

MONITORACE ZTRÁTY BOTULINUMTOXINU PŘI APLIKACI DO DETRUZORU – VÝSLEDKY PILOTNÍ FÁZE STUDIE

MONITORING THE LOSS OF BOTULINUM TOXIN DURING INTRADETRUSOR ADMINISTRATION – PILOT STUDY RESULTS

Vladimír Šámal^{1,2}, Jana Müllerová³,
Vít Paldus¹, Jan Mečl¹

¹Urologické oddělení, Krajská nemocnice
Liberec, a.s.

²Urologická klinika Fakultní nemocnice
a Lékařské fakulty UK, Hradec Králové

³Katedra chemie, Fakulta přírodovědně
humanitní a pedagogická,
Technická univerzita Liberec

Došlo: 3. 9. 2013.

Přijato: 2. 10. 2013.

Kontaktní adresa

MUDr. Vladimír Šámal, Ph.D.

Urologické oddělení, Krajská nemocnice
Liberec, a.s.

Husova 10, 460 63 Liberec

e-mail: vladimir.samal@nemlib.cz

Práce vznikla s finanční podporou

Vědecké rady Krajské nemocnice Liberec, a.s.

Střet zájmů: žádný.

Souhrn

Šámal V, Müllerová J, Paldus V, Mečl J. Mo-
nitorace ztráty botulinumtoxinu při aplikaci
do detruzoru – výsledky pilotní fáze studie

Cíl:

Cílem práce je dokumentovat možnou ztrátu
onabotulinumtoxinu A (onaBTA), která vzni-
ká při endoskopické aplikaci do detruzoru
močového měchýře v léčbě neurogenní hyper-
aktivity detruzoru.

Metoda:

Soubor byl tvořen jedenácti pacienty s neu-
rogenní hyperaktivitou detruzoru, u kterých
nebyla standardní léčba anticholinergiky
úspěšná. Pacienti byli léčeni endoskopickou
aplikací 200 U onaBTA do 30 míst detru-
zoru 23 G flexibilní endoskopickou jehlou.
K monitoraci ztráty onaBTA při endosko-
pické aplikaci jsme použili barvení roztoku
léku metylenovou modří. Po vyšetření jsme
spektrofotometricky stanovili koncentraci
metylenové modři v lavážním roztoku po en-
doskopické aplikaci, ze které byla vypočítána
výsledná ztráta onaBTA.

Výsledky:

U prvního pacienta jsme provedli ověření me-
tody monitorace ztráty onaBTA s prokázanou
ztrátou U onaBTA 13 U. V souboru dalších
deseti pacientů jsme prokázali při endosco-
pické aplikaci onaBTA do detruzoru ztrátu $2,6 \pm$
 $1,67$ U onaBTA.

Závěr:

V pilotní fázi studie jsme prokázali, že ztráta onaBTA při endoskopické aplikaci do detruzoru je z hlediska podané dávky zanedbatelná.

Klíčová slova:

botulinum toxin, onabotulinumtoxin A, neurogení močový měchýř, endoskopická aplikace, ztráta léku.

Summary

Šámal V, Müllerová J, Paldus V, Mečl J. Monitoring the loss of botulinum toxin during intradetrusor administration – pilot study results

Aim:

The aim of this study was to examine the possible loss of the onabotulinumtoxinA (onaBTA) in the course of endoscopic injection into the detrusor muscle in patients with neurogenic detrusor overactivity.

Methods:

The study group included 11 patients with neurogenic detrusor overactivity who failed standard treatment with anticholinergics. Patients were treated with endoscopic injection of 200 U onaBTA divided into 30 injection si-

tes using a 23 G flexible endoscopic needle. In order to determine the content of onaBTA lost during endoscopic administration, methylene blue dye was added to the solution of the drug. The concentration of methylene blue was quantified using spectrophotometry in the bladder irrigant collected immediately after the final intradetrusor injection. The volume of onaBTA that was lost in the course of each procedure was subsequently calculated based the concentration of methylene blue in the solution.

Results:

In the first patient, the method for monitoring the loss of onaBTA was performed using a known loss of 13 U of onaBTA. In the following 10 patients there was a loss of 2.6 ± 1.67 U onaBTA during endoscopic administration onaBTA to detrusor.

Conclusions:

In this pilot study, we demonstrated that compared to the total injected volume, the loss onaBTA during endoscopic injection in the detrusor was negligible.

Key words:

botulinum neurotoxin, onabotulinumtoxinA, neurogenic detrusor overactivity, endoscopic administration, detrusor injection.

ÚVOD

Aplikace botulinum neurotoxinu A (BTA) se stala metodou volby u pacientů s neurogení hyperaktivitou detruzoru (NDO) refrakterních na standardní terapii anticholinergiky a rychle narůstá i počet léčených pacientů s idiopatickou hyperaktivitou detruzoru.

Výsledky výzkumu posledních let ukazují, že mechanismus účinku BTA na močový měchýř je komplexní a ovlivňuje jak eferentní, tak i aferentní nervový přenos. Je zřejmé, že kromě přímého vlivu na eferentní dráhy bloádou uvolnění acetylcholinu je modulován také celou řadou multimodálních efektů na senzoricke aferentní dráhy (1). Jedná se zejména o sní-

žené uvolňování ATP, substance P a sníženou axonální expresi vaniloidních a purinergních receptorů. Kombinací uvedených mechanismů dochází k dlouhodobé inhibici eferentního i aferentního nervového přenosu, které se využívá k léčbě NDO (2, 3). Právě ovlivnění aferentního nervového přenosu je pravděpodobně příčinou dlouhodobého účinku BTA na detrusor.

Z dosavadních výzkumů je zřejmé, že existuje korelace mezi dávkou BTA a intenzitou účinku, jak prokázal Dressler (4). Korelační vztah funguje pouze pro nízké dávky BTA, křivka má polynomičský charakter. Stejně tak

existuje vztah mezi dávkou a délkou trvání efektu léčby, pro který platí obdobná zjištění jako pro intenzitu účinku (4, 5).

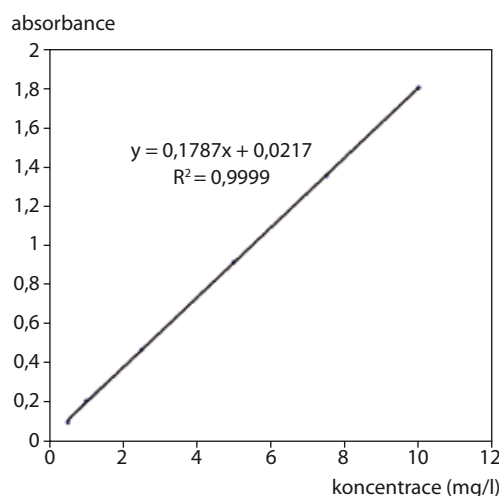
Endoskopickou aplikaci BTA si zkušený urolog rychle osvojí. Doposud není přesně známo, jak velkou ztrátou léku je aplikace zatížena. Existují pouze dílčí informace o tom, kolik BTA se dostává mimo cílový distribuční prostor – detruzor – do perivezikální tukové tkáně (6). Metylenová modř je látka se silnou barvicí schopností i v nízkých koncentracích. Při průchodu světla roztokem se část světla pohltí v roztoku – dochází k jeho absorpci. Absorbance je součinem extenčního koeficientu (ϵ), délky kyvety použité pro měření (l) a koncentrace roztoku (c). Extenční koeficient není v praxi často známý, a proto se před měřením provádí sestavení kalibračního grafu, kdy se změří absorbance série roztoků o známé koncentraci. Pro metylenovou modř má křivka v základní části prakticky lineární charakter ($R^2 = 0,9999$). Při změření absorbance roztoku o neznámé koncentraci lze koncentraci metylenové modři odečíst z grafu při použití rovnice křivky.

METODIKA

Do pilotní fáze sledování jsme zařadili jedenáct pacientů s NDO v důsledku spinálního poranění nebo roztroušené sklerózy refrakterních na standardní terapii anticholinergiky. Jednalo se o deset mužů a jednu ženu, průměrný věk byl 36,7 roku.

K léčbě jsme použili onabotulinumtoxin A (onaBTA) v dávce 200 U, který jsme aplikovali do 30 míst močového měchýře (6,7 U/ml). K ředění onaBTA jsme použili zásobní roztok 2 ml 2,5% metylenové modři ve 100 ml fyziologického roztoku. Dávku 200 U onaBTA jsme naředili do 12 ml fyziologického roztoku a rozdělili do tří 10 ml stříkaček po 4 ml. Do každé stříkačky jsme doplnili 6 ml zásobního roztoku metylenové modři.

Výkon jsme prováděli v celkové nebo regionální anestezii při standardní náplni močového měchýře 150–200 ml. K cystoskopii jsme použili rigidní 21 FR cystoskop a k aplikaci flexibilní endoskopickou jehlu 23 G. Provedli jsme aplikaci onaBTA mimo oblast trigona tak, aby byla vytvořena rovnoměrně rozprostřená síť míst, kam byl onaBTA aplikován. Aplikaci jsme provedli formou intramurální injekce



Graf 1. Kalibrační graf metylenové modři
Graph 1. Calibration graph of methylen blue

do detruzoru. Při této technice jsme zaváděli jehlu kolmo ke stěně močového měchýře v radiálním směru do hloubky 4 mm, bez možnosti opticky kontrolovat místo aplikace.

Při vlastním výkonu jsme po provedené cystoskopii před začátkem aplikace zcela vyprázdnili močový měchýř. Během následné aplikace jsme již všechnu tekutinu vypuštěnou cystoskopem z močového měchýře měřili, na konci výkonu jsme provedli výplach močového měchýře 200 ml lavážního roztoku (fyziologický roztok). Po skončení výkonu jsme změřili objem lavážní tekutiny použitý při aplikaci onaBTA. Koncentrace metylenové modři ve vzorku lavážní tekutiny byla stanovena UV-VIS spektrofotometrií na přístroji UV-VIS Cintra 202 v 1 cm dlouhé křemenné kyvetě. Při nízké koncentraci metylenové modři ve vzorku jsme použili 5 cm dlouhou kyvetu a výsledná koncentrace byla přepočítána dle Lambert-Beerova zákona. Při znalosti absorbance se koncentrace roztoku odečte z kalibračního grafu (graf 1). Rovnice křivky kalibračního grafu byla v našem případě $y = 0,1788x + 0,0211$.

Permanentní močový katétr jsme ponechali po výkonu zavedený po dobu 24 hodin a po jeho odstranění se pacienti vraceli k technice intermitentní autokatetrizace.

Studie byla schválena Etickou komisí Krajské nemocnice Liberec, a.s.

Výsledky jsou uváděny jako naměřené hodnoty, jejich průměr a SD. K ověření hypotézy byl použit t-test.

Tab. 1. Výsledky

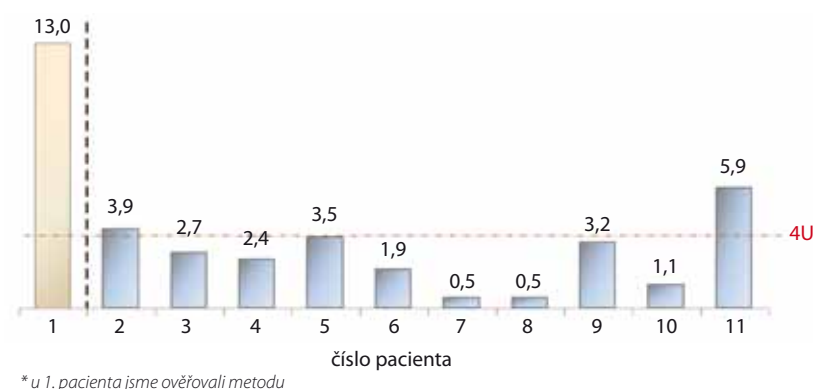
Table 1. Results

Pacient	Objem výplachu (ml)	Absorbance	c_{MM} ve výplachu (mg/ml)	Ztráta MM (mg)	Ztráta onaBTA (U)	Průměr ± SD
1**	748	0,160	0,782	0,585	13,0	2,6 ± 1,67
2	605	0,297	0,29*	0,175	3,9	
3	240	0,475	0,508*	0,122	2,7	
4	410	0,257	0,264*	0,108	2,4	
5	480	0,395	0,324*	0,156	3,5	
6	912	0,190	0,094*	0,086	1,9	
7	370	0,162	0,063*	0,023	0,5	
8	255	0,185	0,088*	0,022	0,5	
9	535	0,070	0,2718*	0,145	3,2	
10	580	0,037	0,0889*	0,052	1,1	
11	572	0,104	0,463	0,265	5,9	

 c_{MM} – koncentrace metylenové modři

* – přepočítáno z 5 cm kyvety

** – u 1. pacienta jsme ověřovali metodu



Graf 2. Rozložení ztráty onaBTA (U)

Graph 2. The distribution of loss of onaBTA

Stanovili jsme si ztrátu do 2 % podané dávky jako úspěšnou aplikaci.

VÝSLEDKY

Zhodnotili jsme vzorky lavážní tekutiny po provedené endoskopické aplikaci onaBTA do detruzoru u jedenácti pacientů. U prvního pacienta jsme při ověření metody měření měli ztrátu 13 U onaBTA. U dalších deseti provedených aplikací byla průměrná ztráta $2,6 \pm 1,67$ U onaBTA. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1 a grafu 2. Během studie jsme neza-

znamenalí žádné komplikace. Na 5% hladině významnosti (p -value = 0,012) nepřesahuje ztráta onaBTA při endoskopické aplikaci 2 % podané dávky.

DISKUSE

Aplikace BTA do detruzoru formou intramurální injekce je standardní metodou aplikace BTA a naprostá většina autorů referuje své zkušenosti a výsledky právě s touto formou aplikace BTA (7–10). Aplikace do detruzoru močového měchýře při jeho variabilní síle s se-

bou přináší riziko podání BTA mimo detruzor močového měchýře nebo riziko systémového podání v případě aplikace do cévy ve svalovině (významně zvyšuje možný systémový nežádoucí účinek léku). Variabilita síly detruzoru je závislá především na pohlaví, věku, náplni močového měchýře a přítomnosti neurogenní léze či obstrukce.

Morfologickým zhodnocením distribuce BTA v detruzoru se zabývali Mehnert et al., kteří ve své pilotní práci hodnotili u šesti pacientů distribuci BTA v detruzoru (6). K léčbě použili standardně cystoskopicky aplikovaný BTA s přidáním magnetické kontrastní látky gadopentátu. Ihned po aplikaci provedli magnetickou rezonanci. Prokázali, že pouze 82,4 % podané látky je v detruzoru, zbylá část byla v perivezikální tukové tkáni. Zajímavé je, že i při značném úniku BTA mimo cílový distribuční prostor nezaznamenali žádné nežádoucí účinky.

K určitému úniku BTA může po aplikaci dojít také místem vpichu po odstranění jehly. Předpokládá se, že toto množství je velice malé a odpovídá malému průměru jehly. Při použití barviva methylen blue k obarvení roztoku léku a fotometrickém hodnocení lavážní tekutiny po cystoskopické aplikaci udával Madersbacher po aplikaci onaBTA v dávce 170–400 U průměrnou ztrátu 1,96–19,2 U (medián 5,5 U), což bylo vzhledem k aplikované dávce zanedbatelné. Výsledky tohoto pozorování nebyly samostatně publikovány.

Dalším faktorem, který významně ovlivňuje ztrátu, je doba, po kterou je injekce prováděna a po kterou je ponechána jehla v detruzoru. Pokud je injekce provedena rychle a jehla poté ihned odstraněna, odchází otvorem po vpichu velké množství modře zbarveného léku. Toto pozorování bylo patrné zejména u prvního pacienta, kde jsme ověřovali metodu. Pokud byla jehla u dalších pacientů po vpichu několik sekund ponechána v místě aplikace, aby mohlo dojít k difuzi léku do svaloviny, byl únik léku již minimální. Problematická je aplikace BTA do detruzoru zejména u pacientů s výraznou trabekulární hypertrofií svaloviny detruzoru, kde jsou vytvořeny hypertrofické svalové trávce s množstvím pseudodivertiklů s tenkou stěnou mezi nimi. Právě v těchto případech je riziko podání BTA mimo stěnu detruzoru vysoké.

Subslizniční aplikace onaBTA je alternativou ke klasickému podání onaBTA do detruzoru. Podání do subslizničního prostoru

lze endoskopicky vizuálně dobře kontrolovat, protože se při něm vytváří typický „bulking“ sliznice. Tato metoda se jeví také bezpečnější, protože odpadá riziko náhodného podání do drobných cév v detruzoru s rizikem systémových nežádoucích účinků. Dosavadní zkušenosti ukazují na stejnou efektivitu léčby při aplikaci onaBTA subslizničně nebo do detruzoru (11, 12). Zatím nejsou zkušenosti s monitorací ztráty onaBTA při subslizničním podání.

V naší práci jsme použili koncentraci BTA a počet injekcí původně popsanou Schurchem (7). Je prokázáno, že při vyšším ředění se může zvýšit difuze BTA, a tím zvýšit terapeutický efekt. Může to mít také vliv na vyšší výskyt nežádoucích účinků. K prokázání optimální koncentrace BTA neexistují validní studie a je značná variabilita aplikačních protokolů, tj. v množství roztoku, do kterého se ředí BTA, počtu injekcí a objemu jednotlivé injekce (13). Účinná dávka BTA by měla být podávána v co nejmenším objemu, tkáňová difuze BTA roste s klesající koncentrací. Při běžné koncentraci 10 U onaBTA/1 ml dochází k difuzi léku v průměru 1–3 cm kolem místa vpichu. Důležité je dosáhnout vysoké koncentrace v místě aplikace s poklesem gradientu směrem od místa vpichu (14).

Důkaz o tom, jakou roli hraje objem jednotlivé injekce, tj. koncentrace BTA, přinesli recentně Coelho et al. (15). V experimentu na prasatech testovali dávku 2 U onaBTA/2 µl vs. dávku 2 U onaBTA/20 µl. Distribuční prostor onaBTA po aplikaci jedné injekce měřili pomocí značené protilátky proti SNAP-25. Prokázali signifikantně větší imunoreaktivitu po injekci aplikované ve 20 µl. Imunoreaktivitu po injekci v tomto objemu prokázali dokonce i na protilehlé stěně močového měchýře a dominantně byla v 85 % reaktivní cholinergní vlákna. Při instilační léčbě použili dávku 50 U onaBTA/2 ml vs. placebo. Při hodnocení nenalezli imunoreaktivitu vláken v detruzoru ani subslizničním prostoru, ačkoliv v jiných studiích vykazovala instilační léčba jistou míru efektivity (16). Z této studie vyplývá, že stejná dávka ředěná do většího objemu obsadí více SNAP 25 ve větším distribučním prostoru (15).

Objem roztoku, do kterého se ředí BTA, je v rozpětí od 3 ml do nejčastěji 30 ml. Koncentrace 10U onaBTA na 1 ml pro jednu jednotlivou injekci je nejčastější, ale existují zkušenosti s menším aplikačním objemem 10 U/0,5 ml

(17), 10 U/0,2 ml (18) nebo s objemem 10 U/0,1 ml (19). Poslední velké studie pracují s koncentrací onaBTA 6,7 U/ ml (9, 10).

Počet injekcí při aplikaci BTA také není ustálený a pohybuje se mezi 10–40 injekcemi. Nejčastější je aplikace do 30 míst detruzoru, jak ve své původní práci popsali Stöhrer a Schurch (7), Del Popolo et al. popisují výsledky s aplikací do 20 míst detruzoru (20). Pouze jedna studie porovnává na malém počtu pacientů výsledky při aplikaci do 10 nebo 30 míst detruzoru bez prokazatelného rozdílu (21). V současné době lze považovat za zlatý standard aplikaci roztoku 30 ml BTA do 30 míst detruzoru s 1 ml na jednotlivou aplikaci. Při současně schválené dávce 200 U onaBTA

pro léčbu NDO je potom koncentrace jednotlivé injekce 6,7 U onaBTA/1 ml (při předpokládaném počtu 30 aplikací).

ZÁVĚR

V pilotní fázi studie jsme prokázali, že ztráta onaBTA při endoskopické aplikaci do detruzoru je minimální. U našeho souboru nepřekročila 2 % podávané dávky.

Poděkování

Autoři děkují za pomoc se statistickým zpracováním dat Mgr. Haně Kolářové, Ph.D.

LITERATURA

1. **Apostolidis A, Dasgupta P, Fowler CJ.** Proposed mechanism for the efficacy of injected botulinum toxin in the treatment of human detrusor overactivity. *Eur Urol* 2006; 49(4): 644–650.
2. **Apostolidis A, Popat R, Yiangou Y, et al.** Decreased sensory receptors P2X3 and TRPV1 in suburothelial nerve fibers following intradetrusor injections of botulinum toxin for human detrusor overactivity. *J Urol* 2005; 174(3): 977–982; discussion 982–983.
3. **Chancellor MB, Fowler CJ, Apostolidis A, et al.** Drug Insight: biological effects of botulinum toxin A in the lower urinary tract. *Nat Clin Pract Urol* 2008; 5(6): 319–328.
4. **Dressler D, Benecke R.** Pharmacology of therapeutic botulinum toxin preparations. *Disabil Rehabil* 2007; 29(23): 1761–1768.
5. **Dressler, D.** Botulinum toxin mechanisms of action. *Suppl Clin Neurophysiol* 2004; 57: 159–166.
6. **Mehnert U, Boy S, Schmid M, et al.** A morphological evaluation of botulinum neurotoxin A injections into the detrusor muscle using magnetic resonance imaging. *World J Urol* 2009; 27(3): 397–403.
7. **Schurch B, Stöhrer M, Kramer G, et al.** Botulinum-A toxin for treating detrusor hyperreflexia in spinal cord injured patients: a new alternative to anticholinergic drugs? Preliminary results. *J Urol* 2000; 164(3): 692–697.
8. **Schurch B, De Seze M, Denys P, et al.** Botulinum toxin type a is a safe and effective treatment for neurogenic urinary incontinence: results of a single treatment, randomized, placebo controlled 6-month study. *J Urol* 2005; 174(1): 196–200.
9. **Cruz F, Herschorn S, Aliotta P, et al.** Efficacy and safety of onabotulinumtoxinA in patients with urinary incontinence due to neurogenic detrusor overactivity: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Eur Urol* 2011; 60(4): 742–750.
10. **Ginsberg D, Gousse A, Keppenne V, et al.** Phase 3 efficacy and tolerability study of onabotulinumtoxinA for urinary incontinence from neurogenic detrusor overactivity. *J Urol* 2012; 187(6): 2131–2139.
11. **Kuo HC.** Therapeutic effects of suburothelial injection of botulinum a toxin for neurogenic detrusor overactivity due to chronic cerebrovascular accident and spinal cord lesions. *Urology* 2006; 67(2): 232–236.

12. **Krhut J, Samal V, Nemec D, Zvara P.** Intradetrusor versus suburothelial onabotulinumtoxinA injections for neurogenic detrusor overactivity: a pilot study. *Spinal Cord* 2012; 50(12): 904–907.
13. **Mangera A, Andersson KE, Apostolidis A, et al.** Contemporary management of lower urinary tract disease with botulinum toxin A: a systematic review of botox (onabotulinumtoxinA) and dysport (abobotulinumtoxinA). *Eur Urol* 2011; 60(4): 784–795.
14. **Klein AW.** Dilution and storage of botulinum toxin. *Dermatol Surg* 1998; 24(11): 1179–1180.
15. **Coelho A, Cruz F, Cruz CD, Avelino A.** Spread of onabotulinumtoxinA after bladder injection. Experimental study using the distribution of cleaved SNAP-25 as the marker of the toxin action. *Eur Urol* 2012; 61(6): 1178–1184.
16. **Krhut J, Zvara P.** Intravesical instillation of botulinum toxin A: an in vivo murine study and pilot clinical trial. *Int Urol Nephrol* 2011; 43(2): 337–343.
17. **Grosse J, Kramer G, Stohrer M.** Success of repeat detrusor injections of botulinum toxin A in patients with severe neurogenic detrusor overactivity and incontinence. *Eur Urol* 2005; 47(5): 653–659.
18. **Kuo HC.** Urodynamic evidence of effectiveness of botulinum A toxin injection in treatment of detrusor overactivity refractory to anticholinergic agents. *Urology* 2004; 63(5): 868–872.
19. **Rapp DE, Lucioni A, Katz EE, et al.** Use of botulinum-A toxin for the treatment of refractory overactive bladder symptoms: an initial experience. *Urology* 2004; 63(6): 1071–1075.
20. **Del Popolo G, Filocamo MT, Li Marzi V, et al.** Neurogenic detrusor overactivity treated with english botulinum toxin a: 8-year experience of one single centre. *Eur Urol* 2008; 53(5): 1013–1019.
21. **Karsenty, G, Boy, S, Reitz A.** Botulinum toxin A (BTA) in the treatment of neurogenic detrusor overactivity incontinence (NDOI): a prospective randomized study to compare 30 vs. 10 injections sites [abstract 93]. *Neurourol Urodyn* 2005; 24: 547–548.