0,035	0,041	2, 7, 13, 27
Naprosken		36		2, 7, 14, 28,
Ibuprofen		7,6 ; 2,4	5,7	2, 7, 17, 16
ASA		4,45; 10	13,88; >1000	2, 7, 9, 19, 20
Metamizol		1,03	0,87	7, 23, 29
Paracetamol		105; 113,7; >1000	25, 8	2, 7, 12, 25

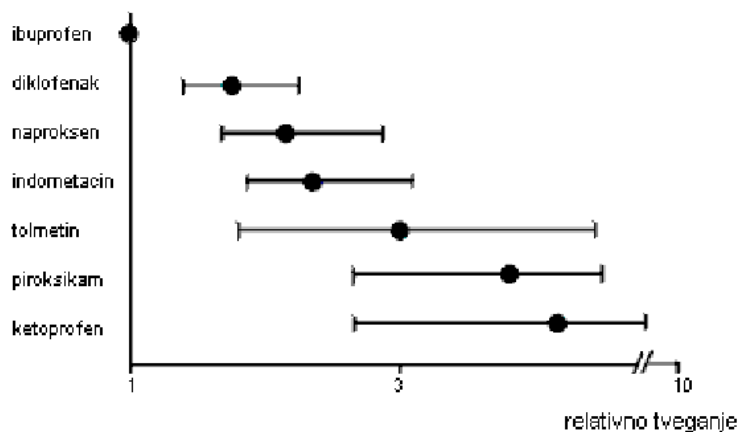


## 1.2 NEŽELENI UČINKI NSAID

Najpogostejši neželeni učinki, ki jih povzročajo NSAID, so učinki na sluznico prebavil (10 - 15 %). Pokažejo se kot bolečina v želodcu, dispepsija, slabost, driska ali bruhanje, ki jih lahko spremljajo ulceracije, perforacije in krvavitve. Redkeje lahko pride do krvavitve iz prebavil in peptične razjede. Neželeni učinki so posredna posledica sistemskega zaviranja COX in neposredna zaradi kisle narave učinkovin. NSAID lahko zmanjšajo hidrofobnost zaščitne sluzi v želodcu, s tem je kislini in pepsinu omogočen lažji dostop do površine epitelija, kjer nastanejo poškodbe. Do poškodbe sluznice pride, ker so šibki analgetiki kemijsko šibke kisline, ki v kislem želodčnem lumnu preidejo v neionizirano lipofilno obliko. V takšni obliki lažje prehajajo v želodčno sluznico, kjer zaradi višjega pH-ja ionizirajo. Sprostijo se vodikovi ioni, ki v celicah povzročijo poškodbe celičnih struktur. (1, 6) Selektivni NSAID zavirajo le COX-2 in so varnejši samo glede neželenih učinkov na prebavni trakt. (4)

Od neželenih učinkov na osrednje živčevje se lahko občasno pojavi glavobol in vrtoglavica, redkeje pa zaspanost. Drugi neželeni učinki, o katerih so poročali pri zdravljenju s šibkimi analgetiki, so še kožni izpuščaji, urtikarija, preobčutljivostne reakcije, edem, akutna ledvična odpoved, prehodno zvečanje vrednosti jetrnih encimov v serumu, hepatitis, visok krvni tlak in srčno popuščanje. (13) Z večanjem odmerka NSAID se analgetični učinek ne povečuje, povečuje pa se tveganje za neželene učinke. Ostali dejavniki tveganja za neželene učinke so še starost bolnika, uporabljeni NSAID, trajanje zdravljenja in kombinirano zdravljenje, predvsem z glukokortikoidi in antikoagulantami. (2)

Nevarnost za nastanek neželenih učinkov je odvisna od bolnika in od uporabljenega NSAID. Ker so ob uporabi ekvivalentnih odmerkov enako učinkoviti, prednostno izberemo posamezni NSAID, ki je bolj varen. Pri neselektivnih NSAID je relativna nevarnost za perforacijo in krvavitev najmanjša pri zdravljenju z ibuprofenom in diklofenakom, medtem ko ketoprofen povzroča največ neželenih učinkov. (6) Poleg tega so analgetiki med posamezniki različno učinkoviti, zato je pomembno za vsakega posameznika izbrati primeren odmerek, ki predstavlja najboljše razmerje med zmanjšanjem bolečine in neželenimi učinki. Na sliki 3 je predstavljen vrstni red NSAID glede na relativno tveganje za nastanek hudih neželenih učinkov na prebavilih ob uporabi ekvivalentnih odmerkov. Razlog za majhno škodljivost ibuprofena je v majhnem odmerku, ki se večinoma uporablja v klinični praksi (do 1200 mg na dan). Pri odmerkih, večjih od 1600 mg na dan, se ta prednost izgubi. (6)



Slika 3: Vrstni red NSAID glede na relativno tveganje za nastanek hudih neželenih učinkov na prebavilih ob uporabi ekvivalentnih odmerkov (6)

### 1.3 PREOBČUTLJIVOST ZA NSAID

Med neželene učinke štejemo vse reakcije na zdravilo, ki so škodljive, nenamerne in se pojavijo ob zaužitju običajnih količin. V grobem neželene učinke delimo na dve veliki skupini. Pogostejši so učinki iz prve skupine, kamor štejemo neželene učinke, ki so povezani s farmakološkim delovanjem zdravilne učinkovine, odvisni od odmerka, predvidljivi in se lahko pojavijo pri vseh bolnikih, predvsem pri tistih, ki dobijo večje kumulativne odmerke. V to skupino spadajo bolečine v želodcu, krči in krvavitve. Zaradi vazokonstrikcije aferentne arteriole in zmanjšane glomerulne filtracije lahko ob uporabi NSAID pride tudi do kronične ledvične odpovedi. V drugo skupino spadajo neželeni učinki, ki so nepredvidljivi, se pojavijo samo pri bolj dovzetnih posameznikih in že pri majhnih odmerkih. Pravimo jim tudi preobčutljivostne reakcije. (5)

NSAID so med zdravili takoj za protimikrobnimi zdravilnimi učinkovinami drugi najpogostejši povzročitelji reakcij preobčutljivosti. Preobčutljivost se lahko pokaže takoj (v 15 minutah) ali pa kasneje (v 24 urah) po zaužitju zdravila, največkrat pa se razvije v 1 do 4 urah. Reakcija je lahko zelo huda, tudi smrtno nevarna. (7)

### Mehanizem preobčutljivosti za NSAID

Aspirinska intoleranca in preobčutljivost se kaže kot urtikarija, angioedem, sinusitis, astma ali anafilaksija. Znano je, da veliko teh reakcij ne poteka preko IgE mehanizma, ampak so rezultat zaviranja COX-1 in posledično povečanega izločanja mediatorjev mastocitov, eozinofilcev in bazofilcev. Točen mehanizem reakcije preobčutljivosti na NSAID ni znan.

Predlaganih je več mehanizmov:

- selektivna preobčutljivost za en NSAID oziroma izjemoma več različnih, če je njihova kemijska struktura zelo podobna. Reakcija je lahko akutna, če pri njej sodelujejo IgE ali zapoznela, če so vključeni limfociti T
- netoleranco pri več NSAID različnih kemijskih skupin, povzročeno z neimunološkim mehanizmom. Slednja vključuje inhibicijo COX-1. (7)

### **Preobčutljivost za acetilsalicilno kislino**

ASA je najpomembnejše zdravilo iz skupine NSAID, saj je zaradi svojih lastnosti najbolj pogosto uporabljeno zdravilo proti bolečinam na svetu. Zaradi dostopnosti v prosti prodaji in navzkrižne reaktivnosti z drugimi NSAID, je tudi preobčutljivost za ASA dokaj pogosta, predvsem pri bolnikih z astmo in se lahko kaže kot rinitis, konjunktivitis, urtikarija/angioedem ali psevdoanafilaksija s prizadetostjo kože. Ocenjeno je, da ASA ne prenaša do 20 % odraslih in 5 % otrok z astmo. (8). Zaradi navzkrižne reaktivnosti med ASA in drugimi NSAID se v primeru znane preobčutljivosti za ASA odsvetuje tudi uporaba drugih COX-1 inhibitorjev. Pogostost navzkrižne reaktivnosti med ASA in drugimi šibkimi analgetiki je predstavljena v preglednici 2. (8)

Z ASA povzročeno poslabšanje respiratorne bolezni (ang. *aspirin exacerbated respiratory disease*; AERD) je klinični sindrom, povzročen s preobčutljivostjo na ASA in druge NSAID. AERD prizadene 10-20 % astmatičnih pacientov in pacientov z rinosinusitisom z nosnimi polipi. Zaužitje ASA ali drugih NSAID pri teh pacientih povzroči bronhokonstrikcijo in poslabšanje bronhospazma z napadi astme in rinitisa. Patogeneza AERD še ni popolnoma pojasnjena. Astma je multifunkcionalna in kompleksna kronična bolezen pljuč, do katere pride zaradi hipertrofije in hiperplazije gladkih mišic pljuč, okvare epitelija, povečane sekrecije mukusa, povečane produkcije citokinov in infiltracije vnetnih celic. Klasifikacija na atopično in neatopično astmo temelji na podlagi prisotnosti kliničnih znakov, ki so posledica prisotnosti IgE. Vnetje pljuč pri astmi je povezano z obsežno produkcijo imunskih celic, eozinofilcev, celic T pomagalk (Th2), mastocitov, nevtrofilcev in makrofagov. Lokalna produkcija interlevkinov igra pomembno vlogo pri pretvorbi Th2 celic, induciranju IgE in hiperodzivnosti na alergen. (30) Patogeni mehanizem AERD še ni popolnoma pojasnjen. Najverjetnejši in doslej najpogosteje opisani mehanizem opisuje aspirinsko intoleranco kot posledico aktivacije 5-lipooksigenazne (5-LO) poti, do katere pride zaradi inhibicije COX-1. Posledično se poveča produkcija cisteinil levkotrienov (Cys-LT) in ekspresija cisteinil levkotrienskih receptorjev-1. Ob enem pa motena ekspresija COX-2 vpliva na nižjo produkcijo zaščitnega prostaglandina E2, kar lahko vpliva na povišano sintezo cisteinil

levkotrienov. Cys-LT, s spodbujanjem levkotrienskih receptorjev 1, sproži vse klinične manifestacije astmatičnih reakcij: bronhospazem, povečano žilno prepustnost in izločanje sluzi. Verjetno pa je ključen mehanizem aspirinske intolerance v tem, da je zaradi zaviranja COX-1 zmanjšana tudi tvorba PGE2, ki je zaviralec 5-lipoksigenaze, enega od ključnih encimov tvorbe levkotrienov. (31)

Preglednica 2: Navzkrižna reaktivnost med ASA in najpogosteje uporabljenimi šibkimi analgetiki (8)

Šibki analgetiki	Navzkrižna reaktivnost (%)
Ibuprofen	98
Naproksen	100
Diklofenak	93
Paracetamol	7

## 1.4 DIAGNOSTIČNI TESTI

Danes obstajajo različni testi, s katerimi ugotavljamo alergije. Z alergološkim testom dokažemo, da nekatere bolezenske znake kot so smrkanje, kihanje, izpuščaji na koži, prebavne težave itd. povzroča preobčutljivost. (32)

### 1.4.1 KOŽNI TESTI

Za diagnosticiranje preobčutljivosti uporabljamo vbodni, intradermalni in epikutani krpični test. Pri vbodnem testu naneseemo na notranjo stran podlahtnice majhno količino alergena in skozi kapljico vbodemo v kožo z iglo. Po 15 do 20 minutah pogledamo reakcijo. Pri pozitivnih reakcijah se pojavita mehurček in rdečina, ki ju spremlja srbečica. (32) Pri intradermalnem testu z injekcijsko iglo vnesemo majhno količino alergena med plasti kože, odčitamo pa podobno kot vbodni test. Pri epikutanem krpičnem testu naneseemo alergen na kožo na hrbtu in jo prekrijemo s krpicami, ki jih kasneje odstranimo. Odziv preverimo po 48 urah in 72 urah od nanosa. (32) Pozitivna reakcija se pokaže z vnetjem kože na mestu nanosa alergena.

### 1.4.2 PERORALNI PROVOKACIJSKI TEST

Peroralni provokacijski testi (OPT) so nujni, kadar drugi testi ne dajejo nedvoumnega odgovora o vzroku preobčutljivosti. S tem testom želimo ponazoriti bolezensko dogajanje. Bolnik zaužije alergen (v našem primeru analgetik), pri tem pa opazujemo simptome in znake, ki se lahko razvijejo pri preobčutljivosti. OPT je občutljiv test, a je sam postopek izvedbe

zapleten in lahko tudi nevaren, zato ga delajo samo v bolnišnicah pod strogim nadzorom strokovnjakov in sprva z zelo majhnim odmerkom, ki ga za faktor 5 ali 10 postopoma povečujemo do maksimalnega testnega odmerka, v kolikor manjši odmerek ne povzroči odziva. Test je lahko za preiskovanca zelo neprijeten. Odziv je lahko posledica delovanja več alergijskih in nealergijskih mehanizmov. Vlogo mastocitov in bazofilcev pri tem odzivu lahko ocenimo z merjenjem sproščenega histamina, prostaglandinov, levkotrienov in triptaze v krvi ali metilhistamina v urinu, vlogo eozinofilcev pa z merjenjem eozinofilne kationske beljakovine. Glede na različne mehanizme preobčutljivosti je treba teste izvajati od nekaj ur do več dni. Če imamo le subjektivne simptome, test po navadi ponovimo in primerjamo s placebom (7, 19, 32)

### **1.4.3 TEST AKTIVACIJE BAZOFILCEV**

Test aktivacije bazofilcev (*ang.* basophil activation test – BAT) je *in vitro* diagnostični test za ugotavljanje preobčutljivostnih reakcij. Test omogoča kvantitativno določitev aktivacije bazofilcev po inkubaciji pacientove krvi z alergenom. BAT je metoda, pri kateri s pretočnim citometrom v periferni krvi merimo izražanje označevalcev na površini bazofilcev. Vzorec krvi stimuliramo z določeno količino alergena, ki navzkrižno poveže protitelesa IgE na njihovi površini oziroma bazofilce aktivira preko drugačnih mehanizmov.

#### **Mehanizem testa aktivacije bazofilcev**

Bazofilci so krvne celice, ki spadajo v skupino granulocitov in imajo na svoji citoplazemski membrani tetrasporinski protein CD63 (označevalec pripadnosti (*ang.* *Cluster of differentiation*) ter receptor FcεRI (receptor za Fc regijo imunoglobulina E), ki veže IgE (imunoglobulin razreda E). Pri anafilaktični degranulaciji pride do zlitja granul z membrano bazofilca, kar omogoča izražanje CD63 na celični površini. Marker CD63 se izrazi na površini samo ob aktivaciji, kar izkoriščamo pri izvajanju testa. Detekcijo CD63 izvedemo s pretočno citometrijo, ki lahko analizira veliko število celic. Uporabimo protitelesa *anti-IgE* in *anti-CD63*. Aktivirane bazofilce, ki izražajo visoko afinitetne IgE površinske receptorje – FcεRI, identificiramo z gostoto fluorokromnih konjugatov s protitelesi *anti-IgE* in *anti-CD63*. (33)

#### **Zgodovina razvoja testa aktivacije bazofilcev**

Metoda se uporablja že vse od zgodnjih devetdesetih let, ko je Knol s sodelavci (34) odkril CD63 (znan tudi kot lizosomatski membranski glikoprotein 3) kot označevalec aktivacije bazofilcev, vendar so jo od takrat še dodatno izpopolnili. V 90. letih se je izkazalo, da bazofilci po aktivaciji z alergenom preurejajo izražanje številnih označevalcev pripadnosti

(CD45, CD63, CD 203c). Prvič je bila zamisel analize izražanja CD63 s pretočno citometrijo kot označevalca aktivacije bazofilcev predstavljena leta 1991. Pri neaktiviranih bazofilcih je CD63 izražen znotrajcelično na membrani granul, ki vsebujejo histamin. Navzkrižna povezava protiteles IgE z alergenom na površini bazofilcev sproži zlitje granul s plazemsko membrano in izražanje CD63 na zunajcelični membrani bazofilcev. (34)

Trabado in sodelavci (33) ter Gamboa s sodelavci (35) so v Španiji med leti 2003 in 2008 opravili dve študiji, kjer so pisali o 100 % specifičnosti in 42 % občutljivosti BAT. V prvi študiji (Trabado et al.) je sodelovalo 43 pacientov (19 moških in 24 žensk), ki so imeli predhodno reakcijo na NSAID, in 29 kontrol. Vse analgetike so testirali pri koncentraciji 100 µg/ml. O pozitivnem testu so govorili pri vrednostih razmerja med odzivom na analgetik in spontanem odzivom bazofilcev več kot 2. V drugi študiji (Gamboa et al) je sodelovalo 26 pacientov (6 moških in 20 žensk), občutljivih na metamizol in 30 kontrol. Poročali so, da je BAT zaradi visoke specifičnosti in pozitivne napovedne vrednosti (100 %) zelo uporaben pri potrjevanju preobčutljivosti za NSAID, predvsem pri dokazovanju navzkrižnih reakcij. Zaključili so, da je zaradi visoke občutljivosti in specifičnosti BAT dragoceno alternativno orodje diagnosticiranja preobčutljivosti za pirazolone (metamozol). (33, 35).

V nasprotju z zgoraj omenjenim so leta 2009 Celik in sodelavci (36) že izrazili dvom v uporabnost BAT. Opravili so študijo, ki je zajemala 10 pacientov z astmo (4 ženske in 6 moških) in 10 zdravih kontrol. 6 od 10 pacientov je imelo pozitiven kožni test za NSAID. Pri BAT so uporabili koncentracijo ASA 5 mg/ml. Rezultati so pokazali le 30 % specifičnost za AERD. Dokazali so, da BAT pri bolnikih z dokazano preobčutljivostjo za NSAID ni pokazal razlik s kontrolno skupino. (36)

V študiji, ki jo je opravil Abuaf s kolegi (7), je sodelovalo 60 pacientov s preobčutljivostjo na NSAID v obliki angioedema in urtikarije. 22 od teh pacientov je imelo po zaužitju NSAID tudi druge neželene reakcije (znižan tlak, driska, abdominalna bolečina). Občutljivost BAT za ASA pri 1mg/ml je bila pri teh pacientov 21 %, medtem ko so pri pacientih z resnejšimi reakcijami določili 64 % občutljivost. Skupaj so določili 22 pozitivnih rezultatov od 60, kar kaže na 37 % občutljivost. Dve kontroli od 20 sta imeli pozitiven rezultat, kar pomeni 90 % specifičnost BAT. (7)

### **Uporabe testa aktivacije bazofilcev na Kliniki Golnik**

Na kliniki Golnik so dokazali, da je *in vitro* metoda BAT visoko specifična in občutljiva, omogoča dokaz senzibilizacije, napoveduje neželene učinke specifične imunoterapije in razmeji klinično pomembne in nepomembne epitope. (8). Metodo BAT uporabljajo za

napoved neželenih učinkov med imunoterapijo pri bolnikih, preobčutljivih za strup čebele in ose, pri diagnozi od IgE odvisnih preobčutljivostih za vdihane alergene, lateks, hrano, nekatera zdravila in strupe kožekrilcev. Uporablja se tudi za dokazovanje preobčutljivosti na  $\beta$ -laktamske antibiotike, mišične relaksante in vdihane alergene. Zaradi slabo raziskane diagnostične zanesljivosti testa pa za enkrat te metode pri diagnosticiranju preobčutljivosti na NSAID še ne uporabljajo. (7)

## 2. NAMEN

Namen magistrskega dela je ugotoviti diagnostično vrednost in klinično uporabnost testa aktivacije bazofilcev za ugotavljanje preobčutljivosti na šibke analgetike ter optimizacija tega testa. Določiti smo želeli v kakšni meri rezultati BAT sovpadajo z anamnezo pacientov in rezultati peroralnih provokacijskih testov pacientov in tako določiti diagnostično uporabnost testa. V raziskavo smo vključili paciente, ki so imeli pozitiven rezultat peroralnega provokacijskega testa za NSAID ali paracetamol in paciente, katerim smo po pregledu anamneze ugotovili veliko predtestno verjetnost za preobčutljivost za NSAID ali paracetamol. Na koncu smo zbrali 50 pacientov, ki so se strinjali s sodelovanjem v raziskavi. Test smo opravili tudi pri 10 zdravih ljudeh, da smo dobili kontrolne vzorce. Kontrolne vzorce predstavljajo osebe, ki nimajo znane preobčutljivosti za šibke analgetike. Zdrave kontrole so osebe Klinike Golnik in osebe, ki so prišle na Kliniko Golnik v času raziskave zaradi drugih vzrokov. Vsem pacientom smo opravili BAT za ASA, naproksen in diklofenak, ciljano, če je bila predhodno postavljena diagnoza preobčutljivosti, pa BAT za ibuprofen, metamizol in paracetamol. Teste smo izvajali pri treh različnih koncentracijah. 10 zdravim kontrolam smo opravili BAT za ASA pri vseh treh koncentracijah.

Poleg tega smo želeli določiti ponovljivost metode v istem dnevu in po enem mesecu. Ponovljivost v istem dnevu smo določali tako, da smo pri petih pacientih test za posamezen analgetik (ASA, naproksen in diklofenak) izvedli v triplikatu in sicer pri vseh treh koncentracijah analgetika. Ponovljivost BAT indeksov v istem dnevu smo prikazali s koeficientom variacije (KV). Za določitev ponovljivosti metode po enem mesecu smo BAT za ASA, naproksen in diklofenak ponovno izvedli pri 10 pacientih, ki so že enkrat prišli na testiranje. Vzorce smo analizirali s pretočno citometrijo, podatke pa smo obdelali z računalniškim programom BD CELLQuest Pro software. Statistično analizo podatkov smo izvedli s programoma Microsoft Office Excel IBM SPSS Statistics 24.



### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Vključitev pacientov v raziskavo

Magistrska naloga je del raziskave z naslovom »Profil tolerance za nesteroidne antirevmatike pri bolnikih z anafilaksijo po enem od NSAID in diagnostično uporabnost BAT pri tej entiteti«, ki poteka pod mentorstvom prof. dr. Mitja Košnika, dr. med. Soglasje k izvedbi raziskave je podala Komisija RS za medicinsko etiko in sicer 15.12.2015 - številka soglasja: 0120-647/2015-2, KME 63/12/15 (priloga 1).

V našo raziskavo smo vključili:

- paciente, ki so imeli pozitiven rezultat peroralnega provokacijskega testa za NSAID ali paracetamol
- paciente, katerim smo po pregledu anamneze ugotovili veliko predtestno verjetnost za preobčutljivost za NSAID ali paracetamol in jim zato peroralni provokacijski test z osumljenim analgetikom ni bil narejen.

V februarju in marcu 2016 smo izbrali paciente iz programa BIRPIS po zgornjih kriterijih in jim poslali dopise (vabilo k sodelovanju v raziskavi). Iz raziskave smo izključili vse, ki so zavrnilo sodelovanje v raziskavi. Na koncu smo zbrali 50 pacientov, katerim smo opravili BAT.

Test smo opravili tudi pri 10 zdravih ljudeh, da smo dobili kontrolne vzorce. Kontrolne vzorce predstavljajo osebe, ki so prišle na Kliniko Golnik v času raziskave zaradi drugih vzrokov (druga terapija, zdravljenje ali pregled) in osebje na kliniki ter ambulantni Klinike Golnik v Ljubljani. Ti ljudje nimajo znane preobčutljivosti za šibke analgetike in so tudi soglašali s sodelovanjem v raziskavi.

Preiskovanci so podpisali informiran pristanek. Odvzeli smo jim vensko kri v 5 ml vakuumske epruvete s heparinom. Odvzem smo izvedli na Kliniki Golnik ali v ambulantni Klinike Golnik v Ljubljani. BAT smo izvedli v roku 6 ur od odvzema krvi.

Uporabljeni šibki analgetiki, ki smo jih testirali pri vseh pacientih, so diklofenak, naproksen in ASA, ciljano pa smo testirali ibuprofen, paracetamol ali metamizol in sicer le v primerih, če je bila predhodno postavljena diagnoza preobčutljivosti na enega izmed naštetih analgetikov. 10 zdravim kontrolam smo opravili BAT le za ASA. Vsak analgetik smo testirali pri treh koncentracijah. Nekateri pacienti so imeli opravljen tudi OPT za testirane analgetike. S predhodno pridobljenimi rezultati OPT smo kasneje primerjali naše rezultate BAT.

### 3.1.2 Standardi

Šibki analgetiki, smo jih uporabili v naši raziskavi:

- Liofiliziran diklofenak: Bühlmann Laboratories, Basel, Švica.
- Naproksen: Bühlmann Laboratories, Basel, Švica.
- Acetilsalicilna kislina: Bühlmann Laboratories, Basel, Švica.
- Paracetamol: Bühlmann Laboratories, Basel, Švica.
- Metamizol: Bühlmann Laboratories, Basel, Švica.
- Ibuprofen: Bühlmann Laboratories, Basel, Švica.

### 3.1.3 Reagenti in oprema

- Stimulacijski pufer: Bühlmann FLOW-CAST Stimulin Buffer, IL-3 (B-BAT-STB)
- anti-FcεRI monoklonski antigeni in protitelesa (Bühlmann FLOW-CAST Stimulon Control, B-BAT-STCON)
- fMLP - L-formil-L-metionil-L-levcil-L-fenilalanin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA), koncentracija 0,05 mg/ml (že pripravljen)
- BD FastImmune CD63/CD123/Anti-HLA-DR, BD Biosciences, San Jose, CA, ZDA
- raztopina za lizo eritrocitov: BD FACS Lysing Solution, BD, 10x koncentriran
- pufer za izpiranje: BD CellWash solution, RUO 349524
- fiksacijski pufer: BD CellFIX; 10x koncentriran
- raztopina za pretočni citometer: BD FACSTyping Sheath fluid, 342003
- destilirana voda
- fiziološka raztopina – FR (0,9 % NaCl)
- stresalnik
- polavtomatske pipete (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- epruvete Falcon 12x75 mm
- vodna kopel (za 4°C in za 37°C)
- vibracijski mešalnik Vibromix (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- centrifuga Eppendorf (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- pretočni citometer (FACSCalibur BD Biosciences)

### 3.2 METODE

Teste in analize smo izvajali v Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko Klinike Golnik.

#### 3.2.1 Priprava raztopin analgetikov

##### 1. Priprava reagentov – ASA

Liofiliziran analgetik Bühlmann, ki vsebuje 1000 mg ASA.

V Bühlmann-ov reagent dodamo 5 ml fiziološke raztopine, da dobimo osnovno raztopino s koncentracijo 200 mg/ml. 100  $\mu$ l te raztopine dodamo 100  $\mu$ l fiziološke raztopine in s tem dobimo prvo uporabljeno koncentracijo ( $C_1$ ) ASA 100 mg/ml.

Nato opravimo redčitve:

- Prva redčitev: 10  $\mu$ l raztopine  $C_1$  dodamo 30  $\mu$ l fiziološke raztopine. Dobimo redčino s koncentracijo  $C_2 = 25$  mg/ml.
- Druga redčitev: 10  $\mu$ l raztopine  $C_2$  dodamo 30  $\mu$ l fiziološke raztopine. Dobimo zadnjo redčino s koncentracijo  $C_3 = 6,25$  mg/ml.

##### 2. Priprava reagentov – diklofenak

Uporabimo liofiliziran analgetik Bühlmann, ki vsebuje 6,25  $\mu$ g diklofenaka.

V reagent dodamo 250  $\mu$ l stimulacijskega pufra. Dobimo osnovno raztopino s koncentracijo 25  $\mu$ g/ml.

Pripravimo še dve redčini:

- Prva redčitev: odpipetiramo 10  $\mu$ l raztopine s koncentracijo 25  $\mu$ g/ml in dodamo 90  $\mu$ l fiziološke raztopine. Dobimo raztopino s koncentracijo 2,5  $\mu$ g/ml
- Druga redčitev 1:10; odpipetiramo 10  $\mu$ l raztopine s koncentracijo 2,5  $\mu$ g/ml in dodamo 90  $\mu$ L fiziološke raztopine. Dobimo raztopino s koncentracijo 0,25  $\mu$ g/ml.

##### 3. Priprava reagentov – naproksen

Liofiliziran analgetik Bühlmann, ki vsebuje 100  $\mu$ g diklofenaka.

V alergen dodamo 250  $\mu$ l stimulacijskega pufra. Dobimo osnovno raztopino s koncentracijo 400  $\mu$ g/ml.

Pripravimo še dve redčini:

- Prva redčitev: odpipetiramo 10  $\mu$ l raztopine s koncentracijo 400  $\mu$ g/ml in dodamo 90  $\mu$ l fiziološke raztopine. Dobimo raztopino s koncentracijo 40,0  $\mu$ g/ml.

- Druga redčitev: odpipetiramo 10  $\mu$ l raztopine s koncentracijo 40,0  $\mu$ g/ml in dodamo 90  $\mu$ l fiziološke raztopine. Dobimo raztopino s koncentracijo 4,0  $\mu$ g/ml.

#### 4. Priprava reagentov – paracetamol

Liofiliziran analgetik Bühlmann, ki vsebuje 2,5  $\mu$ g diklofenaka.

V alergen dodamo 250  $\mu$ l stimulacijskega pufra. Dobimo osnovno raztopino s koncentracijo 10  $\mu$ g/ml.

Pripravimo še dve redčini:

- Prva redčitev: odpipetiramo 10  $\mu$ l raztopine s koncentracijo 10  $\mu$ g/ml in dodamo 90  $\mu$ l fiziološke raztopine. Dobimo raztopino s koncentracijo 1,0  $\mu$ g/ml.
- Druga redčitev: odpipetiramo 10  $\mu$ l raztopine s koncentracijo 1,0  $\mu$ g/ml in dodamo 90  $\mu$ l fiziološke raztopine. Dobimo raztopino s koncentracijo 0,1  $\mu$ g/ml.

#### 5. Priprava reagentov – ibuprofen

Liofiliziran analgetik Bühlmann, ki vsebuje 25  $\mu$ g diklofenaka.

V alergen dodamo 250  $\mu$ l stimulacijskega pufra. Dobimo osnovno raztopino s koncentracijo 100  $\mu$ g/ml.

Pripravimo še dve redčini:

- Prva redčitev: odpipetiramo 10  $\mu$ l raztopine s koncentracijo 10  $\mu$ g/ml in dodamo 90  $\mu$ l fiziološke raztopine. Dobimo raztopino s koncentracijo 10  $\mu$ g/ml.
- Druga redčitev: odpipetiramo 10  $\mu$ l raztopine s koncentracijo 1,0  $\mu$ g/ml in dodamo 90  $\mu$ l fiziološke raztopine. Dobimo raztopino s koncentracijo 1,0  $\mu$ g/ml.

#### 6. Priprava reagentov – metamizol

Liofiliziran analgetik Bühlmann, ki vsebuje 12,5  $\mu$ g diklofenaka.

V alergen dodamo 250  $\mu$ l stimulacijskega pufra. Dobimo osnovno raztopino s koncentracijo 50  $\mu$ g/ml.

Pripravimo še dve redčini:

- Prva redčitev: odpipetiramo 10  $\mu$ l raztopine s koncentracijo 50  $\mu$ g/ml in dodamo 90  $\mu$ l fiziološke raztopine. Dobimo raztopino s koncentracijo 5,0  $\mu$ g/ml.
- Druga redčitev 1:10; odpipetiramo 10  $\mu$ l raztopine s koncentracijo 5,0  $\mu$ g/ml in dodamo 90  $\mu$ l fiziološke raztopine. Dobimo raztopino s koncentracijo 0,50  $\mu$ g/ml.

### 3.2.2 Priprava raztopin ostalih reagentov

1. Liofiliziran stimulacijski pufer (Bühlmann FLOW-CAST Stimulatin Buffer, IL-3 (B-BAT-STB)) raztopimo s 50 ml sterilne destilirane vode in za 15 min postavimo na stresalnik.
2. anti-FcεRI kontrola: raztopimo z 1,5 ml stimulacijskega pufra in za 15 min postavimo na stresalnik.
3. Raztopina za lizo eritrocitov: osnovno raztopino BD FACS Lysing Solution redčimo 1:10 (v 10 ml raztopine za lizo eritrocitov dodamo 90 ml destilirane vode).
4. Fiksacijski pufer: osnovno raztopino BD CellFIX redčimo 1:10 (v 10 ml fiksativa dodamo 90 ml destilirane vode).

Za izvedbo testa ogrejemo vse reagente na sobno temperaturo.

### 3.2.3 Priprava končnih koncentracij analgetikov v vzorcu krvi

#### 1. Stimulacija z ASA

V epruvete Falcon najprej odpipetiramo 10 µl stimulacijskega pufra in 0,6 µl raztopine analgetika ter 50 µl heparinirane krvi in nadaljujemo po BAT protokolu. Enako naredimo za vse tri testirane koncentracije.

#### 2. Stimulacija z ostalimi analgetiki

V epruveto Falcon odpipetiramo 25 µl raztopine analgetika in 50 µl heparinirane krvi in nadaljujemo po BAT protokolu. Enako naredimo za vse tri testirane koncentracije.

Rezultati BAT so podani pri koncentracijah, ki jih dosežemo po dodatku heparinirane krvi k raztopinam šibkih analgetikov. Te koncentracije predstavljajo krvno koncentracijo alergenov in so v nadaljevanju navedene kot končne koncentracije. Končne koncentracije testiranih analgetikov v vzorcu krvi so navedene v preglednici 3.

Preglednica 3: Končne koncentracije analgetikov v vzorcu krvi

Zdravilna učinkovina	Končne BAT koncentracije
ASA	1mg/ml, 0,25mg/ml, 0,0625mg/ml
Diklofenak	8,33µg/ml, 0,83µg/ml, 0,083µg/ml
Naproxen	133,33µg/ml, 13,33 µg/ml, 1,33 µg/ml
Paracetamol	3,33 µg/ml, 0,33 µg/ml, 0,03 µg/ml
Ibuprofen	33,33 µg/ml, 3,33 µg/ml, 0,33 µg/ml
Metamozol	16,67 µg/ml, 1,67 µg/ml, 0,167 µg/ml

3. Pri vsakem alergenu naredimo tudi slepi vzorec ter dve pozitivni kontroli:
  - Slepi vzorec (BLENK): odpipetiramo 10 µl stimulacijskega pufra in 50 µl heparinizirane krvi
  - Anti-FcεRI (pozitivna kontrola): odpipetiramo 3 µl stimulacijskega pufra in 7 µl anti-FcεRI, ter dodamo 50 µl heparinizirane krvi.
  - fMLP (pozitivna kontrola): odpipetiramo 10 µl stimulacijskega pufra in 0,6 µl fMLP, ter dodamo 50 µl heparinizirane krvi.

### **3.2.5. BAT protokol**

Na Kliniki Golnik uporabljajo tribarvno tehniko anti-CD123/anti-HLA DR/anti-CD63, kjer so bazofilci označeni kot CD123+/HLA DR-. Prednost te tehnike je, da se lahko uporablja vzorec celotne krvi in ni potrebno izolirati levkocitov.

Vzorci analgetika s heparinizirano krvjo premešamo na vibracijskem mešalniku. Najprej inkubiramo 15 minut v vodni kopeli na 37°C, da spodbudimo reakcijo. Nato vzorce analgetikov s heparinizirano krvjo prenesemo v vodno kopel, ohlajeno na 4°C, da se degranulacija ustavi. Takoj dodamo v vsako epruveto 10 µl CD63 FITC/CD123 PE/anti-HLA-DR PerCP protiteles in inkubiramo 20 minut. Po 20 minutah vzamemo epruvete iz kopeli in v vsako dodamo 2 ml raztopine za lizo eritrocitov. Epruvete inkubiramo 10 minut v temi na sobni temperaturi, nato jih centrifugiramo 5 minut na 1600 obratih/min in odlijemo supernatant. V naslednjem koraku sedimentu dodamo 2 ml raztopine za izpiranje (CellWASH-a), da celice speremo, ponovno centrifugiramo 5 minut na 1600 obratih/min in odlijemo supernatant. Na sediment dodamo 180 µl fiksacijskega pufra (CellFIX-a), s čimer celice fiksiramo. Analiziramo s pretočnim citometrom FACSCalibur v dveh urah.

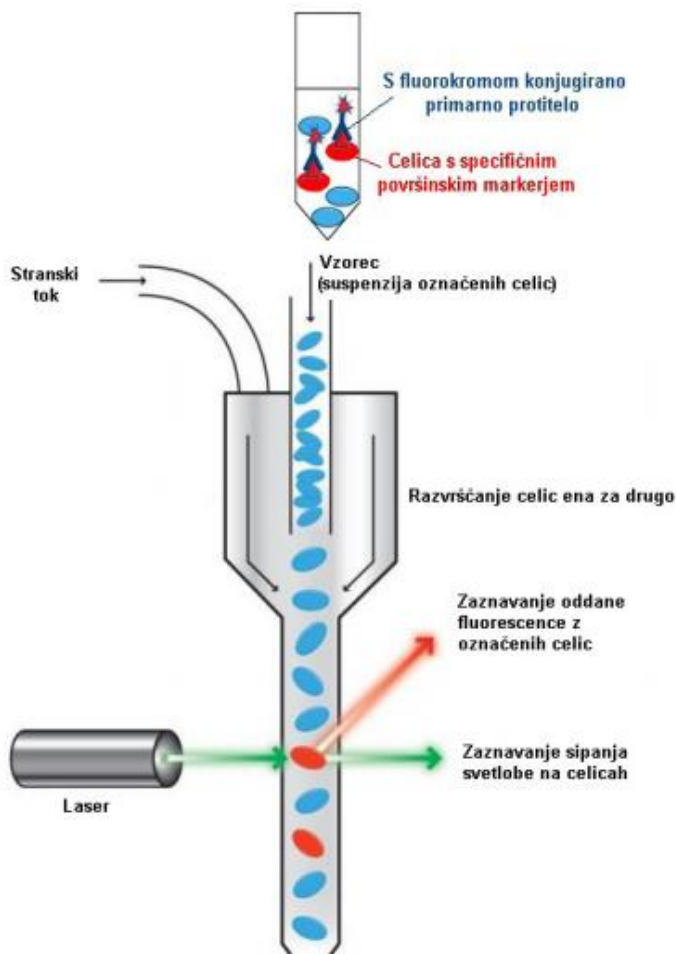
### **3.2.4 Določanje ponovljivosti metode**

Ponovljivost BAT smo določali na dva načina in sicer v istem dnevu in po enem mesecu za ASA, naproksen in naklofen. Ponovljivost v istem dnevu smo določali tako, da smo pri petih pacientih test za posamezen analgetik izvedli v triplikatu in sicer pri vseh treh koncentracijah analgetika. Za določitev ponovljivosti BAT po enem mesecu smo paciente, ki smo jim že enkrat opravili BAT, po enem mesecu ponovno naročili na testiranje. BAT smo ponovili pri 10 pacientih za vsak analgetik (naproksen, diklofenak in ASA) pri vseh treh koncentracijah.

### 3.2.6 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je metoda, ki hkrati meri in analizira več fizikalnih lastnosti enakih delcev, navadno celic, ko se izlivajo v analitski tekočini skozi snop svetlobe. Metoda omogoča merjenje vsake celice, ki v tankem curku potuje skozi pretočni citometer. Svetlobni curek, ki zadene celico, se odbije ali lomi ali pa jo absorbirajo na protitelesu kovalentno vezani fluorokromi, ki nato oddajo svetlobo višjih valovnih dolžin. Fizikalne lastnosti, ki jih izmerimo, so na primer velikost delcev in njihova granuliranost. (37, 38) S pretočno citometrijo je mogoče analizirati tudi celice, obarvane z več fluorescenčnimi barvili hkrati. Celice lahko obarvamo z več monoklonskimi protitelesi hkrati in tako ugotovimo katere kombinacije antigenov so izražene na posamezni populaciji celic. (39)

Pretočni citometer (slika 4) sestavlja pretočna komora, skozi katero tečejo celice v izotonični tekočini. Ob prehodu snopa žarkov posamezna celica odda signal. Dva fotodetektorja merita odboj ali lom, eden iz smeri vira, drugi pa pravokotno na smer vpadne svetlobe. Sipanje zaradi uklona svetlobe na robovih celice zazna prednji detektor sipanja.



Slika 4: Shema pretočne citometrije (28)

### 3.2.7 Analiza rezultatov BAT

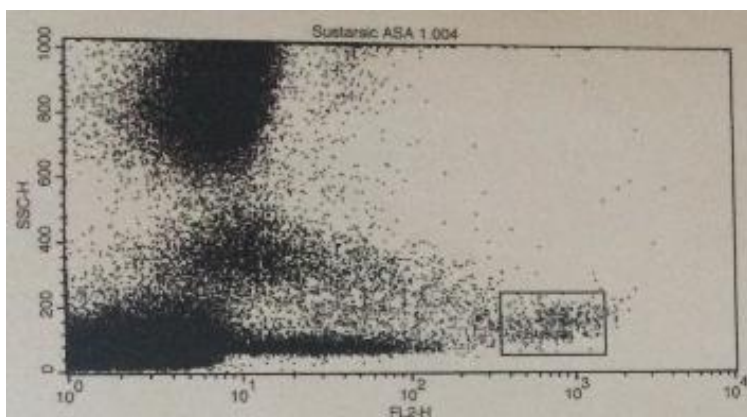
Podatke analize s pretočno citometrijo smo obdelali z računalniškim programom BD CELLQuest Pro software, podjetja BD Bioscience. Omenjeni program omogoča pridobivanje in analizo podatkov, pridobljenih s pretočnim citometrom, ki je direktno povezan z računalnikom. Za zajeto skupino celic določimo zelene parametre. (39)

#### Izračun BAT indeksa za analgetike

Za izračun BAT indeksa 1 (enačba 1) delež CD63 pozitivnih bazofilcev v kvadrantu desno zgoraj delimo s številom aktiviranih bazofilcev v slepem vzorcu. Na sliki 5 so desno spodaj s kvadratom označeni aktivirani bazofilci, ki so zajeti v rezultatih.

$$\text{BAT INDEKS 1} = \frac{\text{odziv bazofilcev pri stimulaciji z alergenom (1 kvadrant)}}{\text{bazalni odziv}}$$

enačba 1



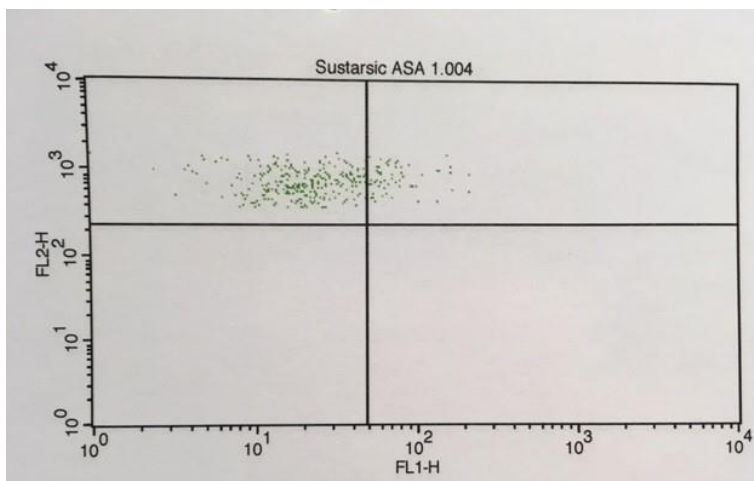
Slika 5: Rezultat pretočne citometrije (osebni arhiv)

Indeks BAT smo ovrednotili še na drugačen način in sicer smo zajeli vse bazofilce ter izračunali BAT indeks 2 z enačbo 2. Upoštevali smo indeks povprečne svetilnosti bazofilcev (povprečno izražanje CD63), aktiviranih z analgetikom, s povprečno svetilnostjo bazofilcev v slepem vzorcu. To smo storili zato, ker je bil v vzorcu majhen delež bazofilcev, ki so močno zažareli. Želeli smo ugotoviti ali je povprečna svetilnost bazofilcev, spodbujenih z alergenom drugačna kot povprečna svetilnost bazofilcev v slepem vzorcu.

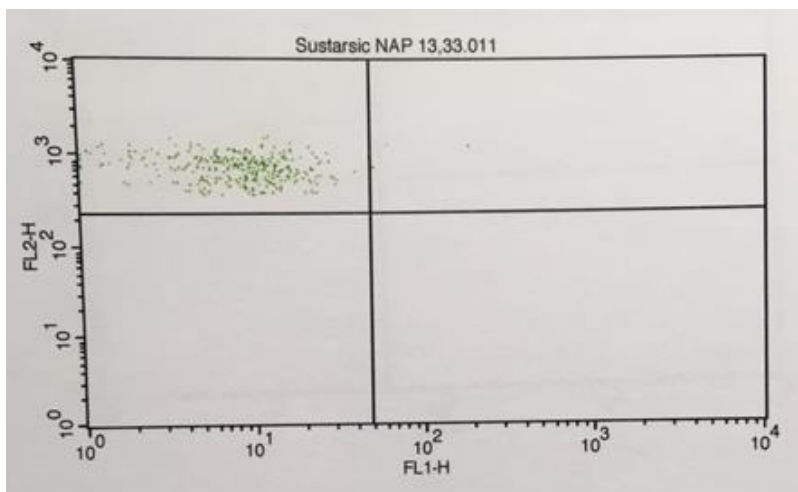
$$\text{BAT INDEKS 2} = \frac{\text{odziv vseh bazofilcev po stimulaciji z alergenom}}{\text{bazalni odziv}}$$

enačba 2





Slika 6: Pozitiven rezultat pretočne citometrije (osebni arhiv)



Slika 7: Negativen rezultat pretočne citometrije (osebni arhiv)

Pri testiranju analgetikov velja:

- Če je izračunani BAT indeks večji kot 2, to pomeni pozitiven odziv (slika 6)
- Če je izračunani BAT indeks manjši kot 2, to pomeni negativen rezultat (slika 7)

### Statistično vrednotenje rezultatov

Statistično analizo podatkov smo izvedli s programoma Microsoft Office Excel IBM SPSS Statistics 24. Ponovljivost BAT indeksov v istem dnevu smo prikazali s koeficientom variacije (KV). Z neparnim  $t$ -testom smo primerjali vrednosti BAT indeksov pri pacientih s preobčutljivostjo za testirana zdravila in zdravih kontrolah. Na ta način smo vrednotili samo rezultate za ASA pri najvišji testirani koncentraciji (1 mg/ml). Za ugotavljanje povezave med rezultati BAT in OPT pri pacientih za ASA pri koncentraciji 1 mg/ml smo uporabili

McNemarjev test z binomsko porazdelitvijo, za ugotavljanje razlike v številu pozitivnih rezultatov BAT za ASA pri koncentraciji 1 mg/ml med pacienti in zdravimi kontrolami pa smo uporabili test  $\chi^2$  kvadrat. Kot statistično značilno razliko smo upoštevali vrednost  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Našo raziskavo smo izvedli zaradi potrebe po *in vitro* metodi diagnosticiranja preobčutljivosti za analgetike. Zaenkrat se kot zlati standard uporablja peroralni provokacijski test, alternativo pa predstavlja BAT. Opravljenih je že bilo nekaj študij z BAT (7, 36, 35), rezultati pa so zelo različni. V prvi študiji so pisali o 42 % občutljivosti in 100 % specifičnosti in zaključili, da je BAT zelo uporabna alternativna metoda za diagnosticiranje preobčutljivosti za NSAID (35), medtem ko so v kasnejših študijah dobili slabše rezultate in sicer, 30 % specifičnost (24) ter 90 % specifičnost in 37 % občutljivost (7), ter zaključili, da pozitivni rezultati BAT za ASA niso bolj pogosti kot pri negativnih kontrolah, zato rezultati niso zanesljivi in je potrebno BAT še optimizirati.

V preglednici 4 so podane demografske značilnosti pacientov z različnim fenotipom preobčutljivosti ter kontrol. Skupaj z 10 negativnimi kontrolami smo opravili BAT 60 ljudem. Med pacienti je bilo 12 moških in 33 žensk, povprečne starosti  $54,2 \pm 6,4$ . Med kontrolami je bilo 7 žensk in 3 moški, povprečne starosti  $48,9 \pm 23,0$ . Največ pacientov je imelo po fenotipu akutno urtikarijo/angioedem, sledijo pa pacienti z anafilaksijo ali urtikarijo po enem analgetiku. 5 pacientom nismo mogli določiti fenotipa, zato smo jih izključili iz analize.

Preglednica 4: Pacienti glede na fenotip, starost in spol ter zdrave kontrole.

Fenotip	Št. P z narejenim BAT	Št. P z opravljenim OPT				Spol		Starost (leta)
		ASA	PAR	NAP	DIK	Moški	Ženske	
Astma/rinitis	5	4	1	/	/	3	2	$55,2 \pm 7,1$
Kronična urtikarija	7	/	2	1	/	1	6	$49,4 \pm 14,6$
Akutna urtikarija/angioedem	18	10	11	1	/	5	13	$51,8 \pm 13,5$
Anafilaksija ali urtikarija po enem analgetiku	15	5	6	5	1	3	12	$60,4 \pm 15,4$
Kasna preobčutljivost	0	/				/	/	/
Izključili iz analize	5					1	4	
Skupaj opravljeni BAT – P	45					12	33	$54,2 \pm 6,4$
Kontrole		10				3	7	$48,9 \pm 23,0$
Skupaj opravljeni BAT – P in NG		60				16	44	$53,1 \pm 9,2$

Legenda: ASA – acetilsalicilna kislina, PAR – paracetamol, NAP – naproksen, DIK – diklofenak, P – pacienti, NG - negativne kontrole

Rezultate BAT predstavljamo v treh sklopih:

- rezultati ponovljivi vosti BAT v istem dnevu in po enem mesecu
- ujemanje rezultatov BAT z rezultati predhodno opravljenih OPT
- rezultati negativnih kontrol

#### 4.1 REZULTATI PONOVLJIVOSTI BAT V ISTEM DNEVU

V prvem sklopu predstavljamo rezultate ponovljivosti BAT v istem dnevu za vse tri analgetike (ASA, naproksen in diklofenak). Ponovljivost smo preverili pri petih pacientih in pri vseh treh koncentracijah vsakega analgetika. Pri posameznem pacientu smo pri vsaki koncentraciji analgetika BAT ponovili trikrat. Kot pozitivno meritev smatramo vrednost indeksa nad 2. Posamezne vrednosti BAT indeksov so podane v preglednicah 5, 7 in 9, ponovljivost BAT indeksov pa predstavljamo s koeficientom variacije (KV) v preglednicah 6, 8 in 10.

##### - ASA

Pri najvišji koncentraciji ASA se rezultati ujemajo pri vseh pacientih in sicer vsi so pozitivni. Pri srednji koncentraciji se rezultati ujemajo pri treh pacientih (pri dveh pacientih so vse tri ponovitve negativne, pri enem pa vse tri pozitivne), pri najnižji koncentraciji pa se rezultati ujemajo pri štirih pacientih, kjer so vsi rezultati negativni (preglednica 5). V preglednici 6 so predstavljeni rezultati ponovljivosti BAT indeksa za ASA pri posamezni testirani koncentraciji. Rezultati so podani s koeficientom variacije (KV), ki je merilo za ponovljivost. Najnižji KV (37,3 %) smo dobili pri najvišji testirani koncentraciji (1 mg/ml), najvišji KV (53, 6%) pa pri najnižji testirani koncentraciji (0,0625 mg/ml).

Preglednica 5: BAT indeksi v istem dnevu za ASA. Zeleno obarvani kvadrati predstavljajo ujemanje pozitivnih vrednosti BAT indeksov pri vseh treh ponovitvah BAT, rumeno obarvani kvadrati pa ujemanje negativnih vrednosti BAT pri vseh treh ponovitvah.

Pacient	Indeks								
	1 mg/ml			0,25 mg/ml			0,0625 mg/ml		
1.	3,97	6,11	3,65	1,62	1,64	1,81	0,55	0,96	1,04
2.	4,00	3,35	2,78	1,47	0,41	0,35	1,37	0,67	0,56
3.	12,83	13,69	11,45	3,79	2,11	3,23	0,88	1,39	1,19
4.	14,36	2,91	3,09	1,99	4,40	7,33	7,73	0,87	1,36
5.	9,13	12,48	15,59	2,43	2,19	1,48	0,49	1,07	1,49

Preglednica 6: Ponovljivosti BAT indeksa pri posamezni testirani koncentraciji ASA, podana s koeficientom variacije (KV). KV je najmanjši pri najvišji testirani koncentraciji.

Pacient	KV (%)		
	1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,0625 mg/ml
1.	29,1	6,3	30,8
2.	26,1	84,7	51,0
3.	8,9	28,2	22,2
4.	96,5	58,5	115,2
5.	26,0	23,5	48,7
Povprečen KV	37,3	40,2	53,6

#### - Naproksen

V preglednici 7 so predstavljeni BAT indeksi ponovljivosti v istem dnevu za naproksen. V preglednici 8 so predstavljeni rezultati ponovljivosti BAT indeksa za naproksen pri posamezni testirani koncentraciji. Najnižji KV (35,9 %) smo dobili pri najnižji testirani koncentraciji (1,33 µg/ml), najvišji KV (56,8 %) pa pri najvišji testirani koncentraciji (133,33 µg/ml).

Preglednica 7: BAT indeksi v istem dnevu za naproksen. Rumeno obarvani kvadrati predstavljajo ujemanje negativnih vrednosti BAT pri vseh treh ponovitvah.

Pacient	Indeks								
	133,33 µg/ml			13,33 µg/ml			1,33 µg/ml		
1.	0,60	1,08	0,86	0,55	0,17	<0,01	0,41	<0,01	0,31
2.	0,36	1,30	0,95	0,37	0,19	0,19	0,20	0,36	0,37
3.	0,23	<0,01	0,22	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
4.	0,59	0,59	0,20	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,19	<0,01
5.	0,28	1,50	1,64	0,40	0,82	0,25	0,14	0,15	0,38

Preglednica 8: Ponovljivosti BAT indeksa pri posamezni testirani koncentracija naproksena, podana s koeficientom variacije (KV).

Pacient	KV (%)		
	133,33 µg/ml	13,33 µg/ml	1,33 µg/ml
1.	28,2	118,2	89,2
2.	55,1	43,3	30,9
3.	86,6	0,0	0,0
4.	48,4	0,0	0,0
5.	65,9	60,0	59,4
Povprečen KV	56,8	44,3	35,9

#### - Diklofenak

V preglednici 9 so predstavljeni BAT indeksi ponovljivosti v istem dnevu za diklofenak. Vsi rezultati ponovljivosti se ujemajo in sicer vsi so negativni. V preglednici 10 so zbrani rezultati ponovljivosti BAT indeksa za diklofenak pri posamezni testirani koncentraciji. Najnižji KV (39,3 %) smo dobili pri najvišji testirani koncentraciji (8,33 µg/ml), najvišji KV (78,6 %) pa pri srednji testirani koncentraciji (0,83 µg/ml).

Preglednica 9: BAT indeksi v istem dnevu za diklofenak. Rumeno obarvani kvadrati predstavljajo ujemanje negativnih vrednosti BAT pri vseh treh ponovitvah.

Pacient	Indeks								
	8,33 µg/ml			0,83 µg/ml			0,083 µg/ml		
1.	0,95	0,37	0,91	0,82	0,04	0,41	0,67	0,25	0,93
2.	0,88	1,24	1,53	0,22	0,11	1,04	0,42	0,30	0,11
3.	0,35	0,61	0,54	0,10	0,17	0,19	0,16	<0,01	0,09
4.	0,12	0,23	0,12	0,12	0,11	0,23	0,24	0,24	<0,01
5.	0,44	1,68	1,03	0,53	<0,01	0,53	0,52	<0,01	0,26

Preglednica 10: Ponovljivosti BAT indeksa pri posamezni testirani koncentracija diklofenaka, podana s koeficientom variacije (KV).

Pacient	KV (%)		
	8,33 µg/ml	0,83 µg/ml	0,083 µg/ml
1.	43,8	44,1	54,7
2.	26,6	111,8	56,3
3.	26,5	33,8	95,1
4.	40,7	42,1	86,6
5.	59,0	101,3	101,3
Povprečen KV	39,3	66,6	78,6

Pri ASA in diklofenaku opazimo podoben trend ponovljivosti v istem dnevu – najnižji KV smo dobili pri najvišji koncentraciji, medtem ko je pri naproksenu ravno obratno. KV so visoki pri vseh analgetikih pri vseh treh koncentracijah, kar pomeni, da se rezultati med seboj razlikujejo in je zato ponovljivost metode slaba. Za diklofenak in naproksen se rezultati pri vseh pacientih pri vseh treh ponovitvah in pri vseh treh koncentracijah ujemajo, vendar moramo tu poudariti, da so vsa ujemanja v negativnih rezultatih. Rezultati za ASA pa so nekoliko različni. Pri najvišji koncentraciji se pozitivni rezultati ujemajo pri vseh pacientih, pri srednji koncentraciji se negativni rezultati ujemajo pri 4 pacientih, pri enem pacientu pa so pozitivni. Pri najnižji koncentraciji se negativni rezultati ujemajo pri 4 pacientih, pri enem so različni, pozitivnih rezultatov pa nismo dobili. KV je v primeru ASA podobno nehomogen kot pri diklofenaku in naproksenu. Giba se med 37,3 % pri najvišji koncentraciji in 53,6 % pri najnižji koncentraciji, zato je tudi v primeru ASA ponovljivost slaba.

Razlog, da smo dobili toliko negativnih rezultatov je najverjetneje v tem, da smo po naknadnem pregledu literature ugotovili, da so naše testirane koncentracije analgetikov prenizke. V več študijah z BAT so testirali dosti višje koncentracije analgetikov, na primer za vse 100 µg/ml (25) oziroma za ASA 5 mg/ml (24).

## 4.2 REZULTATI PONOVLJIVOSTI BAT PO ENEM MESECU

V drugem sklopu predstavljamo rezultate ponovljivosti BAT po enem mesecu. Test smo opravili pri desetih pacientih za vse tri analgetike in pri vseh treh koncentracijah (ena meritev pri posamezni koncentraciji). Za vsakega pacienta smo test izvedli dvakrat; ob prvem naročilu in nato še po enem mesecu (skupaj 30 ponovitev). Rezultate predstavljamo v preglednicah 11-13 v obliki izračunanih BAT indeksov za posamezno meritev. V preglednicah so podani tudi deleži pozitivnih oziroma negativnih ujemanj BAT indeksov pri obeh ponovitvah.

### - ASA

V preglednici 11 so predstavljeni indeksi BAT za ASA ob prvem obisku in po enem mesecu. Ponovljivosti BAT po enem mesecu smo vrednotili tako, da smo pri vsakem pacientu pogledali ujemanje indeksov BAT pri prvem testiranju in po enem mesecu posebej za ASA (indeks nad ali pod 2). Če gledamo rezultate posameznih ponovitev, se rezultati ujemajo pri 16 ponovitvah od 30, kar daje 53,3 % ujemanje. Delež pozitivnih ujemanj predstavlja 30,0 % ujemanje (9/30), delež negativnih ujemanj pa 23,3 % (7/30). Pri dveh od 10 pacientov se vrednosti BAT indeksov prvič in po enem mesecu ujemajo pri vseh treh koncentracijah, kar pomeni 20 % ujemanje. Pri osmih od 10 pacientov se indeksi ujemajo vsaj pri posamezni koncentraciji (največkrat obakrat pozitiven rezultat pri najvišji koncentraciji), pri dveh pacientih pa se indeksi ne ujemajo niti pri eni testirani koncentraciji.

Preglednica 11: Indeksi BAT za ASA ob prvem obisku in po enem mesecu. Zeleno obarvani kvadrati predstavljajo ujemanje pozitivnih vrednosti BAT indeksov ob prvi izvedbi BAT in po enem mesecu, rumeno obarvani pa ujemanje negativnih vrednosti BAT indeksov.

Št. Pacienta	Koncentracija v mg/ml	Indeks		Št. pacienta	Koncentracija v mg/ml	Indeks	
		Prvič	Po enem mesecu			Prvič	Po enem mesecu
1	0,0625	0,23	4,05	6	0,0625	9,25	0,73
	0,25	0,45	12,75		0,25	7,21	1,44
	1	1,71	24,99		1	7,02	5,95



Nadaljevanje preglednice 11: Indeksi BAT za ASA ob prvem obisku in po enem mesecu. Zeleno obarvani kvadrati predstavljajo ujemanje pozitivnih vrednosti BAT indeksov ob prvi izvedbi BAT in po enem mesecu, rumeno obarvani pa ujemanje negativnih vrednosti BAT indeksov

Št. Pacienta	Koncentracija v mg/ml	Indeks		Št. pacienta	Koncentracija v mg/ml	Indeks	
		Prvič	Po enem mesecu			Prvič	Po enem mesecu
2	0,0625	1,08	0,59	7	0,0625	0,13	1,11
	0,25	2,82	1,35		0,25	0,74	5,66
	1	11,39	4,50		1	8,93	14,61
3	0,0625	0,99	0,64	8	0,0625	0,86	1,45
	0,25	1,89	6,62		0,25	1,43	1,57
	1	9,88	23,92		1	6,88	2,88
4	0,0625	0,88	6,25	9	0,0625	0,93	0,60
	0,25	3,79	10,75		0,25	1,78	0,54
	1	12,83	23,39		1	13,26	5,15
5	0,0625	5,01	0,42	10	0,0625	0,60	3,62
	0,25	5,71	0,79		0,25	1,67	3,14
	1	10,35	1,41		1	2,18	4,32
Delež pozitivnih ujemanj				9/30 = 30,0 %			
Delež negativnih ujemanj				7/30 = 23,3 %			

#### - Naproksen

V preglednici 12 so predstavljeni indeksi BAT za naproksen ob prvem obisku in po enem mesecu. Pri naproksenu se vrednosti indeksov ujemajo pri 8 od 10 pacientov pri vseh treh testiranih koncentracijah (indeksi pri vseh treh koncentracijah pod 2, torej negativen rezultat), kar pomeni, da smo dosegli 80 % ujemanje. Pri dveh pacientih smo enkrat dobili pozitiven rezultat, drugič pa negativnega. Skupno smo dosegli 28 od 30 negativnih ujemanj, kar pomeni, da delež negativnih ujemanj predstavlja 93,3 %. Pozitivnih ujemanj za naproksen nismo dosegli.

Preglednica 12: Indeksi BAT za naproksen ob prvem obisku in po enem mesecu. Rumeno obarvani kvadrati predstavljajo ujemanje negativnih vrednosti BAT indeksov ob prvi izvedbi BAT in po enem mesecu.

Št. pacienta	Koncentracija v $\mu\text{g/ml}$	Prvič	Po enem mesecu	Št. pacienta	Koncentracija v $\mu\text{g/ml}$	Prvič	Po enem mesecu
1	1,33	<0,01	0,16	6	1,33	0,20	0,22
	13,33	<0,01	0,63		13,33	0,19	<0,01
	133,33	0,09	5,13		133,33	1,10	0,66
2	1,33	0,08	1,09	7	1,33	0,13	0,19
	13,33	0,08	0,10		13,33	0,29	0,38
	133,33	1,04	0,10		133,33	0,00	1,54
3	1,33	0,19	0,13	8	1,33	0,34	0,20
	13,33	0,22	0,26		13,33	0,16	0,22
	133,33	0,48	1,48		133,33	1,08	0,56
4	1,33	0,97	0,80	9	1,33	<0,01	0,27
	13,33	0,47	0,44		13,33	<0,01	0,19
	133,33	2,17	1,05		133,33	1,13	0,24
5	1,33	0,00	0,24	10	1,33	0,99	0,08
	13,33	0,87	0,12		13,33	0,50	0,52
	133,33	1,27	0,89		133,33	<0,01	0,66
Delež pozitivnih ujemanj					0/30 = 0 %		
Delež negativnih ujemanj					28/30 = 93,3 %		

#### - Diklofenak

V preglednici 13 so predstavljeni indeksi BAT za diklofenak ob prvem obisku in po enem mesecu. Vrednosti BAT indeksov za diklofenak se ujemajo pri 9 od 10 pacientov (pri vseh treh koncentracijah smo obakrat dobili negativen rezultat; indeks manjši od 2), le pri enem pacientu se pri najvišji koncentraciji rezultata ne ujemata (enkrat smo dobili negativen rezultat, naslednjič pa pozitivnega), kar pomeni, da smo dosegli 90 % ujemanje. Skupno se negativni indeksi ujemajo pri 29 od 30 ponovitev, kar pomeni, da delež negativnih ujemanj predstavlja 96,7 %, pozitivnih ujemanj pa nismo dosegli.

Preglednica 13: Indeksi BAT za diklofenak ob prvem obisku in po enem mesecu. Rumeno obarvani kvadrati predstavljajo ujemanje negativnih vrednosti BAT indeksov ob prvi izvedbi BAT in po enem mesecu.

Št. pacienta	Koncentracija v $\mu\text{g/ml}$	Prvič	Po enem mesecu	Št. pacienta	Koncentracija v $\mu\text{g/ml}$	Prvič	Po enem mesecu
1	0,083	0,11	0,31	6	0,083	0,21	0,23
	0,83	0,00	0,32		0,83	0,38	0,25
	8,33	0,24	2,02		8,33	0,60	0,69
2	0,083	0,34	0,10	7	0,083	0,52	0,20
	0,83	0,32	0,10		0,83	0,53	0,27
	8,33	0,25	<0,01		8,33	0,44	1,16
3	0,083	0,00	0,36	8	0,083	<0,01	0,20
	0,83	0,11	0,70		0,83	0,09	0,57
	8,33	0,63	0,98		8,33	0,38	1,45
4	0,083	0,72	0,22	9	0,083	0,12	0,00
	0,83	0,48	1,12		0,83	0,12	0,57
	8,33	1,64	1,89		8,33	0,43	0,17
5	0,083	0,68	0,31	10	0,083	<0,01	0,23
	0,83	0,82	<0,01		0,83	<0,01	0,26
	8,33	0,95	0,47		8,33	0,41	0,83
Delež pozitivnih ujemanj				0/30 = 0 %			
Delež negativnih ujemanj				29/30 = 96,7 %			

Najboljšo ponovljivost metode po enem mesecu smo dosegli pri diklofenaku (90 % ponovljivost), sledi naproksen (80 % ujemanje), najslabše ujemanje pa smo dosegli pri ASA, kjer je ujemanje pri vseh treh koncentracijah le 20 %. Če gledamo ujemanje v posameznih ponovitvah (prvič in po enem mesecu), smo prav tako najboljšo ponovljivost dosegli pri diklofenaku (96,7 %), sledi naproksen (93,3 %) in najslabše ujemanje ponovno pri ASA (53,3 %). Vsa ujemanja, ki smo jih dosegli pri diklofenaku in naproksenu, so ujemanja v negativnih rezultatih, zato ne moremo reči, da je ponovljivost metode dobra. Testni sistem je bil najverjetneje postavljen tako, da se celice sploh niso odzvale, saj smo uporabili prenizke koncentracije. Pri ASA smo dobili nekaj ujemanj v pozitivnih rezultatih (30,0 %), saj je bila najvišja testirana koncentracija dovolj velika, da so se celice odzvale, vendar pa je tudi v primeru najvišje koncentracije ASA ponovljivost metode po enem mesecu slaba.

### 4.3 REZULTATI BAT IN PREDHODNO OPRAVLJENIH OPT

V preglednici 14 so zbrani podatki glede števila opravljenih BAT za določen analgetik ter število in delež pozitivnih BAT indeksov pri najvišji testirani koncentraciji analgetika (pozitiven oz. negativen rezultat). Za ASA, naproksen in diklofenak smo opravili 50 BAT, medtem ko smo ostale tri analgetike testirali ciljano, zato smo zanje opravili manj testov in sicer za ibuprofen 1 BAT, za paracetamol 15 BAT in metamizol 5 BAT.

Pozitivne rezultate BAT smo dobili le pri najvišjih testiranih koncentracijah analgetikov, pri ASA tudi pri nižji koncentraciji. Nikoli se ni zgodilo, da bi dobili pri nižji koncentraciji pozitiven rezultat, pri višji pa negativnega, zato smo v nadaljnjih analizah rezultatov upoštevali vrednosti BAT indeksov pri najvišjih testiranih koncentracijah analgetikov. Rezultati za vse analgetike pri vseh treh koncentracijah se nahajajo v Prilogi 2 (ASA, naproksen in diklofenak) ter Prilogi 3 (ibuprofen, paracetamol in metamizol).

Preglednica 14: Število pacientov, katerim smo opravili BAT za določen analgetik in rezultati pri najvišji testirani koncentraciji analgetika

Analgetik	Št. opravljenih BAT	Št. pozitivnih BAT	Pozitivni testi (%)
Diklofenak	50	1	2
Naproksen	50	5	10
ASA	50	45	90
Ibuprofen	1	0	0
Paracetamol	15	0	0
Metamozol	5	0	0

Največ pozitivnih rezultatov smo dobili za ASA, kjer smo zabeležili 45 pozitivnih rezultatov od 50 opravljenih BAT, kar predstavlja 90 %. Sledi naproksen, kjer smo izmed 50 BAT zabeležili 5 pozitivnih rezultatov, kar predstavlja 10 %. Za diklofenak smo zabeležili le 1 pozitiven rezultat od 50 BAT, medtem ko za ibuprofen, paracetamol in metamizol nismo dobili nobenega pozitivnega rezultata. Glede na paciente, katere smo vključili v raziskavo, smo pri ASA pričakovali največ pozitivnih rezultatov.

V preglednici 15 so predstavljeni rezultati predhodno opravljenih OPT za vključene paciente. Največ OPT je bilo opravljenih za paracetamol (27), sledi ASA (26), naproksen (9), najmanj pa za diklofenak (2). Za ibuprofen in metamizol ni bilo opravljenih OPT. Največ pozitivnih rezultatov OPT, to je 17, je bilo doseženih pri ASA, kar predstavlja 65,4 % vseh opravljenih

OPT za ASA. En pozitiven rezultat od dveh opravljenih OPT (50 %) je bil dosežen pri diklofenaku, sledita paracetamol, s 6 pozitivnimi OPT od 27 opravljenih OPT, kar predstavlja 22,2 % in naproksen, z dvema pozitivnima rezultatoma od 9 OPT (22,2 %).

Preglednica 15: Rezultati predhodno opravljenih OPT

Analgetik	Št. opravljenih OPT	Št. pozitivnih OPT	Pozitiven OPT (%)
Diklofenak	2	1	50
Naproksen	9	2	22,2
ASA	26	17	65,4
Ibuprofen	0	0	/
Paracetamol	27	6	22,2
Metamozol	0	0	/

V preglednici 16 so predstavljeni rezultati testiranja pri pacientih, ki so imeli opravljen OPT in BAT.

Preglednica 16: Število pacientov, pri katerih se rezultati OPT in BAT ujemajo:

	OPT		BAT		Ujemanje rezultatov	Rezultat McNemarjevega testa
ASA	Pozitiven	17	Pozitiven	12	12 (46,2 %)	p=0,424
			Negativen	5		
	Negativen	9	pozitiven	9		
			Negativen	0		
NAPROKSEN	Pozitiven	2	Pozitiven	0	0 oz. 0,0%	/
			Negativen	2		
	Negativen	7	Pozitiven	5		
			Negativen	0		
DIKLOFENAK	Pozitiven	1	Pozitiven	0	1 oz. 50 %	/
			Negativen	1		
	Negativen	1	Pozitiven	0		
			Negativen	1		
PARACETAMOL	Pozitiven	4	Pozitiven	0	10 oz. 71,43 %	/
			Negativen	4		
	Negativen	10	Pozitiven	0		
			Negativen	10		

Za ASA je bilo predhodno opravljenih 26 OPT, medtem ko smo BAT test izvedli pri vseh testiranih. Tu smo dosegli najboljše ujemanje in sicer pri 12 pozitivnih testih (v 46,2 % ujemanja pozitivnega rezultata OPT in BAT), negativnih ujemanj OPT in BAT pa nismo zabeležili. Izvedli smo tudi McNemarjev test za ASA s katerim pa smo dokazali, da med rezultati OPT in BAT ni značilne povezave. Za druge testirane analgetike McNemarjevega testa nismo izvedli, saj nismo dobili primernih rezultatov za analizo. V literaturi zasledimo 37 % ujemanje OPT z BAT (22 pacientov od 60) za ASA pri koncentraciji 1 mg/ml (7) oz. v drugi raziskavi 45,5 % ujemanje (35). Naši rezultati kažejo na 46,2 % ujemanje (občutljivost), kar pomeni, da smo uspeli doseči večjo občutljivost. Vendar pa moramo biti pri podatku o občutljivosti BAT pazljivi, saj vemo, da gre pri ASA za nespecifičen odziv bazofilcev in posledično veliko pogostost lažno pozitivnega rezultata, kar kaže na pomanjkljivost testa (nespecifična aktivacija), občutljivost pa zato lažno višja.

Za naproksen je bilo predhodno opravljenih 9 OPT. Dva testa sta pokazala pozitiven rezultat, 7 jih je bilo negativnih. Kot je razvidno iz preglednice 16, smo BAT za naproksen opravili pri vseh 50 pacientih, a smo za primerjavo upoštevali samo 9 pacientov, ki so imeli opravljen tudi OPT. Pri nobenem pacientu se rezultati obeh testov ne ujemajo.

Za diklofenak sta bila predhodno opravljena samo dva OPT. Eden je pokazal pozitiven in eden negativen rezultat. Rezultati OPT in BAT se ujemajo pri enem pacientu in sicer oba testa sta pokazala negativen rezultat, kar nama daje 50 % občutljivost. Ta odstotek je zaradi majhnega števila izvedenih testov vprašljiv. V literaturi zasledimo 33 % ujemanje (7) in 50 % ujemanje (35). Najvišja uporabljena koncentracija je nižja kot jo zasledimo v literaturi, kjer so uporabili 100 µg/ml (35) oz. 0,125 mg/ml.

Od analgetikov, ki smo jih testirali ciljano, smo največ ujemanja dosegli pri paracetamolu. Skupno število pacientov, ki je imelo opravljeno tako OPT kot tudi BAT, je 14, od tega se pri 10 pacientih rezultati ujemajo (negativen OPT in BAT), kar predstavlja 71,43 % ujemanje. Kljub navideznemu dobremu ujemanju rezultatov pa moramo biti tudi pri paracetamolu pazljivi, saj smo tudi v tem primeru dobili samo negativna ujemanja rezultatov. Rezultat BAT je negativen pri vseh pacientih, OPT pa pri večini, zato ne moremo z gotovostjo trditi, da gre v primeru paracetamola za dobro občutljivost.

Rezultati predhodno opravljenega OPT in rezultati BAT se najbolj ujemajo pri diklofenaku (50 % ujemanje), vendar smo tu upoštevali samo dva pacienta. Zato so nam bolj zanimivi rezultati ujemanja za paracetamol, kjer smo dosegli 71,43 % ujemanje in za ASA, kjer smo dosegli 46,2 % ujemanje. Testirane koncentracije, ki smo jih uporabili pri ASA, so najbolj primerne, saj so najbolj podobne terapevtskim koncentracijam (1 mg/ml) in tudi testiranim

koncentracijam, ki jih zasledimo v literaturi (7). Testirane koncentracije ostalih analgetikov so bile najverjetneje prenizke, saj smo zaznali nek odziv bazofilcev, vendar izračun indeksov ni pokazal dovolj velikega odziva, da bi lahko rekli, da je BAT pokazal pozitiven rezultat. Za diklofenak in paracetamol bi na primer morali vzeti vsaj 10 µg/ml oz. tako kot v literaturi, kjer so vzeli 100 µg/ml. (35)

#### 4.4 REZULATI NEGATIVNIH KONTROL

BAT smo izvedli tudi na 10 prostovoljcih, ki niso imeli predhodnih znanih preobčutljivostnih reakcij na izbrane analgetike. Teste negativnih kontrol smo izvedli z ASA pri vseh treh koncentracijah. Rezultati so predstavljeni v preglednici 17.

Preglednica 17: Rezultati negativnih kontrol za ASA pri vseh treh koncentracijah. Zeleno obarvani kvadrati predstavljajo pozitivne rezultate BAT.

Št. prostovoljca	Indeks BAT 1			Indeks BAT 2
	0,0625 mg/ml	0,25 mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml
1.	0,8	0,1	1,72	1,60
2.	1,3	1,0	4,96	3,19
3.	0,5	0,3	2,88	2,29
4.	2,4	5,5	12,08	1,57
5.	0,9	0,6	1,89	1,50
6..	1,4	2,9	7,78	4,66
7.	0,3	0,2	1,08	0,67
8.	1,5	1,0	5,39	1,92
9.	0,72	1,4	3,33	1,22
10.	0,50	1,4	1,87	1,12
Povprečen indeks	1,03	1,44	4,27	1,97

V nadaljevanju smo pri pacientih s preobčutljivostjo in negativnih kontrolah primerjali vrednosti indeksa BAT izračunanega po enačbi 1 in enačbi 2 in sicer za ASA pri koncentraciji 1 mg/ml. Indeksi BAT 1 in BAT 2 negativnih kontrol se nahajajo v preglednici 17, indeks BAT 1 za paciente se nahajajo v Prilogi 2, indeksi BAT 2 za paciente pa so predstavljeni v preglednici 18. Z neparnim t-testom smo želeli ugotoviti ali so značilne razlike v BAT indeksih pacientov in negativnih kontrol ter s  $\chi^2$  testom ali so med obema skupinama

testirancev značilne razlike v pozitivnih rezultatih. Rezultati statistične analize so predstavljeni v preglednici 19. Kot statistično pomembno smo upoštevali  $p < 0,05$ .

Preglednica 18: Indeks BAT 2 za paciente, izračunan z upoštevanjem povprečne fluorescence označevalca, za ASA pri 1 mg/ml. Zeleno pobarvani kvadrati predstavljajo pozitivne vrednosti BAT indeksov 2.

Št. pacienta	Indeks	Št. pacienta	Indeks	Št. pacienta	Indeks	Št. pacienta	Indeks	Št. pacienta	Indeks
1.	1,9	11.	2,8	21.	2,8	31.	1,9	41.	2,0
2.	3,6	12.	5,4	22.	2,6	32.	1,8	42.	1,9
3.	1,9	13.	1,4	23.	2,1	33.	1,3	43.	2,9
4.	1,8	14.	2,3	24.	2,5	34.	1,8	44.	1,7
5.	1,3	15.	3,6	25.	1,3	35.	1,9	45.	1,3
6.	1,7	16.	2,0	26.	3,2	36.	1,5	46.	1,9
7.	2,3	17.	1,9	27.	3,6	37.	0,9	47.	1,1
8.	2,0	18.	1,9	28.	2,3	38.	2,3	48.	2,3
9.	2,2	19.	2,5	29.	2,4	39.	1,8	49.	2,6
10.	2,2	20.	3,3	30.	2,4	40.	1,8	50.	1,5

Preglednica 19: Rezultati t-testa BAT indeksa 1 in 2 za paciente in negativne kontrole pri ASA 1 mg/ml.

	BAT indeks 1		BAT indeks 2	
	Neg. kontrole	Pacienti	Neg. kontrole	Pacienti
Povprečje	4,27	7,46	1,97	2,18
t-test	0,033		0,60	
$\chi^2$	0,015		0,204	

Po izračunu BAT indeksa 2 za ASA pri 1 mg/ml smo pri pacientih dobili 26 pozitivnih in 24 negativnih rezultatov, med tem ko smo po izračunu BAT indeksa 1 dobili 45 pozitivnih in 5 negativnih rezultatov.

Po pregledu rezultatov iz preglednice 17 smo ugotovili, da je pri najvišji koncentraciji BAT indeks 1 pozitiven tudi pri 6 od 10 zdravih kontrol (indeks večji kot 2), pri dveh testirancih



tudi pri srednji koncentraciji. To pomeni, da je BAT indeks 1 pokazal pozitiven rezultat pri 60 % zdravih kontrol. BAT indeks 2 je pokazal pozitiven rezultat pri treh testirancih, kar pomeni 30 % zdravih kontrol. Iz rezultatov bi sklepali, da je izračun BAT indeksa 2 bolj primeren kot BAT indeks 1.

Primerjava vrednosti BAT indeksa 1 (t-test,  $p=0,033$ ) kaže na to, da je med skupinama testirancev značilna razlika, medtem ko pri BAT indeksu 2 (t-test,  $p=0,60$ ) med skupinama ni statistično pomembnih razlik. Prav tako rezultat  $\chi^2$  testa pokaže značilno razliko v številu pozitivnih BAT indeksov 1 ( $\chi^2$ ,  $p=0,015$ ) med obema skupinama testirancev, medtem ko je ta razlika pri BAT indeksu 2 neznačilna. ( $\chi^2$ ,  $p=0,204$ ).

Glede na rezultate statistične analize to torej lahko zaključili, da je računanje po klasični metodi, s katero smo dobili BAT indeks 1, boljše kot pa z upoštevanjem imunofluorescence označevalca. Čeprav je povprečen BAT indeks 1 pri pacientih v našem primeru večji kot pri negativnih kontrolah, pa zaradi slabe specifičnosti (veliko pozitivnih rezultatov pri negativnih kontrolah) lahko zaključimo, da gre pri BAT za nespecifičen odziv na alergen.

Glede na oba izračunana indeksa lahko zaključimo, da test ne loči posameznike s preobčutljivostjo od zdravih. V literaturi zasledimo 90 % (2 pozitivna rezultata od 20 testiranih zdravih kontrol – 10 %) in celo 100 % specifičnost BAT. Mi smo dobili 6 pozitivnih rezultatov pri BAT indeksu 1 oziroma 3 pozitivne rezultate pri BAT indeksu 2, kar pomeni slabo specifičnost.

Glede na rezultate tudi ne moremo podati mejne vrednosti, ki bi klinično pomembno ločila bolnike od kontrol. Dokazali smo, da BAT nima diagnostične vrednosti pri opredeljevanju preobčutljivosti za analgetike. OPT še vedno ostane edina zanesljiva diagnostična metoda diagnosticiranja preobčutljivosti za analgetike.

## 5. SKLEPI

- V našo raziskavo smo vključili 50 pacientov s predhodno opravljenim OPT ali z visoko verjetnostjo preobčutljivosti za izbrane šibke analgetike in 10 zdravih kontrol.
- Pri določevanju ponovljivosti metode v istem dnevu smo pri ASA, diklofenaku in naproksenu dobili veliko razpršenost rezultatov (KV od 35,9 % do 78,6 %), kar kaže na to, da rezultati niso homogeni. Zato lahko zaključimo, da je ponovljivost metode v istem dnevu slaba.
- Pri določevanju ponovljivosti metode po enem mesecu smo gledali ujemanje rezultatov za ASA, naproksen in diklofenak pri vseh treh testiranih koncentracijah prvič in ob drugem testiranju po enem mesecu. Največ ujemanja BAT indeksov (obakrat negativen oz. pozitiven) smo dosegli pri diklofenaku (96,7 %), vendar je šlo za negativna ujemanja. Zaključili smo, da se zaradi prenizkih koncentracij celice sploh niso odzvale in so rezultati ujemanja lažno visoki. Pri ASA so se zaradi dovolj visoke koncentracije celice odzvale in smo dobili nekaj pozitivnih ujemanj (30 %), vendar pa je tudi v primeru ASA ponovljivost metode slaba.
- Od opravljenih 50 BAT, smo pri ASA dobili 45 pozitivnih rezultatov (90 % vseh opravljenih BAT), pri diklofenaku 1 pozitiven rezultat (2 %) in pri naproksenu 5 pozitivnih rezultatov (10 %). Pri analgetikih, ki smo jih testirali ciljano (ibuprofen, metamizol in paracetamol), nismo dobili nobenega pozitivnega rezultata.
- Najboljše ujemanje rezultatov BAT s predhodno opravljenimi OPT smo dobili pri paracetamolu (71,4 %), sledi diklofenak s 50 %. Pri paracetamolu gre ponovno le za negativna ujemanja, v primeru diklofenaka pa za samo enega pacienta, zato občutljivost BAT najbolj realno pokažejo rezultati ASA, kjer smo dobili 46,2 % ujemanje rezultatov (pozitivno in negativno ujemanje). Za ASA smo tudi dokazali, da med testoma ni značilnih razlik v deležu pozitivnih rezultatov (McNemarjev test,  $p=0,424$ )
- Ugotovili smo, da gre pri BAT za nespecifičen odziv na alergen, saj je bil pri ASA (1 mg/ml) BAT indeks 1 pozitiven pri 6 kontrolah (60 %), medtem ko je bil BAT indeks 2 pozitiven v 30 %. Med kontrolami in pacienti je značilna razlika v vrednosti BAT indeksa 1 (t-test,  $p=0,033$ ), medtem ko pri BAT indeksu 2 med skupinama ni

statistično pomembnih razlik (t-test,  $p=0,60$ ). Med obema skupinama testirancev je značilna razlika v številu pozitivnih BAT indeksov 1 ( $\chi^2=0,015$ ), medtem ko je ta razlika pri BAT indeksu 2 neznačilna ( $\chi^2=0,204$ ). Specifičnost BAT je torej slaba in ne moremo podati neke mejne vrednosti, ki bi klinično pomembno ločila obe skupini testiranih ljudi.

- Zaključimo lahko, da BAT ne loči bolnih od zdravih oseb in pri diagnostiki preobčutljivosti za šibke analgetike (ASA, naproksen, diklofenak, ibuprofen, paracetamol, metamizol) ni uporaben. Da bi bil BAT primeren za klinično uporabo, ga je potrebno še optimizirati, predvsem povišati testirane koncentracije.

## 6. LITERATURA

1. Mau S, Lovely G, Prakash KS, et al. Current Perspectives in NSAID-Induced Gastropathy. Hindawi Publishing Corporation, Mediators of Inflammation, Volume 2013, Article ID 258209
2. Mrhar A: Farmakoterapija bolečine, povzeto po International Association for the Study of Pain, predavanja pri predmetu Biofarmacija s farmakokinetiko, FFA, Ljubljana 2014
3. Sneader W: The discovery of aspirin: a reappraisal, BMJ 2000;321:159
4. Ravnikar A, Lindič J: Nesteroidni antirevmatiki (NSAR) in ledvice. Med razgl, 2007; 46: 337-345.
5. Kowalski ML, Makowska JS. Seven Steps to the Diagnosis of NSAIDs Hypersensitivity: How to Apply a New Classification in Real Practice? Allergy Asthma Immunol Res. 2015; 7(4):312-320.
6. Krčevski ŠN, Rozman MJ, Ivanuša M: Nekateri novejši pogledi na nesteroidne antirevmatike. Zdrav vestn 2001; 70: 405-13
7. Abuaf N, Rostane H, Barbara J, et al. Comparison of CD63 upregulation induced by NSAIDs on basophils and monocytes in patients with NSAID hypersensitivity. J Allergy (Cairo) 2012; 2012:580873
8. Košnik M, Morgan T, Bajrović N, Šilar M: Aspirinska intoleranca in rinitis: zbornik prispevkov, Ljubljana, 22.april 2006. Urednik zbornika Mitja Košnik. Golnik: Bolnišnica, Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo, 2006. ISBN 961-90883-9-5.
9. Kus GT: Razvoj nove analizne metode za določanje acetilsalicilne kisline in njena aplikacija na področju stabilnosti. Fakulteta za farmacijo, diplomska naloga. Ljubljana, 2013
10. Mrhar A. Dolinar T: Paracetamol – učinkovito in varno zdravilo? Predavanja FFA, Ljubljana
11. [www.mediatelly.com](http://www.mediatelly.com)  
URL:<https://mediately.co/si/drugs/STNAhRpZKcBYULmM0RpMwS8Hba5/metamizol-stada-500-mg-ml-peroralne-kapljice-raztopina#dosing>, dostopano: 8.4.2017
12. [www.lekarnaljubljana.si](http://www.lekarnaljubljana.si)  
URL:[http://www.lekarnaljubljana.si/upload/izdelki\\_dokumenti/1122/Paracetamol\\_Na\\_vodilo\\_final.pdf](http://www.lekarnaljubljana.si/upload/izdelki_dokumenti/1122/Paracetamol_Na_vodilo_final.pdf), dostopano: 7.12.2016

13. Voltaren Retard, povzetek glavnih značilnosti zdravila  
URL: <http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-003895.pdf&dir=smpc>,  
dostopano: 5.12.2016
14. Naprosin, povzetek glavnih značilnosti zdravila  
URL: <http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-004157.pdf&d>, dostopano:  
6.12.2016
15. <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/24029>, dostopano: 2.2.2017
16. Bouland DL, Specht NL, Hegstad DR. Ibuprofen and aseptic meningitis. *Annals of Internal Medicine*. 1986; 104:732.
17. Sánchez-Borges M, Capriles-Hulett A, Caballero-Fonseca F. Risk of skin reactions when using ibuprofen-based medicines. *Expert Opinion of Drug Safety*. 2005 Sep;4(5):837-48
18. Ibuprofen. Povzetek glavnih značilnosti zdravila  
URL: <http://si.draagle.com/#!/source/lql/?drug=lqn>, dostopano: 8.4.2017
19. Shaowei W, Han J, Qureshi A A: Use of Aspirin, Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, and Acetaminophen (Paracetamol), and Risk of Psoriasis and Psoriatic Arthritis: A Cohort Study. *Acta Derm Venereol*. 2015 Jan 15; 95(2): 217–222.
20. PUBCEM, Open Chemistry Database - acetylsalicylic acid.  
URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/aspirin#section=Top>, dostopano:  
6.12.2016
21. Aspirin. Povzetek glavnih značilnosti zdravila  
URL: <http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-002199.pdf&dir=smpc>,  
dostopano: 2.2.2017
22. Okonek S, Reinecke HJ. : Acute toxicity of pyrazolones. *Am J Med*. 1983;75(5A):94-8
23. López BN, Pérez-Sánchez N, Agúndez JA: Allergic Reactions to Metamizole: Immediate and Delayed Responses. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2016;169(4):223-30.
24. Centralna baza zdravil, metamizol.  
URL: <https://mediately.co/si/drugs/STNAhRpZKcBYULmM0RpMwS8Hba5/metamizol-stada-500-mg-ml-peroralne-kapljice-raztopina>, dostopano: 2.2.2017

25. Paramo BJ, Gancedo SQ, Cuevas M, Camo IP, Martin JA, Cosmes EL. Paracetamol (acetaminophen) hypersensitivity. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2000 Dec;85(6 Pt 1):508-11.
26. Atcha Z, Majeed A. Paracetamol related deaths in England and Wales, 1993–97. *Health Stat Q* 2000; 7: 5-9
27. <https://www.google.si/search?q=diklofenak&client=opera&hs=zCT&source=lnms&tbm=isch&sa, dostopano: 5.12.2016>
28. <https://www.google.si/search?q=naproksen&client=opera&source=lnms&tbm=isch&sa, dostopano: 6.12.2016>
29. Hinz B, Chremina O, Bachmakov J, Brune K. Dipyron e licits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: New insights into the pharmacology of an old analgesic, *FASEB Journal* 21(10):2343-51, September 2007
30. Machado L, Roca-Ferrer J, Picado C, et al. Prostaglandin E2 receptors in asthma and in chronic rhinosinusitis/nasal polyps with and without aspirin hypersensitivity. *Respiratory research* 2014, 15:100  
URL: <http://respiratory-research.com/content/15/1/100>, dostopano: 5.5.2017
31. Choi JH, Kim MA, Park HS. An update on the pathogenesis of the upper airways in aspirin-exacerbated respiratory disease. *Curren Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2014 Feb;14(1):1-6.
32. E-zdravje-Alergije-Testi (on line), dostopno 2.12.2016  
ULR: <http://www.ezdravje.com/si/aleracija/testi>
33. Rodriguez-Trabado A, Camara-Hijon C, Ramos-Cantarino A, et al. Basophil activation test for the in vitro diagnosis of nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity. *Allergy Asthma Proc* 2008; 29:241–249.
34. McGowan CE, Saini S. Update on the Performance and Application of Basophil Activation Tests. Johns Hopkins Asthma and Allergy Center, Division of Allergy and Clinical Immunology, 5501. Published in *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013 February ; 13(1): 101–109
35. Gamboa PM, Sanz ML, Caballero M R, et al. Use of CD63 expression as a marker of in vitro basophil activation and leukotriene determination in metamizol allergic patients. *Allergy* 2003; 58:312–317.
36. Çelik GE, Schroeder JT, Hamilton RG, et al. Effect of in vitro aspirin stimulation on basophils in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Clinical & Experimental Allergy* 2010; 1–10.

37. BD Bioscience. Introduction to flow cytometry. A learning guide. Manual part number 11-1103201, April, 2000. BD Bioscience, San Jose, CA
38. Dremelj A. Proučevanje vloge katepsina x v celicah človeškega adenokarcinoma prostate (PC3). Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2011
39. BD CELLQuest Pro Software Analysis Tutorial User's Guide,336485 Rev. 1.

## Priloga 1: Soglasje Komisije RS za medicinsko etiko k izvedbi klinične raziskave



REPUBLIKA SLOVENIJA  
MINISTRSTVO ZA ZDRAVJE

Štefanova ulica 5, 1000 Ljubljana

T: 01 478 60 01  
F: 01 478 60 58  
E: gp.mz@gov.si  
www.mz.gov.si

Prof. dr. Mitja Košnik, dr. med.  
Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik  
Golnik 38  
4204 Golnik

Številka: 0120-647/2015-2  
KME 63/12/15  
Datum: 11. januar 2016  
Zadeva: Ocena etičnosti

Spoštovani gospod prof. dr. Košnik,

Komisiji za medicinsko etiko (KME) ste 23. 11. 2015 poslali v oceno etičnosti predlog raziskave z naslovom

*"Profil tolerance za nesteroidne antirevmatike pri bolnikih z anafilaksijo po enem od NSAID (in diagnostično vrednost BAT pri tej entiteti)"<sup>1</sup>. Študentska Prešernova naloga, izvajalki Helena Klar in Nika Sotošek, študentki MF UL, mentor in vodja raziskave prof. dr. Mitja Košnik, dr. med., somentor izr. prof. dr. Peter Korošec, univ. dipl. biol.*

KME je na svoji seji 15. 12. 2015 ocenila, da za izvedbo raziskave ni etičnih zadržkov.

Lepo pozdravljam,

Pripravil:  
Tone Žakelj

dr. Božidar Voljč, dr. med.,  
predsednik KME

P.S.: Pri morebitnih nadaljnjih dopisih v zvezi z raziskavo se obvezno sklicujte na številki tega dopisa.

<sup>1</sup> Slovnčni predmet v delu naslova, ki je v oklepaju, je verjetno v napačnem sklonu, če verjetneje pa manjka pripadajoči glagol. V naslovih del se tudi sicer kaže izogibati okrajšavam in oklepajem.



Priloga 2: Preglednica 20: BAT indeks 1 za ASA, naproksen in diklofenak pri vseh testiranih koncentracijah

	ASA			NAPROKSEN			DIKLOFENAK		
	Koncentracija (mg/ml)			Koncentracija (µg/ml)			Koncentracija (µg/ml)		
Št.	0,0625	0,25	1	1,333	13,33	133,33	0,083	0,833	8,33
1.	4,05	12,75	24,99	0,16	0,63	5,13	0,31	0,32	2,02
2.	2,03	1,96	6,30	0,07	0,07	0,54	0,07	0,14	0,52
3.	2,00	2,79	8,85	0,52	0,76	0,98	0,00	0,26	0,55
4.	1,08	2,82	11,39	0,08	0,08	1,04	0,34	0,32	0,25
5.	0,00	0,27	6,20	0,15	0,00	1,36	0,32	0,34	0,61
6.	0,73	0,71	6,05	0,00	0,54	0,42	0,11	0,32	0,42
7.	0,99	1,89	9,88	0,19	0,22	0,48	0,00	0,11	0,63
8.	0,55	1,62	3,97	0,29	0,39	1,27	0,11	0,12	1,89
9.	0,95	1,94	7,55	0,00	0,53	0,55	0,22	0,10	0,86
10.	1,37	1,47	4,00	0,31	0,16	0,69	0,16	0,16	0,52
11.	0,88	3,79	12,83	0,97	0,47	2,17	0,72	0,48	1,64
12.	7,73	1,99	14,36	0,55	0,70	1,63	0,33	0,30	0,82
13.	0,49	2,39	9,13	0,00	0,26	0,71	0,25	0,00	0,44
14.	2,11	5,92	19,46	0,62	1,19	2,57	0,00	0,00	1,23
15.	1,05	0,78	1,58	0,66	0,00	0,66	0,00	0,00	0,17
16.	1,00	1,20	5,60	0,37	0,34	0,84	0,00	0,35	0,35
17.	5,01	5,71	10,35	0,00	0,87	1,27	0,68	0,82	0,95
18.	9,28	7,21	7,02	0,20	0,19	1,10	0,21	0,38	0,60
19.	0,93	2,76	9,20	0,41	0,41	0,69	0,42	0,22	0,88

Nadaljevanje preglednice 20: BAT indeks 1 za ASA, naproksen in diklofenak pri vseh testiranih koncentracijah

	ASA			NAPROKSEN			DIKLOFENAK		
	Koncentracija (mg/ml)			Koncentracija (µg/ml)			Koncentracija (µg/ml)		
Št.	0,0625	0,25	1	1,333	13,33	133,33	0,083	0,833	8,33
20.	0,53	0,80	2,39	0,10	0,10	0,34	0,16	0,09	0,35
21.	0,68	0,41	6,34	0,00	0,12	0,50	0,24	0,12	0,12
22.	0,13	0,74	8,93	0,13	0,29	0,00	0,52	0,53	0,44
23.	0,86	1,43	6,88	0,34	0,16	1,08	0,00	0,09	0,38
24.	0,93	1,78	13,26	0,00	0,00	1,13	0,12	0,12	0,43
25.	0,46	0,51	2,79	0,00	0,00	0,32	0,00	0,00	0,00
26.	0,00	1,00	8,28	0,00	0,49	0,96	0,00	0,89	1,60
27.	0,78	1,79	6,10	0,20	0,00	0,39	0,30	0,00	0,62
28.	0,60	1,67	2,18	0,99	0,50	0,00	0,00	0,00	0,41
29.	0,28	1,84	5,34	0,21	0,62	1,12	0,18	0,32	0,09
30.	1,91	1,95	10,50	0,41	0,55	0,60	0,00	0,17	0,86
31.	0,87	2,32	33,26	0,31	0,39	0,97	0,18	0,54	1,17
32.	1,36	1,98	3,20	0,19	0,12	0,60	0,20	0,09	0,75
33.	0,98	0,54	1,58	0,18	0,19	0,70	0,48	0,26	0,87
34.	0,90	1,74	8,27	0,29	0,70	1,41	0,40	0,39	0,90
35.	2,40	3,58	13,70	0,32	0,47	0,99	0,15	0,31	1,64
36.	1,55	3,67	18,28	0,20	0,37	0,36	0,74	0,00	1,70
37.	1,97	1,84	12,49	0,41	0,54	2,78	0,25	0,26	1,23
38.	1,00	1,96	5,16	0,32	0,11	0,22	0,45	0,23	0,44

Nadaljevanje preglednice 20: BAT indeks 1 za ASA, naproksen in diklofenak pri vseh testiranih koncentracijah

	ASA			NAPROKSEN			DIKLOFENAK		
	Koncentracija (mg/ml)			Koncentracija (µg/ml)			Koncentracija (µg/ml)		
<b>Št.</b>	<b>0,0625</b>	<b>0,25</b>	<b>1</b>	<b>1,333</b>	<b>13,33</b>	<b>133,33</b>	<b>0,083</b>	<b>0,833</b>	<b>8,33</b>
<b>39.</b>	0,28	1,57	5,93	0,46	0,22	0,76	0,00	0,00	0,02
<b>40.</b>	0,67	0,26	1,64	1,02	0,36	0,27	0,61	0,89	0,52
<b>41.</b>	0,19	0,34	1,08	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00	0,09
<b>42.</b>	0,60	1,01	2,80	0,00	0,00	0,59	0,40	0,00	0,41
<b>43.</b>	0,26	0,50	2,25	0,00	0,00	0,12	0,00	0,12	0,23
<b>44.</b>	1,10	3,19	16,15	0,14	0,40	0,28	0,00	0,00	0,59
<b>45.</b>	1,26	1,70	2,52	0,10	0,52	1,21	0,00	0,92	0,32
<b>46.</b>	0,89	1,19	3,87	0,10	0,00	1,30	0,70	0,52	1,04
<b>47.</b>	0,55	3,79	7,11	0,14	0,08	0,58	0,00	0,08	0,80
<b>48.</b>	1,95	3,99	8,17	0,44	0,12	3,08	0,23	0,35	1,74
<b>49.</b>	1,28	0,94	5,80	0,09	0,27	0,94	0,25	0,16	0,57
<b>50.</b>	0,87	0,49	1,63	0,00	0,00	0,59	0,16	0,42	0,33

Priloga 3

Preglednica 21: Vrednosti BAT indeksa 1 za ibuprofen, paracetamol in metamizol, ki smo jih testirali ciljano

	IBUPROFEN			PARACETAMOL			METAMIZOL		
	Koncentracija (µg/ml)			Koncentracija (µg/ml)			Koncentracija (µg/ml)		
Št.	0,333	3,33	33,33	0,033	0,333	3,33	0,167	1,667	16,67
1.				0,07	0,21	0,46			
2.							0,25	0,31	1,63
3.	0,00	0,28	0,54	0,43	0,12	1,25			
4.				0,11	1,14	1,24			
5.				0,10	0,10	0,97	0,38	0,39	0,00
6.				0,37	0,47	0,75	0,22	0,00	0,72
7.				0,11	0,10	0,40			
8.				0,22	0,12	0,35			
9.				0,00	0,00	0,87			
10.				0,32	0,32	1,82			
11.				0,00	0,50	0,27			
12.				0,11	0,23	0,32			
13.				0,39	0,61	0,39			
14.				0,59	0,23	1,01			
15.							0,10	0,00	0,11
16.				0,00	0,27	0,28	0,28	0,00	0,94