FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis
UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609
ISSN 2729-790X

2

IV • 2022

FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

VYDÁVA
UNIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE V KOŠICIACH
SLOVAKIA

FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA
IV., 2, 2022

PUBLISHED BY
THE UNIVERSITY OF VETERINARY MEDICINE AND PHARMACY IN KOŠICE
2022

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, IV., 2, 2022

O B S A H

Vranecová, Katarína; Massarová, Petra; Žigová, Lucia; Hrubá, Orsolya; Bodnár Mikulová, Mária; Faixová, Dominika; Faixová, Zita; Gažová, Andrea:
FARMAKOLOGICKÝ VÝZNAM INHIBÍCIE A AKTIVÁCIE RÔZNYCH TYPOV ENZÝMOV KARBOANHYDRÁZ
PHARMACOLOGICAL IMPORTANCE OF INHIBITION AND ACTIVATION OF DIFFERENT TYPES OF CARBOANHYDRASE ENZYMES 5
Proškovcová, Martina; Čonková, Eva; Váczi, Peter; Harčárová, Michaela:
ÚČINNOSŤ VYBRANÝCH RASTLINNÝCH SILÍC A EXTRAKTOV NA TVORBU EXTRACELULÁRNEJ FOSFOLIPÁZY CANDIDA ALBICANS
EFFICACY OF SELECTED ESSENTIAL OILS AND EXTRACTS ON THE PRODUCTION OF EXTRACELLULAR PHOSPHOLIPASE BY CANDIDA ALBICANS 15
Kmecová, Veronika; Bačkorová, Miriam:
ANALÝZA PRESKRIPCIE LIEČIV U PACIENTOV S DEPRESIOU
ANALYSIS OF THE DRUG PRESCRIPTION IN PATIENTS WITH DEPRESSION 22
Wolaschka, Tomáš; Kľoc, Dominik; Rohaľová, Simona; Ruttkay, Filip:
BETA-BLOCKERS IN THE TREATMENT OF HYPERTENSION AND TABLET FORMULATION 32
Sefa, Simona; Szabóová, Renáta; Babíková, Jana:
VPLYV PODÁVANÉHO SEMAGLUTIDU NA HLADINU GLYKOVANÉHO HEMOGLOBÍNU HbA1c U PACIENTOV S *DIABETES MELLITUS*
THE EFFECT OF SEMAGLUTIDE ADMINISTRATION ON THE LEVEL OF GLYCATED HEMOGLOBIN HbA1c IN PATIENTS WITH *DIABETES MELLITUS* 46
Simić, Simona; Takáč, Peter:
FIXNÉ KOMBINÁCIE LIEČIV VO FARMAKOTERAPII ARTÉRIOVEJ HYPERTENZIE
FIXED-DOSE COMBINATIONS IN PHARMACOTHERAPY OF ARTERIAL HYPERTENSION 59
Feník, Jozef; Sučik, Monika; Valenčáková, Alexandra:
MOŽNOSTI BIOLOGICKEJ LIEČBY METASTATICKÝCH KOLOREKTÁLNYCH NÁDOROV
POSSIBILITIES OF BIOLOGICAL TREATMENT OF METASTATIC COLORECTAL TUMORS 67
Salayová, Aneta; Filčáková, Zuzana; Nosálová, Natália; Stahorský, Martin; Tkáčiková, Ľudmila:
FARMAKOLOGICKÉ ASPEKTY VYUŽITIA STRIEBORNÝCH NANOČASTÍC PRIPRAVENÝCH ZELENOU SYNTÉZOU
PHARMACOLOGICAL ASPECTS OF THE USE OF SILVER NANOPARTICLES PREPARED BY GREEN SYNTHESIS 82
Kolesárová, Mária; Verešová, Blanka:
PRÍNOS INTRAVITREÁLNYCH INJEKCIÍ ANTIRASTOVÝMI FAKTORMI V TERAPII VEKOM PODMIENENEJ DEGENERÁCIE MAKULY (KAZUISTIKA)
CONTRIBUTION OF INTRAVITREAL INJECTIONS BY ANTIGROWTH FACTORS IN AGE-BASED DEGENERATION OF THE MACULA (CASE REPORT) 96
Holečková, Beáta; Koleničová, Simona; Galdíková, Martina; Halušková, Jana; Schwarzbacherová, Viera:
EFFECT OF EPOXICONAZOLE ON BOVINE ACETYLCHOLINE ESTERASE GENE EXPRESSION 107
Pokyny pre autorov 114

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, IV., 2: 5 – 14, 2022

FARMAKOLOGICKÝ VÝZNAM INHIBÍCIE A AKTIVÁCIE RÔZNYCH TYPOV ENZÝMOV KARBOANHYDRÁZ

PHARMACOLOGICAL IMPORTANCE OF INHIBITION AND ACTIVATION OF DIFFERENT TYPES OF CARBOANHYDRASE ENZYMES

Vranecová, Katarína[1]; Massarová, Petra[1]; Žigová, Lucia[1]; Hrubá, Orsolya[1]; Bodnár Mikulová, Mária [2]; Faixová, Dominika[3]; Faixová, Zita[4]; Gažová, Andrea[1]

[1]Ústav farmakológie a klinickej farmakológie
Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Špitalská 24, 813 72, Bratislava
[2]Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie
Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Odbojárov 10, 832 32, Bratislava
[3]Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
[4]Katedra biológie a fyziológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

katkavranecova@gmail.com

ABSTRAKT

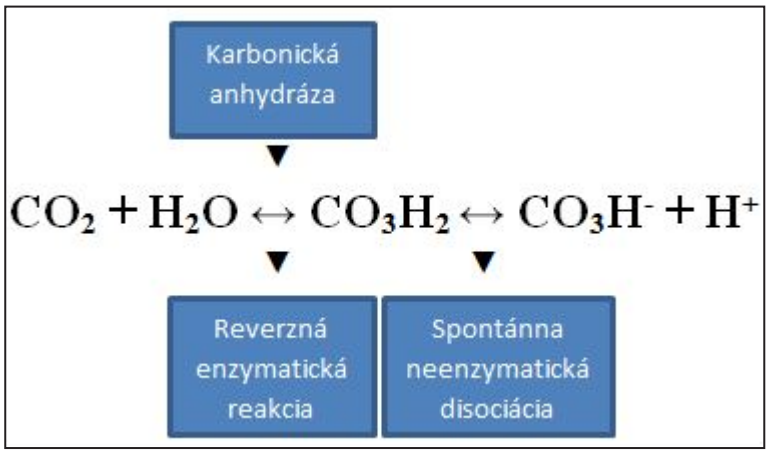
Karbonické anhydrázy (CA), známe aj ako karbonické dehydratázy, sú skupinou enzýmov známych od roku 1933. Aktívne miesto väčšiny CA obsahuje ión zinku, preto CA klasifikujeme ako metaloenzýmy. CA katalyzujú reverzibilnú premenu oxidu uhličitého a vody na bikarbonát a protón. Táto reakcia je esenciálna pre život prokaryotov aj eukaryotov. U cicavcov je známych 16 izoforiem CA. Štúdia prináša prehľad poznatkov týkajúcich sa inhibície a aktivácie CA a ich potenciálne využitie v terapii rôznych ochorení. Inhibícia CA môže byť potenciálnym terapeutickým nástrojom nielen v liečbe nádorových ochorení, ale aj obezity, infekcií, glaukómu, kým aktivácia CA môže mať potenciál pri terapii Alzheimerovej choroby.

Kľúčové slová: aktivátory karbonických anhydráz; inhibítory karbonických anhydráz; izoformy karbonických anhydráz

ABSTRACT

Carbonic anhydrases (CAs), also known as carbonic dehydratases, are a group of enzymes known since 1933. The active site of most CAs contains a

Obr. 1: Reakcia vzniku bikarbonátu pôsobením CA



Zdroj: Koltai a kol., 2020

zinc ion, so we classify them as metalloenzymes. CAs catalyze the reversible conversion of carbon dioxide and water to bicarbonate and proton. This reaction is essential for the lives of both prokaryotes and eukaryotes. In mammals, 16 isoforms of CA are known. The study provides an overview of the knowledge related to the inhibition and activation of CA and their potential use in the therapy of various diseases. CA inhibition may be a potential therapeutic tool not only in the treatment of cancer, but also obesity, infections, glaucoma, while CA activation may have potential in the treatment of Alzheimer's disease.

Key words: carbonic anhydrase activators; carbonic anhydrase inhibitors; carbonic anhydrase isoforms

ÚVOD

Karbonické anhydrázy (CA), známe aj ako dehydratázy, sú skupinou transmembránových metaloenzýmov známych od roku 1933. Metaloenzýmy sú enzýmy, ktorých proteíny obsahujú viazaný kovový prvok. U CA je kovovým prvkom zinok. CA katalyzujú reverzibilnú reakciu oxidu uhličitého a vody na bikarbonát a protón. Táto chemická reakcia je esenciálna pre existenciu prokaryotov aj eukaryotov. CA sa v bunkách nachádza za fyziologických aj patologických podmienok, pričom sa vyvíjajú ich inhibítory alebo aktivátory v podobe liečiv so širokým zameraním sa na mnohé ochorenia.

Cieľom štúdie bolo opísať inhibítory a aktivátory karbonických anhydráz. Inhibícia CA môže byť potenciálnym terapeutickým nástrojom nielen v liečbe nádorových ochorení, ale aj obezity, infekcií, glaukómu, kým aktivácia CA môže mať potenciál v terapii Alzheimerovej choroby.

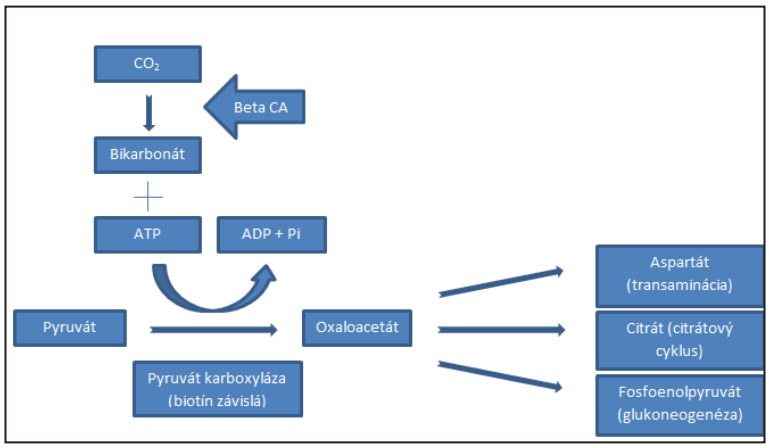
1. Fyziologické funkcie karboanhydrázy

CA majú v organizme rôzne dôležité funkcie. Príkladom je reverzibilná hydratácia oxidu uhličitého. Je to reakcia premeny oxidu uhličitého a vody na kyselinu uhličitú. Táto kyselina z veľkej časti disociuje na bikarbonát a protón. Bez CA by bola reakcia pomalá. Priebeh reakcie je znázornený na obrázku 1.

Vo všetkých živých organizmoch je aktivita CA spojená s fyziologickými a patofyziologickými procesmi. Sú to deje súvisiace s transportom a dodávkou CO_2 alebo HCO_3^-, homeostázou pH, sekréciou elektrolytov, biosyntetickými procesmi a fotosyntézou.

V CNS sa CA podieľajú na neuronálnej signali-

Obr. 2: Vstup CA do glukoneogenézy



Zdroj: Zolfaghari a kol., 2015

zácii. Reverzibilná hydratácia CO_2 prispieva k dostupnosti iónov. Ide o ióny, ktoré sú nevyhnutné pre GABA-ergnú a glutamát-ergnú funkciu neurónov. GABA-ergný systém je skupina neurónov a nervových dráh, ktorý pri prenose nervového vzruchu používa kyselinu gama-aminomaslovú (GABA). Uvedená kyselina je hlavný inhibičný neurotransmiter v mozgu. Pre GABA-ergnú funkciu sú potrebné ióny ako bikarbonát a protóny, ktoré sú schopné regulovať zmeny pH v extra/intracelulárnom priestore (Barresi a kol., 2021). Glutamát sprostredkováva excitačný prenos v mozgu. Má významnú funkciu v procese učenia a pre pamäť. Znížená hladina glutamátu sa spája s viacerými ochoreniami. Príkladom je epilepsia, Huntingtonova choroba, ale aj Rassmusenova encefalitída (Varadkar a Cross, 2015; Rebec, 2018; Kim a kol., 2020).

Medzi biosyntetické procesy, do ktorých sú CA zahrnuté, patrí glukoneogenéza, lipogenéza a ureosyntéza. Glukoneogenéza ako proces novotvorby glukózy z necukrových substrátov či aminokyselín má za úlohu udržať hladinu glykémie v norme. Glukoneogenéza prebieha len v pečeni, obličkách a enterocytoch. Na obrázku 2 je znázornený vstup CA do procesu glukoneogenézy. Lipogenéza v biochémii znamená premenu mastných kyselín a glycerolu na tuky. CA sú nevyhnutné pre poskytnutie bikarbonátu pre zvýšenie lipogenézy (Chegwidden a Spencer, 1996). Účinnosť sulfónamidov pri inhibícii lipogenézy koreluje s ich účinnosťou ako inhibítorov aktivity CA. Zvýšená úroveň lipogenézy bola inhibovaná silnými a špecifickými sulfónamidovými inhibítormi CA – acetazolamidom.

Ureosyntéza je tvorba močoviny a predstavuje najdôležitejší spôsob detoxikácie amoniaku (dusíka aminokyselín). Močovina sa vytvára v pečeni, uvoľňuje sa do krvi a vylučuje sa obličkami. Len malé množstvo močoviny sa u ľudí vylučuje aj slinami a potom. Cyklus ureosyntézy (malý Krebsov cyklus, ortinínový cyklus) možno rozdeliť na 5 na seba nadväzujúcich reakcií. Mitochondriálna CA je potrebná pre syntézu močoviny, lebo poskytuje HCO_3^- pre syntézu karbamoylfosfátu, čo je prvá reakcia ureosyntetického cyklu (Häussinger a kol., 1986).

2. Izoformy karboanhydrázy

U cicavcov je zatiaľ rozpoznaných 16 izoforiem CA (Supuran, 2018). CA VIII, CA X a CA XI nemajú katalytickú aktivitu, pretože vo svojom aktívnom mieste nemajú zinočnatý ión (Balamurugan, 2016). CA majú v organizme mnoho dôležitých funkcií. Vyskytujú sa v pľúcach, mozgu, pankrease, pečeni,

Tab. 1: Prehľad izoforiem karboanhydrázy podľa fyziologického výskytu

Cytozolové	Naviazané na membránu	Mitochondriálne	Sekrečné	Bez enzýmovej aktivity	Nevyskytujúce sa u ľudí
CA I	CA IV	CA VA	CA VI	CA VIII	CA β
CA II	CA IX	CA VB		CA X	
CA III	CA XII			CA XI	
CA VII	CA XIV				
CA XIII	CA XV				

Zdroj: upravené podľa Supuran, 2007; Cuffaro a kol., 2020

žlčníku, svaloch, obličkách a červených krvinkách a majú účinky aj v oku. V tabuľke 1 je uvedený prehľad známych izoforiem CA podľa fyziologického výskytu.

CA zahŕňajú až niekoľko izoenzýmov vyskytujúcich sa v rôznom množstve v rôznych tkanivách: cytozolové (CA I, CA II, CA III, CA VII a CA XIII), naviazané na membránu (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV a CA XV), mitochondriálne (CA VA a CA VB), sekrečné (CA VI) – vylučované do mlieka a slín (Cuffaro a kol., 2020); bez enzýmovej aktivity. Obrázok 3 znázorňuje výskyt známych izoforiem CA v bunke i mimo nej.

Inhibícia alebo aktivácia CA môže predstavovať potenciálny mechanizmus v terapii mnohých ochorení, napríklad Alzheimerovej choroby, obezity, infekčných ochorení, nádorových ochorení a iných.

3. Inhibícia karboanhydráz a ich potenciálne terapeutické využitie

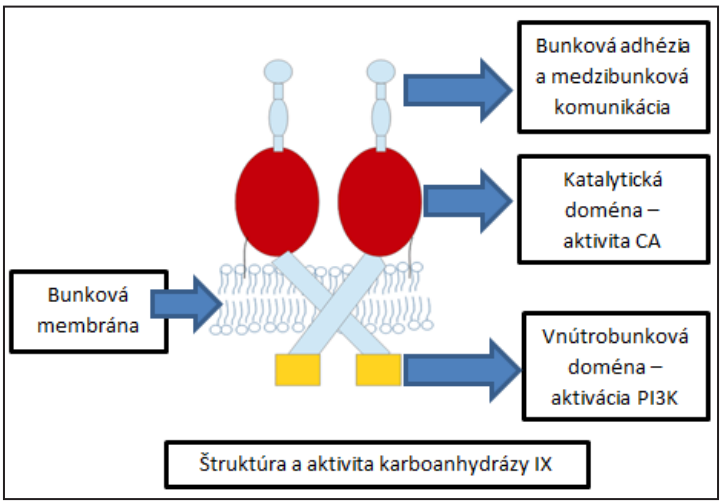
3.1. Využitie inhibície β-karboanhydrázy v potenciálnej terapii infekčných ochorení

Antiinfektíva sú lieky, ktoré sa používajú na liečbu infekčných ochorení. Infekcie môžu byť spôsobené baktériami, vírusmi, kvasinkami, plesňami alebo parazitmi. Antiinfektíva zabraňujú ich vzniku, rozvoju alebo komplikáciám spôsobeným infekčnými organizmami. β-CA je enzým, ktorý môže byť inhibovaný aromatickými a heterocyklickými sulfónamidmi. Zistilo sa, že β-CA môžu byť potenciálnym cieľom inhibície v mykobaktériách.

Nedávno sa ukázalo, že CA sú dôležité biomolekuly pre mnohé baktérie zapojené do ľudských infekcií, ako sú *Vibrio cholerae*, *Brucella suis*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Helicobacter pylori*. U týchto druhov aktivita CA podporuje rast a adaptáciu mikroorganizmov v hostiteľovi alebo moduluje produkciu a virulenciu bakteriálnych toxínov (Campestre a kol., 2021).

Preto by inhibítory β-CA mohli patriť medzi potenciálne antiinfektíva z dôvodu zastavenia rastu spomínaných baktérií (Supuran, 2010). Účinok bol pozorovaný aj u parazitov. Inhibítory sa môžu viazať na centrálny atóm – zinočnatý ión, alebo sa môžu viazať mimo centrálneho atómu (Balamurugan, 2016). DNA *Staphylococcus aureus* kóduje CA – ß (SauBCA). Je to potenciálny cieľ, ktorý môže byť inhibovaný určitými aromatickými a heterocyklickými sulfónamidmi. Skúmali sa anorganické anióny a niektoré ďalšie malé molekuly pre ich inhibíciu SauBCA. Halogenidy, dusitany, dusičnany, hydrogenuhličitany, uhličitany, bisulfity, sírany, stanáty a N, N-dietyldítiokarbamáty boli inhibítory SauBCA. Medzi najúčinnejšie inhibítory SauBCA patrili sulfamid, sulfamát, kyselina fenylboritá a kyselina fenylarsonová (Urbanski a kol., 2021).

Obr. 3: Štruktúra CA IX



Zdroj: Koltai, 2018

3.2. Využitie inhibície karboanhydrázy IX a karboanhydrázy XII v potenciálnej terapii nádorových ochorení

V súčasnosti sa výskum zameriava na prípravu a testovanie nových zlúčenín sulfónamidového typu. Účinné sulfónamidy by mali selektívne inhibovať CA IX alebo CA XII. Efektívnou inhibíciou týchto dvoch izoforiem sa docieli spomalenie alebo úplné potlačenie novotvorby, proliferácie a migrácie nádorových buniek.

Významný prínos majú selektívne inhibítory CA (iCA), ktoré sa značia vhodným rádionuklidom. Využívajú sa pri zobrazení ložísk s vysokou expresiou CA IX. Karboanhydráza IX sa označuje aj ako endogénny marker hypoxie. Hypoxické prostredie je jednou z hlavných charakteristík nádorového mikroprostredia. Je to prostredie, kde je deficit kyslíka. Cieľom je, aby sa skúmané zlúčeniny vychytávali v hypoxickom mikroprostredí nádoru. Cielené vychytávanie je využiteľné pre vývoj rádionuklidmi značených molekúl. Takéto molekuly by umožnili cielenú lokalizáciu a detekciu nádorového ložiska alebo cielenú terapiu rádiofarmakami.

Izoformy CA-IX a CA-XII sa vo vysokej miere vyskytujú v nádorových tkanivách a len v malom množstve v normálnom tkanive (Supuran, 2020). Zvýšená expresia CA IX v nádoroch je dôležitý diagnostický znak a cieľ protinádorových liečiv.

CA IX je dimérny proteín s kvartérnou štruktúrou, ktorá pravdepodobne nie je u iných CA. Na obrázku 3 je znázornená štruktúra CA IX. Vďaka známej štruktúre sa môžu vyvíjať jeho inhibítory s protinádorovým účinkom. Mnoho aromatických a heterocyklických sulfónamidov má dobrú afinitu, avšak nevykazujú špecifickosť na izoenzýmy CA IX a CA XII.

Viaceré štúdie potvrdili významnú inhibičnú aktivitu benzénsulfónamidov s rôznymi substituentmi. Sulfónamidy, obsahujúce 1,3,5-triazínové skupiny, môžu selektívne a silne inhibovať transmembránové izoformy CA IX, XII a XIV oproti cytozolickým izoformám I a II (Lolak a kol., 2019). Syntézu 1,3,5-triazínových skeletov substituovaných benzénsulfónamidovými konjugátmi s aminokyselinami je možné ľahko vykonať s použitím vodného roztoku na báze uhličitanu sodného. Medzi výhody tohto syntetického postupu patrí: vysoká selektivita tvorby disubstituo-

vaných konjugátov; niekoľkonásobne vyšší výťažok (≥ 95 %), ako sa dosiahol predtým; eliminácia organických rozpúšťadiel použitím ekologického vodného média; jednoduchá a rýchla izolácia produktu. Táto metóda prináša efektívny postup syntézy (Krajčiová a kol., 2017).

Ureido-substituované benzénsulfónamidy (USB) sú účinnými a selektívnymi inhibítormi aktivity rekombinantných CA IX a CA XII (Pacchiano a kol., 2011). Röntgenové kryštalografické štúdie nedávno poskytli pohľad na mechanizmus selektívnej inhibície CA IX sprostredkovanej USB prostredníctvom CA II (Mboge a kol., 2018). Štúdie ukázali, že USB interagujú lepšie so zvyškami v aktívnom mieste CA IX oproti CA II, čo poukazuje na ich vyššiu selektivitu k CA izoforme, ktorá je spojená s nádormi. Naviazanie sulfónamidov na aktívne miesto enzýmu CA vyvolá jeho inhibíciu. Dusík aminoskupiny sulfónamidu sa priamo naviaže na zinok, prijíma vodíkovú väzbu z hydrofilnej aminokyseliny a kyslíky sulfónamidu prijímajú vodíkovú väzbu z hlavného reťazca. Vzniká Zn(N)4 v tvare tetraédra. Skupiny na sulfónamide rozširujú aktívne miesto a stabilizujú ho hydrofilnými a hydrofóbnymi zvyškami.

Pri návrhu inhibítorov CA sa najčastejšie naviaže aromatický kruh priamo na sulfónamid, čím sa zvýši afinita na enzým. Stále však chýba izoformová špecifickosť sulfónamidov. Inhihítory CA IX sú vhodnými liečivami, keďže ich nadmerná expresia je len u nádorových buniek (Balamurugan, 2016).

Nové benzénsulfónamidy, obsahujúce skupiny solubilizujúce vo vode, sa syntetizovali s použitím kyseliny GABA. Ich inhibičná aktivita sa hodnotila voči izoformám ľudskej CA (hCA I), II, IX a XII. Niektoré z týchto zlúčenín boli stredne silnými inhibítormi cytozolických (CA I, II) a transmembránových (CA IX) izoforiem a vysoko účinnými nanomolárnymi inhibítormi druhej transmembránovej izoformy hCA XII. Na vývoj nových protinádorových látok je možné použiť syntetizované sulfónamidy, ktoré majú dobrú selektívnu inhibíciu na nádorovo asociovanú izoformu CA XII (Ceruso a kol., 2015).

3.3. Využitie inhibície karboanhydrázy II v potenciálnej terapii glaukómu

Inhibítory sulfónamidového typu obohacujú skupinu liečiv, ktoré zvyšujú diurézu. Medzi inhibítory CA II patria sulfomidové látky ako acetazolamid a dorzolamid, ktoré sa radia medzi proximálne diuretiká, ale v klinickej praxi sa využívajú prevažne v terapii glaukómu (Scozzafava a Supuran, 2014). Glaukóm, známy ako zelený zákal, je poškodenie zraku, ktoré je spôsobené odumieraním zrakového nervu. Hlavnou príčinou je vysoký vnútroočný tlak, ďalšími sú genetické faktory, porucha regulácie tvorby vnútroočnej tekutiny, ale aj *diabetes mellitus*. Inhibíciou CA dochádza k zníženiu množstva vnútroočnej tekutiny. Následkom je zníženie vnútroočného tlaku (Stein a kol., 2021).

Inhibícia aktivity CA v ciliárnych výbežkoch oka zapríčiňuje pokles sekrécie očného moku s následným znížením vnútroočného tlaku. V nepigmentovaných bunkách ciliárneho epitelu dominujú dva izoenzýmy CA II a CA IV. CA II je v cytoplazme a môže byť blokovaná lokálnymi alebo systémovými iCA. CA IV je viazaná na membrány a jej aktivita nie je ovplyvnená lokálnymi iCA. K dosiahnutiu klinicky signifikantného poklesu vnútroočného tlaku je potrebné dosiahnuť takmer úplnú (99,9 %) inhibíciu enzýmu CA II v nepigmentovaných bunkách ciliárneho epitelu. Sodík a bikarbonátové ióny sú secernované do zadnej komory oka pomocou ATP-dependentného procesu. Molekuly vody nasledujú sodík a bikarbonát pasívne v závislosti na osmotickom gradiente. Inhibítory karboanhydráz znížia množstvo bikarbonátu využiteľného pre aktívny transport, následne je znížený počet pasívne prestupujúcich molekúl vody. Takto sa zmenší objem vytvorenej vnútroočnej tekutiny a zníži sa vnútroočný tlak (Shahidullah a kol., 2009).

3.4. Využitie inhibície karboanhydrázy V v potenciálnej terapii obezity

Obezita je chronické ochorenie, v prvom rade predstavuje zdravotný problém. S nadmernou telesnou hmotnosťou sú spájané zdravotné riziká ako *diabetes mellitus*, kardiovaskulárne ochorenia, vysoký

krvný tlak, ochorenia kĺbov a nádorové ochorenia. Isté množstvo tuku v organizme je pre zdravie nevyhnutné. Tuk pomáha chrániť dôležité orgány, je zložkou centrálneho nervového systému, je nevyhnutný pri syntéze hormónov. V telesnom tuku sú skladované aj vitamíny (Hurt a kol., 2011). Väčšina liečiv používaných na liečbu obezity má závažné kardiovaskulárne vedľajšie účinky, čo značne obmedzuje ich užitočnosť (Dias a kol., 2018). Ukázalo sa, že hlavnou triedou iCA v klinickom použití sú sulfónamidy. Inhibícia CA znižuje lipogenézu v adipocytoch v bunkovej kultúre (Spencer a kol.,1988). Inhibítory CA zamerané na mitochondriálne izoformy CA VA a VB majú potenciál znižovať obezitu.

Niekoľko štúdií poukazuje na fakt, že iCA sulfónamidového a sulfamátového typu majú potenciál ako antiobezitiká. Existujú tri izoformy CA rozhodujúce pre celý proces biosyntézy mastných kyselín: CA VA/VB v mitochondriách a CA II v cytozole (Arechederra a kol., 2013).

Ukázalo sa, že inhibícia konkrétnych CA sulfónamidmi znižuje lipogenézu v adipocytoch v bunkovej kultúre. V takýchto skorších experimentoch bola dosiahnutá nerozlišujúca inhibícia všetkých izoenzýmov CA prítomných v týchto tkanivách použitím inhibítorov bez selektivity na mitochondriálne enzýmy, ale napriek tomu demonštrovali účinok na inhibíciu lipogenézy.

Topiramát pôsobí ako vysoko účinný inhibítor mitochondriálnych izoenzýmov CA VA a CA VB zapojených do lipogenézy (Supuran, 2012) a súčasne je aj antiepileptikom. Topiramát vykazuje silné antikonvulzívne účinky vďaka multifunkčnému mechanizmu účinku, blokuje sodíkové kanály a receptory kainát / AMPA, zadržiava CO_2 k inhibícii izoenzýmov CA červených krviniek a mozgu, posilňuje GABA-ergný prenos. Vedľajším účinkom liečiva u obéznych epileptických pacientov bol pokles telesnej hmotnosti, zatiaľ bez farmakologického vysvetlenia. Navyše sa ukázalo, že topiramát znižuje prírastok tuku. Štúdie potvrdili, že liečivo je veľmi účinným inhibítorom niekoľkých izoenzýmov CA: CA II, VA, VB, VI, VII, XII, XIII a röntgen kryštálovej štruktúry komplexu s CA II a CA I objasnil molekulárne interakcie, ktoré vysvetľujú vysokú afinitu tejto zlúčeniny k aktívnemu miestu enzýmu.

4. Aktivácia karboanhydrázy ako potenciálna terapia Alzheimerovej choroby

Aktivácia vybraných izoforiem CA predstavuje inovatívny prístup v terapii Alzheimerovej choroby. Alzheimerova choroba je neurodegeneratívna porucha mozgu a spôsobuje postupnú demenciu. Názov nesie po Aloisovi Alzheimerovi, ktorý ju prvýkrát opísal. Príčina vzniku známa nie je, ale podľa neuropatologických nálezov vieme, ako prebieha. Hlavnou zmenou je ukladanie beta-amyloidu v oblastiach mozgu a procesy, ktoré spôsobujú rozpad nervových vlákien a buniek. Zvýšená aktivita CA by mohla zlepšiť vnímanie, spracovanie a ukladanie dočasne spojených relevantných signálov. Tento dej predstavuje dôležitý terapeutický cieľ vo farmakológii učenia a pamäti (Lopez a kol., 2019).

Dysfunkcia CA zhoršuje kognitívne funkcie a je spojená s mentálnou retardáciou, Alzheimerovou chorobou a fyziologickým starnutím (Barnes, 2015). V rámci výskumného projektu zameraného na vývoj nových aktivátorov CA selektívnych pre určité izoformy sa skúmali tri série derivátov na báze indolu. Test aktivácie enzýmu na ľudských izoformách CA I, II, VA a VII odhalil niekoľko účinných mikromolárnych aktivátorov so sľubnými profilmi selektivity voči cytozolickej izoforme CA VII nachádzajúcej sa v mozgu. Štúdie molekulárneho modelovania navrhli teoretický model komplexu medzi CA VII a novými aktivátormi a poskytli možné vysvetlenie ich modulačných a selektívnych vlastností. Predbežné biologické hodnotenia ukázali, že jeden z najsilnejších aktivátorov CA VII nie je cytotoxický a je schopný zvýšiť uvoľňovanie neurotrofického faktora odvodeného z mozgu (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*) z ľudských mikrogliových buniek, čo zdôrazňuje jeho možnú aplikáciu pri liečbe porúch spojených s CNS (Barresi a kol., 2021). Je známych niekoľko aktivátorov CA. Jedným z nich je histamín. Histamín je organická zlúčenina obsahujúca dusík a

sprostredkuje lokálne imunitné reakcie a pôsobí ako neurotransmiter. Bolo zistené, že aktivátory CA sa viažu na aktívne miesto enzýmu, čím zvyšujú aktivitu CA a zúčastňujú sa tak na procese výmeny protónu (DiLek, 2017).

Izoenzýmy ľudskej CA I a II (hCAI, II) boli purifikované z erytrocytu. Boli skúmané kinetické interakcie medzi enzýmami a memantínom, donepezilom, dvoma rôznymi liečivami, ktoré boli používané na liečbu Alzheimerovej choroby. Memantín bol vybraný kvôli jeho podobnosti s histamínom, ktorý je aktivátorom izoenzýmov CA. Obe zlúčeniny majú skupinu -NH_2. Hladiny spomínaných izoenzýmov CA I a CA II sú nízke u pacientov s Alzheimerovou chorobou alebo u staršej populácie, preto zvýšenie aktivity izoenzýmov má prínos v terapii. Účinok týchto liečiv používaných pri Alzheimerovej chorobe je spôsobený pozitívnymi zmenami v hladinách izoenzýmov CA (DiLek, 2017). Memantín ľahko interagoval s aminokyselinami v aktívnom mieste izoenzýmov CA a tieto izoenzýmy boli aktívnejšie. Memantín a donepezil sú oveľa účinnejšie v porovnaní s histamínom. Tieto zlúčeniny môžu byť použité ako vzor pre vývoj nových aktivátorov. Histidín, fenylalanín, citrát sildenafilu sa ukázal ako potenciálny aktivátor rôznych izoenzýmov CA. Zvýšená aktivita CA by mohla zlepšiť vnímanie, spracovanie a ukladanie dočasne spojených relevantných signálov a predstavuje dôležitý terapeutický cieľ vo farmakológii učenia a pamäti.

ZÁVER

Mnohé vedecké štúdie naznačujú, že CA a jej inhibícia či aktivácia má významnú úlohu v liečbe rôznych chorôb, vrátane nádorových ochorení. Množstvo odborných článkov poukazuje na aplikáciu inhibítorov a aktivátorov CA a ich medicínsky prínos. Základ väčšiny modulátorov CA, ktoré sú využívané ako liečivá, tvoria sulfónamidy s rôznymi substituentmi. Stále však existuje mnoho neprebádaných a nezrealizovaných teórií, ktoré poskytujú potenciál pre nadväzujúce štúdie v danej oblasti.

ZOZNAM LITERATÚRY

Arechederra, R. L., Waheed, A., Sly, W. S., Supuran, C. T., Minteer, S. D.: Effect of sulfonamides as carbonic anhydrase VA and VB inhibitors on mitochondrial metabolic energy conversion. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 21 (6), 1544 – 1548. Doi: 10.1016/j.bmc.2012.06.053.

Balamurugan, K.: HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *International Journal of Cancer*, 2016, 138, 1058 – 1066. https://doi.org/10.1002/ijc.29519.

Barnes, J. N.: Exercise, cognitive function, and aging. *Advances in Physiology Education*, 2015, 39 (2), 55 – 62. Doi:10.1152/advan.00101.2014.

Barresi, E., Ravichandran, R., Germelli, L., Angeli, A., Baglini, E., Salerno, S., Marini, A.M., Costa, B., Da Pozzo, E., Martini, C., Da Settimo, F., Supuran, C., Cosconati, S., Taliani, S.: Carbonic anhydrase activation profile of indole-based derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2021, 36, 1783 – 1797. https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1959573. Published online 2021 August 2, 2021.

Campestre, C., De Luca, V., Carradori, S., Grande, R., Carginale, V., Scaloni, A., Supuran, C. T., Capasso, C.: Carbonic Anhydrases: New perspectives on protein functional role and inhibition in *Helicobacter pylori*. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12, 629 163. https://doi.org/10.3389 fmicb.2021.629163. eCollection 2021.

Ceruso, M., Bragagni, M., AlOthman, Z., Osman, S. M., Supuran, C. T.: New series of sulfonamides containing amino acid moiety act as effective and selective inhibitors of tumor-associated carbonic anhydrase XII. J*ournal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2015, 30, 430 – 434. https://doi.org/10.3109/14756366.2014.942659. Published online August 4, 2014.

Chegwidden, W. R., Spencer, I. M.: Carbonic anhydrase provides bicarbonate for de novo lipogenesis in the locust. *Comparative Biochemistry*

and Physiology – Part B – Biochemistry and Molecular Biology, 1996, 115, 247 – 254. https://doi.org/10.1016/0305-0491(96)00116-2.

Cuffaro, D., Nuti, E., Rossello, A.: An overview of carbohydrate-based carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2020, 35, 1906 –1 922. https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1825409. Published online October 20, 2020.

Dias, S., Paredes, S., Ribeiro, L.: Drugs involved in dyslipidemia and obesity treatment: focus on adipose tissue. *International Journal of Endocrinology*, 2018, vol. 2018, 21 p. ID 2637418. Doi10.1155/2018/2637418.

DiLek, E.: Activation of two different drugs used in Alzheimer's disease treatment on human carbonic anhydrase isozymes I and II activity: an *in vitro* study. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 14, 164 – 168. https://doi.org/10.4274/tjps.43434. Published online August 15, 2017.

Häussinger, D., Kaiser, S., Stehle, T., Gerok, W.: Liver carbonic anhydrase and urea synthesis. The effect of diuretics. *Biochemical Pharmacology*, 1986, 35 (19), 3317 – 3322. Doi: 10.1016/0006-2952(86)90429-6.

Hurt, R. T., Frazier, T. H., McClave, S. A., Kaplan, L. M.: Obesity epidemic: overview, pathophysiology, and the intensive care unit conundrum. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2011, 35 (5 Suppl.), 4S –13S Doi:10.1177/0148607111415110.

Kim, J.-H., Marton, J., Ametamey, S. M., Cumming, P.: A review of molecular imaging of glutamate receptors. Review. *Molecules*, 2020, 25 (20), 4749. Doi:10.3390/molecules25204749.

Koltai, T.: Chapter 6 part I Carbonic anhydrase and the pH paradigm in cancer. In Koltai, T., Reshkin, S.J., Harguindey, S. (Eds.). *An Innovative Approach to Understanding and Treating Cancer: Targeting PH*. Academic Press, 2018, 157 – 176. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819059-3.00007-1.

Koltai, T., Reshkin, S. J., Harguindey, S.: Chapter 7 – Carbonic anhydrases. In Koltai, T., Reshkin, S. J., Harguindey, S. (Eds.). *An Innovative Approach to Understanding and Treating Cancer: Targeting PH*. Academic Press, 2020, pp. 157–176. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819059-3.00007-1.

Krajčiová, D., Pecher, D., Garaj, V., Mikuš, P.: Optimization and comparison of synthetic procedures for a group of triazinyl-substituted benzene-sulfonamide conjugates with amino acids. *Molecules*, 2017, 22 (9), 1533. https://doi.org/10.3390/molecules22091533. Published online September 13, 2017.

Lolak, N., Akocak, S., Bua, S., Supuran, C. T.: Design, synthesis and biological evaluation of novel ureido benzenesulfonamides incorporating 1,3,5-triazine moieties as potent carbonic anhydrase IX inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 82, 117 – 122. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.005. Published online October 5, 2018.

Lopez, J. A. S., González, H. M., Léger, G. C.: Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 2019, 167, 231 – 255. Doi:10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3.

Mboge, M. Y., Chen, Z., Wolff, A., Mathias, J. V., Tu, C., Brown, K. D., Bozdag, M., Carta, F., Supuran, C. T., McKenna, R., Frost, S. C.: Selective inhibition of carbonic anhydrase IX over carbonic anhydrase XII in breast cancer cells using benzene sulfonamides: Disconnect between activity and growth inhibition. *PloS One*, 2018, 13, e0207417 – e0207417. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207417. eCollection 2018.

Pacchiano, F., Carta, F., McDonald, P. C., Lou, Y., Vullo, D., Scozzafava, A., Dedhar, S., Supuran, C. T.: Ureido-substituted benzenesulfonamides potently inhibit carbonic anhydrase IX and show antimetastatic activity in a model of breast cancer metastasis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 54, 1896 – 1902. https://doi.org/10.1021/jm101541x. Published online March 1, 2011.

Rebec, G. V.: Corticostriatal network dysfunction in Huntington's disease: Deficits in neural processing, glutamate transport, and ascorbate release. Review. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2018,

24 (4), 281 – 291. Doi:10.1111/cns.12828.

Scozzafava, A., Supuran, C. T.: Glaucoma and the applications of carbonic anhydrase inhibitors. *Subcellular Biochemistry*, 2014, 75, 349 – 359. Doi:10.1007/978-94-007-7359-2_17.

Shahidullah, M., To, C.-H., Pelis, R. M., Delamere, N. A.: Studies on bicarbonate transporters and carbonic anhydrase in porcine non-pigmented ciliary epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2009, 50 (4), 1791 – 1800. Published online November 14, 2008. Doi:10.1167/iovs.08-2487.

Spencer, I. M., Hargreaves, I., Chegwidden, W. R.: Effect of the carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide on lipid synthesis in the locust. *Biochemical Society Transactions*, 1988, 16, 973 – 974. https://doi.org/10.1042/bst0160973. Published online December 1, 1988.

Stein, J. D., Khawaja, A. P., Weizer, J. S.: Glaucoma in adults-screening, diagnosis, and management: A review. *JAMA*, 2021, 325 (2),164 – 174. Doi: 10.1001/jama.2020.21899.

Supuran, C. T.: Carbonic anhydrases as drug targets – an overview. Review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2007, 7 (9), 825 – 833. Doi:10.2174/156802607780636690.

Supuran, C. T.: Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20, 3467 – 3474. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.05.009. Published online June 15, 2010.

Supuran, C. T.: Carbonic anhydrase inhibitors as emerging drugs for the treatment of obesity. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 2012, 17, 11 – 15. https://doi.org/10.1517/14728214.2012.664132. Published online February 16, 2012.

Supuran, C. T.: Carbonic anhydrase activators. *Future Medicinal Chemistry*, 2018, 10, 561 – 573. https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0223. Published online February 26, 2018.

Supuran, C. T: Experimental carbonic anhydrase inhibitors for the treatment of hypoxic tumors. *Journal of Experimental Pharmacology*, 2020, 12, 603 – 617. https://doi.org/10.2147/JEP.S265620. Published online December 15, 2020.

Urbanski, L. J., Vullo, D., Parkkila, S., Supuran, C. T.: An anion and small molecule inhibition study of the β-carbonic anhydrase from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2021, 36 (1), 1088 – 1092. Doi:10.1080/14756366.2021.1931863.

Varadkar, S., Cross, J. H.: Rasmussen syndrome and other inflammatory epilepsies. Review. *Seminars in Neurology*, 2015, 35 (3), 259 – 268. Doi:10.1055/s-0035-1552921.

Zolfaghari, E. R., Kuuslahti, M., Vullo, D., Barker, H., Supuran, C., Parkkila, S.: Ascaris lumbricoides β carbonic anhydrase: A potential target enzyme for treatment of ascariasis. *Parasites & Vectors*, 2015, 8, 479. https://doi.org/10.1186/s13071-015-1098-5. Published online September 18, 2015.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, IV., 2: 15 – 21, 2022

ÚČINNOSŤ VYBRANÝCH RASTLINNÝCH SILÍC A EXTRAKTOV NA TVORBU EXTRACELULÁRNEJ FOSFOLIPÁZY *CANDIDA ALBICANS*

EFFICACY OF SELECTED ESSENTIAL OILS AND EXTRACTS ON THE PRODUCTION OF EXTRACELLULAR PHOSPHOLIPASE BY *CANDIDA ALBICANS*

Proškovcová, Martina[1]; Čonková, Eva[1]; Váczi, Peter[1]; Harčárová, Michaela[2]

[1]Katedra farmakológie a toxikológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
[2]Katedra výživy a chovu zvierat
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

martina.proskovcova@student.uvlf.sk

ABSTRAKT

Candida albicans **je oportúnny patogén, často zodpovedný za vznik kandidózy u ľudí. Jej patogenita je podmienená viacerými faktormi, ktoré sa podieľajú na vývoji rezistencie voči konvenčným antimykotikám, čo zhoršuje prognózu liečby. V štúdii sme sa zamerali na testovanie antimykotického účinku rastlinných extraktov (RE) a rastlinných silíc (RS) z čeľade *Lamiaceae* (*Mentha piperita* L., *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L., *Salvia officinalis* L.). Následne sme sledovali vplyv antimykoticky najúčinnejšej silice a extraktu na produkciu extracelulárnej fosfolipázy (EPL) klinickými izolátmi *Candida albicans*. Z testovaných silíc bol lepší antimykotický účinok pozorovaný pri RS z *Origanum vulgare* L., *Mentha piperita* L. a *Thymus vulgaris* L., s priemernými hodnotami MIC 0,4 mg.ml^{-1}. Z testovaných RE najlepší antimykotický efekt sme zaznamenali pri extrakte z *Origanum vulgare* L. s priemernou minimálnou inhibičnou koncentráciou (MIC) 4,9 mg.ml^{-1}. Z 23 izolátov (92 %) tvoriacich EPL bola u 22 testovaná inhibícia produkcie EPL vplyvom RS a RE z *Origanum vulgare* L. Po expozícii buniek extraktom, 7 izolátov (31,8 %) produkovalo EPL intenzívne, 6 izolátov (27,3 %) vykazovalo strednú produkciu EPL a 8 izolátov (36,4 %) miernu. Jeden izolát (4,5 %) produkciu EPL nevykazoval. Po hodinovej expozícii buniek RS z *Origanum vulgare* L. (0,8 mg.ml^{-1}) len 1 izolát (4,5 %) naďalej produkoval EPL intenzívne a až 15 izolátov (68,2 %) fosfolipázu netvorilo. Ďalšie 4 izoláty (18,3 %) produkovali EPL mierne a po jednom izoláte bolo v skupine slabých a stredných producentov EPL.**

Potlačenie produkcie EPL rastlinným extraktom bolo slabšie. Dosiahnuté výsledky naznačujú, že RS, prípadne RE z *Origanum vulgare* L. môže byť vhodným nástrojom na znižovanie virulencie kvasinky, čo môže prispievať k efektívnejšej terapii a profylaxii kandidóz.

Kľúčové slová: *Candida albicans*; *Lamiaceae*; hydrolytické enzýmy; extracelulárna fosfolipáza

ABSTRACT

***Candida albicans* is an opportunistic pathogen responsible for the development of candidiasis. Its pathogenicity is due to several factors that contribute to its resistance to conventional antifungals, thus worsening the prognosis of treatment. In our study we focused on the antifungal and antivirulent effect of plant extracts (PE) and essential oils (EO) from the family *Lamiaceae* (*Mentha piperita* L., *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L., *Salvia officinalis* L.) on *Candida albicans* strains. Of the tested PEs, the best antifungal effect was observed in the extract from *Origanum vulgare* L. with an average minimum inhibitory concentration (MIC) of 4.9 mg.ml^{-1}, therefore its effect on the production of extracellular phospholipase by *C. albicans* was further monitored. A better antifungal effect was observed with EOs at average MIC values of 0.4 mg.ml^{-1} (*Origanum vulgare* L., *Mentha piperita* L., *Thymus vulgaris* L.). Of the 23 isolates (92 %) producing EPL, 22 were tested for inhibition of EPL production by plant yields. After exposure of the cells to the extract, 7 isolates (31.8 %) produced EPL intensively, 6 isolates (27.3 %) showed medium EPL production and 8 isolates (36.4 %) moderate EPL production. One isolate (4.5 %) did not show phospholipase activity. After one hour exposure of *Origanum vulgare* L. RS (0.8 mg.ml^{-1}), only 1 isolate (4.5 %) continued to produce EPL intensively and up to 15 isolates (68.2 %) did not form phospholipase. Another 4 isolates (18.3 %) produced EPL moderately and one isolate was in the group of weak and medium EPL producers. The suppression of EPL production by PE was weaker. The obtained results suggest that EO or PE of *Origanum vulgare* L. may be a suitable tool for reducing yeast virulence, thus contributing to more effective therapy and prophylaxis of candidiasis.**

Key words: *Candida albicans*; *Lamiaceae*; hydrolytic enzymes; extracellular phospholipase

ÚVOD

Candida albicans (*C. albicans*) je fyziologickou súčasťou ľudskej komenzálnej mikrobioty, avšak za určitých podmienok je príčinou 50 – 90 % diagnostikovaných humánnych kandidóz (Finkel a Mitchell, 2011). Vzrastajúci trend výskytu kandidóz sa odráža na rastúcom počte rizikových pacientov, na počte hospitalizácií, na znížení funkcie imunitného stavu pacientov, či na zavádzaní moderných invazívnych postupov v medicíne. Indikovaná antimykotická liečba prináša so sebou rad nežiaducich účinkov. Opakované užívanie antimykotík môže navyše viesť k nárastu rezistencie patogénu na liečivo. Preto je potrebné hľadať nové bezpečnejšie antifungálne zlúčeniny a dostatočne prebádať špecifiká ich inhibičného pôsobenia na *C. albicans* (Wall a Lopez-Ribot, 2020).

Vhodnou alternatívou konvenčných antimykotík predstavujú obsahové látky v liečivých rastlinách. Čeľaď *Lamiaceae* (hluchavkovité) je druhovo veľmi pestrá a patrí k najviac medicínsky preskúmaným čeľadiam. Rastliny obsahujú silice, ktoré sú zložené z monoterpénov a seskviterpénov alebo derivátov fenylpropánu. Vykazujú antibakteriálny, karminatívny, antivírusový, antitusický či sedatívny účinok (Košťálová a kol., 2012). Za ich výslednú biologickú aktivitu môže byť zodpovedná hlavná obsahová látka, prípadne synergické pôsobenie viacerých obsahových látok (Raut a Karuppayil, 2014). Z uvedeného dôvodu sme sa v štúdii zamerali

na sledovanie účinku rastlinných výťažkov z čeľade *Lamiaceae* na kvasinku *C. albicans*. Testovali sme silice a etanolové extrakty z *Thymus vulgaris* L. (dúška tymiánová), *Mentha piperita* L. (mäta pieporná), *Origanum vulgare* L. (pamajorán obyčajný), *Salvia officinalis* L. (šalvia lekárska). Testovali sme antimykotický účinok silíc a extraktov, ako aj vplyv na produkciu EPL, významný faktor virulencie (Martins a kol., 2014). EPL je hydrolytický enzým, ktorý sa podieľa na metabolizácii fosfolipidov, hlavných zložiek bunkových membrán či membrán vezikúl (Mayer a kol., 2013).

MATERIÁL A METÓDY

1. Stanovenie citlivosti *C. albicans* na silice a extrakty z rastlín čeľade *Lamiaceae*

In vitro testovanie citlivosti *C. albicans* na vybrané RE a RS (Calendula, a. s., Slovenská republika) bolo vykonané štandardnou mikrodilučnou metódou CLSI M27-A3 (2008) s menšími modifikáciami. Najprv sme si pripravili zásobné roztoky silíc a extraktov (400 $mg.ml^{-1}$) z rastlín *Mentha piperita* L., *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L. a *Salvia officinalis* L. Následne, binárnym riedením, boli priamo v 96-jamkovej mikrotitračnej platničke (stĺpce 1 – 10) nariedené jednotlivé koncentrácie testovaných RE a RS v rozsahu od 200 do 0,4 $mg.ml^{-1}$. Zásobný roztok RS bol pripravený vo forme emulzie pomocou arabskej gumy (v množstve 30 % zo silice). Ako rozpúšťadlo bol použitý Sabouraud-dextrózový bujón (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Bombaj, India) obohatený 10 mM glukózou (SG). K 100 µl testovanej látky v mikrotitračnej platničke sa pridalo 100 µl inokula (10^3 KTJ/ml). Inokulum bolo pripravené z 24-hodinovej kultúry *C. albicans*. Otestovaných bolo 25 klinických izolátov (Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, Univerzitná nemocnica Louisa Pasteura, SR) a referenčný kmeň *C. albicans* ATCC 10231 (Česká zbierka mikroorganizmov, Brno, Česká republika).

Po 24-hodinovej inkubácii (35 ± 1 °C) boli odčítané hodnoty MIC na základe absencie rastu kvasiniek, porovnávaného s pozitívnou kontrolou (stĺpec 12, ktorý obsahoval inokulum v médiu bez RS, resp. RE) a negatívnou kontrolou (stĺpec 11, samotné médium). Na lepšiu vizualizáciu výsledkov bol použitý 0,15 % vodný roztok resazurínu (10 µl). RE a RS, ktoré vykazovali najlepší inhibičný účinok, boli použité v ďalšej časti experimentu.

2. Vplyv rastlinnej silice a rastlinného extraktu na produkciu extracelulárnej fosfolipázy *C. albicans*

Stanovenie vplyvu najúčinnejšieho RE a RS na produkciu EPL bolo vykonané Egg Yolk agarovou metódou podľa Ellepolu a kol. (2016). V pilotnom experimente bola zisťovaná tvorba EPL 25 izolátmi a referenčným kmeňom *C. albicans*. Samotný vplyv látok na tvorbu EPL bol sledovaný už len na izolátoch *C. albicans*, pri ktorých bola zistená intenzívna, stredná a mierna tvorba EPL.

Bunkové suspenzie testovaných izolátov *C. albicans* boli pripravené z 24-hodinových kultúr (37 °C) v sterilnom PBS a pomocou denzitometra (Pliva-LaChema a. s., Brno, Česká republika) bola denzita buniek upravená na hodnotu 5,7 McFarland. Z každého izolátu kvasinky bolo prenesených 0,5 ml suspenzie do 2 ml PBS (v prípade pilotného testovania a kontrolnej skupiny), resp. do 2 ml roztoku RS alebo RE v koncentrácii 2 x MIC (RS: 0,8 $mg.ml^{-1}$ a RE: 25; 12,5; 6,25; 3,2; 0,8 $mg.ml^{-1}$). Po polhodinovej expozícii pri 37 °C boli bunky premyté dvakrát 2,5 ml PBS (10 min, 3 000 otáčok), čím sa zbavili rezíduí testovaných látok.

Z tejto bunkovej suspenzie sme aplikovali 10 µl (duplicitne) na Egg Yolk agarovú pôdu (13 g SDA – Sabouraud agar; 11,7 g NaCl; 0,11 g $CaCl_2$; 10 % Egg Yolk emulzia – emulzia vaječného žĺtka). Platne boli inkubované 7 dní pri teplote 35 ± 1 °C. Tvorba EPL sa prejavila vytvorením bielej, hustej zóny okolo vytvorenej kolónie. Aktivita tvorby EPL bola vyhodnotená ako index Pz nasledovne:

$$Pz = \frac{\text{priemer kolónie}}{\text{priemer kolónie} + \text{zóna}}$$

Pz – index fosfolipázovej produkcie

Tab. 1: Interpretačné kritériá pre hodnotenie fosfolipázovej aktivity

Produkcia PL	Hodnota Pz
žiadna	1
slabá	0,99 – 0,90
mierna	0,89 – 0,80
stredná	0,79 – 0,70
intenzívna	< 0,70

Zdroj: Ellepola a kol., 2016

Na základe interpretačných kritérií (viď. tab. 1) bola určená intenzita tvorby EPL, tzv. fosfolipázová aktivita.

VÝSLEDKY

1. Stanovenie citlivosti *C. albicans* na silice a extrakty z rastlín čeľade *Lamiaceae*

V prvej časti štúdie sme stanovili citlivosť 25 izolátov a jedného referenčného kmeňa *C. albicans* na RE a RS z vybraných rastlinných druhov čeľade *Lamiaceae*. Štatistické vyhodnotenie MIC testovaných RE a RS uvádzame v tabuľke 2.

Z testovaných extraktov najvyššiu účinnosť vykazoval extrakt z *Origanum vulgare* L., s priemernou hodnotou MIC 4,9 mg.ml^{-1}. Nižšia antifungálna efektivita bola zaznamenaná pri extraktoch z *Mentha piperita* L. (MIC 52 mg.ml^{-1}), z *Thymus vulgaris* L. (MIC 60 mg.ml^{-1}) a zo *Salvia officinalis* L. (MIC 122 mg.ml^{-1}). Priemerné MIC RE pri pôsobení na referenčný kmeň dosiahli hodnoty 1,3 ± 0,46 mg.ml^{-1} (*Origanum vulgare* L.), 25 mg.ml^{-1} (*Mentha piperita* L.), 5 mg.ml^{-1} (*Thymus vulgaris* L.) a 66,7 ± 28,9 mg.ml^{-1} (*Salvia officinalis* L.). Testované RS boli v porovnaní s RE účinnejšie a hodnoty MIC sa pohybovali v rozmedzí od 0,4 do 3,13 mg.ml^{-1}. Spomedzi 4 testovaných silíc najslabšie pôsobila silica zo *Salvia officinalis* L., s priemernou MIC 0,7 mg.ml^{-1}. Pri ďalších troch RS bola zistená inhibícia rastu kvasiniek pri hodnote MIC 0,4 mg.ml^{-1}. Všetky štyri RS pôsobili na rast referenčného kmeňa *C. albicans* inhibične, v koncentrácii 0,4 mg.ml^{-1}. Na základe týchto výsledkov bol pre ďalšiu časť pokusu vybraný len jeden najúčinnejší RE a k nemu príslušná RS, konkrétne z rastliny *Origanum vulgare* L.

2. Vplyv rastlinnej silice a rastlinného extraktu na produkciu extracelulárnej fosfolipázy *C. albicans*

Pilotným testovaním 25 klinických izolátov *C. albicans* a referenčného kmeňa sme zistili ich potenciálnu tvorbu EPL. Ako vyplýva z tabuľky 3, len pri dvoch izolátoch (8 %) tvorba EPL nebola pozorovaná, 92 % izolátov EPL tvorilo. Pri 12 izolátoch (48 %) bola zaznamenaná intenzívna produkcia EPL, strednú produkciu EPL vykazovali 4 kmene (16 %) a mierna produkcia bola zistená pri 6 izolátoch (24 %). Referenčný kmeň vykazoval intenzívnu tvorbu EPL. Týchto 22 fosfolipázu produkujúcich izolátov

Tab. 2: MIC (mg.ml^{-1}) rastlinných extraktov a silíc pri planktonických bunkách *C. albicans*

Fytoterapeutikum		min. – max.	x	SD	Mo	Me	MIC50	MIC90
***Origanum vulgare* L.**	RE	0,4 – 12,5	4,9	2,69	6,25	6,25	6,25	6,25
	RS	0,4	0,4	0	0,4	0,4	0,4	0,4
***Mentha piperita* L.**	RE	50 – 100	52	10	50	50	50	50
	RS	0,4	0,4	0	0,4	0,4	0,4	0,4
***Thymus vulgaris* L.**	RE	50 – 200	60	32,27	50	50	50	50
	RS	0,4	0,4	0	0,4	0,4	0,4	0,4
***Salvia officinalis* L.**	RE	50 – 200	122	45,83	100	100	100	200
	RS	0,4 – 3,13	0,7	0,58	0,4	0,4	0,4	0,8

min. – max. – minimálna a maximálna hodnota MIC (mg.ml^{-1}); x – priemer; SD – smerodajná odchýlka; Mo – modus; Me – medián; MIC50/MIC90 – minimálna inhibičná koncentrácia inhibujúca 50 %, resp. 90 % celkového počtu izolátov

Tab. 3: Vyhodnotenie fosfolipázovej aktivity klinických izolátov *C. albicans*

Intenzita tvorby EPL	Kontrola	RE	RS
	n/%	n/%	n/%
žiadna	2/8	1/4,5	15/68,2
slabá	1/4	0/0	1/4,5
mierna	6/24	8/36,4	4/18,3
stredná	4/16	6/27,3	1/4,5
intenzívna	12/48	7/31,8	1/4,5

EPL – extracelulárna fosfolipáza, n – počet izolátov

Tab. 4: Štatistické vyhodnotenie indexu Pz a redukcie tvorby EPL

Parameter	Kontrola	RE	RS
min. – max.	0,45 – 1	0,5 – 1	0,59 – 1
x	0,71	0,75	0,94
SD	0,16	0,12	0,11
Redukcia (%)	–	5,6	32,4

min. – max. – minimálna a maximálna hodnota Pz ($mg.ml^{-1}$); x – priemer; SD – smerodajná odchýlka

bolo vybraných do ďalšieho experimentu, v ktorom sme sledovali inhibičný efekt RE a RS z *Origanum vulgare* L. (2 x MIC) na produkciu EPL.

Po 7-dňovej inkubácii buniek, ktoré boli exponované RE, iba v jednom prípade (4,5 %) nedošlo k tvorbe EPL. Produkcia EPL bola zachovaná pri 21 izolátoch (95,5 %); s rôznou intenzitou. EPL tvorilo 7 izolátov (31,8 %) intenzívne, 6 kmeňov (27,3 %) stredne a 8 izolátov (36,4 %) mierne. Referenčný kmeň aj po expozícii RE naďalej tvoril EPL intenzívne. Po expozícii buniek silici až pri 15 izolátoch (68,2 %) nebola zaznamenaná tvorba EPL a rovnako aj pri referenčnom kmeni. Zvyšných 7 izolátov produkovalo EPL nasledovne: 1 izolát (4,5 %) slabo, 4 izoláty (18,3 %) mierne, 1 izolát (4,5 %) stredne a iba 1 izolát (4,5 %) intenzívne. Práve pri izolátoch intenzívne tvoriacich fosfolipázu bol zaznamenaný významný pokles produkcie EPL, kedy po expozícii RS z 12 izolátov (48 %) tvoril EPL iba 1 izolát (4,5 %).

Lepšiu účinnosť silice v redukcii tvorby EPL v porovnaní s extraktom potvrdzuje aj priemerný index Pz (viď tab. 4). Po expozícii extraktom bola zaznamenaná redukcia tvorby EPL 5,6 %; s hodnotou indexu Pz 0,75 ± 0,12. Po expozícii kvasiniek RS redukcia produkcie EPL predstavovala 32,4 %; pričom došlo k zvýšeniu indexu Pz v porovnaní s kontrolou, ktorý dosahoval hodnotu 0,94 ± 0,11

DISKUSIA

Rod *Candida* zahŕňa viacero druhov kvasiniek (*C. tropicalis*, *C. dubiensis*, *C. parapsilopsis*), avšak *C. albicans* patrí k tým najvirulentnejším. Štúdie v Európe, v Spojených štátoch a na Blízkom východe označujú *C. albicans* za najčastejšiu príčinu kandidózy (Whaley a kol., 2017), ktorej incidencia v posledných desaťročiach narastá (Cortegiani a kol., 2018). Jedným z dôvodov nárastu incidencie kandidóz je zvýšená rezistencia kvasinky na konvenčné antimykotiká. Málo informácií o špecifických štruktúrach kvasinky, resp. o možných cieľoch pôsobenia liečiv, vedie k neustálemu výskumu nových strategických prístupov

v terapii a v profylaxii kandidóz (Wall a Lopez-Ribot, 2020). Patogenita kvasinky je podmienená viacerými faktormi virulencie, a preto štúdium ich ovplyvnenia predstavuje možnosť ako zabrániť rozvoju či prenosu kandidóz (Rossoni a kol., 2013).

V štúdii sme sa zamerali na testovanie potenciálneho využitia rastlinných extraktov a silíc v inhibícii produkcie EPL *C. albicans*. Úvodné experimenty boli venované testovaniu antifungálneho účinku extraktov a silíc štyroch rastlín, *Origanum vulgare* L., *Mentha piperita* L., *Thymus vulgaris* L. a *Salvia officinalis* L. Rastlinné silice z *Origanum vulgare* L., *Mentha piperita* L., *Thymus vulgaris* L. vykazovali veľmi dobrú účinnosť pri MIC 0,4 $mg.ml^{-1}$. Nami dosiahnuté výsledky sú podobné štúdii Baja a kol. (2020), v ktorej autori uvádzajú antifungálnu účinnosť RS *Thymus vulgaris* L. a *Origanum vulgare* L. v rozmedzí MIC 0,5 – 0,25 $mg.ml^{-1}$. Rovnako pri testovaní RE bol najúčinnejší extrakt z *Origanum vulgare* L. (MIC 4,9 $mg.ml^{-1}$). Preto do ďalších experimentov, zameraných na inhibíciu produkcie EPL *C. albicans*, boli zaradené extrakt a silica z *Origanum vulgare* L.

Princípom pôsobenia EPL je vplyv na glycerofosfolipidy membrán hostiteľských buniek (Mohandas a Ballal, 2011). Zistilo sa, že vyššiu virulenciu založenú na produkcii EPL vykazujú kmene, ktoré boli izolované od chorých jedincov, nie od zdravých (Ellepola a kol., 2016). Intenzita fosfolipázovej aktivity sa hodnotí na základe precipitačnej zóny vytvorenej okolo porastenej kolónie po 7 dňoch inkubácie. Zóna vzniká v dôsledku vytvorenia komplexu vápnika s mastnými kyselinami, ktoré sa uvoľňujú pôsobením fosfolipázy na fosfolipidy prítomné v žĺtkovej emulzii v médiu (Price a kol., 1982). Z testovaných izolátov až 92 % (23 izolátov) produkovalo EPL, čo sa približuje štúdii Fule a kol. (2015), kde 81,08 % bolo EPL aktívnych a z toho 56,66 % s intenzívnou tvorbou. V našom experimente takmer rovnaké percento izolátov (56,5 %) z fosfolipázu-produkujúcich (23 izolátov) tvorilo EPL intenzívne. Brondani a kol. (2018) považujú RS z *Origanum vulgare* L. za vhodnú na redukciu tvorby EPL, avšak s predlžujúcou sa expozíciou klesá antienzymatická aktivita. Naše výsledky sú s uvedenou štúdiou podobné v tom, že RS (Pz = 0,94 ± 0,11) z *Origanum vulgare* L. preukázala lepší účinok v porovnaní s extraktom (Pz = 0,75 ± 0,12). Silica nielenže dosiahla nižšiu hodnotu indexu Pz, ale po jej expozícii až 15 izolátov (68,2 %) netvorilo EPL. Za výsledok môže byť zodpovedná prevládajúca obsahová látka v chemickom zložení silice, príp. extraktu, avšak môže ísť o výsledok synergizmu majoritných a minoritných zložiek silice.

ZÁVER

Farmakoterapeutické využívanie rastlinných extraktov a silíc nadobúda v posledných rokoch na aktuálnosti. Vhodným predmetom skúmania je čeľaď *Lamiaceae*, do ktorej patrí viacero rastlín s potenciálnym antifungálnym účinkom, čím môže pozitívne prispievať k terapii kandidóz. V našom experimente *C. albicans* preukázala citlivosť na všetky testované RE a RS z rastlín *Mentha piperita* L., *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L., *Salvia officinalis* L. Najvyššiu antifungálnu aktivitu vykazovali RE a RS z *Origanum vulgare* L. (MIC 4,9 $mg.ml^{-1}$; resp. 0,4 $mg.ml^{-1}$). V experimentoch zameraných na inhibíciu produkcie EPL sa účinnejšou javí RS. Po jej expozícii až 15 izolátov (68,2 %) netvorilo fosfolipázu, a to z celkového počtu 22 EPL produkujúcich izolátov. Významne poklesol najmä počet izolátov s intenzívnou tvorbou EPL. Z 12 izolátov po exponovaní RS len 1 izolát (4,5 %) si zachoval intenzívnu tvorbu EPL. Po expozícii RE všetky izoláty naďalej tvorili fosfolipázu, znížila sa však intenzita jej produkcie. Táto štúdia poukazuje na možnosti antifungálnej aktivity rastlinného extraktu a silice z *Origanum vulgare* L. Rastlinná silica sa javí v porovnaní s extraktom účinnejšia. Veľkým prínosom v oblasti liečby a profylaxie kandidóz by bolo podrobnejšie preskúmanie biologického účinku RS. Ďalší výskum by mohol byť zameraný na stanovenie účinnosti hlavných obsahových látok RS / RE samostatne, a taktiež ich synergického pôsobenia s inými rastlinnými látkami, príp. antimykotikami.

POĎAKOVANIE

„Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-15-0377 a Internou grantovou agentúrou IGA UVLF 05/2020 „In vitro“ stanovenie proapoptickej, antibiofilmovej a antioxidačnej aktivity vybraných silíc z rastlín čeľade Lamiaceae“.

ZOZNAM LITERATÚRY

Baj, T., Biernasiuk, A., Wróbel, R., Malm, A.: Chemical composition and *in vitro* activity of *Origanum vulgare* L., *Satureja hortensis* L., *Thymus serpyllum* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils towards oral isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Open Chemistry*, 2020, 18 (1), 108 – 118.

Brondani, L. P., da Silva Neto, T. A., Freitag, R. A., Lund, R. G.: Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans*. *J. Mycol. Med*., 2018, 28 (1), 94 – 100.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. M27-A3: *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. Approved Standard 3rd edn. CLSI: Wayne, PA, USA, 2008.

Cortegiani, A., Misseri, G., Fasciana, T., Giammanco, A., Giarratano, A., Chowdhary, A.: Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. *J. Intensive Care*, 2018, 6 (1), 1 – 3.

Ellepola, A. N., Samaranayake, L. P., Khan, Z. U.: Extracellular phospholipase production of oral *Candida albicans* isolates from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to polyene, echinocandin and azole antimycotics. *Braz. J. Microbiol.*, 2016, 47 (4), 911 – 916.

Finkel, J. S., Mitchell, A. P.: Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2011, 9 (2), 109 – 118.

Fule, S. R., Das, D., Fule, R. P.: Detection of phospholipase activity of *Candida albicans* and non albicans isolated from women of reproductive age with vulvovaginal candidiasis in rural area. *Indian J. Med. Microbiol*., 2015, 33 (1), 92.

Košťálová, D., Fialová, S., Račková, L.: *Fytoterapia v súčasnej medicíne* [Phytotherapy in the current medicine]. Martin: Osveta, 2012, 384 s.

Martins, N., Ferreira, I. C., Barros, L., Silva, S., Henriques, M.: Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. *Mycopathologia*, 2014, 177 (5), 223 – 240.

Mayer, F. L., Wilson, D., Hube, B.: *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 2013, 4 (2), 119 – 128.

Mohandas, V., Ballal, M.: Distribution of Candida species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. *J. Glob. Infect. Dis*., 2011, 3 (1), 4.

Price, M. F., Wilkinson, I. D., Gentry, L. O.: Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 1982, 20 (1), 7 – 14.

Raut, J. S., Karuppayil, S. M.: A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crops Prod*., 2014, 62, 250 – 264.

Rossoni, R. D., Barbosa, J. O., Vilela, S. F., Santos, J. D., Jorge, A. O., Junqueira J. C.: Correlation of phospholipase and proteinase production of Candida with *in vivo* pathogenicity in *Galleria mellonella*. *Braz. J. Oral Sci*., 2013, 12 (3), 199 – 204.

Wall, G., Lopez-Rinot, J. L.: Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy. *Antibiotics*, 2020, 9 (8), 445.

Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S., Rogers, P. D.: Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans Candida species. *Front. Microbiol*., 2017, 7, 2173.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, IV., 2: 22 – 31, 2022

ANALÝZA PRESKRIPCIE LIEČIV U PACIENTOV S DEPRESIOU

ANALYSIS OF THE DRUG PRESCRIPTION IN PATIENTS WITH DEPRESSION

Kmecová, Veronika; Bačkorová, Miriam

Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

miriam.backorova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Depresia je všeobecne rozšíreným duševným ochorením s afektívnou poruchou, pri ktorej dochádza k primárnej poruche nálady. Cieľom štúdie bolo na základe vzorky preskripčných záznamov (PZ) analyzovať charakteristiku pacientov s diagnózou v rozmedzí F32 – F39, F00 – F29 alebo F40 – F99 podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb 10 (MKCH-10) a vyhodnotiť údaje o spotrebe antidepresív vo vybranej verejnej lekárni, lokalizovanej v Trebišove za rok 2019. Z celkového počtu 2154 (PZ) pre 650 pacientov s diagnózou v rozmedzí F00 – F99 bolo zistené, že depresiou trpeli viac ženy (65 %, 423 žien) ako muži. Najpočetnejšiu skupinu tvorili pacienti vo veku 50 – 59 rokov. Najviac zastúpená bola diagnóza F33.2 Recidivujúca depresívna porucha, terajšia epizóda ťažkého stupňa bez psychotických príznakov, ktorá sa vyskytla u 24,46 % pacientov. Najviac predpisovanými antidepresívami boli inhibítory spätného vychytávania serotonínu (SSRI), ktoré sa v preskripcii vyskytli v 55,13 % prípadov (1187 PZ). Zo 650 pacientov bola indikovaná kombinovaná terapia u 66,62 % (433) pacientov, z nich väčšina mala predpísanú dvojkombináciu liečiv (65,86 %; 428 pacientov).

Kľúčové slová: depresia; farmakoterapia; SSRI

ABSTRACT

Depression is a widespread mental illness with an affective disorder in which a primary mood disorder occurs. The aim of the study was to analyze the characteristics of patients with a diagnosis in the range of F32 – F39, F00 – F29 or F40 – F99 according to the International Classification of Diseases 10 (ICD-10) based on a sample of prescription records (PZ) and to evaluate data on the consumption of antidepressants in a selected

public pharmacy localized in Trebišov in 2019. Analysis of medication prescriptions from a total of 2154 (PZ) for 650 patients diagnosed with F00 – F99 revealed that more women (65 %, 423 women) suffered from depression than men. The most numerous group consisted of patients aged 50 – 59 years. The most common diagnosis was F33.2 Relapsing depressive disorder, the current severe episode without psychotic symptoms, which occurred in 24.46 % of patients. The most prescribed antidepressants were SSRIs, which occurred in prescription in 55.13 % (1187 PZ). Of the 650 patients, combination therapy was indicated in 66.62 % (433 patients), most of whom had been prescribed a dual combination of drugs (65.86 %, 428 patients).

Key words: depression; pharmacotherapy; SSRI

ÚVOD

Depresia je veľmi časté a vážne psychické ochorenie, ktoré spôsobuje zhoršenie kvality a funkčnosti života nielen samotného jedinca, ale aj jeho rodiny. Príčiny depresie sú komplexné, existujú rôzne biologické, psychologické faktory, ale aj zložité životné situácie, ktoré sú rizikové z hľadiska vzniku depresívnej choroby. Ochorenie je ťažko diagnostikovateľné, pretože je nutné odlíšiť ho od bežného smútku. Depresiou trpí na celom svete takmer 120 miliónov pacientov. Pacienti, ktorí sa liečia na chronickú depresiu, sú často nezamestnaní, v populácii 24 – 65 ročných je iba polovica ekonomicky aktívnych. Podľa doterajších poznatkov až 50 % pacientov nevyhľadá lekársku pomoc, pretože nerozpozná príznaky alebo ich zľahčuje. V krajinách Európskej únie je trend liečby depresie pacientov návštevou všeobecného lekára, pričom nie je kvalifikovane diagnostikovaná a dostatočne kontrolovaná. Na Slovensku je oproti ostatným krajinám veľkou výhodou, že 90 % pacientov s depresiou je v rukách psychiatra a počet hospitalizácií postupne klesá. Prevalencia depresie je najvyššia vo veku 40 – 54 rokov a častejšie postihuje ženy ako mužov. Z dôvodu rozvoja civilizačných chorôb či predlžovania ľudského veku sa predpokladá, že výskyt depresií bude stúpať. Najväčším problémom nielen na Slovensku, ale aj v okolitých krajinách je neskoré rozpoznanie ochorenia, teda zlá diagnostika a terapia, čo má za následok zhoršenie stavu pacienta. V súčasnosti sa aj napriek snahe psychiatrov a užívaniu modernej farmakoterapie nachádza v akútnej fáze ochorenia približne 30 % pacientov a približne 20 % pacientov nedosiahne remisiu (Forgáčová, 2010).

Patogenéza depresie spočíva vo funkčnom deficite monoamínovej neurotransmisie, súvisí so zmenami počtu a senzitivity receptorov pre neurotransmitery, nedostatku biogénnych monoamínov (noradrenalín, serotonín, dopamín). Pri depresii je prítomná aj zmenená hladina kyseliny GABA a vazopresínu (Švihovec a kol., 2018).

Medzi príznaky depresie patrí: chorobne zmenená nálada, ktorá sa prejavuje skleslosťou, bezradnosťou, pesimizmom, úzkosťou, strachom, iritabilitou, emočnou labilitou. Ďalším z príznakov je anhedónia, teda neschopnosť prežívať radosť, tešiť sa z bežných vecí, znížená aktivita, zvýšená únava. Často sa vyskytujú poruchy myslenia, pri ktorých pacient stráca sebadôveru, sebaistotu, pacient je nerozhodný, má pocit zlyhania, viny, uvažuje o samovražde, nevníma racionálne, má spomalené myslenie a vnímanie, trpí obsesiami a hypochondrickými myšlienkami (American Psychiatric Association, 2013).

Podľa DEPRES (Depression Research in European Society) epidemiologickej štúdie je šesťmesačná prevalencia depresie 17 %. Na Slovensku sa podľa EPID (Epidemiológia Depresie na Slovensku) vyskytla ľahšia forma depresie až u 40,9 % a ťažšia forma u 12,8 % populácie. V poslednej dobe sa zmenilo vnímanie konceptu depresie. V súčasnosti pôvodné rozdelenie depresie na endogénnu, reaktívnu a somatogénnu, t. j. rozdelenie podľa etiológie poruchy už nezohráva veľkú úlohu. Aktuálne je dôležitá posledná 10. revízia MKCH (Medzinárodná klasifikácia chorôb) (ICD – 10 Version: 2019), ktorá depresiu zaraďuje do diagnostických kritérií podľa príznakov

a priebehu. Depresia je choroba, ktorá súvisí s fungovaním celého organizmu a často sa vyskytuje aj ako pridružené ochorenie k už existujúcemu ochoreniu. V takomto prípade môže byť jeho príznakom alebo komorbiditou. Teda správne preliečená depresia vie ovplyvniť aj prognózu somatického ochorenia (Marko a kol., 2009).

Neliečená depresia zhoršuje kvalitu života, či už zo zdravotného hľadiska, ale aj ekonomického, nakoľko pacient je často práceneschopný. Pri liečbe je potrebná komplexná terapia, vytvorenie bezpečného vzťahu medzi pacientom a lekárom a potrebná je aj podporná pravidelná psychoterapia. Vo vyššej miere je nutné edukovať všeobecných lekárov a lekárnikov v tejto problematike, pretože sú prvým záchytným bodom pre pacientov (Kořínková a Novotný, 2007).

V súčasnosti podľa odhadov WHO (Svetovej zdravotníckej organizácie) pozorujeme zvýšený výskyt depresie a často sa o nej uvažuje aj ako o tzv. epidémii 21. storočia. Nádejou pre pacientov s depresiou je, že v posledných 30-tich rokoch boli dosiahnuté významné pokroky v oblasti farmakologickej liečby. V praxi sa najčastejšie používajú selektívne inhibítory spätného vychytávania sérotonínu (SSRI) a inhibítory spätného vychytávania sérotonínu a noradrenalínu (SNRI). Vo všeobecnosti došlo k lepšej akceptácii pacientov, ale naďalej zostávame v tejto oblasti veľmi konzervatívnou krajinou (Králová, 2019).

Cieľom štúdie bolo na základe vzorky preskripčných záznamov (PZ) analyzovať charakteristiku pacientov s diagnózou v rozmedzí F32 – F39, F00 – F29 alebo F40 – F99 podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb 10 (MKCH-10) a vyhodnotiť údaje o spotrebe antidepresív vo vybranej verejnej lekárni, lokalizovanej v Trebišove za rok 2019.

MATERIÁL A METÓDY

Spotreba klasických a novších antidepresív bola sledovaná vo verejnej lekárni v období od 1.1.2019 do 31.12.2019. Lekáreň sa nachádza v súkromnej poliklinike Oremus v Trebišove, spolu s psychiatrickou ambulanciou a ambulanciami viacerých všeobecných lekárov. Za spomínané obdobie bolo vyselektovaných 2153 preskripčných záznamov (PZ), z nich 1854 PZ obsahovalo diagnózu v rozmedzí F32 – F39 a 299 PZ obsahovalo diagnózu v rozmedzí F00 – F29 alebo F40 – F99 podľa MKCH-10 (ICD – 10 Version: 2019). Celkový počet analyzovaných pacientov bol 650. Z toho 605 pacientov malo diagnózu v rozmedzí F32 – F39 a 45 pacientom bola určená diagnóza v rozmedzí F00 – F29 alebo F40 – F99. Analýza dát bola spracovaná pomocou lekárenského informačného systému NRSys. Pomocou programu boli zo zretaxovaných PZ zhromaždené údaje o počte, veku a pohlaví pacientov. Ďalším zo sledovaných parametrov boli predpísané liečivá používané v terapii depresie a diagnózy, ktoré sa vyskytovali spolu s depresiou. Analýzou bola hodnotená aj zastúpenosť monoterapie a kombinovanej terapie. Získané výsledky boli spracované pomocou programu Microsoft Excel. Pri vyhodnotení a spracovaní získaných dát sa postupovalo v zmysle zákona o ochrane osobných údajov.

VÝSLEDKY

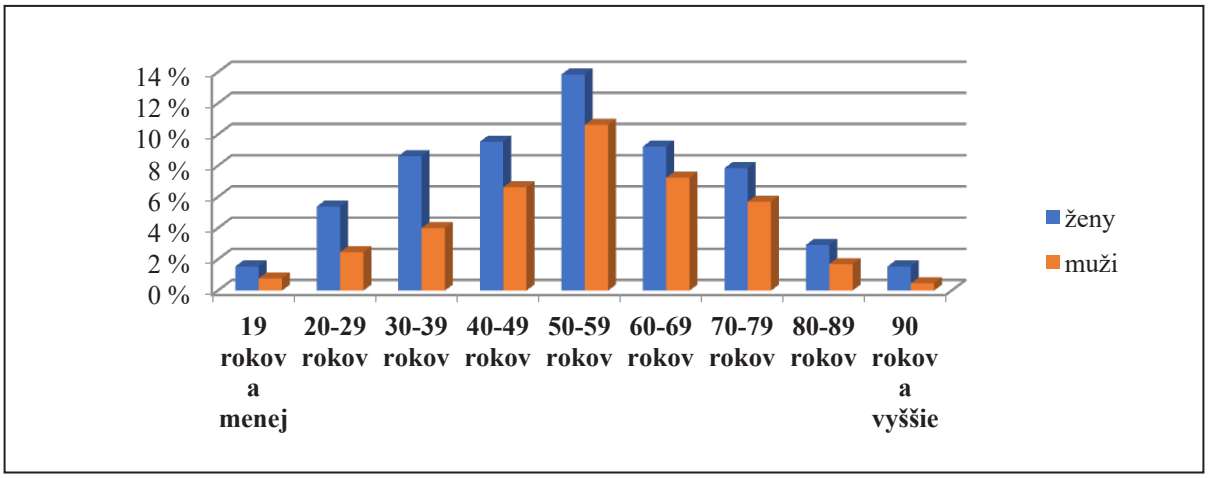
Preskripčné záznamy

V roku 2019 bolo v danej lekárni vyexpedovaných celkovo 125 003 PZ, z nich bolo vyselektovaných 1854 PZ, ktoré obsahovali diagnózu v rozmedzí F32 – F39, čo predstavuje 1,48 % z celkového počtu záznamov. Ostatné diagnózy (F00 – F29, F40 – F99) sa vyskytli v počte 299 PZ, čím predstavujú 0,24 % z celkového počtu PZ.

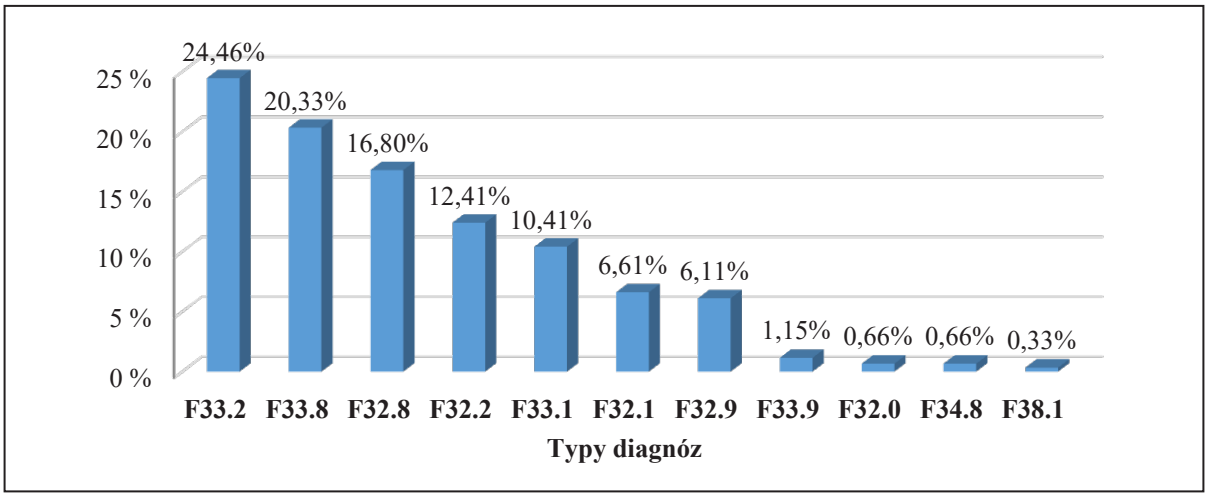
Hodnotenie pacientov podľa pohlavia a veku

Z celkového počtu 650 analyzovaných pacientov bolo 423 žien, čo predstavuje 65 %, a 227 mužov, teda 35 %. V sledovaných PZ tvorili najpočetnejšiu skupinu ženy vo veku 50 – 59 rokov (90 žien; 13,84 %); následne to boli muži tiež v skupine 50 – 59 rokov (69 mužov; 10,61 %) (viď graf 1). Pri oboch pohlaviach bol pozorovaný výskyt depresívneho ochorenia už vo veku 19 rokov a menej. Najstaršími pacientami boli žena a muž vo veku 91 rokov a najmladšou pacientkou bolo dievča vo veku 10 rokov.

Graf 1: Rozdelenie pacientov podľa pohlavia a veku



Graf 2: Depresívne epizódy v rozsahu diagnóz F32 – F39



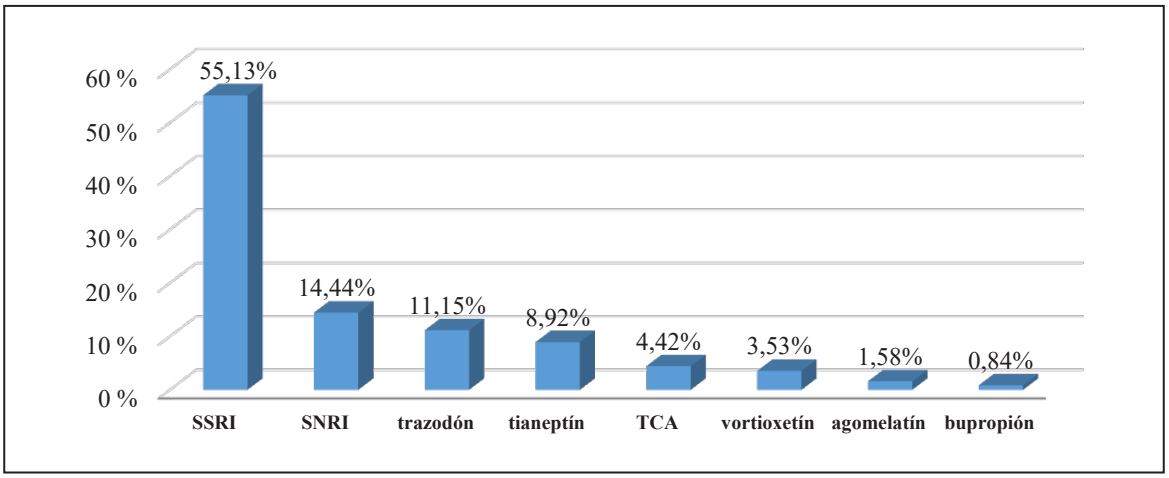
F33.2 Recidivujúca depresívna porucha, terajšia epizóda ťažkého stupňa bez psychotických príznakov, **F33.8** Iné recidivujúce depresívne poruchy, **F32.8** Iné depresívne psychózy, **F32.2** Epizóda ťažkej (hlbokej) depresie bez psychotických príznakov, **F33.1** Recidivujúca depresívna epizóda, terajšia stredne ťažká epizóda, **F32.1** Epizóda stredne ťažkej depresie, **F32.9** Nešpecifikovaná depresívna epizóda, **F33.9** Nešpecifikované recidivujúce depresívne poruchy, **F32.0** Epizóda ľahkej depresie, **F34.8** Iné perzistujúce afektívne poruchy, **F38.1** Iné návratné afektívne poruchy

Diagnózy depresívnych epizód u pacientov

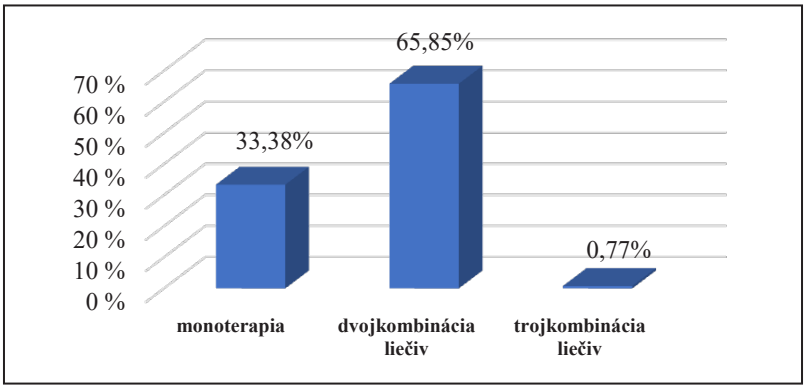
Depresívne epizódy sa zaraďujú podľa MKCH-10 do skupiny duševných porúch a porúch správania (F00 – F99). Depresívne epizódy sa vyskytli v preskripcii 1854 krát. Počet sledovaných pacientov v rozsahu diagnóz **F32 – F39** bol 605. Zastúpenie jednotlivých diagnóz popisuje graf 2. Najvyššiu početnosť z celkového počtu lekárskych predpisov dosiahla diagnóza **F33.2** Recidivujúca depresívna porucha, terajšia epizóda ťažkého stupňa bez psychotických príznakov, ktorá sa vyskytla u 24,46 % pacientov. Ďalšie najpočetnejšie skupiny tvorili diagnózy **F33.8** Iné recidivujúce depresívne poruchy (20,33 %) a **F32.8** Iné depresívne psychózy (16,80 %).

Ostatné sledované diagnózy pacientov v rozmedzí **F00 – F29** a **F40 – F99** sa vyskytli v preskripcii celkovom počte 299 PZ, pričom celkový počet pacientov bol 45. Najvyššiu početnosť z ostatných sle-

Graf 3: Percentuálne zastúpenie liečiv



Graf 4: Monoterapia versus kombinovaná terapia

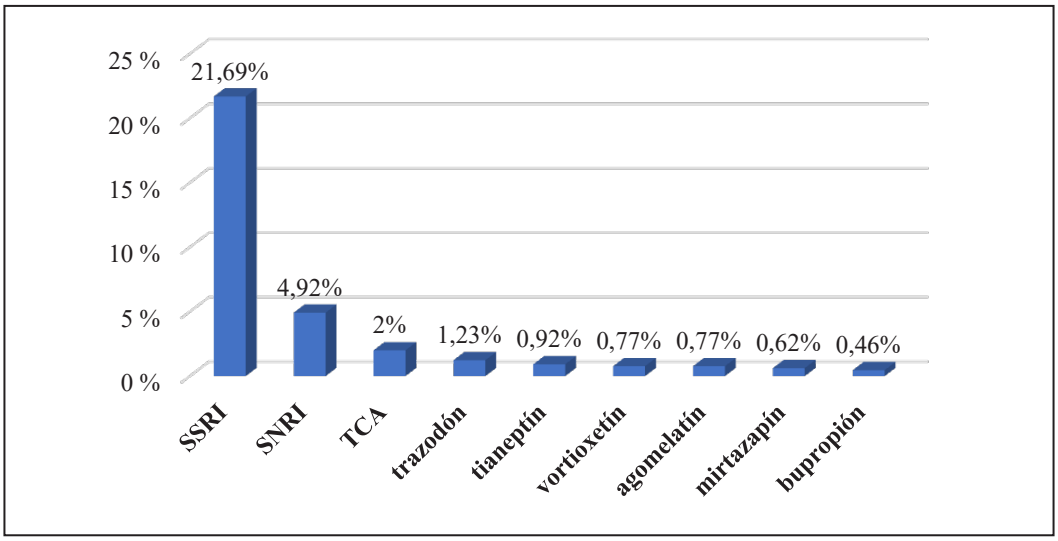


dovaných diagnóz dosiahli **F41.2** Zmiešaná úzkostná a depresívna porucha (22,22 %); **F41.0** Panická porucha (17,77 %) a **F41.1** Porucha s generalizovanou úzkosťou, ktorá sa vyskytla u 13,33 % PZ.

Analýza preskripcie liečiv

Z celkového počtu 2153 PZ bolo zistené, že najčastejšie predpisovanou skupinou liečiv na terapiu depresie boli liečivá zo skupiny inhibítorov spätného vychytávania serotonínu (SSRI), ktoré sa v preskripcii vyskytli v 55,13 % (1187 PZ). Na terapiu depresie najčastejšie predpisovaným liečivom zo skupiny SSRI bol citalopram, ktorý sa vyskytol v 25,49 % PZ a sertralín (13,79 %). Nasledovali liečivá zo skupiny SNRI (selektívne inhibítory spätného vychytávania noradrenalínu a serotonínu), ich zastúpenie bolo 14,44 % (311 PZ). V rámci preskripcie liečiv zo skupiny SNRI sa v sledovanej lekárni vyskytol venlafaxín, v celkovom počte 9,20 % (198 PZ), po ňom nasledoval duloxetín, ktorý bol zastúpený v 5,25 % (113) PZ. Tretiu skupinu liečiv tvoril trazodón 11,15 % (240 PZ) (viď graf 3). Tricyklické antidepresíva (TCA) tvorili 4,41 % z celkového počtu PZ. Ich zástupca amitryptilín sa v preskripcii vyskytol v 2,09 % (45 PZ) a dosulepín 2,32 % (50 PZ).

Graf 5: Prehľad liečiv v rámci monoterapie



Tab. 1: Dvojkombinácia liečiv

Kombinácie liečiv	Počet percent	Počet pacientov
venlafaxín (SNRI) + trazodón	8,77 %	57
sertralín (SSRI) + mirtazapín	6,61 %	43
citalopram (SSRI) + trazodón	5,23 %	34
sertralín (SSRI) + trazodón	4,77 %	31
fluoxetín (SSRI) + amitriptylín (TCA)	2,92 %	19
escitalopram (SSRI) + trazodón	2,46 %	16
venlafaxín (SNRI) + duloxetín (SNRI)	2,46 %	16
sertralín (SSRI) + amitripytilín (TCA)	2,31 %	15
escitalopram (SSRI) + amitriptylín (TCA)	2,31 %	15
paroxetín (SSRI) + trazodón	2,31 %	15
duloxetín (SNRI) + agomelatín	2,31 %	15
citalopram (SSRI) + mirtazapín	2,15 %	14
venlafaxín (SNRI) + mirtazapín	2,15 %	14
citalopram (SSRI) + dosulepín (TCA)	1,84 %	12
escitalopram (SSRI) + dosulepín (TCA)	1,69 %	11
sertralín (SSRI) + dosulepín (TCA)	1,69 %	11
bupropión + fluoxetín (SSRI)	1,54 %	10

Tab. 1: Dvojkombinácia liečiv

Trojkombinácia liečiv	Počet percent	Počet pacientov
trazodón + escitalopram (SSRI) + venlafaxín (SNRI)	0,31 %	2
mirtazapín + amitriptylín (TCA) + trazodón	0,31 %	2
trazodón + mirtazapín + vortioxetín	0,15 %	1

Farmakoterapia depresie

Z celkového počtu 650 pacientov s diagnostikovanou depresiou bola kombinovaná liečba predpisovaná 66,62 % (433) pacientom. Monoterapia bola zaznamenaná na úrovni 33,38 % (217) pacientov. Z hľadiska kombinovanej liečby bola u pacientov najviac zastúpená dvojkombinácia liečiv, a to v 65,86 % (428) pacientov a iba 0,77 % (5) pacientov malo predpísanú trojkombináciu antidepresív (viď graf 4).

Prehľad liečiv v rámci monoterapie

Najviac predpisovanou skupinou v rámci monoterapie boli SSRI, a to u 21,69 % (141) pacientov, druhou najviac predpisovanou skupinou boli SNRI, celkovo 4,92 % (32) pacientov. Nasledovali antidepresíva zo skupiny TCA, ktoré sa vyskytli v prípade 2 % (13) pacientov. Trazodón bol predpísaný u 1,23 % (8) pacientov, tianeptín u 0,92 % (6), vortioxetín a agomelatín zhodne pri 0,77 % (5) pacientov. Využívaný bol aj bupropión, a to pri 0,42 % (3) a mirtazapín u 0,62 % (4) pacientov (viď graf 5).

Vyhodnotenie kombinovanej terapie

V praxi sa veľmi často využíva kombinácia antidepresív. Pri vhodnej kombinácii antidepresív je cieľom dosiahnuť aditívne/synergické pôsobenie liečiv, ktoré majú odlišný mechanizmus účinku. Ide napr. o antidepresíva zo skupiny SSRI a mirtazapín, alebo ak je potrebné zmierniť nežiaduce účinky (SSRI + trazodón/bupropion), kedy dochádza k zníženiu účinku na sexuálne funkcie či ovplyvnenie spánku. Mierne pozitívny účinok vzniká pri kombinácii dvoch SSRI. V rámci dvojkombinácie liečiv (viď tab. 1) sa najčastejšie vyskytovali liečivá zo skupiny SNRI spolu s trazodónom u 8,77 % (57) pacientov z celkového počtu 433 pacientov. Ďalej nasledovali antidepresíva zo skupiny SSRI, ku ktorým bol pridaný mirtazapín pre 6,61 % (43 PZ) pacientov. Iba 0,77 % (5) pacientom bola indikovaná trojkombinácia antidepresív (viď tab. 2).

DISKUSIA

Depresia patrí medzi najbežnejšie duševné poruchy. Neliečené a nesprávne diagnostikované ochorenie je veľmi častým dôvodom práceneschopnosti a zhoršenia kvality pracovného a súkromného života. Z daného aspektu je dôležité upozorniť na to, že depresia je v porovnaní so somatickými ochoreniami závažným ochorením, ktoré treba liečiť psychoedukáciou a farmakoterapiou (Forgáčová, 2010).

Celkové náklady na liečbu depresívnych ochorení v posledných rokoch stúpajú a dajú sa porovnať s liečbou *diabetes mellitus*. Finančne najviac náročné sú hospitalizácie pacientov. Používa sa aj expertný rozhodovací model a analýza efektívnosti nákladov (CEA) alebo analýza nákladov a prínosov (CBA). Najlepšie zdokumentované sú najmä novšie antidepresíva ako citalopram, escitalopram, venlafaxín. Podľa analýzy vývoja spotreby v SR od roku 1996 do 2010 došlo k nárastu počtu používaných molekúl. Vzrast spotreby má lineárnu krivku a predpokladá sa, že bude stúpať. Spotreba na Slovensku je ale nižšia v porovnaní s európskym priemerom a spotrebou v susedných krajinách. Došlo aj k zvýšeniu DDD (denná definovaná dávka). V súčasnosti sa priemerné celkové náklady na liečbu antidepresívami stabilizovali a po vstupe generík klesajú. Dôvodom je tlak kontrolných inštitúcií liekovej politiky na znižovanie cien liekov a dodržiavanie zásad racionálnej farmakoterapie (Heretik a kol., 2003).

Zozbieraním údajov zo sledovanej lekárne bolo evidovaných 2153 PZ záznamov (1,72 %). Z toho 1854 PZ sa týkalo diagnóz v rozmedzí F32 – F39, čo predstavuje 1,48 %. Zvyšných 0,24 % PZ obsahovalo inú diagnózu v rozmedzí F00 – F29 alebo F40 – F99, z nich sa najčastejšie vyskytovali úzkostné poruchy, pri ktorých sa tiež využívajú antidepresíva. Rozsiahly počet lekárskych predpisov v rámci rozsahu diagnóz mohol byť dôsledkom lokalizácie psychiatrickej ambulancie v budove polikliniky, v ktorej sa nachádza aj verejná lekáreň. V budove sa nachádzajú aj viacerí všeobecní lekári, ktorí predpisovali antidepresíva, väčšinou po uvoľnení preskripcie od odborného leká-

ra, alebo na ľahšie formy depresie.

Spotreba psychoanaleptík, medzi ktoré patria aj antidepresíva, stúpla oproti minulému roku o 3,4 % (NCZI, 2019). V sledovanej lekárni bol v rozsahu našich diagnóz zaznamenaný celkový počet 650 pacientov, z toho 65 % (423) tvorili ženy a 35 % (227) muži, najmä vo vekovej skupine 50 – 59 rokov. Podľa Královej (2019) je najvyššia prevalencia vo vekovej skupine 40 – 55 rokov. Depresívne poruchy sú častejšie u žien ako u mužov (v pomere približne 2 : 1). Najčastejšie sa vyskytovala diagnóza F33.2 Recidivujúca depresívna porucha, terajšia epizóda ťažkého stupňa bez psychotických príznakov. Početne bola zastúpená ešte diagnóza F32.2 Epizóda ťažkej hlbokej depresie bez psychotických príznakov. Recidivujúca depresívna porucha je charakterizovaná opakovanými depresívnymi epizódami bez nezávislých epizód mánie v anamnéze (Králová, 2019).

Stahl (2008) vo svojej štúdii udáva, že farmakoterapia depresie sa začína prvou voľbou SSRI a SNRI. Liečivá zo skupiny SSRI boli uvedené na trh v 90. rokoch minulého storočia. Ich spotreba, ale aj spotreba iných antidepresív v posledných rokoch stúpa. Medzi hlavné dôvody patrí nielen nástup rôznych civilizačných ochorení a vplyvov spoločnosti, ale aj lepší záchyt ochorenia a lepšia zdravotná starostlivosť. Najčastejšie predpisovanými liečivami v sledovanej lekárni boli liečivá zo skupiny SSRI – 55,13 % receptov (1187 PZ), ďalej nasledovali SNRI v počte 14,44 % (311 PZ). Pri nedostatočne kontrolovanej depresii prichádzajú na rad liečivá 2. voľby, kde patria TCA, NDI (inhibítory spätného vychytávania noradrenalínu), SARI (antidepresíva so zdvojeným serotonínovým pôsobením) a IMAO (inhibítory monoaminoxidázy). Ďalším z dôvodov ich zvýšeného predpisovania je aj široké spektrum iných diagnóz, na ktoré sú indikované. Patrí sem liečba OCD (obsedantno-kompulzívna porucha) poruchy, posstraumatickej stresovej poruchy, generalizovanej úzkostnej poruchy, predmenštruačnej dysforickej poruchy, chronickej bolesti, nespavosti, či nočnej enurézy u detí (Rull, 2019). Podľa štatistiky OECD (Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj), ktorá sledovala spotrebu antidepresív vo svete, na Slovensku pripadlo na 1000 obyvateľov 40 definovaných dávok denne (OECD, 2015).

Spomedzi liečiv zo skupiny SSRI bol najviac predpisovaný citalopram, ktorého účinnosť podľa štúdie Parker a Brown (2000) je oveľa vyššia ako placebo a je porovnateľná s ostatnými antidepresívami. Vďaka dobrému bezpečnostnému profilu a nízkemu výskytu interakcií s inými liečivami je vhodný pre liečbu depresie aj u starších pacientov s komorbiditami. Ďalším často predpisovaným liečivom bol sertralín, ktorý podľa klinickej štúdie Lewisa a kolektívu (2019) veľmi dobre pôsobí a ovplyvňuje anxietu, nakoľko je vhodný pri liečbe depresie sprevádzanej úzkosťou a nepokojom. Venlafaxín je silný inhibítor spätného vychytávania serotonínu a noradrenalínu a dosť slabý inhibítor spätného vychytávania dopamínu. Už mnoho rokov sa používa ako účinné antidepresívum. Venlafaxín je účinný pri súbežných kognitívnych a mentálnych poruchách. Často sa používa ako alternatíva k SSRI (Dold a kol., 2016). Podobne ako v prípade SSRI, venlafaxín ovplyvňuje činnosť imunitného systému prostredníctvom regulácie stresovej reakcie (Galecki a kol., 2018).

Z ďalších antidepresív sa v analýze vyskytol syntetický analóg melatonínu, agomelatín. Agomelatín je relatívne nové antidepresívum s unikátnym mechanizmom účinku, pôsobí synergicky na melatonínergný a serotonínový systém, avšak neovplyvňuje uvoľňovanie serotonínu, ale noradrenalínu a dopamínu. Je účinný v liečbe depresie, dobre ovplyvňuje príznaky anxiety, anhedónie a parametre spánku (Plesničar, 2014). Kvôli jeho možnému efektu na zvýšenie hepatálnych enzýmov sa nemá používať ako liečivo prvej voľby (Gahr, 2014). Antagonista serotonínových 5-HT3A, 5-HT7 a 5-HT1D receptorov, agonista 5-HT1A receptora, parciálny agonista 5-HT1B receptora a inhibítor serotonínového transportéra – vortioxetín sa v preskripcii vyskytol v 76 PZ (3,53 %) (Švihovec a kol., 2018). Vortioxetín je vo všeobecnosti dobre tolerované a účinné multimodálne novšie antidepresívum a má pozitívny efekt na kognitívne funkcie. U pacientov s poruchou obličiek a pečene by

sa mal užívať s opatrnosťou (Frampton, 2016).

Trazodón sa využíva v liečbe generalizovanej úzkostnej poruchy. Viaceré štúdie poukázali na to, že trazodón má v liečbe depresívnej poruchy porovnateľnú účinnosť ako TCA. Podľa prehľadovej štúdie Khouzama (2017) bol trazodón rovnako efektívny v liečbe depresie ako liečivá paroxetín a sertralín, ktoré patria do skupiny SSRI. Avšak trazodón vykazoval lepší vplyv na pacientov, ktorí trpeli poruchami spánku (Dunner, 2014). V rámci dvojkombinácie liečiv sa v štúdii najčastejšie vyskytovali liečivá zo skupiny SNRI (venlafaxín) spolu s trazodónom.

Na základe analýzy výsledkov preskripcie sa zistilo, že dosiahnutie remisie ochorenia je veľmi zložitý dej a často dochádza k recidíve ochorenia. Liečba depresie musí byť komplexná, musí zahŕňať farmakoterapiu a psychoterapiu. Dôležitá je snaha o maximálnu možnú adherenciu pacienta k liečbe, zlepšenie možných negatívnych exogénnych vplyvov a zbavenie sa škodlivých návykov pacienta.

ZÁVER

Depresia je afektívna porucha s vážnymi následkami, ktoré často negatívne vplývajú na život pacienta, či už súkromný alebo pracovný. Pre zlepšenie stavu včasnej diagnostiky a adekvátnej liečby depresie je potrebná systematická aktivita vo viacerých oblastiach života. Včasná diagnostika a správna terapia pozitívne vplývajú na spoločnosť, zdravotné a ekonomické parametre. Výsledky získané sledovaním preskripcie liečiv v rámci terapie depresie vo vybranej verejnej lekárni počas roka 2019 potvrdili nárast spotreby novších antidepresív, medzi ktoré patria hlavne liečivá zo skupiny SSRI a SNRI. Najväčšia prevalencia bola zistená vo veku od 50 – 59 rokov. Vo všeobecnosti sa depresívne poruchy vyskytujú častejšie u žien ako mužov. Najčastejšie sa vyskytujúcou diagnózou bola F33.2 Recidivujúca depresívna porucha, terajšia epizóda ťažkého stupňa bez psychotických príznakov a po nej nasledovala F33.8 Iné recidivujúce depresívne poruchy. V terapii depresie sa vyskytovali novšie liečivá zo skupiny SSRI ako je citalopram a sertralín. Prvoradým kritériom na dosiahnutie úspešnosti liečby pri výbere konkrétneho antidepresíva je jeho bezpečnosť u konkrétneho pacienta.

ZOZNAM LITERATÚRY

American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, (DSM-V), 5th edn. Washington: American Psychiatric Press, 2013. 991 p.

Dold, M., Kautzky, A., Bartova, L., Rabl, U., Souery, D., Mendlewicz, J., Kasper, S.: Pharmacological treatment strategies in unipolar depression in European tertiary psychiatric treatment centers – a pharmacoepidemiological cross-sectional multicenter study. *European Neuropsychopharmacology*, 2016, 26 (12), 1960 – 1971.

Dunner, D.: Combining antidepressants. *Shanghai Archives of Psychiatry*, 2014, 26 (6), 363 – 364.

Forgáčová, Ľ.: Odporúčané postupy pre liečbu unipolárnej depresívnej poruchy [Recommendations for the treatment of unipolar depressive disorder]. *Psychiatrie pro prax*, 2010, 11 (4), 139 – 144. https://www.solen.sk/casopisy/psychiatria-pre-prax/odporucane-postupy-pre-liecbu-unipolarnej-depresivnej-poruchy. [cit. 13.01.2021].

Frampton, J. E.: Vortioxetine: A review in cognitive dysfunction in depression. *Drugs*, 2016, 76 (17), 1675 – 1682.

Gahr, M.: Agomelatine in the treatment of major depressive disorder: an assessment of benefits and risks. *Current Neuropharmacology*, 2014, 12 (5), 387 – 398.

Khouzam, H. R.: A review of trazodone use in psychiatric and medical conditions. *Postgraduate medicine*, 2017, 129 (1), 140 – 148.

Gałecki, P., Mossakowska-Wójcik, J., Talarowska, M.: The anti-inflammatory mechanism of antidepressants–SSRIs, SNRIs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2018, 80, 291 – 294.

Heretik, A., Novotný, V., Pečeňák, J., Ritomský, A.: *EPID: epidemiológia depresie na Slovensku*

[EPID: Epidemic of depresion in Slovakia]. Nové Zámky: Psychoprof, 2003. 200 s.

International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10 Version:2019). http://apps.who.int/classi_cations/icd10/browse/2019/en. Accessed October 27, 2019.

Khouzam, H. R.: A review of trazodone use in psychiatric and medical conditions. *Postgraduate medicine*, 2017, 129 (1), 140 – 148.

Kořínková, V., Novotný, V.: *Racionálna liečba depresie* [Rational treatment of depression]. Metodický list Ústrednej komisie racionálnej farmakoterapie a liekovej politiky MZ SR 2007. Bratislava: Vydavateľstvo Herba, 2007, 11 (3 – 4), 1 – 8.

Králová, M.: *Depresívna epizóda – diagnosticko-liečebný štandard* [Depression episode – diagnostic treatment standard]. Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky, 2019.

Lewis, G., Duffy, L., Ades, A., Amos, R., Araya, R., Brabyn, S., Lewis, G.: The clinical effectiveness of sertraline in primary care and the role of depression severity and duration (PANDA): a pragmatic, double-blind, placebo-controlled randomised trial. *The Lancet Psychiatry*, 2019, 6 (11), 903 – 914.

Marko, P.: Depresívne poruchy v praxi všeobecného lekára pre dospelých – I. časť [Depressive disorders in general practitioners practice – part I.]. *Psychiatr. Prax*, 2010, 11 (4), 407 – 413. http://www.slovenskachirurgia.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=4050&magazine_id=1. [cit. 14.10.2020].

NCZI – Štatistické výstupy, 2019 [NHIC – Statistical outputs, 2019]. http://www.nczisk.sk/Statisticke_vystupy/Zdravotnicka_rocenka/Pages/default.aspx. [cit. 21.12.2020].

OECD: Fit mind, fit job: From evidence to practice in mental health and work, Mental health and work. Paris: OECD Publishing, 2015. https://www.oecd-ilibrary.org/employment/fit-mind-fit-job_9789264228283-en. Accessed September 27, 2020.

Parker, N. G., Brown, C. S.: Citalopram in the treatment of depression. *Annals of Pharmacotherapy*, 2000, 34 (6), 761 – 771.

Plesničar, B. K.: Efficacy and tolerability of agomelatine in the treatment of depression. *Patient preference and adherence*, 2014, 8, 603.

Stahl, S. M.: *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Application*. 5. Edition. Cambridge University Press, 2021. 1117 p.

Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., Votava, M.: *Farmakologie* [Pharmacology]. Praha: Grada, 2018, 257 – 300.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, IV., 2: 32 – 45, 2022

BETA-BLOCKERS IN THE TREATMENT OF HYPERTENSION AND TABLET FORMULATION

Wolaschka, Tomáš; Kľoc, Dominik; Rohaľová, Simona; Ruttkay, Filip

Department of Pharmaceutical Technology, Pharmacognosy and Botany
University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice
The Slovak republic

tomas.wolaschka@uvlf.sk

ABSTRACT

The aim of this study was formulation and valuation of tablets containing a beta-blocker. Before preparing the tablets we chose the excipients in the appropriate ratio. We used cetylstearyl alcohol and macrogol 1500 as the binders. We also added colloidal silica as the lubricant and stearic acid as the antiadhesive substance. We studied flow properties of granulates. We used the samples with the most suitable results for the preparation of tablets with propranolol. The use of lubricant and antiadhesive substances was inevitable due to their obvious positive effect on the quality of tablets. We made uniformity of mass, disintegration, and dissolution tests. Pair-wise dissolution comparison methods were used to compare dissolution profiles. We made a conclusion that macrogol 1500 as a binder was suitable for immediate release tablets and cetylstearyl alcohol is an appropriate alternative for tablets with prolonged release of an active ingredient. As the binder concentration increases, the time required to release the drug also increases.

Key words: beta-blockers; binders; dissolution; granulation; hypertension; moistening agent; technology

INTRODUCTION

Hypertension is a condition in which an adult has elevated values of systolic or diastolic blood pressure, with critical value of 140/90 mmHg (Mirossay et al., 2006). Antihypertensives are substances used to treat arterial hypertension (AH). Antihypertensives consist of a broad group of active pharmaceutical substances (API) used also in different therapeutical indications. Beta-blockers together with diuretics are the most widely used drugs for treatment of AH (Hynie, 2001).

Beta-blockers antagonize catecholamines effect on beta receptors by their occupation and competitive inhibition. The widely clinically used beta-blockers are pure antagonists, some substances belong to the

Tab. 1: The most commonly used beta-blockers in the treatment of AH

Generic name	Daily dose (mg)
selective	
Atenolol	2 x 50 – 100
Betaxolol	1 x 10 – 20
Bisoprolol	1 x 5 – 10
Metoprolol	2 x 50 – 100
Metoprolol SR	1 x 100 – 200
Nebivilol	1 x 5 – 10
selective with ISA	
Acebutolol	1 x 400 – 800
Celiprolol	1 x 200 – 400
non-selective	
Metipranolol	2 x 10 – 40
Propranolol	2 x 10 – 40
non-selective with ISA	
Bopindolol	1 x 1 – 2
Carvedilol (combined α and β effect)	2 x 12.5 – 25
Labetalol (combined α and β effect)	2 – 3 x 100 – 200

Source: Češka et al., 2010

group of partial agonists (evoke partial receptor activation) (Katzung et al., 2006).

β1 receptors occur mostly in heart and juxtaglomerulal apparatus, β2 receptors are present mostly in smooth muscles of veins and bronchioles, their blockage leads to constrictions of both systems, β3 receptors are located in adipocytes. Cardioselectivity of beta-blockers means their greater affinity to β1 receptors opposite to β2 by the common therapeutical concentrations. The antihypertension effect of nonselective molecules is decreased through vasoconstriction, the problem is also increased bronchial reactivity in asthmatics. Bisoprolol and nebivolol have the highest cardioselectivity among the commonly used molecules (Poirier and Tobe, 2014).

The hypotensive effect of beta-blockers occurs in the first few days of the therapy, but the full effect does not begin until 2 – 3 weeks of the therapy. All beta-blockers (see Tab. 1), applied in equipotent doses, lower blood pressure in a similar manner. The selection of a beta-blocker depends not only on specific properties of the selected drug [cardioselectivity, intrinsic sympathomimetic activity (ISA)] but also on its pharmacokinetics (Hynie, 2001).

The use of beta-blockers begins with small doses, which are gradually titrated to optimal doses. Lipophilic molecules have more demanding requirements for precise dose adjustment. Small initial doses prevent the early symptoms as severe fatigue and excessive bradycardia (Hynie, 2001). After long-term use of betablockers their abrupt discontinuation manifests itself in the so-called rebound phenomenon; withdrawal syndrome manifested by nervousness, tachycardia, and increased blood pressure. The prototype of the first beta-blocker was propranolol. Propranolol antagonizes catecholamines at both β1 and β2 receptors. Due to the high first-pass effect, its intravenous doses are lower than oral doses. This

Tab. 2: Composition of basic granules (m/m %)

	A3	A4	B3	B4
LAC	35	30	35	30
MCC	35	30	35	30
PEG 1500	30	40	0	0
CSA	0	0	30	40

Tab. 3: Composition of granulates with lubricant and antiadhesive addition (m/m %)

	A3+	A4+	B3+	B4+
LAC	33.95	29.10	33.95	29.10
MCC	33.95	29.10	33.95	29.10
PEG 1500	29.10	38.80	0.00	0.00
CSA	0.00	0.00	29.10	38.80
stearic acid	1.50	1.50	1.50	1.50
colloidal silica	1.50	1.50	1.50	1.50

effect is also responsible for dose variability required to achieve clinical effect. Propranolol was suitable for the treatment of mild and moderate hypertension. In severe hypertension, propranolol is particularly suitable to prevent reflex tachycardia developed following direct vasodilators usage (Katzung et al., 2006).

The oral route of administration is the most popular due to its simplicity, patient cooperation and no sterility requirements. It is also popular for its painless application, precise dosing by the patients themselves and the variety of dosage forms.

The most preferred oral dosage forms are tablets and capsules. The ideal medicine should reach the desired site quickly enough at the optimal concentration, remaining there for the required time until its elimination (Shahanoor, 2017). To achieve these requirements, tablets must have the properties necessary to ensure that they are properly formulated. It is especially important during the initial processing of raw materials, the so-called granulation process. Granulation is particle enlargement, in which small primary particles aggregate into larger permanent agglomerates. These clusters have properties more advantageous for further processing (tablets formulation) and also the fate of drug in the body.

MATERIAL AND METHODS

To prepare granules, we used the following materials:

Drug: propranolol (Fagron, Czech republic)

Fillers: lactose (LAC), (Cerapharm, Czech republic); microcrystalline cellulose (MCC), (Centralchem, Slovak republic)

Binders: polyethylene glycol 500 (PEG 1500), (Fagron, Czech republic); cetylstearyl alcohol (CSA), (Fagron, Czech republic)

Antiadhesive: stearic acid (Galvex, Slovak republic)

Lubricant: colloidal silica (Fagron, Czech republic)

To prepare dissolution and disintegration media, we use the following materials:

natrium hydroxide (NaOH) (Lach-ner, Slovak republic); concentrated hydrochloric acid (HCl), (Centralchem, Slovak republic);

Tab. 4: Composition of granules with propranolol and addition of lubricant and antiadhesive (m/m %)

	A3+P	A4+P	B3+P	B4+P
LAC	32.880	28.130	32.799	28.080
MCC	32.880	28.130	32.799	28.080
PEG 1500	28.182	37.456	0.000	0.000
CSA	0.000	0.000	28.113	37.439
stearic acid	1.500	1.500	1.500	1.500
colloidal silica	1.500	1.500	1.500	1.500
propranolol	3.058	3.284	3.289	3.401

potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), (Centralchem, Slovak republic)

Preparation of granules

The preparation of granules by thermoplastic granulation preceded the tablet production. Individual batches were designated based on following criteria: the first letter presents the binder **A** = PEG 1500 and **B** = CSA, the number represents binder concentration **3** = 30 % and **4** = 40 %, the + sign indicates samples with extragranular addition of lubricant and antiadhesive, **P** represents batches containing propranolol.

The composition of individual batches without extragranular excipients and propranolol is presented in Table 2. The individual components of the granulation mixture were homogenized and subsequently the mixture was heated at 80 °C for 30 minutes in Memmert UNB400 dryer. After cooling to 35 °C, the mixture was forced and extruded through the 1 mm sieve.

To prepare granules with the addition of lubricant and antiadhesive, the procedure was similar. We weighted the components according to Table 3. We added colloidal silica and stearic acid extragranularly to the prepared base granulate.

To prepare granules with the addition of propranolol, the procedure was similar. We weighted the raw material according to Table 4. We mixed propranolol with LAC before homogenization with MCC. We also added stearic acid and colloidal silica extragranularly to the propranolol granules.

Flow properties of granules

We evaluated flow properties of the prepared granules by pharmacopoeial tests. We determined flowability, angle of repose, compressibility index and Hausner ratio. Three measurements were performed, an average and a standard deviation (SD) were calculated.

Flow through an orifice was performed on GDT (Erweka, Germany) apparatus. We performed three measurements with each sample (50 g). The apparatus recorded automatically the time needed for the entire sample to flow through the orifice.

Angle of repose was determined using the funnel placed approximately 4 cm over the top of the powder pile. A petri dish served as a base with a fixed diameter and a protruding outer edge to retain a layer of powder upon which the cone is formed. We powdered continuously 100 g of the granulate on the inner side of the funnel to minimize the impact of falling powder on the tip of the cone. Angle of repose α was calculated after measuring the diameter of base d and the height h of the resulting cone.

To calculate the compressibility index and the Hausner ratio, we determined apparent volume and tapped volume. We poured 100 mL granulate into a 100 mL measuring cylinder, weighted it and tapped it 100 times. From the values obtained, we calculated the compressibility index and the Hausner ratio (Rabišková and Wolaschka, 2016).

Particle-size distribution estimation by analytical sieving

Analytical sieving was performed on a AS2000 (Retsch, Germany). The device included a set of sieves placed in the descending order: 1250 µm, 1000 µm, 800 µm, 500 µm, 250 µm, 125 µm. We set 10-second intervals with 2 mm amplitude on the device, which corresponds to an acceleration of the bottom of the sieve of 2 g and shaking time of 2 minutes. By sieving, we divided 100 g of the granulate into individual fractions, weighed them, and calculated the mean particle diameter *d* (Rabišková and Wolaschka, 2016).

$$d = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i d_i}{100} \; [mm]$$

d – mean particle diameter, x_i – arithmetic mean of the mesh size of the upper and lower sieve of the fraction, d_i – weight ratio of fraction *i*.

Tablet preparation

Prepared granules were used as a raw material for the tablet preparation. We used a AM 8 (Romaco, Italy) rotary tablet machine. The compression pressure was the same for all granules. We set the height of the upper die to 15 mm, so that the propranolol content of one tablet was 20 mg. We thoroughly cleaned the device before each use to avoid contamination of the final product. About 50 tablets were prepared for each batch.

Uniformity of mass of tablets

The prepared tables were tested for the uniformity of mass. We randomly selected 20 tablets from each batch, weighted them to the nearest 0.001 g and determined the average mass. The tablets passed the test, if not more than 2 of the individual masses deviated from the average mass by more than 5 % and none deviated by more than 10 % (Rabišková and Wolaschka, 2016).

Disintegration of tablets

The disintegration test determines whether the tablets disintegrate in a liquid medium under the given experimental conditions during the prescribed time (Rabišková and Wolaschka, 2016). We performed this experiment on an ZT3-2 (Erweka, Germany) tablet disintegration apparatus. We used 0.1 M HCl and phosphate buffer pH 6.8 as the medium. We maintained a liquid medium temperature of 37 ± 2 °C. We placed 6 tablets from the same batch in the basket-rack assembly and recorded the disintegration time.

Dissolution of tablets

By dissolution, we determine the amount of drug released in certain time intervals under prescribed conditions in a liquid environment (Ministry of Health, Czech republic, 2012). We performed basket dissolution on the Hanson virtual instruments dissolution test station SR8 plus (Hanson, United States). The base of the device consisted of a glass container with a rounded bottom, a drive shaft and a cylindrical basket. The apparatus consists of 8 such vessels tempered in a water bath at 37 ± 0,5 °C. In one experiment, seven vessels were used to analyze propranolol tablets from one batch and one vessel for a propranolol-free tablet (blank) with the same quantity of the excipients. The vessels were filled with 750 mL of 0.1 M HCl, and the apparatus was set at 50 rpm. We took samples at regular intervals; we supplemented the dissolution medium losses. After 60 min, a mixture of 46 mL of 0.2 M NaOH, 200 mL of 0.2 M KH_2PO_4 and 4 mL of H_2O was added to the dissolution medium, and sampling continued, the last one was taken 24 hours after the start of the dissolution. The absorbance of the samples was measured on a spectrophotometer at 290 nm Care 60 (Agilent Technologies, United States). The amount of propranolol released was calculated based on the calibration line (R = 0.99999).

Tab. 5: Flow properties of basic granules

method	A3	A4	B3	B4
flow through an orifice	–	–	9.60 ± 0.20 s	10.00 ± 0.20 s
angle of repose	42.06 ± 0.03°	38.67 ± 0.02°	40.33 ± 0.04°	27.84 ± 0.25°
compressibility index	18 %	16 %	16 %	18 %
Hausner ratio	1.22	1.19	1.19	1.22

Tab. 6: Flow properties of granules with the addition of extragranular excipients

method	A3 +	A4 +	B3 +	B4 +
flow through an orifice	6.60 ± 0.00 s	15.73 ± 0.31 s	6.93 ± 0.23 s	15.47 ± 0.42 s
angle of repose	34.14 ± 0.04°	34.81 ± 0.00°	35.09 ± 0.05°	36.57 ± 0.01°
compressibility index	9 %	10 %	15 %	11 %
Hausner ratio	1.10	1.11	1.18	1.12

Pair-wise dissolution comparison methods

Pair-wise procedures compare the values of the reference R and the tested T sample. The key parameters in pair-wise procedures are the difference factor f_1 and the similarity factor f_2. The difference factor f_1 calculates the percentual deviation between two dissolutions at all their points:

$$f_1 = \frac{\sum_{j=1}^{n} |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^{n} R_j} x100$$

where n is number of samples, R_j and T_j are the weight percentages of drug released in the reference and the test sample at a given time point j. The difference factor f_1 is equal to zero when the dissolution profiles are identical and increases with their increasing difference.

The similarity factor is a logarithmic function:

$$f_2 = 50xlog\left\{\left[1 + \left(\frac{1}{n}\right)\sum_{j=1}^{n}|R_j - T_j|^2\right]^{-0,5} x100\right\}$$

where n is number of samples, R_j and T_j are the weight percentages of drug released in the reference and the test sample at a given time point j. The similarity factor f_2 can take values from 0 to 100. The higher the values are, the more similar are the samples. This method is more accurate if more than 3 to 4 time points are available and the average difference between R and T is less than 100.

According to EMEA and FDA recommendations, two dissolution profiles may be considered similar, when the difference factor f_1 is less than 15 and the similarity factor f_2 is higher than 50 (Costa and Sousa Lobo, 2001).

We compared all samples with each other, once on the reference side and once on the test side. The comparisons were made separately for acid and alkaline dissolution sampling, while the 0th sampling was not included in the comparison, as it was the same for all dissolution sampling. The average values of the released drug at the given time were included in the calculation.

RESULTS AND DISCUSSION

Flow properties of granules

In the flow through the orifice method, the PEG 1500 samples did not flow at all, we recorded an

Tab. 7: Particle-size distribution estimated by analytical sieving of basic granules

fraction (µm)	A3	A4	B3	B4
2000 – 1250	0.000	0.406	0.000	0.077
1250 – 1000	0.120	5.349	0.245	1.033
1000 – 800	1.050	9.455	3.676	6.617
800 – 500	5.326	33.720	11.893	23.186
500 – 250	63.482	35.543	20.257	40.032
250 – 125	24.360	10.939	37.897	27.359
< 125	4.648	3.904	25.667	1.306
d	**0.34**	**0.53**	**0.29**	**0.43**

d – mean particle diameter (mm), fraction weight (g)

Tab. 8: Uniformity of mass of experimental tablets

m	deviation	m	deviation	m	deviation	m	deviation
A3		**B3**		**A4**		**B4**	
555	3.89	547	2.53	492	3.91	464	3.6
A3+		**B3+**		**A4+**		**B4+**	
654	1.68	608	1.13	609	1.1	588	1.51
A3+P		**B3+P**		**A4+P**		**B4+P**	
567	1.64	628	1.03	534	1.75	629	1.11

m – average weight of tablet in each batch (mg), deviation (%)

infinite pouring time. The 100 g amount of CSA granulates flowed 9.6 s sample B3, and 10.0 s sample B4 (see Tab. 5). PEG 1500 granulates became measurable after extragranular addition of colloidal silica and stearic acid. Samples with 30 % binder concentration achieved significantly better results. Granules coated with extragranular excipients were able to slide one after the other and cross the flow point with greater ease (see Tab. 6). A lower base flow energy was required to cross the flow limit (Hui et al., 2018).

The angles of repose corresponded to the following flow properties: A3 passable, A4 and B3 fair and B4 good. The results of the flow through an orifice: sample B4 achieved a significantly better (lower) angle of repose than the other samples. Extragranular addition of colloidal silica and stearic acid almost erased the differences in the angle of repose of all samples. In all samples except B4+, the angle of repose was reduced compared to samples without extragranular excipients. The angle of repose corresponded to the following flow properties: A3+, A4+ and B3+ good, B4+ fair.

The compressibility index and Hausner ratio values characterized the flow properties of all basic samples as fair. Extragranular addition of colloidal silica and stearic acid decreased these values. The flow properties were excellent (A3+, A4+) and good (B3+, B4+). When converting bulk density to the tapped, the stronger structured granulate resisted collapse more easily and achieved a low Hausner ratio, while the cohesive granulate collapsed considerably (Li et al., 2004). Hausner ratio is a relatively unreliable flow indicator. The rearrangement of the granules

Tab. 9: Disintegration of PEG 1500 tablets with addition of lubricant and antiadhesive

	A3+; HCl		A3+; buffer		A4+; HCl		A4+; buffer	
	m_1	m_2	m_1	m_3	m_1	m_2	m_1	m_3
average weight	655	36	662	60	610	0	612	0
disintegration percentage	95		91		100		100	

m_1 – initial tablet weight, m_2 – weight after 60 min in HCl, m_3 – weight after 60 min in buffer (mg)

Tab. 10: Disintegration of CSA tablets with addition of lubricant and antiadhesive

	B3+			B4+		
	m_1	m_2	m_3	m_1	m_2	m_3
average weight	611	36	36	585	748	730
disintegration percentage	0	95	97	0	– 28	– 25

m_1 – initial tablet weight, m_2 – weight after 60 min in HCl, m_3 – weight after 60 min in buffer (mg)

depends not only on the properties of the particles but also on the immediate supply of energy from the taps. Granules with a very wide particle distribution, irregularly shaped particles and high adhesiveness may cause the assigned flow based on the calculated Hausner ratio values not correspond to the actual flow properties (Li et al., 2004).

The results of the individual methods did not always match. This was because different methods for determining the flow properties of the granulate may characterize the flow differently (Hui et al., 2018). The most ideal way to evaluate the powder flow is therefore a combination of several methods (Freeman, 2007).

Particle-size distribution estimated by analytical sieving

Lower concentrations of both binders resulted in smaller particle sizes (see Tab. 7). Their size increased in the direction of B3, A3, B4, A4. In sample B3 we can see more than 25 % of dust, primary particles (< 125 μm), which means that in this composition and procedure, the CSA did not bind all the particles and granulation was not sufficient.

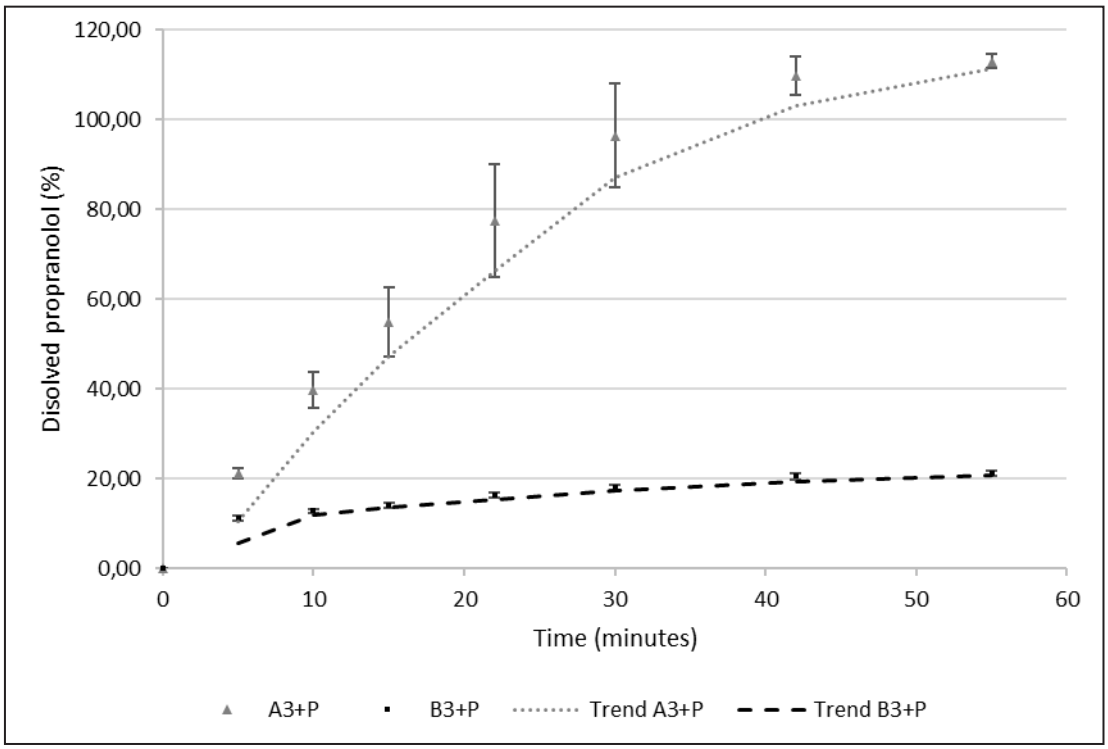
Uniformity of mass of tablets

None of the batches of basic experimental tablets without extragranular excipients passed the pharmacopoeial uniformity of mass test (see Tab. 8). All batches with extragranular excipients passed the test, as none of the 20 randomly selected tablets did not exceed a 5 % deviation from the average weight. This did not change the incorporation of propranolol into the tablets. Tablets with a 40 % binder concentration achieved a lower average weight. The higher binder concentration was responsible for the larger mean particle diameter, and the associated greater porosity of the granulate, resulting in lower weight of particles capable of occupying the matrix volume before compression (Davies and Gloor, 1992).

Disintegration of tablets

The A3+ tablets disintegrated almost completely in both solutions, leaving only a small amount of

Graph 1: Dissolution of propranolol from A3+P and B3+P tablet in an acidic medium



material that did not pass through the sieve (see Tab. 9). The A4+ tablets disintegrated completely in both solutions, in HCl solution after 44 min and in buffer after 45 min. Their disintegration could be accelerated by the hydrophilicity of PEG 1500. Its higher concentration in A4+ accelerated the penetration of water into the tablet and its subsequent disintegration (Passerini et al., 2002). The change in the pH of the medium did not have a significant effect on the disintegration rate of the PEG 1500 tablets.

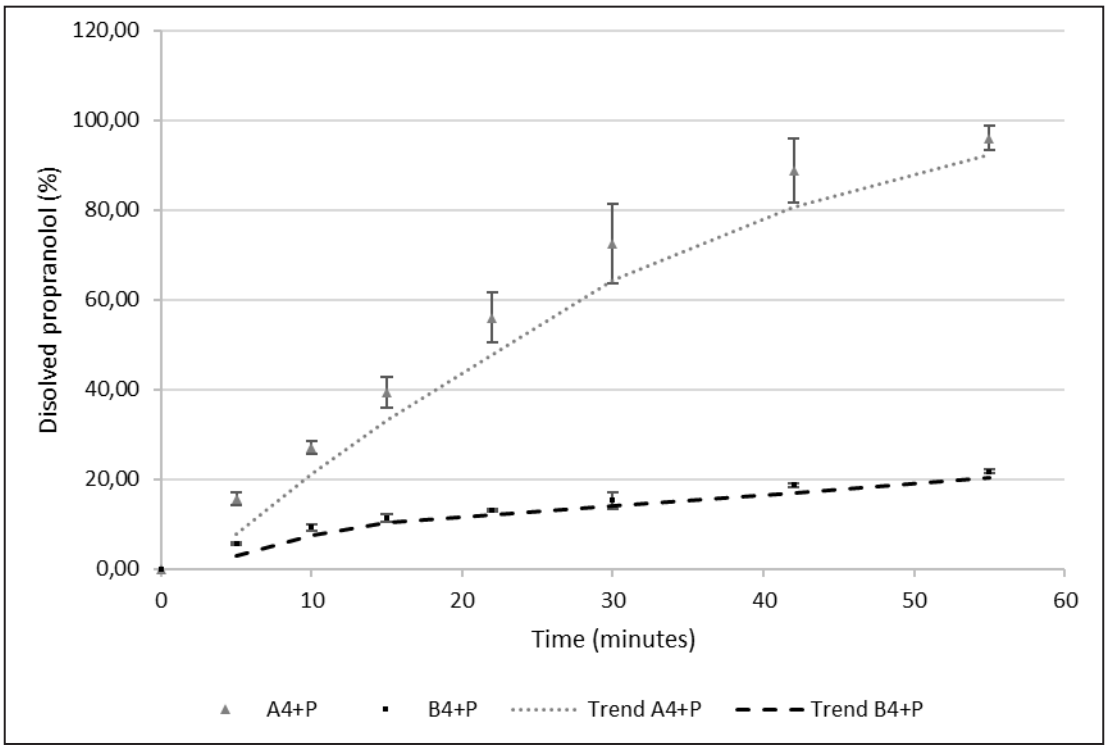
Of the B3+ tablets, 95 % of their weight disintegrated in HCl solution (see Tab. 10). What is interesting, is the value of the percentage of disintegration of B4+ tablets, when the tablets retained their shape and paradoxically their weight increased by 28 %, because liquid disintegration medium entered them. The higher CSA content gave the tablets more compactness. MCC is a filler that accelerates the disintegration of tablets by forming capillaries that allow media to penetrate and weaken the tablet structure. In B4+ tablets, the amount of MCC was less than in B3+.

Dissolution of tablets

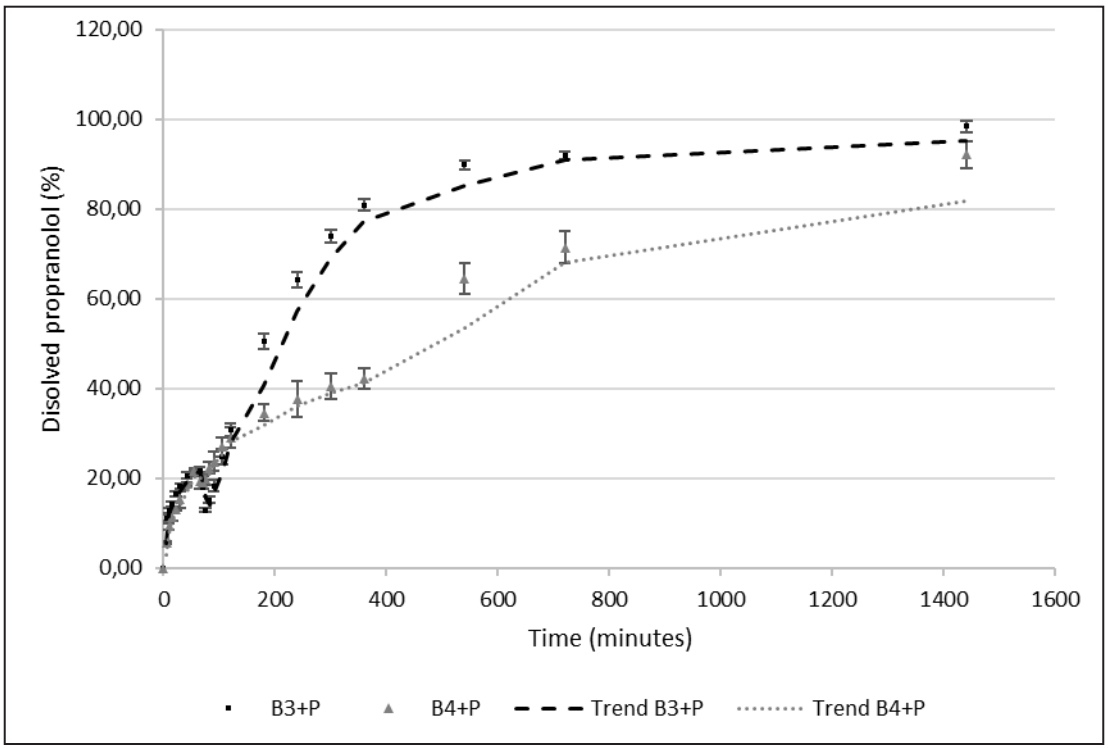
The drug was released significantly faster from tablets containing PEG 1500 than from tablets with CSA. After 60 minutes, the PEG 1500 tablets were completely dissolved, while the CSA tablets released only 21 % propranolol (see Graphs 1, 2).

This is due to the hydrophilicity of PEG 1500 (Yang et al., 2007); which could absorb water from the dissolution medium and cause tablet disintegration and drug release. Sample A4+P released the drug later than A3+P. PEG 1500 accelerates the dissolution of hydrophobic drugs up to twofold (Rodriguez et al., 2002). However, propranolol is a hydrophilic substance, and a higher concentration of PEG 1500 in the A4+P sample may have slowed its release.

Graph 2: Dissolution of propranolol from A4+P and B4+P tablet in an acidic medium



Graph 3: Dissolution of propranolol from B3+P and B4+P tablet in both acidic and alkaline medium



Tab. 11: Comparison of dissolution profiles of experimental tablets in acidic medium using difference factor f_1

	A3+P	A4+P	B3+P	B4+P
		Reference ↑ : Test ←		
A3+P	x	23	78	81
A4+P	30	x	71	76
B3+P	348	245	x	18
B4+P	440	316	22	x
	Reference ← : Test ↑			

Tab. 12: Comparison of dissolution profiles of experimental tablets in alkaline medium using difference factor f_1

	A3+P	A4+P	B3+P	B4+P
		Reference ↑ : Test ←		
A3+P	x	8	64	72
A4+P	9	x	61	70
B3+P	178	156	x	35
B4+P	262	233	45	x
	Reference ← : Test ↑			

The relative amount of propranolol released at 22 minutes was significantly different for A3+P (73.53 ± 15.75 %) and A4+P (56.06 ± 5.66 %). At 55 minutes, this difference was already insignificant (100.85 ± 1.42 %; 96.06 ± 2.81 %). CSA tablets released propranolol gradually due to the lipophilicity of the binder. Moisture entry into the tablet was not accelerated by the binder hydrophilicity. Again, we observed differences in drug release kinetics from tablets at different binder concentrations. After the initial five minutes (after the first sampling), the amount of propranolol released in sample B3+P was almost double that of sample B4+P. Sustained-release dosage forms should generally have a minimal "burst effect". Thus, there should be no significant release of the active substance in the first minutes (Huang et al., 2004). Within 55 minutes of the dissolution in the acidic environment of the stomach, approximately the same amount of active substance, i. e. 21 %, was released from both samples (see Graphs 1, 2).

After adjusting the pH of the medium, the B4+P sample continued to release propranolol evenly until the last collection after 24 hours, when 92 % of the propranolol was released. The release curve of propranolol from sample B3+P had a steeper course after increasing the pH, after 12 hours of dissolution it released approximately the same amount of drug as sample B4+P after 24 hours (see Graph 3). Higher concentrations of CSA caused greater tablet cohesiveness, thereby prolonging the drug release. In our experiment, regardless of the binder used in the granulation, its higher content slowed the release of the drug from the tablet (Monteyene et al., 2016).

Propranolol is a non-selective β-adrenergic receptor antagonist that is not currently used for the primary treatment of AH. We used it as an experimental β-blocker.

Due to a significant first-pass effect, the bioavailability of orally administered propranolol is 25 %, volume of distribution 4 $l.kg^{-1}$ (EMA, 2020); which corresponds to a theoretical plasma concentration of 10.42 $ng.ml^{-1}$ (60 kg body weight) with 10 mg tablets. This is consistent with published results in which the administration of 40 mg tablets of propranolol resulted in plasma levels of 41 $ng.ml^{-1}$ after 52 minutes (Krantz et al., 2006).

PEG 1500 A3+P and A4+P tablets achieved almost complete drug release after 55 minutes of dissolution. We can assume that they would reach a plasma concentration of 20 $ng.ml^{-1}$. The therapeutic concentration of propranolol is above 20 $ng.ml^{-1}$. The best antihypertensive effects are obtained at a concentration of 50 to 100 $ng.ml^{-1}$ (Mansur et al., 1998). The optimal therapeutic dose would be achieved by oral administration of two tablets containing propranolol containing 20 mg and PEG 1500 in 30 or 40 % binder concentration. PEG 1500 tablets would be a suitable immediate release dosage form of propranolol.

However, the plasma half-life of propranolol

Tab. 13: Comparison of dissolution profiles of experimental tablets in acidic medium using similarity factor f_2

	A3+P	A4+P	B3+P	B4+P
		Reference ↑ : Test ←		
A3+P	x	38	10	9
A4+P	38	x	16	16
B3+P	10	16	x	73
B4+P	9	16	73	x
	Reference ← : Test ↑			

Tab. 14: Comparison of dissolution profiles of experimental tablets in alkaline medium using similarity factor f_2

	A3+P	A4+P	B3+P	B4+P
		Reference ↑ : Test ←		
A3+P	x	52	8	6
A4+P	52	x	10	9
B3+P	8	10	x	37
B4+P	6	9	37	x
	Reference ← : Test ↑			

is relatively short, so these tablets should be taken several times a day. Tablets with CSA as a binder could be a suitable alternative. We know that the almost complete release of the drug occurred after 12 or 24 hours depending on CSA concentration. With an increase in the amount of propranolol in the tablet, tablets with a 30 % CSA concentration could theoretically be administered twice a day and tablets with a 40 % CSA only once a day.

Pair-wise dissolution comparison methods

The values of the difference factor f_1 indicate small differences between samples A3+P vs. A4+P (f_1 = 23 and 30, respectively) and B3+P vs. B4+P (f_1 = 18 and 22, respectively, see Tab. 11). Nevertheless, these differences are above the limit set by the FDA (2022) for similar dissolution profiles (0 – 15).

Calculations of the difference factor f_1 in an acidic environment indicate that the dissolution profiles of samples A3+P and A4+P are similar (f_1 = 8 and 9, respectively). This follows the fact that these samples were almost completely dissolved within 65 minutes and thus there were no kinetic changes in the drug release. Samples B3+P and B4+P in the basic environment (see Tab. 12) showed a slightly higher difference (f_1 = 35 and 45, respectively) in the dissolution profile than in the acidic environment (see Tab. 11). At the same time, we can see that the calculation of the difference factor f_1 is not symmetric and therefore it depends on which sample is considered as a reference and which as tested.

The value of the similarity factor f_2 of samples B3+P and B4+P in an acidic environment (f_2 = 73) falls within the range 50 – 100, which according to the FDA (2022) indicates a similar dissolution profile. The values of the similarity factor f_2 for other comparisons are below the value of 50 (see Tab. 13).

The similarity factor f_2 of samples A3+P vs. A4+P in alkaline medium indicates the similarity of the dissolution profiles, which is related to the already mentioned fact that these samples were almost completely dissolved in the acidic medium. The similarity of the dissolution profiles of samples B3+P and B4+P in alkaline medium decreased to the value of f_2 = 37 (see Tab. 14). The similarity factor f_2 is symmetric in contrast to the difference factor f_1 and it does not matter which sample is considered as reference and which is tested. The similarity factor, in contrast to the difference factor, is a logarithmic function and even small deviations in the comparison profiles lead to more significant differences in its value (Haršányová et al., 2020).

CONCLUSIONS

The higher binder concentration in the granulation mixture meant the formation of larger granule grains and affected the flow properties of the granules. The extragranular addition of colloidal silica and stearic acid significantly improved the flow properties of the

granules, facilitated the production process of the experimental tablets, and improved their properties.

The type of the binder used significantly affected the properties of the experimental tablets. PEG 1500 accelerated both tablet disintegration and beta-blocker release during dissolution. The CSA, on the other hand, slowed down these processes. Based on this, we were able to conclude that PEG 1500 may be a binder suitable for immediate release tablets. CSA may be a suitable alternative for prolonged-release tablets.

ACKNOWLEDGEMENT

The study was also written thanks to the support of project from the Structural Funds „Renewal of research and development infrastructure and equipment at UVLF, ITMS 26210120028" and project VEGA 1/0731/21 „Substances of natural origin as part of sustainable aquaculture".

REFERENCES

Češka, R. et al.: *Interna* [Internal medicine]. 1. vyd. Praha: Triton, 2010. 140 – 141.

Costa, P., Sousa Lobo, J. M.: Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, 13 (2), 123 – 133. https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1. Accessed March 29, 2022. [cit. 2022-03-29].

Davies, W. L., Gloor, W. T.: Batch production of pharmaceutical granulation in a fluidized bed II: effects of various binders on granulation and compressed tablets. *Pharmaceutical Research Division*, 1992, 61 (4), 618 622. Doi: 10.1002/jps.2600610428.

Európska lieková agentúra [European Medicines Agency]. Súhrn charakteristických vlastností propranololu. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/hemangiol-eparproduct-information_sk.pdf. Accessed August 11, 2020.

Food and drug administration. Guidance for industry: dissolution testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, 1997. https://www.fda.gov/media/70936/download. Accessed February 3, 2022.

Freeman, R.: Measuring the flow properties of consolidated, conditioned and aerated powders – a comparative study using a powder rheometer and a rotational shear cell. *Powder Technology*, 2007, 174, 25 – 33. Doi: 10.1016/j.powtec.2006.10.016.

Haršányová, T., Wolaschka, T., Matušová, D., Bauerová, K.: Vplyv technologických vlastností suchého extraktu na vlastnosti tabliet [Influence of technological properties of dry extract on properties of tablets]. *Chemické listy*, 2020, 114, 12, 847 – 852.

Huang, Y.-B., Tsai, Y.-H., Yang, W.-Ch., Chang, J.-S., Wu, P.-Ch., Takayama, K.: Once-daily propranolol extended-release tablet dosage form: formulation design and *in vitro/in vivo* investigation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004, 58 (3), 607 – 614. Doi: 10.1016/j.ejpb.2004.03.037.

Hui, P. G., Heng, P. W., Liew, C. V.: Comparative evaluation of powder flow parameters with reference to particle size and shape. *International journal of Pharmaceutics*, 2018, 547 (1 – 2), 133 – 141. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.05.059.

Hynie, S.: *Farmakologie v kostce* [Pharmacology]. 2. vyd. Praha: Triton, 2001. 253 – 258.

Katzung, G. et al.: *Základní a klinická farmakologie* [Basic and Clinical Pharmacology]. 2. vyd. Jinčany: H α H, 2006. 48, 151 – 153, 171.

Krantz, M., Hui, Z., Zhu, J.: Characterization of powder flow: Static and dynamic testing. *Powder Technology*, 2006, 194 (3), 239 245. Doi: 10.1016/j.powtec.2009.05.001.

Li, Q., Rudolph, V., Weigl, B., Earl, A.: Interparticle van der Waals force in powder flowability and compatibility. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 280 (1 – 2), 77 – 93. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.05.001.

Mansur, A. P.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propranolol in hypertensive patients after sublingual administration: systemic availability. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1998, 31 (5), 691 – 696.

McEvoy, G. K.: *AHFS Drug Information 2003*. Bethesda, Md.: American Society of Health – System Pharmacists, 2003. 1785 – 1786.

Ministerstvo zdravotnictví ČR. Český lékopis 2009 – doplňek 2012 [Ministry of Health Czech republic, the Czech Pharmacopoeia 2009 – Suppl. 2012]. Praha: Grada, 2012. 76, 145 – 146, 387 – 392, 451 – 454.

Mirossay, L. et al.: *Základná farmakológia a farmakoterapia* [Basic Pharmacology and Pharmacotherapy]. 1. vyd. Košice: Equilibria, 2006. s. 128.

Monteyne, T., Vancoillie, J., Remon, J.-P., Vervaet, Ch., De Beer, T.: Continuous melt granulation: Influence of process and formulation parameters upon granule and tablet properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 107, 249 – 262. Doi: 10.1016/j.ejpb.2016.07.021.

Passerini, N.: Preparation and characterisation of ibuprofen-poloxamer 188 granules obtained by melt granulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002, 15, 71 – 78. Doi: 10.1016/s0928-0987(01)00210-x.

Poirier, L., Tobe, S. W.: Contemporary use of β-blockers: clinical relevance of subclassification. *Can. J. Cardiol.*, 2014, 30 (5), 9 – 15. Doi: 10.1016/j.cjca.2013.12.001.

Rabišková, M., Wolaschka, T.: *Tuhé liekové formy. Návody na praktické cvičenia* [Solid dosage forms. Guidelines for practical exercises]. Košice: UVLF, 2016. 12, 62 – 74.

Rodriguez, L., Cavallari, C., Passerini, N., Albertini, B., Gonzáles-Rodríguez, M., Fini, A.: Preparation and characterization by morphological analysis of diclofenac/PEG 4000 granules obtained using three different techniques. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 242 (1 – 2), 285 – 289. Doi: 10.1016/s0378-5173(02)00189-8.

Shahanoor, M., Shahab, K., Ghadage, D. M., Yadav, A. V., Wagh, A.: Formulation and evaluation of bilayer tablets of propranolol hydrochloride. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2017, 7 (2), 50 – 51.

Yang, D.: Effect of the melt granulation technique on the dissolution characteristics of griseofulvin. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 329 (1 – 2), 72 – 80. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.08.029.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, IV., 2: 46 – 58, 2022

VPLYV PODÁVANÉHO SEMAGLUTIDU NA HLADINU GLYKOVANÉHO HEMOGLOBÍNU HbA1c U PACIENTOV S *DIABETES MELLITUS*

THE EFFECT OF SEMAGLUTIDE ADMINISTRATION ON THE LEVEL OF GLYCATED HEMOGLOBIN HbA1c IN PATIENTS WITH *DIABETES MELLITUS*

Sefa, Simona[1]; Szabóová, Renáta[1]; Babíková, Jana[2]

[1]Katedra biológie a fyziológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
[2]Diabetologická ambulancia
Dobšinského 4380, 979 01 Rimavská Sobota
Slovenská republika

renata.szaboova@uvlf.sk

ABSTRACT

***Diabetes mellitus* (*DM*) je pojem opisujúci skupinu metabolických porúch charakterizovaných a identifikovaných prítomnosťou hyperglykémie bez liečby. S cieľom o dosiahnutie obmedzenia polyfarmakoterapie *DM* typu 2 sa do povedomia dostáva užívanie agonistov glukagón podobnému peptidu-1 (GLP-1). Agonisti GLP-1, tzv. inkretínové mimetiká, zvyšujú sekréciu inzulínu, ako aj znižujú sekréciu glukagónu, spomaľujú vyprázdňovanie žalúdka, udržiavajú pocit sýtosti a podporujú zníženie hmotnosti pacienta. Medzi GLP-1 s terapeutickým dávkovaním raz týždenne je zaradený aj semaglutid. Semaglutid je analóg GLP-1, ktorý je v 94 % štrukturálne homologický s prírodným GLP-1. Je indikovaný ako doplnok k diéte s cieľom kontroly hladiny glukózy v krvi s očakávaním normoglykémie alebo poklesu hyperglykémie u pacientov s *DM* typu 2.**

Cieľom štúdie je sledovanie vplyvu semaglutidu na hladinu glykovaného hemoglobínu HbA1c, biochemické parametre, BMI, hmotnosti, tlak krvi v priebehu 1 roka terapie u pacientov (n = 30) s diagnózou *DM* typu 2. Vplyvom ročného podávania semaglutidu sa u pacientov znížila hmotnosť v priemere o 8,5 kg na osobu. Aplikácia semaglutidu neovplyvnila negatívne hladiny celkového, HDL a LDL cholesterolu, triglyceridov (TAG), kreatinínu, urey, alanínaminotransferázy

(ALT) a aspartátaminotransferázy (AST). Taktiež bol sledovaný priaznivý účinok semaglutidu na činnosť kardiovaskulárneho systému v podobe hodnoty tlaku krvi, ktorý sa znížil z pôvodnej priemernej hodnoty pacientov 140 / 86 mmHg na 130 / 82 mmHg po ročnej liečbe. Signifikantné zníženie hladiny glykovaného hemoglobínu HbA1c (p < 0,001) sa pozorovalo nielen po 12 mesiacoch, ale už po 6 mesiacoch terapeutického manažmentu semaglutidom v porovnaní s hodnotami HbA1c získanými pred terapiou.

Výsledky poukazujú na účinok semaglutidu ako perspektívneho liečiva pri liečbe pacientov s *DM* typu 2 trpiacich súčasne nadváhou – obezitou rôzneho stupňa.

Kľúčové slová: *diabetes mellitus*; glykovaný hemoglobín; semaglutid; terapia

ABSTRACT

***Diabetes mellitus* (*DM*) is a term describing a group of metabolic disorders characterized / identified by the presence of hyperglycemia without treatment. In order to limit polypharmacotherapy, the use of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) agonists has become known. GLP-1 agonists – incretin mimetics, increase insulin secretion and decrease glucagon secretion, slow gastric emptying, improve satiety, may lead to weight loss. Semaglutide is also included once weekly therapeutically at GLP-1 receptor agonists. Semaglutide is a GLP-1 analog that is 94 % structurally homologous to native GLP-1. It is indicated as an adjunct to diet to monitor blood glucose levels regularly to normoglycemia or to decrease hyperglycaemia in patients with *DM* type 2.**

The aim of this study was to monitor the effect of semaglutide on HbA1c level, biochemical parameters, BMI, weight, blood pressure values during the therapy lasting 1 year in patients (n = 30) with a diagnosis of *DM* type 2. Due to the peroral administration of semaglutide, patients lost an average of 8.5 kg per person, while administration did not negatively affect the levels of total, HDL and LDL cholesterol, triglycerids (TAG), creatinine, urea, alaninaminotransferase (ALT) and aspartataminotransferase (AST). The beneficial effect of semaglutide on the activity of the cardiovascular system of blood pressure was also observed, which decreased from the original initial value of 140 / 86 mmHg to 130 / 82 mmHg after one year treatment. The most significant result was a significant reduction in the glycated hemoglobin HbA1c (p < 0.001) level not only after 12 months, but already after 6 months of semaglutide therapeutic management compared to the results obtained before the therapy. The results point to the beneficial effects of semaglutide as a potential drug in the treatment of patients with DM type 2 concurrently diagnosed with both overweight and obesity of various degrees.

Key words: *diabetes mellitus*; glycated hemoglobin; semaglutide; therapy

ÚVOD

Termín *diabetes mellitus* (*DM*) typu 2 opisuje skupinu metabolických porúch charakterizovaných a identifikovaných prítomnosťou hyperglykémie bez adekvátnej liečby. V súčasnosti žije s ochorením *diabetes mellitus* takmer pol miliardy ľudí, avšak predpokladá sa, že tento počet pacientov sa v roku 2030 zvýši o 25 % a v roku 2045 o 51 % (Guariguata, 2011). Odhaduje sa, že významné percento prípadov cukrovky (30 – 80 %, v závislosti od krajiny) nie sú pacienti s *diabetes mellitus* diagnostikovaní (Alberti a Zimmet, 1998). U subjektov mladších ako 50 rokov nebolo ochorenie diagnostikované u viac ako polovice (Shaw, 2011).

Heterogénna etiopatológia zahŕňa defekty v sekrécii inzulínu, pôsobenia inzulínu samostatne alebo v ich kombinácii a poruchy metabolizmu uhľohydrátov, tukov a bielkovín. V súčasnosti platí, že základnou charakteristikou spoločnou pre všetky formy

cukrovky je dysfunkcia alebo deštrukcia β-buniek pankreasu (Tuomi, 2014). Medzi dlhodobé špecifické komplikácie *DM* typu 2 patrí retinopatia, nefropatia a neuropatia. Pri tomto type ochorenia však symptómy často nie sú závažné alebo môže dochádzať k ich absencii, a to z dôvodu postupne a pomaly sa vyvíjajúcej hyperglykémie. V dôsledku toho môže dôjsť k hyperglykémii zapríčiňujúcej patologické a funkčné zmeny.

Farmakologická liečba metabolického ochorenia *DM* typu 2 sa za posledných niekoľko rokov výrazne zmenila, pričom boli v rámci terapie k dispozícii nové triedy liekov. V súčasnosti je zaznamenaný zvýšený záujem o užívanie agonistov glukagón podobnému peptidu-1 (GLP-1, glucagon like peptide). GLP-1 je peptidový hormón s 30 aminokyselinami primárne vylučovaný bunkami črevného traktu (Holst, 2007). Agonisti GLP-1, známi tiež ako „inkretínové mimetiká," zvyšujú sekréciu inzulínu, ako aj znižujú sekréciu glukagónu, spomaľujú vyprázdňovanie žalúdka, zlepšujú pocit sýtosti a môžu viesť k zníženiu hmotnosti pacienta (Dungan, 2005). U pacientov s *DM* typu 2 je často pozorovaný takmer žiadny alebo znížený účinok inkretínového systému. Z toho dôvodu je použitie inkretínového systému ideálnym prístupom k liečbe spomínaného ochorenia (Garber, 2011).

Posledným a najnovším členom patriacim do skupiny GLP-1 je semaglutid obsiahnutý v lieku Ozempic (Novo Nordisk, Dánsko). Semaglutid má polčas rozpadu 1 týždeň, je vhodný pre subkutánne podávanie raz týždenne (Lau, 2015).

Sledovanie vplyvu perorálne aplikovaného semaglutidu na hladinu glykovaného hemoglobínu (HbA1c) v krvi poukázalo na fakt, že užívanie spomínaného agonistu GLP-1 môže ovplyvniť hladinu glykovaného hemoglobínu a spôsobiť výraznú stratu hmotnosti v porovnaní s pacientmi užívajúcimi placebo. Glykovaný hemoglobín je spoľahlivým biomarkerom na diagnostiku a prognózu *DM* typu 2, ako aj dôležitým ukazovateľom dlhodobej kontroly glykémie so schopnosťou hodnotiť kumulatívnu glykemickú históriu za predchádzajúce dva až tri mesiace. Mnoho štúdií potvrdilo potenciál sledovania koncentrácie HbA1 ako parametra kontroly hladiny glukózy v krvi. Glykovaný hemoglobín sa začal klinicky používať v 80. rokoch a následne sa stal základným liečivom v klinickej praxi (Massi-Benedetti, 2006), pričom vyjadroval priemernú hladinu glukózy v plazme za posledných 8 až 12 týždňov (Nathan a kol., 2007). Zvýšená hladina HbA1c bola tiež považovaná za nezávislý rizikový faktor koronárnej choroby srdca a cievnej mozgovej príhody (Herman a Fajans, 2010). Meranie hladiny HbAc1 sa môže vykonávať kedykoľvek počas dňa. Väčšina pacientov užívajúcich semaglutid dosahuje hladinu HbA1c pod 7,0 % bez hypoglykémie a bez prírastku hmotnosti. Klinicky významné zníženie hmotnosti spolu s preukázanými prínosmi činnosti kardiovaskulárneho systému podporujú uprednostnené použitie semaglutidu u osôb s preukázaným kardiovaskulárnym ochorením (Marso a kol., 2016).

Gastrointestinálna tolerancia je hlavnou podmienkou pri začatí liečby pomocou GLP-1. Ak sú pozorované gastrointestinálne vedľajšie účinky, môže sa zvážiť titrácia dávky udržiavaním alebo znižovaním dávky semaglutidu na 0,5 alebo 0,25 mg (Warren, 2018).

Poznatky o priaznivých účinkoch na činnosť kardiovaskulárneho systému sú mimoriadne povzbudivé. Pacienti užívajúci semaglutid mali o 26 % signifikantne nižšie riziko výskytu kardiovaskulárneho ochorenia (nefatálny infarkt myokardu alebo nefatálna mozgová príhoda). Ďalším benefitom je zníženie hmotnosti, ktoré je výraznejšie pri užívaní semaglutidu v porovnaní s aplikáciou iných dlhodobo pôsobiacich GLP-1 agonistov (Marso a kol., 2016). Významným zaznamenaným nežiaducim účinkom je riziko hypoglykémie, ktoré je ale nízke pri monoterapii subkutánnym alebo orálnym semaglutidom. Riziko sa zvyšuje pri kombinácii so sulfonylmočovinou a / alebo inzulínovou terapiou (Romera a kol., 2019). Najvyšší výskyt zaznamenanej hypoglykémie bol u jedincov užívajúcich deriváty sulfonylmočoviny. Pri perorálnej forme semaglutidu bola hypoglykémia zaznamenaná u 1,4 % pacientov (Brown a kol., 2020).

K významnému zníženiu výskytu tohto ochorenia

Tab. 1: Klasifikácia obezity podľa BMI (Body Mass Index; Index telesnej hmotnosti)

	Trieda obezity	BMI (kg/m²)	Riziko pridružených chorôb
Podváha		<18,5	
Normálna		18,5 – 24,9	Priemerné
Nadváha		25,0 – 29,9	Zvýšené
Obezita	I.	30,0 – 34,9	Stredne zvýšené
	II.	35,0 – 39,9	Vysoké
Extrémna obezita	III.	≥40	Veľmi vysoké

Zdroj: Flegal a kol., 2002

dokážeme prispieť úpravou životného štýlu, stravovaním, pravidelným cvičením, abstinenciou fajčenia a znížením konzumácie alkoholu.

MATERIÁL A METÓDY

Cieľom tejto štúdie je sledovanie vplyvu podávaného semaglutidu na hladinu glykovaného hemoglobínu HbA1c u tridsiatich pacientov s diagnózou neuspokojivo kompenzovaný *diabetes mellitus* typu 2. Štúdia ďalej obsahuje sledovanie a porovnanie výsledkov vyšetrení vybraných biochemických parametrov vrátane hodnôt BMI, hmotnosti, ako aj hodnôt tlaku krvi v priebehu terapie u jednotlivých pacientov v časovom intervale 1 rok, a to v následnosti: 1. odber pred začiatkom terapie, 2. odber po 6 mesiacoch terapie semaglutidom, 3. odber po 12 mesiacoch terapie semaglutidom.

Po príchode pacienta do diabetologickej ambulancie a zistení dôkladnej anamnézy sa každému pacientovi počas 1., 2. a 3. odberu zaznamenala manuálne hodnota tlaku krvi v lakťovej jamke v pokojovom režime v sede, a to pomocou bezortuťového tlakomeru s LCD displejom BK 1016 (Fazzini, S.r.l., Miláno, Taliansko) a fonendoskopu Littmann Classic III (Littmann, USA). Nameraná hodnota sa stanovila v jednotkách mmHg (milimeter orťuťového stĺpca), pričom meranie sa pri každom odbere opakovalo trikrát s časovým odstupom 3 minúty a výsledná hodnota tvorí priemer z druhého a tretieho merania. Taktiež sa zaznamenala hmotnosť pacienta (vyjadrená v kg) v spodnej bielizni s použitím váhy RADWAG WPT 100/200.O. (Radwag, Poľsko).

Na klasifikáciu nadváhy a obezity u dospelých sa použil index BMI (Body Mass Index; index telesnej hmotnosti), ktorý je definovaný ako hmotnosť osoby v kilogramoch delená druhou mocninou jej výšky v metroch (kg/m^2).

Index telesnej hmotnosti poskytuje najbežnejšiu orientačnú klasifikáciu nadváhy a obezity, pretože je rovnaký pre obe pohlavia a pre všetky vekové skupiny dospelých. Pacienti boli zaradení na základe klasifikácie obezity (viď tab. 1) do jednotlivých tried obezity.

Na základe odberu vzoriek venóznej krvi z *vena mediana cubiti* sa v 1., 2. a 3. odbere u pacientov (n = 30) stanovili v laboratóriu D. G. s. r. o. Laboratórium klinickej biochémie, hematológie a transfuziológie (Zdravotné stredisko Rimava, Rimavská Sobota, Slovenská republika) nasledovné biochemické parametre:

- glykovaný hemoglobín (HbA1c) vyjadrený v %,
- celkový cholesterol vyjadrený v jednotkách mmol.l^{-1}
- lipoproteín s vysokou hustotou – HDL cholesterol vyjadrený v jednotkách mmol.l^{-1},
- lipoproteín s nízkou hustotou – LDL cholesterol

vyjadrený v jednotkách mmol.l^{-1},
- triacylglyceroly (TAG) vyjadrené v jednotkách mmol.l^{-1},
- močovina (urea) vyjadrená v jednotkách mmol.l^{-1},
- kreatinín vyjadrený v jednotkách µmol.l^{-1},
- alanínaminotransferáza (ALT) vyjadrená v jednotkách µkat.l^{-1},
- aspartátaminotransferáza (AST) vyjadrená v jednotkách µkat.l^{-1}.

Štatistická významnosť rozdielov / porovnaní medzi jednotlivými terapeutickými intervalmi / odbermi (pred začiatkom terapie, 6 mesiacov a 12 mesiacov terapie) bola stanovená pomocou štatistického testu ANOVA a Tukey *post-hoc* testom (MiniTab, Česká republika). Stupeň štatistickej významnosti bol stanovený hodnotou p na úrovni $p < 0,001$. Výsledky hladiny HbA1c, ako aj hladiny / aktivity vybraných biochemických parametrov boli spracované a uvedené vo forme grafov a tabuliek.

VÝSLEDKY

Pri sledovaní pacientov s diagnózou *DM* typu 2 s budúcou možnou perorálnou terapiou semaglutidom boli ako prvé orientačné parametre vyšetrené tlak krvi, hmotnosť a BMI.

Hodnota krvného tlaku pacientov bola zaznamenaná v pokojovom režime pacienta v sede, a to v intervale 120/85 mmHg – 160/90 mmHg (priemerne 140/86 mmHg) pred začiatkom terapie, v intervale 120/80 mmHg – 150/95 mmHg (priemerne 132/82 mmHg) po 6-mesačnej terapii a 100/70 mmHg –150 / 81 mmHg (priemerne 130/82 mmHg) po 12- mesačnej terapii. Priemerná zaznamenaná hodnota hmotnosti pacientov (n = 30) pred začiatkom terapie bola 115,4 kg; pri kontrolnom meraní po 6 mesiacoch terapie semaglutidom bola dosiahnutá priemerná hodnota hmotnosti 108,8 kg a po roku terapie klesla na 106,9 kg. Pri sledovaní hodnôt BMI pozorujeme pred začiatkom liečby extrémnu obezitu (BMI = ≥ 40) u 11 pacientov, čo predstavuje 36,3 %; obezitou I. stupňa (BMI = 30,0 – 34,9) trpelo 9 pacientov (30 %); obezitou II. stupňa (BMI = 35,0 – 39,9) 9 pacientov (30 %) a nadváha (BMI = 25,0 – 29,9) sa vyskytovala u 1 pacienta, čo predstavuje 3,33 %.

Po 6 mesiacoch terapie semaglutidom sa extrémna obezita vyskytovala u 8 pacientov, čo predstavuje 26,6 %; obezitu II. typu sme pozorovali u 8 pacientov (26,6 %) a obezita I. typu sa vyskytovala u 14 pacientov (46,6 %).

Po 12-mesačnej terapii semaglutidom sa výskyt extrémnej obezity znížil na 5 pacientov, čo predstavuje 16,6 %; obezita II. stupňa bola zaznamenaná u 10 pacientov (33,3 %); obezita I. stupňa bola u 13 pacientov (43,3 %) a pri 2 pacientoch (6,6 %) sme pozorovali nadváhu, a to znížením hodnôt BMI v intervale BMI = 25 – 29,9.

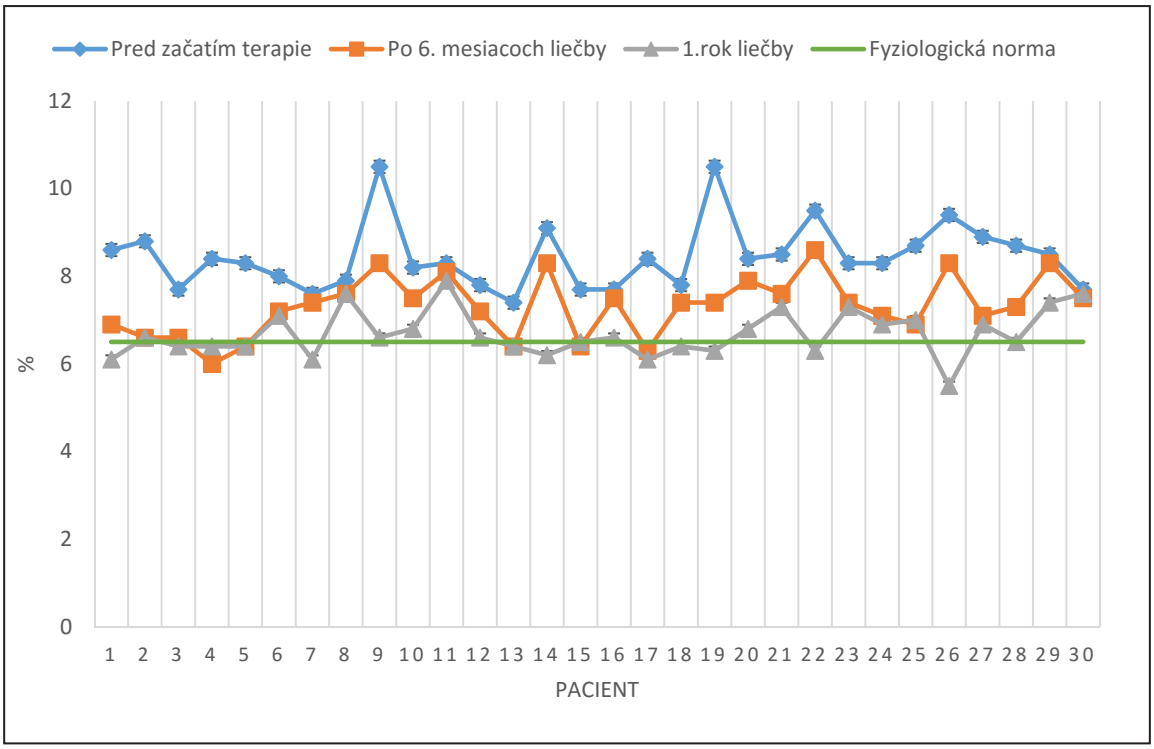
Ďalším sledovaným biochemickým parametrom bolo stanovenie celkového cholesterolu v intervale 2,94 mmol.l^{-1} – 6,92 mmol.l^{-1} (priemerne 4,89 mmol.l^{-1}) pred začiatkom terapie, v intervale 2,94 mmol.l^{-1} – 5,46 mmol.l^{-1} (priemerne 4,52 mmol.l^{-1}) po 6-mesačnej terapii a 2,33 mmol.l^{-1} – 6,26 mmol.l^{-1} (priemerne 4,44 mmol.l^{-1}) po 12-mesačnej terapii v porovnaní s referenčnými hodnotami hladín celkového cholesterolu = < 5,0 mmol.l^{-1}.

V rámci pozorovania hladiny HDL cholesterolu bola jeho koncentrácia zaznamenaná v intervale 0,60 mmol.l^{-1} – 1,60 mmol.l^{-1} (priemerne 1,13 mmol.l^{-1}) pred začiatkom terapie, v intervale 0,70 mmol.l^{-1} – 1,50 mmol.l^{-1} (priemerne 1,15 mmol.l^{-1}) po 6-mesačnej terapii a 0,70 mmol.l^{-1} – 1,93 mmol.l^{-1} (priemerne 1,20 mmol.l^{-1}) po 12-mesačnej terapii v porovnaní s referenčnými hodnotami hladín HDL = 1,0 – 2,70 mmol.l^{-1}.

Sledované hodnoty LDL cholesterolu sa nachádzali v intervale 1,51 mmol.l^{-1} – 4,0 mmol.l^{-1} (priemerne 2,77 mmol.l^{-1}) pred začiatkom terapie, v intervale 1,50 mmol.l^{-1} – 3,51 mmol.l^{-1} (priemerne 2,54 mmol.l^{-1}) po 6-mesačnej terapii a 1,0 mmol.l^{-1} – 3,33 mmol.l^{-1} (priemerne 2,58 mmol.l^{-1}) po 12-mesačnej terapii v porovnaní s referenčnými hodnotami hladín LDL= 1,0 – 3,0 mmol.l^{-1}.

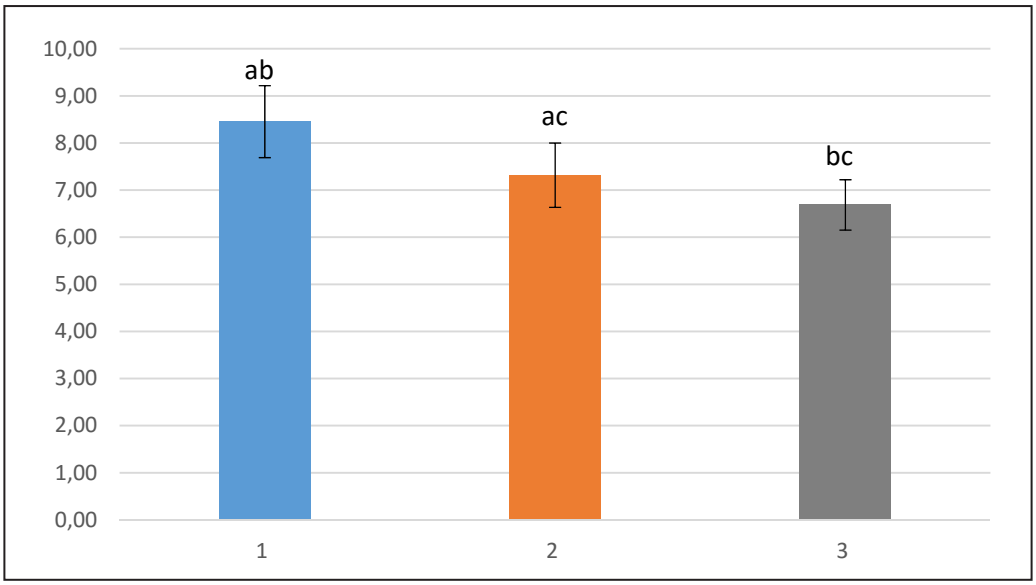
Následne sme pozorovali hladiny TAG, ktoré sa pohybovali v intervale 1,60 mmol.l^{-1} – 6,68 mmol.l^{-1}

Graf 1: Hladiny glykovaného hemoglobínu (HbA1c) počas ročnej terapie semaglutidom u pacientov s *diabetes mellitus* typu 2



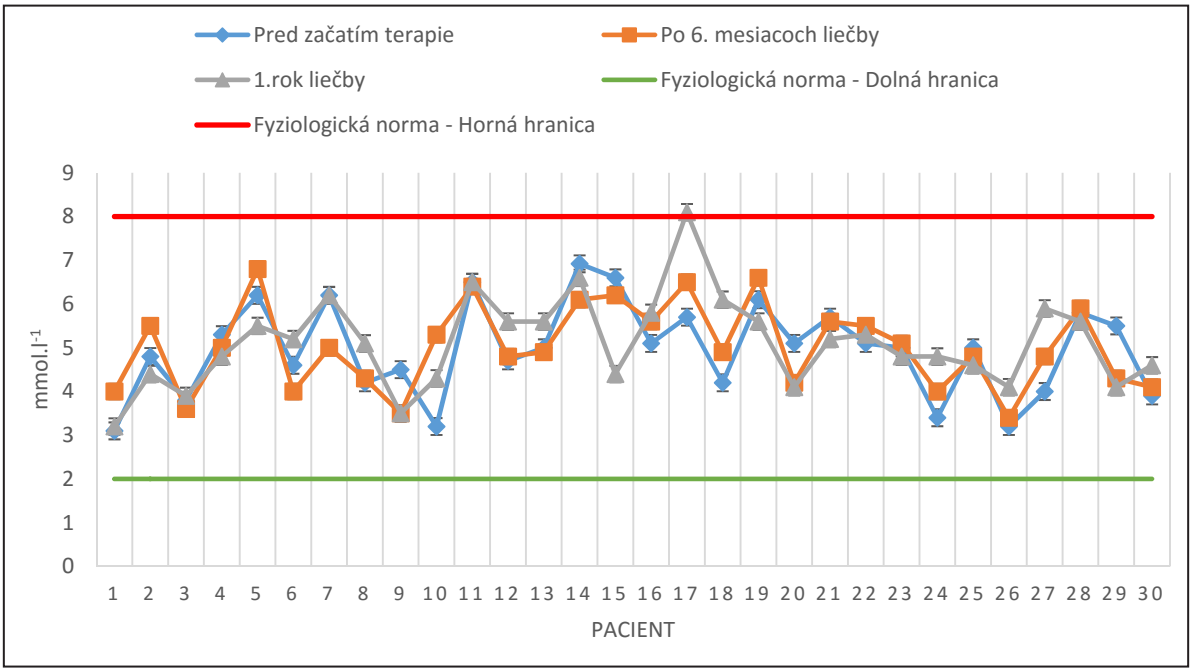
Referenčná hodnota HbA1c < 6,50 % ; HbA1c = glykovaný hemoglobín

Graf 2: Priemerná hodnota parametra HbA1C pacientov pred a po 6 a 12-mesačnej terapii semaglutidom



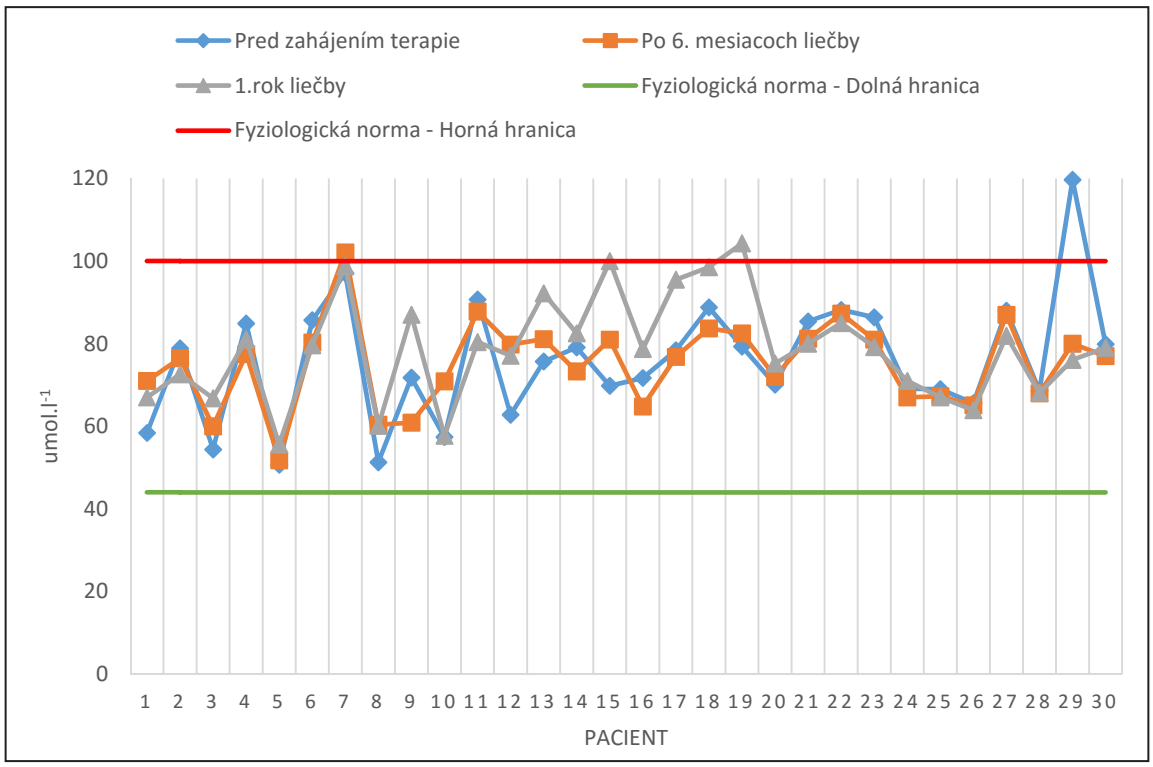
štatistická významnosť je vyjadrená hodnotou p na úrovni p < 0,001 (rovnaké písmená a, b alebo c vyjadrujú signifikantný vzťah medzi jednotlivými skupinami); 1 – pred terapiou; 2 – po 6-mesačnej terapii; 3 – po 12-mesačnej terapii

Graf 3: Hladiny močoviny (urea) počas ročnej terapie semaglutidom u pacientov s *diabetes mellitus* typu 2



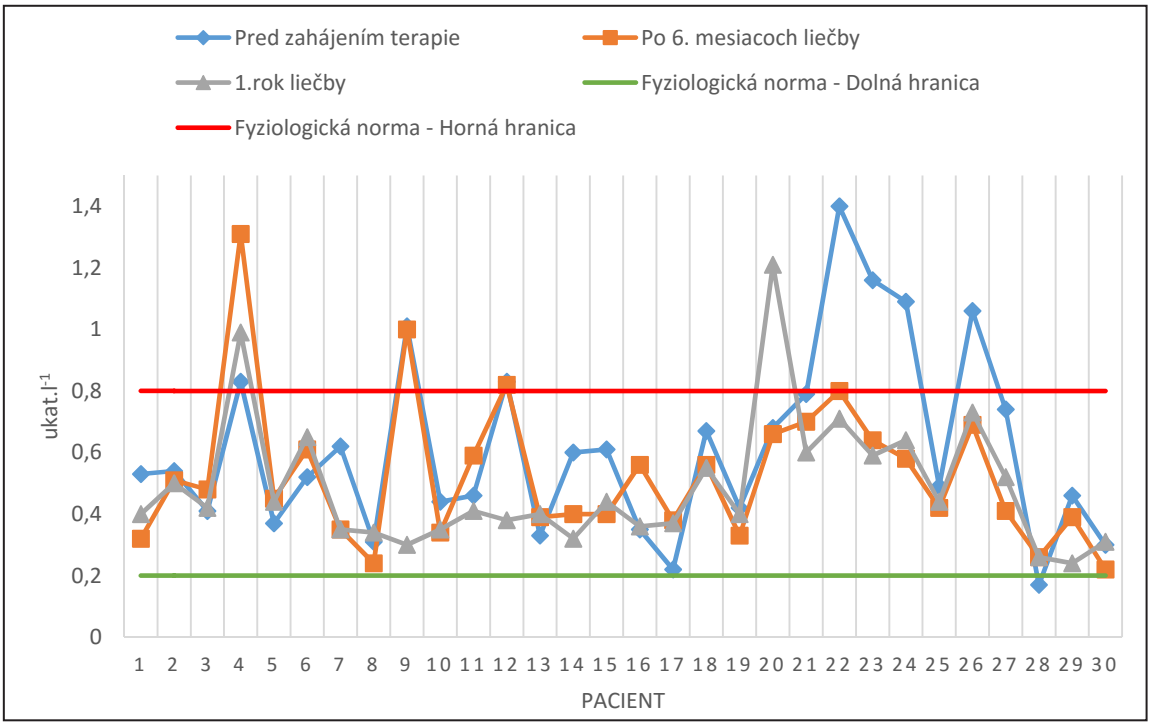
Referenčná hodnota urea = 2,0 – 8,0 mmol.l^{-1}

Graf 4: Hladiny kreatinínu počas ročnej terapie semaglutidom u pacientov s *diabetes mellitus* typu 2



Referenčná hodnota kreatinínu = 44,0 – 100,0 µmol.l^{-1}

Graf 5: Katalytická aktivita alanínaminotransferázy počas ročnej terapie semaglutidom u pacientov s *diabetes mellitus typu* 2



Referenčná hodnota ALT = 0,2 – 0,8 µkat.l^{-1}; ALT = Alaninaminotransferáza

(priemerne 2,56 mmol.l^{-1}) pred začiatkom terapie, v intervale 4,38 mmol.l^{-1} – 0,79 mmol.l^{-1} (priemerne 2,20 mmol.l^{-1}) po 6-mesačnej terapii a 0,96 mmol.l^{-1} – 5,47 mmol.l^{-1} (priemerne 2,13 mmol.l^{-1}) po 12-mesačnej terapii v porovnaní s referenčnými hodnotami hladín TAG = 0,45 – 1,70 mmol.l^{-1}.

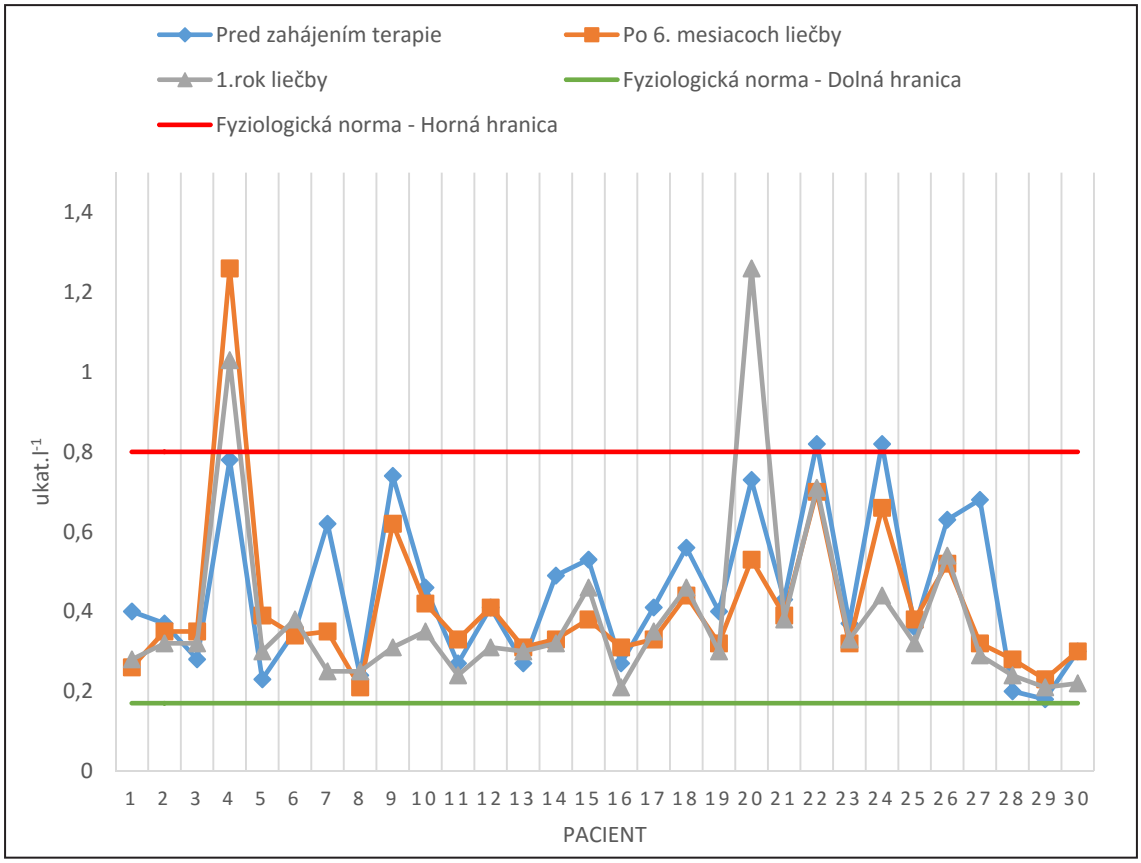
Pokles HbA1c do rozmedzia referenčnej hodnoty bol sledovaný u 60 % pacientov (18 pacientov z celkového počtu 30) počas terapie prebiehajúcej po dobu 1 roka. Štatistická významnosť ($p < 0,001$) sa potvrdila sledovaním vplyvu podávania semaglutidu na pokles priemernej hladiny glykovaného hemoglobínu po 6 (7,32 ± 0,68 %), ako aj po 12 mesiacoch (6,69 ± 0,53 %) v porovnaní so začiatkom terapie (8,45 ± 0,53 %). Zároveň bola zaznamenaná signifikancia ($p < 0,001$) medzi jednotlivými terapeutickými intervalmi, pričom pokles hladiny HbA1c sa pozoroval po roku terapie v porovnaní podávania semaglutidu po 6 mesiacoch u pacientov s diagnózou *DM* typu 2 (viď graf 1, 2).

Koncentrácie močoviny (mmol.l^{-1}; viď graf 3) a kreatinínu (µmol.l^{-1}; až na výnimku pacienta 19; viď. graf 4) dosahovali v priebehu terapie hodnoty patriace do intervalu fyziologickej normy.

Katalytická aktivita enzýmu ALT poukazujúca na činnosť hepatocytov bola vyhodnotená po 12-mesačnej terapii semaglutidom v rámci fyizologickej normy (94 %; okrem pacientov 4 a 20) v porovnaní pred začiatkom liečby u pacientov, t. j. pred podávaním semaglutidu, kedy 17 % pacientov vykazovalo zvýšenú katalytickú aktivitu ALT (viď graf 5).

Katalytická aktivita enzýmu AST (viď. graf 6) bola zaznamenaná po 12-mesačnej terapii v intervale referenčnej hodnoty (94 %; opäť okrem pacientov 4 a 20) v porovnaní pred terapiou. U oboch spomínaných pacientov (č. 4 a 20) sa vyskytuje pridružená diagnó-

Graf 6: Katalytická aktivita aspartátaminotransferázy počas ročnej terapie semaglutidom u pacientov s *diabetes mellitus* typu 2



Referenčná hodnota AST = 0,17 – 0,85 µkat.l^{-1}; AST = aspartátaminotransferáza

za nealkoholová steatohepatitída (NASH) a familiárna kombinovaná hyperlipidémia (FKH), čo môže mať za následok spomínané disbalancie v enzymatických aktivitách ALT a AST.

Podávanie semaglutidu v rámci terapie pacientov s *DM* typu 2 nemá negatívny vplyv na činnosť obličiek, lipidový metabolizmus, ako aj činnosť hepatocytov, kardiomyocytov a buniek kostrového svalstva.

DISKUSIA

Diabetes mellitus typu 2 je chronická metabolická porucha, ktorej prevalencia na celom svete neustále narastá. V dôsledku tohto trendu sa v niektorých krajinách sveta rýchlo stáva epidémiou, pričom sa očakáva, že počet postihnutých ľudí sa v nasledujúcom desaťročí zdvojnásobí, čím sa zvýši už existujúca záťaž pre poskytovateľov zdravotnej starostlivosti, najmä v slabo rozvinutých krajinách (Yach, a kol., 2004). *DM* typu 2 patrí do skupiny metabolických ochorení charakterizovaných hyperglykémiou. Nedostatočný účinok inzulínu je výsledkom poruchy sekrécie inzulínu a / alebo zníženej odozvy tkaniva na inzulín. Chronická hyperglykémia je spojená s dlhodobým poškodením, dysfunkciou a zlyhaním rôznych orgánov, najmä očí, obličiek, nervov, srdca a ciev (Genuth a kol., 2003). Hlavnou odporúčanou zmenou v diagnostických kritériách pre *diabetes mellitus* je zníženie diagnostickej hodnoty koncentrácie glukózy v plazme nalačno na 7,0 mmol.l^{-1} a viac z pôvodnej

hodnoty 7,8 mmol.l^{-1} a vyššie. V krvi je navrhovaná nová fyziologická hladina glukózy, a to 6,1 mmol.l^{-1} a viac, z pôvodných 6,7 mmol.l^{-1}. Tieto výsledky sa darí dosahovať aj pomocou vhodne zvolenej farmakologickej terapie (Alberti a Zimmet, 1998). Na liečbu *DM* typu 2 sú dostupné rôzne spôsoby liečby, perorálne aj injekčné. Na dosiahnutie vhodnej metabolickej kontroly a jej dlhodobé udržanie je nevyhnutná kombinácia zmien životného štýlu a farmakologickej liečby. Dosiahnutie fyziologickej hladiny Hb1Ac znižuje riziko výskytu makrovaskulárnych a mikrovaskulárnych komplikácií a vedie k dlhodobej kontrole nad ochorením *DM* typu 2 (Mazzone a kol.,2008).

Doporučené postupy čoraz viac zdôrazňujú dôležitosť multifaktoriálneho manažmentu *DM* typu 2, na rozdiel od tradičnejšieho zamerania sa na kontrolu glykémie. Mnoho liekov používaných na terapiu *DM* typu 2 sa môže použiť v kombinácii s rôznymi inými perorálne užívanými liekmi na dosiahnutie dôslednejšieho monitorovania kontroly hladiny glukózy v krvi. Lieky môžu byť podávané raz týždenne, čo je z hľadiska frekvencie užívania vhodná alternatíva v porovnaní s predchádzajúcim systémom. Zároveň sa dosiahne obmedzenie polyfarmakoterapie, čo nebolo možné pri dennej monoterapii (Khardori, 2015).

V súčasnosti je zaznamenaný zvýšený záujem o užívanie agonistov glukagón podobnému peptidu-1 (GLP-1, glucagon like peptide). Výskumy sa zamerali na vývoj agonistov receptora GLP-1 s menej častým dávkovaním s cieľom zlepšenia adherencie pacientov (Polonsky, 2011). Najnovším členom patriacim do skupiny GLP-1 je semaglutid obsiahnutý v lieku Ozempic. Semaglutid, agonista receptora glukagón podobnému peptidu, je indikovaný pre dospelých trpiacich *DM* typu 2 na zlepšenie kontroly glykémie ako monoterapia s odporúčanou diétou a pravidelnou fyzickou aktivitou, a to v prípade, ak je metformín kontraindikovaný, alebo ako prídavok k samotnému metformínu, prípadne v kombinácii s inými perorálnymi antidiabetikami či inzulínom (Goldenberd a Steen, 2009). Predĺžený účinok semaglutidu umožňuje jeho týždenné podávanie v dávkach stanovených v predklinických štúdiách u dospelých pacientov s *diabetes mellitus* typu 2. Jeho predĺžené uvoľňovanie umožňuje podávanie bez ohľadu na príjem potravy (Chudleigh a Bain, 2017).

U pacientov s nedostatočne kontrolovaným *DM* typu 2 bol pozorovaný výrazný pokles hladín glykovaného hemoglobínu HbA1c a výrazná strata hmotnosti v porovnaní s pacientmi užívajúcimi placebo (Gomez-Peralta, 2018); čo koreluje s výsledkami dosiahnutými v tejto štúdii.

Blundell, Finlayson, Axelsen v roku 2017 pozorovali zníženie chuti do jedla opísané ako možný mechanizmus zníženia telesnej hmotnosti, ktorý viedol k nižšiemu dennému príjmu energie (pokles o 24 %), zatiaľ čo neexistoval dôkaz o tom, že semaglutid vplýva na možné zvýšenie výdaja energie. Semaglutid sa taktiež podieľal na zlepšení stravovacích návykov pacientov, napr. znížením prijímania potravy s vysokým obsahom tukov (Blundell a kol., 2017).

Medzi prínosné účinky semaglutidu zaraďujeme aj jeho vplyv na hodnoty systolického a diastolického tlaku krvi, kde pacientom s dlhodobým podávaním semaglutidu (26 týždňov) klesol priemerný systolický krvný tlak z 135,6 mmHg (milimeter ortuťového stĺpca) na 132,2 mmHg (dávka semaglutidu 0,5 mg po dobu 26 týždňov) a 130,3 mmHg (dávka semaglutidu 1,0 mg po dobu 26 týždňov (Marso a kol., 2016).

Poznatky o priaznivých účinkoch GLP-1 na činnosť kardiovaskulárneho systému sú mimoriadne povzbudivé, čo môžeme potvrdiť poklesom priemernej hodnoty tlaku krvi u sledovaných pacientov, u ktorých sa znížil tlak krvi z pôvodnej hodnoty 140/86 mmHg na 130/82 mmHg v priemere, a to po ročnej terapii semaglutidom. Marso (2016) zaznamenal znížený výskyt kardiovaskulárnych príhod (nefatálna cievna mozgová príhoda, nefatálny infarkt myokardu) a boli zaznamenané signifikantne priaznivé účinky na funkciu obličiek, ako aj revaskularizáciu. Marso v roku 2016 pozoroval výskyt infarktu myokardu u 47 pacientov (2,9 %) v semaglutidovej skupine v porovnaní s jedincami v placebo skupine (64 osôb; t. j. 3,9 %). Pacienti užívajúci semaglutid mali o 26 % signifikantne nižšie riziko výskytu kardiovaskulárneho ochorenia (nefatálny infarkt myokardu, alebo

nefatálna mozgová príhoda). Riziko kardiovaskulárnych úmrtí bolo podobné v oboch skupinách, pričom úmrtia boli hlásené u 44 pacientov (2,7 %) v semaglutidovej skupine a 46 (2,8 %) v skupine s placebom (Marso a kol., 2016).

Na záver je možné konštatovať, že vplyvom semaglutidu na hladinu HbA1c v krvnom sére je možné prispieť k dosiahnutiu priaznivého terapeutického manažmentu v rámci metabolického ochorenia *diabetes mellitus* typu 2. Prostredníctvom úpravy životného štýlu, stravovania, pravidelným cvičením, abstinenciou fajčenia a znížením konzumácie alkoholu dochádza k významnému zníženiu výskytu tohto ochorenia.

ZÁVER

Cieľom tejto štúdie bolo sledovanie vplyvu podávaného semaglutidu na hladinu glykovaného hemoglobínu u pacientov s *diabetes mellitus* typu 2. U liečiv, ktoré regulujú glykémiu, je tento stav mimoriadne nebezpečný, užívanie antidiabetík si vyžaduje spoluprácu na úrovni lekár-pacient a dodržiavanie navrhovanej odbornej terapie. Túto úlohu spĺňa skupina liečiv pod názvom agonisti GLP-1, známi tiež ako „inkretínové mimetiká," ktoré zvyšujú sekréciu inzulínu, ako aj znižujú sekréciu glukagónu, spomaľujú vyprázdňovanie žalúdka, zlepšujú pocit sýtosti a môžu viesť k zníženiu hmotnosti pacienta. Agonisti GLP-1 receptora, vyžadujúci podávanie jeden alebo dvakrát denne, boli prvými rozvíjajúcimi sa liečivami v tejto triede liekov. Posledné výskumy sa zamerali práve na vývoj agonistov receptora GLP-1 s menej častým dávkovaním s cieľom zlepšenia adherencie pacientov. Dôležitým markerom *DM* typu 2 je sledovanie hodnôt glykovaného hemoglobínu – HbA1c, jedného z validných ukazovateľov dodržiavania terapie, či už farmakologickej alebo nefarmakologickej, pričom na základe získanej hodnoty HbA1c dokážeme posúdiť vhodnosť zvolenej terapie. U disciplinovaných pacientov sa pri terapii semaglutidom sleduje hladina HbA1c pohybujúca sa v intervale referenčnej hodnoty, čo sme mohli pozorovať aj u nami sledovaných pacientov. Výhodou podávania inkretínových mimetík sú ich priaznivé účinky na reguláciu systolického a diastolického tlaku krvi. U všetkých parametrov – HbA1c, celkový cholesterol, LDL, HDL, TAG, močovina, kreatinín, ALT a AST sme v priebehu celej terapie pozorovali priaznivý účinok semaglutidu, ako napríklad zníženie hmotnosti, BMI, ako aj krvného tlaku počas ročnej liečby. Avšak pre pacientov je často najťažšia časť terapie súvisiaca s dodržiavaním pravidelnej fyzickej aktivity a diétneho režimu. Daný fakt potvrdili aj dvaja pacienti z našej experimentálnej skupiny, a to pacienti 4 a 19, u ktorých sa v rámci komplikácie výskytu iných chronických ochorení, nedôsledného dodržiavania diéty a nedostatočne aktívneho životného štýlu nedosiahol požadovaný účinok semaglutidu na hladinu glykovaného hemoglobínu po dobu 1 roka. V súčasnosti je obezita zaradená v rámci jej výskytu ako civilizačnej choroby na popredné miesta. Obezita zohráva dôležitú úlohu v zaradení semaglutidu do terapie u pacientov trpiacich *DM* typu 2. Zníženie hmotnosti pri užívaní semaglutidu sa javí priaznivejšie v porovnaní s užívaním iných dlhodobo pôsobiacich GLP-1 agonistov pridaných v terapeutickom manažmente k bazálnemu inzulínu.

ZOZNAM LITERATÚRY

Alberti, K. G., Zimmet, P. Z.: Definition, diagnosis and classification of *diabetes mellitus* and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine*, 1998, 15 (7), 539 – 553. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9686693/. Accessed October 21, 2021.

Blundel, J., Finlayson, G., Axelsen, M., Flint, A., Gibbons, C., Kvist, T., Hjerpsted, J. B.: Effects of once-weekly semaglutide on appetite, energy intake, control of eating, food preference and body weight in subjects with obesity. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2017, 19 (9), 1242 – 1251. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5573908/. Accessed September 1, 2021.

Brown, R. E., Bech, P. G., Aronson, R.: Semaglutide once weekly in people with type 2 diabetes: Real-world analysis of the Canadian LMC Diabetes Registry (SPARE Study). *Diabetes, Obesity and Metabolism,* 2020, 22 (11), 2013 – 2020. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7689820/. Accessed September 27, 2021.

Dungan, K., Buse, J.: Glucagon-like peptide 1-based therapies for type 2 diabetes: a focus on exenatide. *Clinical Diabetes*, 2005, 23, 56 – 62.

Flegal, K. M., Carroll, M. D., Ogden, C. L., Johnson, C. L. Prevalence and trends in obesity among US adults 1999 – 2000. *JAMA*, 2002, 288 (14), 1723 – 1727.

Garber, A.: Long-acting glucagon-like peptide 1 receptor agonists: a review of their efficacy and tolerability. *Clinical Diabetes*, 2011, 34 (Suppl. 2), 279 – 284. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3632193/. Accessed November 11, 2021.

Genuth, S., Alberti, K. G. M. M., Bennett, P.: The expert committee on the diagnosis and classification of *diabetes mellitus*: Follow-up report on the diagnosis of *diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, 2003, 26, 3160 – 3167. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3006051/. Accessed December 19, 2021.

Goldenberg, R. M., Steen, O.: Semaglutide: Review and place in therapy for adults with type 2 diabetes. *The Canadian Journal of Diabetes*, 2009, 43 (2), 136 – 145.

Gomez-Peralta, F.: Recomendaciones de la Sociedad Española de diabetes (SED) para el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia en La diabetes tipo 2: Actualización 2018 [Spanish Diabetes Society (SED) recommendations for the pharmacologic treatment of hyperglycemia in type 2 diabetes: 2018 Update]. *Endocrinology Diabetes Nutrition*, 2018, 65 611 – 624.

Guariguata, D.: The International Diabetes Federation diabetes atlas methodology for estimating global and national prevalence of diabetes in adults. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2011, 94, 322 – 332. https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227(19)31230-6/fulltext. Accessed June 24, 2021.

Herman, W. H., Fajans, S. S.: Hemoglobin A1c for the diagnosis of diabetes: practical considerations. *Polish Archives of Internal Medicine*, 2010, 120, 37 – 40. https://www.mp.pl/paim/issue/article/877/. Accessed August 24, 2021.

Holst, J. J.: The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiological Reviews*, 2007, 87 (4), 1409 – 1439. https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00034.2006?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org. Accessed January 14, 2022.

Chudleigh, R., Bain, S. C.: Semaglutide BSC. Semaglutide. GLP-1 receptor agonist, treatment of type 2 diabetes. *Drugs of the Future*, 2017, 42 (8), 479.

Khardori, R.: Type 2 *diabetes mellitus* medication. *Medscape*, 2015, 41, 357 – 360.

Lau, J.: Discovery of the once-weekly glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue Semaglutide. *Journal of Medicinal Chemistry Impact*, 2015, 58, 7370 – 7380.

Marso, S. P, Bain, S. C., Consoli, A., Eliaschewitz, F. G., Jódar, E., Leiter, L. A., Lingvay, I., Rosenstock, J., Seufert, J., Warren, M. L., Woo, V., Hansen, O., Holst, A., G., Pettersson, J., Vilsbøll, T.: Semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 Diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 2016, 375, 1834 – 1844.

Massi-Benedetti, M.: Changing targets in the treatment of type 2 diabetes. *Current Medical Research and Opinion*, 2006, 22 (Suppl. 2), 5 – 13.

Mazzone, T., Chait, A., Plutzky, J.: Cardiovascular disease risk in type 2 *diabetes mellitus*: insights from mechanistic studies. *Lancet*, 2008, 371, 1800 – 1809. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2774464/. Accessed November 10, 2021.

Nathan, D. M., Turgeon, H., Regan, S.: Relationship between glycated haemoglobin levels

and mean glucose levels over time. *Diabetologia*, 2007, 50, 2239 – 2244. https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-007-0803-0. Accessed October 12, 2021.

Polonsky, W. H., Fisher, L., Hessler, D., Bruhn, D., Best, D. H.: Patient perspectives on once-weekly medications for diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2011, 13 (2), 144 – 149. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21199266/. Accessed January 1, 2022.

Romera, I., Cebrián-Cuenca, A., Álvarez-Guisasola, F., Gomez-Peralta, F., Reviriego, J.: A Review of practical issues on the use of glucagon-like peptide-1 receptor agonists for the management of type 2 diabetes. *Diabetes Therapy*, 2019, 10 (1), 5 – 19.

Shaw, J. E.: Impact of new diagnostic criteria for diabetes on different populations. *Diabetes Care*, 2011, 22, 762 – 766. https://diabetesjournals.org/care/article/22/5/762/20926/Impact-of-new-diagnostic-criteria-for-diabetes-on. Accessed November 20, 2021.

Tuomi, T.: The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *Lancet*, 2014, 383 (9922), 1084 – 1094.

Warren, M., Chaykin, L., Trachtenbarg, D., Nayak, G., Wijayasinghe, N., Cariou, B.: Semaglutide as a therapeutic option for elderly patients with type 2 diabetes: Pooled analysis of the SUSTAIN 1 – 5 trials. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2018, 20 (9), 2291 – 2297.

Yach, D., Hawkes, C., Gould, C. L., Hofman, K. J.: The global burden of chronic diseases: overcoming impediments to prevention and control. *JAMA*, 2004, 291 (21), 2616 – 2622.

Zimmet, P., Alberti, K. G., Shawn, J.: Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 2001, 414, 782 – 787. https://www.researchgate.net/publication/11615119_Zimmet_P_Albert_KGMM_Shaw_J_Global_and_societal_implications_of_the_diabetes_epidemic_Nature_414_782-787. Accessed July 1, 2021.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, IV., 2: 59 – 66, 2022

FIXNÉ KOMBINÁCIE LIEČIV VO FARMAKOTERAPII ARTÉRIOVEJ HYPERTENZIE

FIXED-DOSE COMBINATIONS IN PHARMACOTHERAPY OF ARTERIAL HYPERTENSION

Simić, Simona; Takáč, Peter

Katedra farmakológie a toxikológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

peter.takac@uvlf.sk

ABSTRAKT

Ochorenia kardiovaskulárneho systému sú na druhom mieste v rebríčku úmrtnosti. Dôvodom je aj stúpajúci vek obyvateľstva a s tým spojené zdravotné problémy. Cieľom lekárov pri vyšetrení je vyhodnotiť stav pacienta a nastaviť ho na najlepšiu terapiu. Najvyužívanejšou metódou diagnostiky vysokého krvného tlaku je jeho meranie. Po diagnostikovaní hypertenzie je na mieste výber terapie pre každého pacienta individuálne. Lekár si môže vybrať klasickú terapiu, teda jedno liečivo obsiahnuté v jednej tablete, alebo dve, resp. tri a viac liečiv obsiahnutých v jednej tablete, alebo inak povedané fixné kombinácie liečiv. Od 60-tych rokov 20. storočia sú k dispozícii aj fixné kombinácie liečiv. Odvtedy sú pozorované viaceré aspekty tejto terapie. Fixné kombinácie liečiv vykazujú nie len lepšiu compliance pacientov, ale aj lepšie výsledky. Samozrejme, že takáto terapia predstavuje aj isté negatíva ako každá iná, napr. nižšia možnosť titrácie dávky či vyššie náklady. Využívanými fixnými kombináciami v praxi na Slovensku sú inhibítory renín-angiotenzín-aldosterónového systému s diuretikami, duálna terapia diuretikami, blokátory kalciových kanálov s β-blokátormi, β-blokátory s diuretikami alebo trojkombinácia – inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu, diuretiká, blokátory kalciových kanálov. Cieľom našej štúdie je poukázať na potenciál využitia fixných kombinácií antihypertenzív v praxi. Za obdobie január 2020 – december 2020 sme získali 1288 receptov pomocou lekárenského počítačového programu NRSYS. Výsledky štúdie poukazujú hlavne na využívanie kombinácií inhibítorov renín-angiotenzín-aldosterónového systému s diuretikami. Pacienti vo vyššom veku majú viac zdravotných ťažkostí spojených s kardiovasku-

lárnym systémom, na čo poukazujú aj naše výsledky. Najviac pacientov liečených pomocou fixných kombinácií antihypertenzív bolo vo veku okolo 70 rokov. Spomedzi fixných dvojkombinácií sú najpredpisovanejšími inhibítory renín-angiotenzín-aldosterónového systému v kombinácii s diuretikami a trojkombináciami – kombinácia inhibítora angiotenzín-konvertujúceho enzýmu s diuretikom a blokátorom kalciových kanálov. Najpredpisovanejšou fixnou dvojkombináciou je Co-prenessa 4 mg/1,25 mg x 90 tabliet, a trojkombinácia Triplixam 5 mg/1,25 mg/5 mg x 30 tabliet.

Kľúčové slová: antihypertenzíva; fixné kombinácie liečiv; preskripcia

ABSTRACT

Diseases of the cardiovascular system are on the second place in the mortality ranking. The reason is also the growing age of the population and the associated health problems. The goal of the doctors during the examination is to evaluate the patient's condition and adjust him to the best therapy. The most commonly used method of diagnosing high blood pressure is it's measurement. After diagnosing the hypertension, it is appropriate to select the therapy for each patient individually. The physician can choose between the usual therapy by using a single medication or two and three or more drugs contained in one tablet, respectively. So-called fixed-dose combinations of drugs have also been on the market since the 1960s. Thenceforth, several aspects of this therapy have been observed. Fixed-dose combinations show not only better patient compliance but also better results. Of course, such therapy also entails certain negatives as any other therapy, e. g. lower dose titration or higher costs. The fixed combinations used in practice in Slovakia are: inhibitors of renin-angiotensin-aldosterone system with diuretics, dual therapy with diuretics, calcium channel blockers with β-blockers, β-blockers with diuretics or triple combination – inhibitors of angiotensin converting enzyme, diuretics, cakcium channel blockers. The aim of our study was to point out the potential use of fixed combinations of antihypertensives in practice. This was done by evaluations of 1288 prescriptions from January to December 2020 by using the pharmaceutical software NRSYS. The results of the study indicate the use of mainly the combinations of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors with diuretics. Older patients have more health problems with cardiovascular system, as evidenced by our results. Most patients treated with fixed combinations of antihypertensives were around 70 years old. Among the fixed dual combinations, the most prescribed are the renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors in combination with diuretics and triple combinations – angiotensin-converting receptor inhibitor with a diuretic and a calcium channel blocker. Co-prenessa 4 mg/1,25 mg x 90 tablets were the most prescribed from dually combined, whereas Triplixam 5 mg/1,25 mg 5 mg 30 tablets from triple combined preparations.

Key words: antihypertensives; fixed-dose combinations; prescription

ÚVOD

Liečivá sú v dnešnej dobe využívané v terapii rôznych chorôb. Pri kardiovaskulárnych ochoreniach nachádzajú svoje využitie najmä u starších pacientov. Najčastejšie choroby kardiovaskulárneho systému, ktoré môžu byť liečené pomocou liekov, sú *angina pectoris*, vysoký krvný tlak, infarkt myokardu či srdcová insuficiencia.

Medzi najviac využívané liečivá kardiovaskulárneho systému zaraďujeme: inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu, blokátory AT_1-receptorov, β-blokátory, diuretiká a blokátory kalciových kanálov.

Hypertenzia predstavuje závažný problém v dnešnej spoločnosti. V počiatočných štádiách sa

jedná o ochorenie, ktoré sa navonok neprejavuje. Dôvodom je asociácia so zvýšeným rizikom úmrtia, srdcovými chorobami či mozgovými príhodami. Okrem toho býva súčasťou iných ochorení, teda ako sekundárne ochorenie, napr. pri diabete. Celosvetovo patria kardiovaskulárne ochorenia na prvé priečky dôvodov úmrtia.

Vysoký krvný tlak sa ťažko kontroluje. Často je nutná kombinácia liečiv, minimálne dvoch. Z hľadiska compliance pacienta je v dnešnej dobe výhodná terapia pomocou fixnej kombinácie, čo znamená prítomnosť minimálne dvoch liečiv v jednej tablete. Dané liečivá pôsobia na inom mechanizme účinku, čo v prvom rade znamená nižšiu dávku liečiva a v druhom rade vyššiu pravdepodobnosť kontroly hypertenzie. Najviac frekventované kombinácie pri terapii hypertenzie sú diuretiká tiazidové / K-šetriace, β-blokátory / inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu.

Cieľom štúdie je poukázať na potenciál fixných kombinácií pri terapii artériovej hypertenzie.

MATERIÁL A METÓDY

Zdroje údajov boli získané z jednej lekárne v Košiciach použitím lekárenského počítačového programu NRSYS.

Údaje boli získané a vyhodnotené v období od januára 2020 do decembra 2020. Sledovaný súbor predstavoval 1288 receptov v Košiciach.

Z lekárenského systému NRSYS boli zistené aj doplňujúce informácie ako rodné čísla pacientov a z nich vypočítaný vek a pohlavie. Informácie boli spracovávané v súlade so zákonom č. 18/2018 Z. z. o ochrane osobných údajov a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov.

Z receptov spomedzi sledovaných hypertonikov sme sa zamerali na antihypetenzíva vo fixných kombináciách. Rozdelili sme si údaje na duálne a trojkombinácie. Zhodnotili sme konkrétne najpredpisovanejšie, resp. najviac sa opakujúce kombinácie. Sledovali sme aj diagnózy a zhodnotili ich nasledovne: našu hlavnú sledovanú skupinu predstavovali diagnózy od I10.00 – I15.00, a ako iné sme označili ostatné diagnózy z pozbieraných receptov. V prvom rade sme diagnózy zhodnotili v závislosti od pohlavia, ďalej podľa veku a pohlavia.

VÝSLEDKY

Z údajov na preskripčných záznamoch sme sa zamerali na antihypertenzíva vo fixných kombináciách. V prvom rade sme ich rozdelili na základe počtu liečiv vo fixných kombináciách, teda na duálne a triálne (viď nižšie). Nakoľko naše výsledky presahujú rozsah tohto článku, radi by sme ich zhrnuli v tomto odstavci. Na preskripčných záznamoch sme zhodnotili diagnózy. Našou hlavnou sledovanou skupinou boli diagnózy od I10.00 – I15.00, a ako iné sme označili všetky ostatné diagnózy. Najčastejšie písanou diagnózou boli diagnózy spomedzi poddiagnóz I10. Ďalej sme zhodnotili odbornosť lekárov preskribujúcich fixné kombinácie antihypertenzív. Najväčšie množstvo receptov v našom súbore receptov vystavili všeobecní lekári s počtom receptov 953. Okrem všeobecných lekárov predpisovali antihypertenzíva vo fixných kombináciách aj internisti (101), diabetológovia (27), kardiológovia (124). Ďalej môžeme spomenúť vekovú skupinu. Pozbierali sme širokú škálu pacientov, t. j. 29 – 96 rokov. Najväčšie množstvo receptov bolo vypísaných pre vekovú skupinu od 70 – 74 rokov. Zhodnotili sme na preskripčných záznamoch pohlavie pacientov, kde prevažovali ženy.

Duálne fixné kombinácie antihypertenzív

V tabuľke 1 sa nachádzajú najpredpisovanejšie duálne kombinácie antihypertenzív. Najpredpisovanejšou duálnou fixnou kombináciou je Co-prenessa 4 mg / 1,25 mg; táto fixná kombinácia obsahuje 4 mg perindoprilu, ktorý patrí k inhibítorom angiotenzín-konvertujúceho enzýmu a zároveň 1,25 mg indapamidu – diuretikum. Na druhom mieste sa nachádza fixná kombinácia perindoprilu s amlodipínom, ktorý zaraďujeme k blokátorom kalciových kanálov. Konkrétne šlo o liek s názvom Amlessa s množstvom 4 mg perindoprilu a 5 mg amlodipínu. Na treťom mies-

Tab. 1: Tri najpredpisovanejšie fixné dvojkombinácie antihypertenzív

ATC	NÁZOV	LIEČIVO	POZNÁMKA	POČET EXPEDOVANÝCH BALENÍ
HLC09BA04	CO-PRENESSA 4 mg/1,25 mg 90 tbl.	perindoprilterc-butylamín + indapamid	IACE + D	60
HLC09BB04	AMLESSA 4 mg/5 mg 90 tbl.	perindoprilerbumín + amlodipín	IACE + CCB	56
HLC09BB04	PRESTANCE tbl. 5 mg/5 mg 30 tbl.	amlodipín + perindoprilarginín	CCB + IACE	48

IACE – inhibítor angiotenzín-konvertujúceho enzýmu, D – diuretikum, CBB – blokátor kalciového kanála, tbl. – tablety

Zdroj: vlastný zdroj, www.adc.sk

Tab. 2: Najpredpisovanejšie fixné trojkombinácie antihypertenzív

ATC	NÁZOV	LIEČIVO	POZNÁMKA	POČET EXPEDOVANÝCH BALENÍ
HLC09BX01	TRIPLIXAM 5 mg/1,25 mg/5 mg 30 tbl.	Perindopril arginín + indapamid + amlodipínbesilát	IACE + D + CBB	24
HLC09BX01	CO-AMLESSA tbl. 4mg /5mg/1,25 mg 90 tbl.	Perindoprilerbumín + amlodipín + indapamid	IACE + CBB + D	18
HL09BX01	TRIPLIXAM 5mg /1,25 mg /5 mg 90 tbl.	Perindopril arginín + indapamid + amlodipínbesilát	IACE + D + CBB	16

IACE – inhibítor angiotenzín-konvertujúceho enzýmu, D – diuretikum, CBB – blokátor kalciového kanála, tbl. – tablety

Zdroj: vlastný zdroj, www.adc.sk

te z najpredpisovanejších duálnych fixných kombinácií sa nachádza liek Prestance s 5 mg perindoprilu a 5 mg amlodipínu.

Trojkombinácie antihypertenzív

V tabuľke 2 sa nachádzajú najpredpisovanejšie trojkombinácie antihypertenzív. Najpredpisovanejším liekom je Triplixam tbl. s obsahom 5 mg perindoprilu; 1,25 mg indapamidu a 5 mg amlodipínu. Druhými v poradí boli tablety Co-amlessa s obsahom 4 mg perindoprilu, 5 mg amlodipínu a 1,25 mg indapamidu. Na tretej priečke je Triplixam v rovnakej sile, avšak väčšie balenie. V našom celom súbore zozbieraných receptov sa nenachádzala triálna fixná kombinácia s inými liečivami ako perindopril, amlodipín a indapamid. Recepty boli zozbierané prostredníctvom lekárenského programu NRSYS.

DISKUSIA

Veľmi dôležitým faktorom pre dosiahnutie optimálnych výsledkov, či už pri hypertenzii alebo iných ochoreniach je adherencia pacienta k terapii. Adherenciu k liekom môžeme definovať ako správanie pacienta pri užívaní liekov. Hlavným bodom je komunikácia medzi pacientom a lekárom, ale aj farmaceut je dôležitou súčasťou tohto procesu. Tento proces je dynamický, nakoľko závisí aj od času. Štúdia z roku 2018 z Nového Zélandu dokazuje prínos lekárnikov v tejto oblasti. V štúdii sa zároveň odhaduje, že približne 50 % pacientov v rozvinutých krajinách dodržiava terapiu pri chronických ochoreniach (Milosavljevic, Aspden, Harrison, 2018). Tento problém by podľa nášho názoru mohlo ovplyvniť predpisovanie liekov FDC (fixné kombinácie liečiv), nakoľko to pre pacienta znamená menej užívaných tabliet.

FDC hrajú dôležitú úlohu pri liečbe vírusu ľudskej imunodeficiencie, malárie, tuberkulózy a kardiovaskulárnych chorôb, a teda významne prispievajú k zlepšeniu verejného zdravia. Za posledné dve desaťročia sa zvýšil počet FDC a pravdepodobne tento trend bude pokračovať z dôvodu rôznych výhod tejto formy terapie. V nedávnej metaanalýze bola terapia FDC spojená s výrazným zlepšením kompatibility pacientov s hypertenziou v porovnaní s kombinovanou terapiou s viacerými tabletami (Adis Medical Writers, 2013; Moon a Oh, 2016).

Usmernenia pre terapiu hypertenzie podľa Neutel z roku 2018 poukazujú na potrebu viacerých liečiv na zníženie TK (krvný tlak), najmä u rizikových pacientov. V praxi sa množstvo používaných FDC zvyšuje. FDC sú možnou terapiou pre ťažko liečiteľných pacientov, nakoľko takáto terapia zníži možnosť NÚ (nežiaduce účinky), zvýši compliance, zníži náklady na liečbu a zlepší cieľový TK.

Tumová a kol. z roku 2018 opisujú aj isté nevýhody spojené s užívaním terapie FDC. Medzi možné nevýhody patrí finančná záťaž pre pacientov pri terapii originálnymi FDC, identifikovanie liečiva, ktoré vyvolalo NÚ, alebo alergickej reakcie. Dôležitým faktorom je, aby lekár pri určení diagnózy a komorbidít sprevádzajúcich dané ochorenie zvážil prínos a riziko terapie.

Terapiu FDC podporuje aj ekonomický vplyv pre pacientov užívajúcich takúto terapiu. Štúdia z roku 2013 sledovala dôvod prechodu z terapie viacerých liečiv na terapiu FDC. Pre hypertonikov znamenala táto zmena aj pokles finančných nákladov až o 14 % (Akazawa a Fukuoka, 2013). Z výsledkov našej štúdie vyplýva, že takúto terapiu užívajú najmä starší pacienti, pre ktorých by tento prechod mohol znamenať aj ušetrenie financií.

V nasledujúcej časti uvádzam niektoré zistenia o efektivite FDC, aj keď mojím cieľom nebolo hodnotiť efektivitu danej terapie. Hlavným dôvodom je najmä fakt, že som nenašla dostupné práce, ktoré by sa zaoberali problematikou expedovania a spotreby antihypertenzív vo forme FDC.

Na základe štúdie z roku 2020 je napriek širokej dostupnosti účinných antihypertenzívnych liečiv kontrola TK neuspokojivá. Dostatočnú kontrolu TK dosahuje len 30 – 50 % liečených pacientov. Pozorované dôkazy naznačujú, že kombinovaná terapia skracuje čas potrebný na dosiahnutie kontroly TK, zvyšuje adherenciu k terapii, bezpečnosť aj znášanlivosť v porovnaní s monoterapiou. Odporúčanie znie zvážiť terapiu FDC v prvej línii u väčšiny pacientov s hypertenziou (Campana a kol., 2020).

Štúdia z roku 2021 sledovala dodržiavanie terapie antihypertenzívami FDC a monoterapie. Cieľom štúdie bolo porovnanie adherencie pacientov k danej terapii. Sledovaných bolo vyše 63-tisíc pacientov vo veku od 40 – 80 rokov v Taliansku. Štúdia mala zistiť či a do akej miery modifikovala počiatočná terapia adherenciu k liečbe antihypertenzívami. Vysoká adherencia k terapii antihypertenzívami bola u 46 % pacientov, z toho 54 % pri počiatočnej terapii FDC. Výsledky jasne poukazujú na lepšiu adherenciu pacientov k FDC terapii, v prípade, ak boli použité v prvej línii. Štúdia sledovala aj skupinu antihypertenzív užívaných pacientmi. Najpoužívanejšími skupinami predpisujúcimi FDC boli IACE alebo ARBS plus D a ARBS plus CCB (Rea a kol., 2021). V porovnaní s našou štúdiou, kde sa na prvom mieste umiestnili

FDC CCB + ARBS, a nasledovala FDC ARBS + D, môžeme poznamenať, že štúdie majú podobné výsledky.

Podľa štúdie Ishida a kol. z roku 2019, ktorí sledovali predpísané antihypertenzívne liečivá, boli spomedzi najpredpisovanejších FDC CCB + ARBS, a následne ARBS + D. V porovnaní s našimi výsledkami sú najpoužívanejšími IACE + D a IACE + CCB. V každom prípade sú vo vedení inhibítory RAAS. Z daných výsledkov sú inhibítory RAAS, CCB a D najpoužívanejšie liečivá v terapii hypertenzie.

Existujú viaceré štúdie podporujúce použitie terapie viacerými liečivami. Uvedieme si štúdie dokazujúce potrebu viacerých liečiv pri terapii hypertenzie: ALLHAT, ACCORD, HOPE, SPRINT. Vo všetkých spomínaných štúdiách boli potrebné minimálne dve a viaceré liečivá na adekvátnu kontrolu TK. Spolu s touto publikáciou by sme opäť radi poukázali na potrebu FDC, nakoľko to podporujú spomínané odporúčania od Widimský, Widimský, Jr. z roku 2016 (Widimský a Widimský, Jr., 2016; DiPette a kol. 2019).

V ďalšom odstavci uvádzame štúdie podporujúce terapiu FDC hypertenzie. Začneme štúdiou ASCOT-BLPA, ktorá sa zaoberala štúdiom kombinácie IACE/CCB a dokázala znížiť *DM* o 32 % v porovnaní s kombináciou BB/D. Podštúdia CAFE dokázala zo štúdie ASCOT prvý dôkaz o superiórnom efekte kombinácie IACE/CCB na zníženie centrálneho arteriálneho tlaku oproti kombinácii BB/D. Štúdia HAMLET z roku 2004 dokázala prospešnosť FDC, nakoľko nižšie hodnoty STK vykazovali pacienti s touto terapiou. Významnou štúdiou je štúdia ACCOMPLISH, ktorá ukázala, že FDC IACE/CCB bol lepší v znižovaní tlaku oproti IACE/D. Jednalo sa o veľkú randomizovanú kontrolnú štúdiu, kde bolo viac ako 70 % pacientov schopných dosiahnuť hodnoty TK pod 140/90 mmHg pomocou terapie FDC (Šuch, 2010; DiPette a kol., 2019).

V roku 2015 vyšiel článok o postavení FDC terapie pri hypertenzii. Zachytáva viaceré klinické štúdie sledujúce duálnu fixnú kombináciu liečiv pri hypertenzii. Kombinácie IACE + D sú zachytené štúdiami PROGRESS, ADVANCE a HYVET. Tieto štúdie sledovali účinnosť terapie FDC perindopril + indapamid verzus placebo. Rozdiel bol v skupinách pacientov, ktoré štúdie vybrali. V štúdii PROGRESS bol u sledovaných pacientov, ktorí prekonali cievnu mozgovú príhodu, zaznamenaný pokles TK o 9 mmHg. V štúdii ADVANCE sa u pacientov s *DM* zaznamenal pokles TK o 5,6 mmHg. V štúdii HYVET pacienti s AH vo veku nad 80 rokov vykazovali pokles TK o 15 mmHg. Nami spracované údaje poukazujú na využívanie tejto kombinácie v terapii FDC. Co-prenessa je na prvom mieste v rebríčku používanejších dvojkombinácií FDC. Štúdie SCOPE, LIFE opisujú užívanie ARBS + D. Štúdia SCOPE hodnotila pacientov s AH vo veku vyššom ako 70 rokov, ktorí využívali terapiu FDC kandesartan + HCTZ (hydrochlorotiazid) verzus D + placebo – výsledky poukazujú na pokles TK o 3,2 mmHg. V štúdii LIFE sledovali pacientov s AH a hypertrofiou ľavej srdcovej komory, využívali FDC losartan + HCTZ verzus BB + D, zachycujú pokles TK o 1 mmHg. Nami spracované údaje zachytili konkrétne 48 receptov kombinácie ARBS + D. Jedná sa konkrétne o Prestance 5 mg/5 mg 30 tabliet. Nachádza sa na štvrtom mieste najpredpisovanejších dvojkombinácií FDC. Kombinácie IACE + CBB zachycujú štúdie ASCOT a ACCOMPLISH, ktoré sledovali pacientov s AH. ASCOT skúmal účinok FDC perindopril + amlodipín verzus BB + D, ACCOMPLISH skúmal FDC benazepril + amlodipín verzus IACE + D. ASCOT pozoroval pokles TK o 3 mmHg a ACCOMPLISH o 1 mmHg. Ďalšou významnou štúdiou FDC je štúdia SHEP, ktorá sledovala kombináciu selektívneho BB a D, konkrétne atenolol + chlórtalidon verzus placebo. V štúdii boli zaradení pacienti s izolovanou systolickou hypertenziou. Výsledky tejto terapie poukázali na pokles tlaku o 13 mmHg. My sme zachytili ako najpredpisovanejšie kombinácie FDC BB + D – Lodoz 5 mg/6 mg a Nebilet HCTZ. Poslednou skupinou sú štúdie FDC blokátorov RAAS. ONTARGET vybrala vysoko rizikových pacientov. FDC použitá v štúdii bola telmisartan + ramipril verzus telmisartan alebo ramipril, sledovali pokles tlaku o 3 mmHg. ALTITUDE vyberala taktiež rizikových pacientov, avšak sledovala účinnosť FDC IACE ale-

bo ARBS + aliskiren verzus IACE alebo ARBS. Tlak sa znížil o 1,3 mmHg. My sme zachytili Co-prenessu 4 mg/1,25 mg ako najpredpisovanejšie FDC kombinácií RAAS (renín-angiotenzín-aldosterónový systém). Vo všetkých uvedených štúdiách sú spomínané systolické krvné tlaky (Sninčák, 2015). Spomínaným článkom sme chceli poukázať na efektívnosť využívania FDC v terapii hypertenzie najmä u rizikových pacientov.

V prípade nedostatočnej terapie duálnou kombináciou FDC je možné pacienta nastaviť na trojkombináciu FDC. Podľa Davis, Oparil z roku 2018 štúdia PIANIST sledovala účinok trojkombinácie FDC perindopril + amlodipín + indapamid. Pacienti zaradení do tejto štúdie dosahovali uspokojivé cieľové hodnoty TK. Najpredpisovanejšou triálnou fixnou kombináciou na základe nami získaných údajov bol Triplixam 30 tbl.

Z dôvodu šíriaceho sa ochorenia COVID-19 a celej pandemickej situácie sme pozbierali recepty len z jednej lekárne. Návrhom na prípadné rozšírenie tejto či už inej štúdie tohto žánru by bolo porovnať výsledky z minimálne dvoch lekární, resp. ambulancií, nakoľko sme aj my takýto výskum mali v pláne. Tieto štúdie by mohli mať zaujímavé výsledky, nakoľko by bolo zohľadnené širšie množstvo pacientov, resp. lekárov predpisujúcich takéto lieky.

ZÁVER

Cieľom našej štúdie bolo poukázať na potenciál využitia fixných kombinácií antihypertenzív v praxi. V našej štúdii sme vyhodnotili 1288 receptov pozbieraných z lekárne pomocou lekárenského systému NRSYS.

Z pohľadu skupín užívaných vo fixných kombináciách antihypertenzív sú podľa materiálov najpoužívanejšími IACE + D a ARBS + D, teda vedú inhibítory RAAS a diuretiká. Na prvom mieste sa umiestnil liek Co-prenessa 4 mg / 1,25 x 90 tbl. Spomedzi fixných antihypertenzív sa nám podarilo zozbierať jedine recepty s obsahom skupín IACE + D + CCB, konkrétne ako najpredpisovanejšia fixná trojkombinácia bol liek Triplixam.

Predpokladáme nárast v užívaní fixných kombinácií z dôvodu vyššej compliance pacientov a zvyšujúceho sa priemerného veku obyvateľstva v oblasti kardiovaskulárnych ochorení.

ZOZNAM LITERATÚRY

Adis Medical Writers: Improve adherence to antihypertensive therapy by using fixed-dose combinations. *Drugs & Therapy Perspectives*, 2013, 29, 25. https://www.researchgate.net/publication/287984693_Improve_adherence_to_antihypertensive_therapy_by_using_fixed-dose_combinations. Accesed August 31, 2021.

Akazawa, M., Fukuoka, K.: Economic impact of switching to fixed-dose combination therapy for Japanese hypertensive patients: a retrospective cost analysis. *Health Services research*, 2013, 13, 1, 4. https://www.researchgate.net/publication/236103367_Economic_impact_of_switching_to_fixed-dose_combination_therapy_for_Japanese_hypertensive_patients_A_retrospective_cost_analysis. Accessed September 14, 2021.

Campana, E., Cunha, V., Glaveckaite, S., Gruev, I., Lamirault, G., Lehmann, E., Masi, S., Mfeukeu, K. L., Mishenko, L., Ona, D., Oo, M. Z., Tautu, O. G. F., Valuchova, A., Vintila, A.-M., Wolf, J., Zvartau, N., Narkiewicz, K., Laurent, S.: The use of single-pill combinations as first -line treatment for hypertension: translating guidelines into clinical practice. *Journal of Hypertension*, 2020, 38, 2369. https://journals.lww.com/jhypertension/Abstract/2020/12000/The_use_of_single_pill_combinations_as_first_line.5.aspx. Accessed September 14, 2021.

Davis, J. Oparil, S.: Novel medication treatments for hypertension and related comorbidities. *Current Hypertension Reports*, 2018, 20, 5. https://link.springer.com/article/10.1007/s11906-018-0890-y. Accessed August 31, 2021.

DiPette, D. J., Skeete, J., Ridley, E., Campbell, N. R. C., Lopez-Jaramillo, P., Kishore, S. P.,

Jaffe, M. G., Coca, A., Townsend, R. R., Ordunez, P.: Fixed-dose combination pharmacologic therapy to improve hypertension control worldwide: Clinical perspective and policy implications. *Journal of clinical hypertension*, 2019, 21, 5, 8. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30480368/. Accessed September 1, 2021.

Guerrero-Garcia, C., Rubio-Guerra, A. F.: Combination therapy in the treatment of hypertension. *Drugs in context*, 2018, 7, 1, 3. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5992964/. Accessed August 11, 2021.

Ishida, T., Oh, A., Nishigaki, N., Tsuchihashi, T.: Treatment patterns of antihypertensive fixed-dose combinations according to age and number of agents prescribed: Retrospective analysis using a Japanese claims database. *Geriatrics & gerontology international*, 2019, 19, 1078. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31436025/. Accessed August 31, 2021.

Milosavljevic, A. Aspden, T., Harrison, J.: Community pharmacist-led interventions and their impact on patients‘ medication adherence and other health outcomes: a systematic review. *International Journal of Pharmacy Practise*, 2018, 26, 387. https://academic.oup.com/ijpp/article/26/5/387/6099602. Accessed September 14, 2021.

Moon, C., Oh, E.: Rationale and strategies for formulation development of oral fixed dose combination drug products. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2016, 46, 615 – 616. https://link.springer.com/article/10.1007/s40005-016-0286-4. Accessed August 31, 2021.

Neutel, M. J.: Prescribing patterns in hypertension: the emerging role of fixed-dose combinations for attaining BP goals in hypertensive patients. *Current medical research and opinion*, 2008, 24, 2387, 2392. https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1185/03007990802262457?journalCode=icmo20. Accessed September 14, 2021.

Rea, F., Savaré, L., Franchi, M., Corrao, G., Mancia, G.: Adherence to treatment by initial antihypertensive mono and combination therapies. *American Journal of Hypertension*, 2021, 1, 3. https://academic.oup.com/ajh/advance-article-abstract/doi/10.1093/ajh/hpab083/6284340?redirectedFrom=fulltext. Accessed September 14, 2021.

Snинčák, M.: Význam/postavenie fixných kombinácií v liečbe hypertenzie [Significance/position of fixed combinations in the treatment of hypertension]. *Medikom: edukafarm medinews*, 2015, 5, 24. https://www.edukafarm.sk/data/soubory//casopisy/mediNEWS/01-2015/04%20Snincak.pdf. Accessed September 14, 2021.

Šuch, S.: Fixné kombinácie kalciových blokátorov a inhibítorov angiotenzín konvertujúceho enzýmu v liečbe hypertenzie [Fixed combinations of calcium channel blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors in the treatment of hypertension]. *Via Practica*, 2010, 7, 135. https://www.solen.sk/storage/file/article/bbfc47b7312afaf57c41d0dd0f1dd45f.pdf. Accessed August 31, 2021.

Tumová, I.: Predstavujú fixné kombinácie sartanov s inými antihypertenzívami optimálnu liečbu hypertenzie?. [Are fixed combinations of sartans with other antihypertensives the optimal treatment for hypertension?]. *Praktické lekárnictvo*, 2018, 8, 4, 160. https://www.solen.sk/casopisy/prakticke-lekarnictvo/predstavuju-fixne-kombinacie-sartanov-s-inymi-antihypertenzivami-optimalnu-liecbu-hypertenzie. Accessed August 31, 2021.

Widimský, J. Widimský, J. Jr.: *Farmakoterapie hypertenze* [Pharmacotherapy of hypertension]. Česká republika: Maxdorf, 2016, s. 12, 13, 21, 132, 134.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, IV., 2: 67 – 81, 2022

MOŽNOSTI BIOLOGICKEJ LIEČBY METASTATICKÝCH KOLOREKTÁLNYCH NÁDOROV

POSSIBILITIES OF BIOLOGICAL TREATMENT OF METASTATIC COLORECTAL TUMORS

Feník, Jozef; Sučik, Monika; Valenčáková, Alexandra

Katedra biológie a fyziológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

alexandra.valencakova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Cieľom tejto štúdie je zhrnúť v súčasnosti dostupné poznatky o možnostiach biologickej liečby metastatických kolorektálnych nádorov so zameraním na humánne monoklonálne protilátky, charakterizovať prípravky, ktoré patria do cielenej liečby, opísať ich farmakologické účinky, vlastnosti, ale aj nežiaduce účinky spojené s ich aplikáciou. Uvádzame aj možnosti prevencie tohto ochorenia. Jedným z cieľov je zostaviť frekvenčnú analýzu incidencie a úmrtnosti na kolorektálny karcinóm a použitie jednotlivých cielených liečiv pri liečbe tohto ochorenia. Na zostavenie analýzy bola použitá vzorka 35 pacientov, ktorí sa v roku 2019 liečili v onkologickej ambulancii vo Vranove nad Topľou na kolorektálny karcinóm. 17 pacientov sa liečilo iba ambulantne a 18 pacientov využívalo aj možnosti ústavnej starostlivosti na onkologickom oddelení Nemocnice s poliklinikou v Trebišove. V uvedenej vzorke bolo 57,14 % mužov a 48,84 % žien. Najmladší pacient mal 38 rokov, najstarší 86 rokov. Obaja muži. Vekový priemer vo vzorke bol 64,1 roka. Najčastejšie používané cielené liečivá boli cetuximab a bevacizumab v kombinácii s chemoterapiou.

Kľúčové slová: cielená biologická liečba; hrubé črevo; konečník; metastatický kolorektálny karcinóm; nádor

ABSTRACT

This study summarises the currently available knowledge on the possibilities of biological treatment of metastatic colorectal tumours, focusing on human monoclonal antibodies; characterizes preparations belonging to targeted treatment,

describes their pharmacological effects, properties, and the side effects associated with their application. We also present the possibilities of preventing this disease. One of the goals is to compile a frequency analysis of the incidence and mortality of colorectal cancer and the use of individual targeted drugs in the treatment of this disease. A sample of 35 patients treated for colorectal cancer in an oncology clinic in Vranov nad Topľou in 2019 was used to compile the analysis. Seventeen patients were treated only on an outpatient basis, and 18 patients also used the possibilities of institutional care at the Hospital's oncology department with a polyclinic in Trebišov. 57.14 % were men in this sample, and 48.84 % were women. The youngest patient was 38 years old; the oldest was 86, both men. The average age in the sample was 64.1 years. The most commonly used targeted drugs were cetuximab and bevacizumab combined with chemotherapy.

Key words: colon; metastatic colorectal cancer; rectum; targeted biological treatment; tumour

ÚVOD

Kolorektálny karcinóm (KRK) je najčastejším nádorovým ochorením v Európe a tretím najčastejšie sa vyskytujúcim nádorovým ochorením na celom svete. Väčšina kolorektálnych karcinómov sa nachádza v hrubom čreve (*colon*), sú to karcinómy hrubého čreva a predstavujú 9 % všetkých typov nádorov v Európe. Približne jedna tretina kolorektálnych karcinómov sa nachádza iba v konečníku (*rectum*), známe ako karcinómy konečníka (ESMO, 2016).

Kolorektálny karcinóm je častejší u mužov ako u žien. V Európe sa kolorektálny karcinóm vyvinie v určitom čase života približne u jedného z 20 mužov a približne u jednej z 35 žien. Inými slovami, každoročne sa v Európe diagnostikuje kolorektálny karcinóm približne u 35 zo 100 000 mužov a približne u 25 zo 100 000 žien (Vavrečka, 2020). Celkovo je frekvencia kolorektálneho karcinómu vyššia v industrializovaných a urbanizovaných regiónoch. Väčšina pacientov s kolorektálnym karcinómom má v čase stanovenia diagnózy viac ako 60 rokov. Kolorektálny karcinóm sa vo veku do 40 rokov vyskytuje zriedkavo.

Celkové štatistiky vo výskyte kolorektálneho karcinómu na Slovensku sú alarmujúce. Každý rok je nádor hrubého čreva diagnostikovaný asi 5 tisícom pacientov. Koncom 20. storočia bola liečba kolorektálneho karcinómu takmer výlučne chirurgická. 21. storočie prináša aj iné, nechirurgické metódy liečby. Ide o rádioterapiu, chemoterapiu a cielenú liečbu (Šálek, 2017). Dôležitú úlohu zohráva prevencia. Kolorektálny nádor je typ nádoru, ktorému sa dá predchádzať zmenou životného štýlu. Medzi účinné prostriedky patrí hlavne správna výživa, nízkotučná strava, dostatok vápnika a vitamínov, správny pitný režim, vyhýbanie sa alkoholu a cigaretám, užívanie probiotík, aktívny pohyb a zdravý životný štýl.

Hrubé črevo má za úlohu predovšetkým zahusťovať črevný obsah a posúvať ho smerom do rekta. Na naplnenie tejto úlohy slúžia funkcie: absorpcia, motilita a sekrécia.

Špecifické postavenie má bakteriálna flóra hrubého čreva, ktorá má fyziologický, ale aj klinický význam. Až 50 % obsahu stolice tvoria baktérie. Pomer anaeróbnych a aeróbnych baktérií je 100 : 1. Baktérie v hrubom čreve majú tieto funkcie: syntéza biotínu, kyseliny listovej, vitamínu K, inhibícia rastu patogénnych mikroorganizmov, metabolizovanie žlčových kyselín, hydrolýza urey na amoniak (Prochotský, 2006).

Kolorektálny karcinóm je nádor vyvíjajúci sa v hrubom čreve. Podľa rozsahu ochorenia môžeme rozlíšiť štádiá ochorenia (KRK: Príručka pre pacientov, 2016):

V štádiu 0 je nádor postihujúci tú najvrchnejšiu vrstvu steny čreva alebo konečník. V tomto štádiu sa nádor odstraňuje chirurgicky (4 % pacientov).

Štádium I zasahuje do podslizničného tkaniva – submukózy, teda o jednu vrstvu hlbšie. Dosahuje svalstvo hrubého čreva alebo konečníka. Nádor je potrebné odstrániť chirurgicky spolu s lokálnymi lymfatickými uzlinami (32 % pacientov).

Tab. 1: TMN klasifikácia

T–primárny nádor	Klinická klasifikácia
TX	Primárny nádor nemožno hodnotiť
T0	Bez známok primárneho nádoru
Tis	Karcinóm *in situ*, intraepiteliálny alebo invázia do *lamina propria mucosae*
T1	Nádor postihuje submukózu
T2	Nádor postihuje *tunica muscularis propria*
T3	Nádor prerastá cez *muscularis propria* do subserózy alebo do neperitonealizovaného perirektálneho tkaniva
T4	Nádor priamo porušuje iné orgány alebo štruktúry a perforuje viscerálne peritoneum
N-regionálne lymfatické uzliny	
NX	Regionálne lymfatické uzliny nemožno hodnotiť
N0	V regionálnych lymfatických uzlinách bez metastáz
N1	Metastázy v 1 až 3 regionálnych lymfatických uzlinách
N2	Metastázy v 4 alebo viac regionálnych lymfatických uzlinách
M-vzdialené metastázy	
MX	Vzdialené metastázy nemožno hodnotiť
M1	Bez vzdialených metastáz
M2	Vzdialené metastázy

Zdroj: Jurga, 2010

Štádium II postihuje nielen svalstvo čreva, ale prerastá aj mimo neho (29 % pacientov). Zasahuje aj okolité orgány. Pri liečbe je potrebné chirurgicky odstrániť všetky postihnuté tkanivá. U niektorých pacientov je potrebné dodatočne aplikovať chemoterapiu, ak ide o nádor hrubého čreva. V prípade karcinómu konečníka je potrebná rádioterapia alebo rádioterapia v kombinácii s chemoterapiou.

Štádium III postihuje nielen okolie hrubého čreva, ale aj regionálne lymfatické uzliny (22 % pacientov). Je potrebné chirurgicky odstrániť nádory a tiež ďalšie postihnuté tkanivá. Následne je potrebné realizovať adjuvantnú terapiu, teda chemoterapiu na karcinóm hrubého čreva a rádioterapiu alebo chemoterapiu plus rádioterapiu na nádor konečníka.

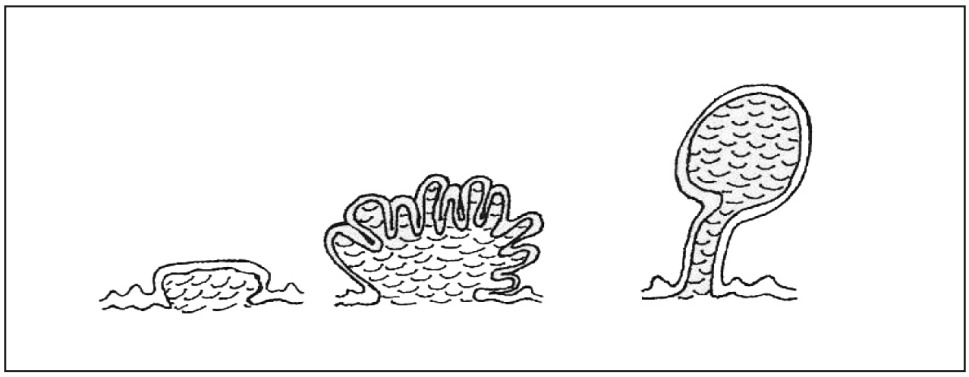
Štádium IV je charakteristické napadnutím vzdialených orgánov (zvyčajne ide o pečeň a pľúca) metastázami (13 % pacientov). Možnosťami liečby v tomto štádiu sú chemoterapia a cielená biologická liečba. Pomocou chemoterapie je možné redukovať veľkosť metastatických nádorov, aby sa následne dali operovať.

Karcinóm, ktorý sa rozšíri aj mimo hraníc hrubého čreva a blízkych lymfatických uzlín, označujeme termínom metastatický kolorektálny karcinóm – mKRK. Spravidla je klasifikovaný ako štádium IV. Z epidemiologických a genetických štúdií vyplýva, že mKRK je multifaktoriálne ochorenie.

Presnejšie zaradenie zhubných novotvarov umožňuje TMN klasifikácia (*tumor*, *nodus*, *metastasis*). V dnešnej dobe je štandardom v klasifikácii a identifikácii prognostických skupín, pričom zachováva kompatibilitu s predchádzajúcimi formami klasifikácie. V tabuľke 1 uvádzame TMN klasifikáciu podľa Jurgu (2010).

Karcinóm hrubého čreva patrí k závažným medicínskym problémom vo svete. KRK bol počas roku 2018 diagnostikovaný viac ako 1,8 miliónom pacien-

Obr. 1: Schéma prisadnutého, poloprisadnutého a stopkatého polypu



Zdroj: Prochotský, 2006

tov, pričom takmer polovica týchto pacientov v roku 2018 zomrela. Incidencia KRK v západnej a východnej Európe bola rovnaká: 28,8/100 000 obyvateľov, miera výskytu úmrtí na KRK v strednej a východnej Európe je 15,2/100 000 (Kohútek a Bystrický, 2019). V celosvetovom meradle pripadá Slovensku nelichotivé tretie miesto po Maďarsku a Južnej Kórei. Karcinóm hrubého čreva a konečníka je druhé a tretie najbežnejšie onkologické ochorenie u žien a mužov.

Miera incidencie kolorektálneho karcinómu štandardizovaná podľa veku je vyššia u mužov (20,6 na 100 000 jedincov) ako u žien (14,3 na 100 000). Väčšina pacientov so sporadickým výskytom nádorov má viac ako 50 rokov, pričom 75 % pacientov s karcinómom konečníka a 80 % pacientov s karcinómom hrubého čreva je v čase diagnózy starších ako 60 rokov (Šálek, 2017).

KRK je veľmi heterogénne ochorenie, ktoré je spôsobené interakciou genetických a environmentálnych faktorov a možno ho klasifikovať na základe dôležitosti každého z týchto faktorov. Väčšina KRK je sporadická (70 % − 80 %), pričom najdôležitejším rizikovým faktorom je vek. Iba malá časť prípadov je dedičného charakteru.

Už roku 1989 (Shimoda a kol., 1989) boli KRK klasifikované na polypoidné a nonpolypoidné. Polypoidné typy karcinómu hrubého čreva vznikajú na základe tzv. adenóm-karcinómovej sekvencie, ale nonpolypoidné karcinómy vznikajú *„de novo“*, teda priamo zo sliznice. KRK sa vyvíja postupnou akumuláciou genetických a epigenetických zmien, čo vedie k transformácii normálnej sliznice hrubého čreva na invazívny nádor. Väčšina KRK sa vyvíja z adenómov. Za dobu neoplastickej transformácie sa považuje približne čas 10 – 15 rokov. Je to čas dostupný na detekciu a odstránenie týchto adenómov pred ich progresiou do invazívneho karcinómu. Z epidemiologických štúdií (Prochotský, 2006) je dôležitý poznatok, že u 30 – 50 % jedincov celej populácie počas života vzniknú adenómy, ale len 5 – 6 % z nich sa vyvinie na kolorektálny karcinóm. Väčšina adenómov sa v priebehu života malígne nezvrhne.

Kolorektálny karcinóm teda vzniká väčšinou z polypov, ktoré sú definované ako protrúzie vyčnievajúce z povrchu sliznice alebo steny čreva (Prochotský, 2006). Podľa makroskopického vzhľadu sú polypy stopkaté, poloprisadnuté a prisadnuté (sesilné) (viď obr. 1).

Medzi rizikové faktory KRK patria endogénne aj exogénne faktory, ktoré pôsobia komplexne a v interakcii s molekulárnymi faktormi ovplyvňujúcimi prostredie epiteliálnych buniek čreva (Prochotský, 2006). Vplyv stravy na incidenciu KRK sa študuje už takmer 40 rokov. Doll a Peto (1981) uvádzajú, že

zmeny v diétnom režime by mohli viesť k 30 % poklesu incidencie KRK. Viacero vedeckých štúdií potvrdilo, že príjem ovocia a zeleniny (hlavne zelená a tmavožltá zo skupiny kapustovitých a strukoviny) pôsobí v prevencii nádorov na viacerých miestach organizmu vrátane gastrointestinálneho a respiračného traktu. Fyzická aktivita je dôležitou prevenciou vzniku KRK, najmä však karcinómu rekta. Nedostatok fyzickej aktivity, vysoký energetický príjem a obezita pôsobia synergicky ako rizikové faktory hlavne karcinómu konečníka. Nadmerné množstvo telesného tuku je rizikovým faktorom. V telesnom tuku sa totiž môže hromadiť viac karcinogénov. Zvýšená ponuka energie v tukových zásobách pôsobí stimulujúco na rozvoj KRK. Mieru obezity určuje BMI (Body Mass Index). Čím je jeho hodnota vyššia, tým je vyššie riziko vzniku KRK. Vplyv fajčenia na rozvoj rakoviny bol dokázaný už v päťdesiatych rokoch minulého storočia. Giovannucci a kol. (1992,1994) odhadujú, že 12 % úmrtí na karcinóm kolónu sa viaže na fajčenie. Fajčenie síce zvyšuje rakovinovú mortalitu u oboch pohlaví, ale riziko úmrtia fajčiarok na KRK je vyššie. Pedersen a kol. (2003) sa zaoberali vzťahom medzi množstvom a druhom konzumovaného alkoholu a KRK. Jedinci, ktorí pili týždenne viac ako 41 dávok alkoholických nápojov, mali riziko KRK 2,2-krát vyššie v porovnaní s tými, ktorí alkohol pravidelne nekonzumovali. Riziko vzniku KRK je vyššie pri užívaní piva a tvrdého alkoholu. Zvýšené riziko vzniku KRK oproti priemeru je u ľudí pracujúcich so syntetickými vláknami, v metalurgickom a textilnom priemysle. Vyššia incidencia bola zaznamenaná aj u hasičov, ľudí pracujúcich s azbestom, prípadne vystavených pôsobeniu sadzí a ťažkých olejov (Prochotský, 2006). K rizikovým faktorom môžeme zaradiť aj sedavý spôsob zamestnania. Riziko výskytu KRK je podľa Reensteina a kol. (1981) až 20-krát vyššie u jedincov s Crohnovou chorobou oproti bežnej populácii. Vyššie riziko vzniku KRK je tiež u pacientov s univerzálnou formou ulceróznej kolitídy. KRK môže vzniknúť aj po rádioterapii indikovanej pre rôzne druhy nádorov. Priemerný interval medzi rádioterapiou a diagnózou karcinómu sa pohybuje okolo 15 rokov. Taktiež imunosupresia využívaná po orgánovej transplantácii sa spája so zvýšenou incidenciou rôznych druhov karcinómov. Papaconstantinou a kol. (2004) uvádzajú, že chronická imunosupresia po orgánových transplantáciách prináša zvýšené riziko incidencie KRK, ktoré sú aj biologicky agresívnejšie.

Diagnostika kolorektálneho karcinómu spôsobuje častejšie ťažkosti vtedy, keď je pokročilý. Najčastejšími prejavmi sú zmeny pozorované v činnosti čriev a konečníka, nepríjemné pocity (diskomfort) v brušnej dutine, chudnutie a únava. Výstražným znamením môže byť prítomnosť krvi v stolici (Dobrovodská, 2017). Je možné pozorovať ju voľným okom alebo sa dá zistiť laboratórnym vyšetrením stolice. Lokalizáciu a veľkosť nádorov možno indikovať rôznymi metódami – endoskopiou alebo špeciálnym rádiologickým vyšetrením.

Dobrou metódou na určenie diagnózy vo vybraných situáciách je špeciálne vyšetrenie krvi na karcinogénny antigén (CEA), nádorový marker. Diagnóza je však potvrdená až laboratórnym vyšetrením karcinómu a poškodených tkanív (histopatológia).

Termín cielená biologická liečba sa používa na označovanie látok a postupov, ktoré selektívne účinkujú na ciele špecifické pre ochorenie, a to bez účinku alebo s minimálnym účinkom na normálne bunky. Pri nádorových ochoreniach boli identifikované viaceré bunkové a molekulárne ciele špecifické pre nádorové bunky pre rôzne typy nádorov. Najčastejšie molekulárne ciele využívané v klinike sú povrchové antigény, vasoendoteliálny rastový faktor, receptor pre epidermoidný rastový faktor a niektoré geneticky presne definované molekulárne abnormality. Bežná chemoterapia je zameraná prakticky na akékoľvek proliferujúce bunky, bez ohľadu na to, či sú nádorové alebo nie. Výsledkom je systémová toxicita. Cielená liečba je zameraná na špecifické ciele, má teda menej nežiaducich účinkov, ktoré sú zväčša (nie vždy) mierne a viaceré sú špecifické. Výskum zameraný na molekulárne ciele nádorových ochorení už priniesol výsledky. Niekoľko desiatok látok prišlo alebo prichádza do klinickej praxe. Asi 500 ďalších je v rôznych fázach

klinického výskumu (Beržinec, 2009).

Cielenú terapiu, ktorá sa používa v súčasnosti, tvoria prevažne dve skupiny látok. Sú to monoklonálne protilátky a malé molekuly.

Monoklonálne protilátky (bevacizumab, cetuximab, panitumumab) sa vyznačujú imunoglobulínovou podstatou. Sú to vlastne imunoglobulíny, ktoré sa získavajú klonovaním jednej plazmatickej bunky. Keďže ide o jednu plazmatickú bunku, majú rovnaké výkonné funkcie, primárnu štruktúru a rovnakú špecifickosť väzbových miest. Unikátna vlastnosť monoklonálnych protilátok je v tom, že majú presne definované vlastnosti a špecifickú väzbovosť na substrát, vďaka čomu neovplyvňujú iné molekuly.

Podľa Beržinca (2009) monoklonálne protilátky môžu účinkovať viacerými spôsobmi: podporujú protinádorový účinok imunitného systému väzbou na rastové faktory a ich receptory alebo priamym cytotoxickým účinkom pri konjugácii s rádioizotopom alebo toxínmi. V poslednom období sa postupne prechádza od vývoja chimérických protilátok (65 % humánnej zložky) k humanizovaným protilátkam (95 % humánnej zložky) až k plne humánnym (100 % humánnej zložky). Typy jednotlivých protilátok sa dajú rozlíšiť podľa koncovky. Humanizované protilátky majú koncovku: -**zumab**, plne humánne protilátky -**mumab** a chimérické majú koncovku -**ximab**.

Malé molekuly sú látky, ktoré účinkujú ovplyvnením tyrozínkináz, čím zasahujú do bunkových pochodov. Tyrozínkinázy sú enzýmy, ktorých úlohou je prenášať fosforovú skupinu z adenozíntrifosfátu na aminokyselinu v bielkovinách, nazývanú tyrozín. Tieto tyrozínkinázy v bunke spúšťajú zmeny, a tým ovplyvňujú prenos signálov pre proliferáciu, rast, migráciu a angiogenézu z receptorov v cytoplazme alebo v bunkovej membráne do jadra bunky. V porovnaní s monoklonálnymi protilátkami sa malé molekuly nepodávajú intravenózne, ale perorálne. Tiež majú menšiu špecifickosť. V dôsledku metabolizácie cytochrómom P450 môže pri nich vzniknúť nežiaduca interakcia s niektorými liekmi. Pri monoklonálnych protilátkach je polčas rozpadu niekoľko dní až týždňov, a preto ich je potrebné podávať v jednotýždňových alebo viactýždňových intervaloch. Pri malých molekulách je polčas rozpadu len niekoľko hodín, preto sa podávajú denne (Beržinec, 2009).

Inhibítory PD-1 (programovaná smrť buniek) je transmembránový glykoproteín, ktorý reguluje aktivitu na bunkách imunitného systému. Pomáha chrániť tieto bunky pred útokmi na iné bunky v tele. Blokovaním PD-1 tieto lieky zosilňujú imunitnú odpoveď proti zhubným bunkám. Dnes je na trhu známych 5 monoklonálnych protilátok, ktoré sú v klinickom skúšaní. Ide o atezolizumab, avelumab, durvalumab, nivolumab a pembrolizumab (Kocan a Babál, 2019).

Blokovaním PD-1 tieto lieky zosilňujú imunitnú odpoveď proti zhubným bunkám. Tieto lieky sa podávajú ako intravenózna (IV) infúzia každé 2 alebo 3 týždne. Vedľajšie účinky týchto liekov môžu zahŕňať únavu, kašeľ, nevoľnosť, svrbenie, kožnú vyrážku, zníženú chuť do jedla, zápchu, bolesť kĺbov a hnačku. Iné, závažnejšie vedľajšie účinky sa vyskytujú menej často.

Inhibítor CTLA-4 je cytotoxický proteín 4 asociovaný s T-lymfocytmi. Jeho inhibíciou dochádza k aktivácii imunitného systému. Ipilimumab je ďalšie liečivo, ktoré zosilňuje imunitnú odpoveď. Blokuje CTLA-4, ďalší proteín na T bunkách, ktorý ich zvyčajne udržiava pod kontrolou. Toto liečivo sa môže používať spolu s nivolumabom na liečbu kolorektálneho karcinómu, ale nepoužíva sa samostatne. Podáva sa ako intravenózna (IV) infúzia, zvyčajne raz za 3 týždne počas 4 ošetrení. Medzi najbežnejšie vedľajšie účinky tohto liečiva patrí únava, hnačka, kožná vyrážka a svrbenie.

Látky anti- VEGF sú zamerané proti cievnemu zásobeniu nádoru. Tým, že pôsobia proti vaskulárnemu endoteliálnemu rastovému faktoru (VEFG), spôsobia spomalenie šírenia nádoru a tiež spomalenie jeho rastu. Novovzniknuté, ale aj zdravé tkanivo potrebuje prísun kyslíka a živín z krvi pre svoj rast, v dôsledku čoho začína prostredníctvom VEGF vysielať signál pre zabezpečenie nových krvných ciev, aby mu zabezpečili potrebné látky. Vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF) je proteín, ktorý pomáha nádorom vytvárať nové krvné cievy (proces známy

ako *angiogenéza*). Angiogenéza je nevyhnutným procesom tak pre rast nádoru, ako aj pre metastatické šírenie chorôb. Nádory, ktoré sú väčšie ako 2 mm trpia nedostatkom živín a kyslíka. V dôsledku toho začínajú vo zvýšenom množstve vysielať VEFG, ktorý zabezpečí smerom k nádoru rast krvných ciev. Sieť ciev nádoru vytvára cestu, ktorou sa šíri v tele a vytvára metastázy. Látky blokujúce účinky VEFG vlastne inhibujú vznik nádorových ciev. Na nádor nepôsobia teda priamo, ale narúšajú výživu nádoru. Pri terapii karcinómu hrubého čreva a konečníka sa najčastejšie kombinujú s chemoterapiou oxaliplatiny a irinotekanu. Medzi látky anti-VEFG patria bevacizumab a aflibercept (Kohútek a Bystrický, 2019).

EGFR inhibítory pôsobia proti receptoru epidermálneho rastového faktora, čím dochádza k blokáde biologických procesov a prenosu signálu v bunke. Receptor epidermálneho rastového faktora (EGFR) je proteín, ktorý pomáha nádorovým bunkám rásť a nachádza sa na ich povrchu. Jeho funkcia súvisí s onkogénnom KRAS. Výskum ukazuje, že pri ľuďoch s mutáciami v KRAS (gén súvisiaci s EGFR) nemusia byť tieto inhibítory EGFR účinné. Rozhodujúci vplyv na klinickú účinnosť inhibítorov EGFR má teda tzv. RAS gén. Tento gén zohráva úlohu napríklad pri prežívaní bunky alebo pri jej delení. V nádorových bunkách sa vyskytuje v zmutovanej podobe alebo v nezmutovanej (divoký typ). EGFR inhibítory sú účinné iba pri nádoroch, v ktorých je nezmutovaný genóm RAS. Preto je potrebné otestovať pacientov pred začatím liečby na typ RAS génu. Medzi látky inhibujúce EGFR patria cetuximab a panitumumab. Podávajú sa intravenóznou infúziou, raz týždenne alebo každý druhý týždeň (Kohútek a Bystrický, 2019).

Regorafenib je typ cielenej terapie známy ako inhibítor kinázy. Kinázy sú proteíny na povrchu bunky alebo v jeho blízkosti, ktoré prenášajú dôležité signály do kontrolného centra bunky. Regorafenib blokuje niekoľko proteínov kinázy, ktoré buď pomáhajú nádorovým bunkám rásť alebo pomáhajú formovať nové krvné cievy, aby kŕmili nádor. Blokovanie týchto proteínov môže pomôcť zastaviť rast rakovinových buniek. Tento liek sa používa na liečbu pokročilého kolorektálneho karcinómu, zvyčajne keď už iné lieky nie sú užitočné. Berie sa ako tabletka (KRK, príručka pre pacientov 2016).

METODIKA PRÁCE A METÓDY SKÚMANIA

Informácie o cielených liečivách používaných pri liečbe metastatického kolorektálneho karcinómu sme získali na onkologickej ambulancii vo Vranove nad Topľou. V tejto ambulancii ordinujú lekári špecialisti, ktorí zároveň pôsobia na onkologickom oddelení Nemocnice s poliklinikou v Trebišove. Z dokumentácie o liečení jednotlivých pacientov sme vyhľadali pacientov s diagnózou C18 – C21.8, ktorí boli v ambulancii liečení v roku 2019. Vyselektovali sme takto vzorku 35 pacientov. Z údajov sme zistili vek, pohlavie, druh použitej liečby a úmrtnosť. V 28 prípadoch bolo toto ochorenie diagnostikované už pred rokom 2019 a v siedmich prípadoch išlo o nových pacientov, u ktorých bol KRK indikovaný až v roku 2019. 17 pacientov sa liečilo iba ambulantne a 18 využívalo podľa odporúčania lekárov aj ústavnú zdravotnú starostlivosť na onkologickom oddelení Nemocnice s poliklinikou v Trebišove. Informácie sme spracovali tabuľkovo aj graficky pomocou programu Microsoft Excel.

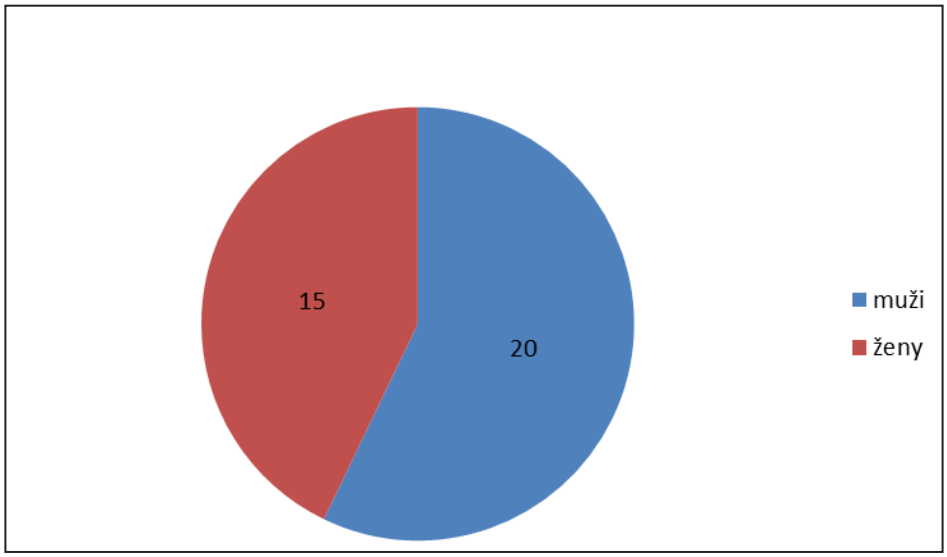
Z celkového počtu 35 pacientov bolo 20 mužov (57,14 %) a 15 žien (42,86 %); čo dokazuje teóriu, že KRK sa vyskytuje častejšie u mužov ako u žien (viď graf 1).

VÝSLEDKY

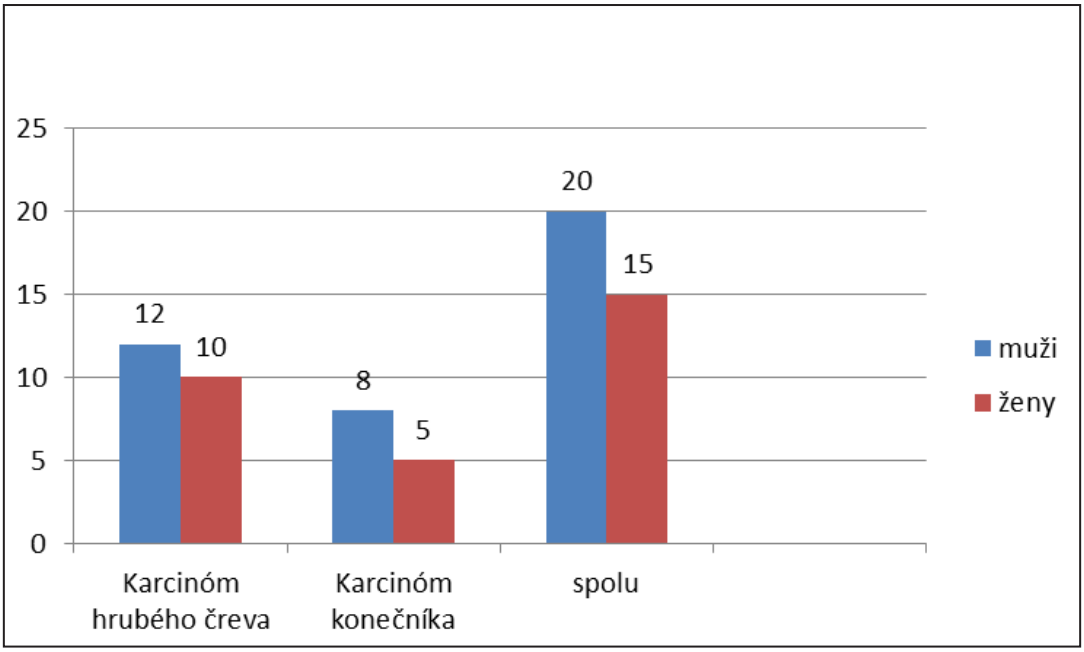
Incidencia kolorektálneho karcinómu

V roku 2019 sa liečilo vo Vranove nad Topľou na nádorové ochorenie hrubého čreva 12 mužov (60 % všetkých liečených mužov) a 10 žien (66,66 % všetkých liečených žien). Karcinómom konečníka bolo postihnutých 8 mužov (40 % všetkých liečených mužov) a 5 žien (33,33 % všetkých liečených žien; viď graf 2).

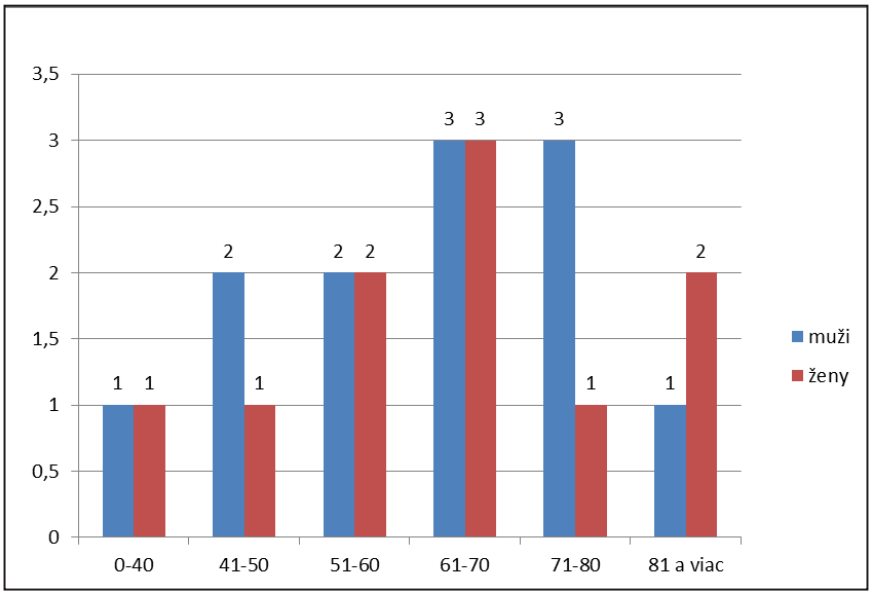
Graf 1: Zastúpenie mužov a žien s KRK



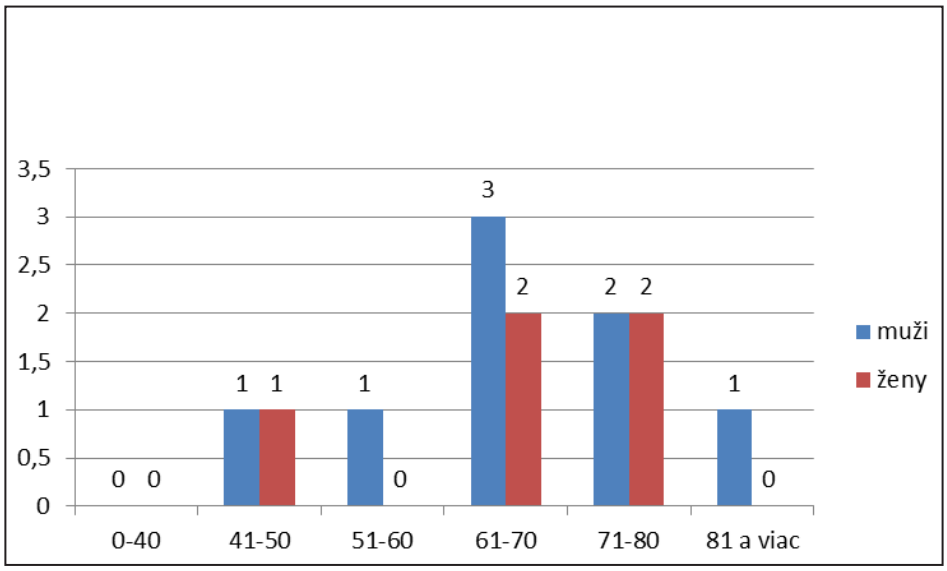
Graf 2: Incidencia kolorektálneho karcinómu



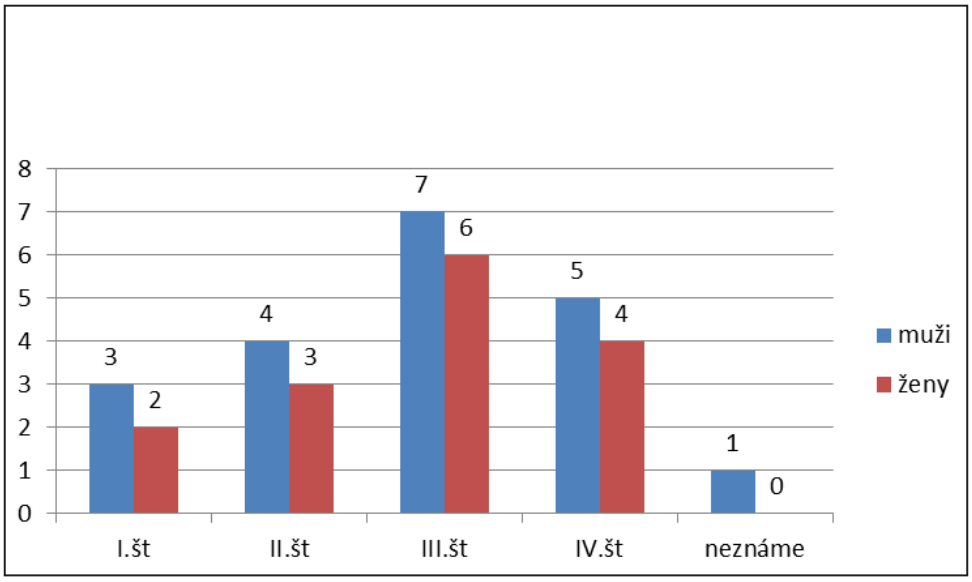
Graf 3: Veková štruktúra pacientov s karcinómom hrubého čreva



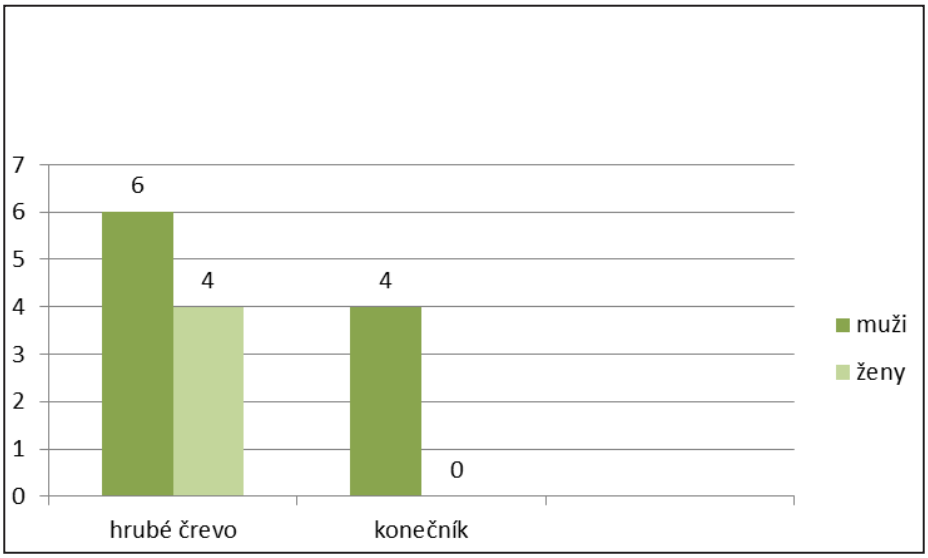
Graf 4: Veková štruktúra pacientov s karcinómom konečníka



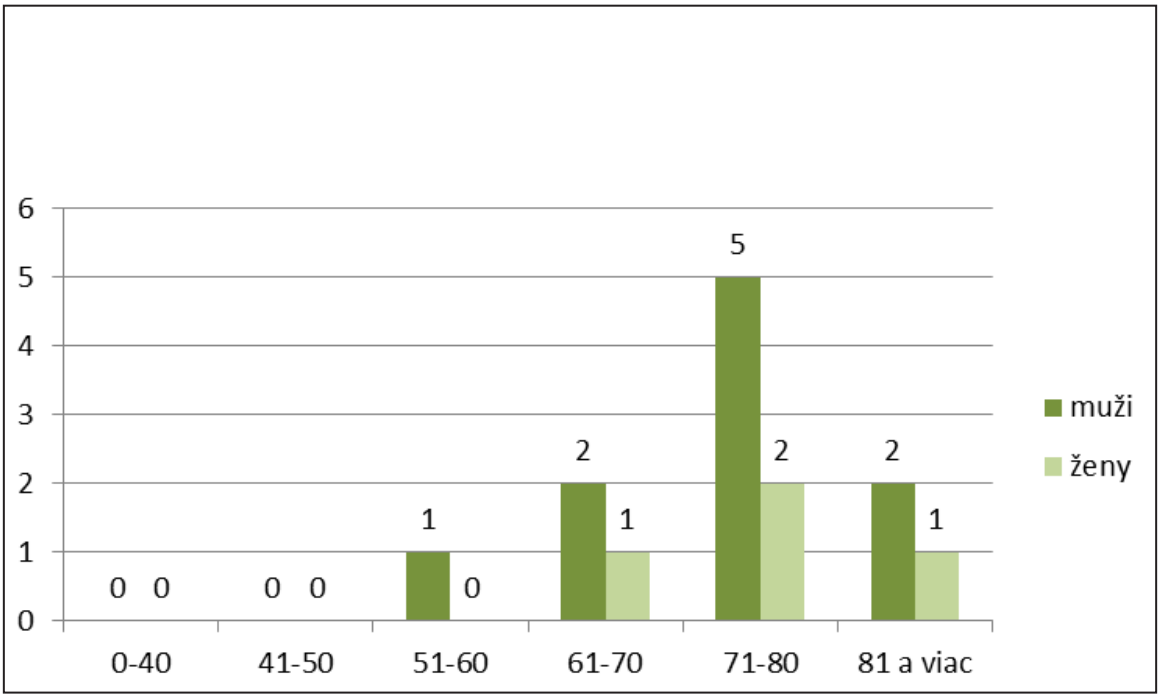
Graf 5: Výskyt kolorektálneho karcinómu v jednotlivých štádiách



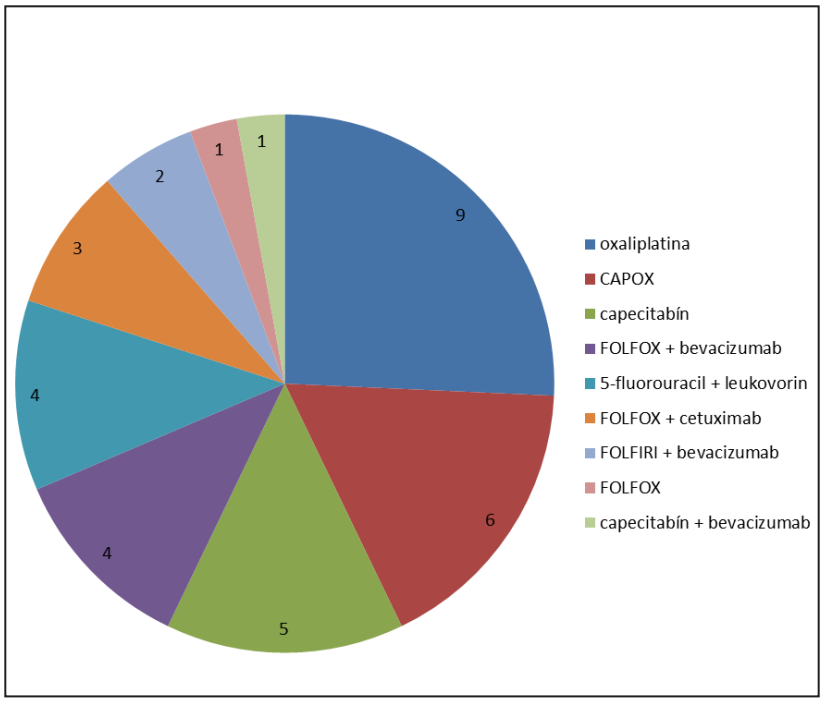
Graf 6: Úmrtnosť v dôsledku ochorenia na kolorektálny karcinóm



Graf 7: Veková štruktúra zomrelých pacientov



Graf 8: Účinné látky používané pri liečbe KRK



Veková štruktúra pacientov s karcinómom hrubého čreva

Najpočetnejšie zastúpenie medzi chorými bolo vo vekovej kategórii 61 – 70 rokov. Išlo o 6 pacientov (27,27 %); z toho boli 3 ženy. Rovnaké zastúpenie pacientov, 4 chorí, bolo vo vekovej kategórii 51 – 60 a 71 – 80 rokov, čo predstavovalo 18,18 %. Vo vekovej kategórii 41 – 50 a viac ako 81 rokov boli zastúpení traja pacienti (13,64 %). Kategória pacientov mladších ako 40 rokov bola zastúpená dvomi osobami, jedným mužom a jednou ženou (9,09 %). Najmladší pacient mal 38 rokov a najstarší 86 rokov. Vekový priemer pacientov s karcinómom hrubého čreva bol 62,6 rokov (viď graf 3).

Veková štruktúra pacientov s karcinómom konečníka

Medzi chorými na karcinóm konečníka bola najpočetnejšia veková kategória od 61 do 70 rokov, 5 osôb (38,46 %); z toho 2 ženy. Druhou najpočetnejšie zastúpenou vekovou kategóriou bola kategória od 71 – 80 rokov, 4 chorí (30,77 %). Dvaja pacienti boli vo veku 41 – 50 rokov (15,39 %) a v kategóriách veku od 51 až 60 a nad 80 rokov bol iba jeden pacient, muž (7,69 %). V najmladšej vekovej kategórii do 40 osôb sa nenachádzal žiaden pacient. Je pravdou, že tento druh nádorového ochorenia sa u ľudí mladších ako 40 rokov vyskytuje veľmi zriedkavo (viď graf 4).

Výskyt kolorektálneho karcinómomu v jednotlivých štádiách

Najviac ochorení sa vyskytovalo v treťom štádiu, až 13 pacientov (37,14 %); z toho 6 žien. Vo štvrtom štádiu choroby bolo 9 osôb (25,71 %); pričom z tohto počtu to boli 4 ženy. Ochorenie sa rozvinulo do druhého štádia u štyroch mužov a troch žien, čo predstavuje 20 %. Prvé štádium bolo indikované u piatich pacientov (14,29 %); z toho u 2 žien. U jedného pacienta (2,86 %) nebolo možné určiť štádium choroby (viď graf 5).

Úmrtnosť v dôsledku ochorenia na kolorektálny karcinóm

Mortalita tohto ochorenia je dosť vysoká. V našej vzorke to bolo až 14 pacientov, čo predstavuje 40 %. Karcinóm hrubého čreva bol príčinou úmrtia u desiatich pacientov, z toho bolo 6 mužov a 4 ženy. Vzhľadom na celkový počet úmrtí v danej vzorke je to 71,43 %. Štyria pacienti, všetko muži, zomreli na karcinóm konečníka. Percentuálne zastúpenie vzhľadom na celkový počet úmrtí je 28,57 %. Mortalita z hľadiska pohlaví je nižšia u ženského pohlavia a predstavuje 28,57 % (viď graf 6).

Veková štruktúra zomrelých pacientov

V skúmanej vzorke bola zaznamenaná najvyššia mortalita vo vekovej kategórii od 71 do 80 rokov. Išlo o 7 osôb (z toho 2 ženy), čo predstavuje 20 %. Vzhľadom na celkovú úmrtnosť vo vzorke je to až 50 %. Vo vekových kategóriách 61 až 70 rokov a viac ako 80 rokov bola úmrtnosť rovnaká (8,57 %); pričom bolo rovnaké aj zastúpenie žien (iba jedna žena) v oboch kategóriách. Vo vzťahu k počtu zomrelých pacientov je to 21,43 %. Vo veku 51 až 60 rokov zomrel len jeden muž (2,86 %). V porovnaní s počtom zomrelých osôb je to 7,41 %. U pacientov mladších ako 51 rokov nebolo zaznamenané žiadne úmrtie (viď graf 7).

Účinné látky používané pri liečbe KRK

Na liečbu kolorektálneho karcinómu vo vybranej vzorke bola u niektorých pacientov použitá monoterapia. Vždy išlo len o chemoterapiu, nie o biologickú liečbu. Najčastejšie sa však používa kombinácia chemoterapie s biologickými liečivami. Oxaliplatina bola použitá pri terapii u 9 pacientov, čo predstavuje 25,71 %. 6 pacientov bolo liečených kombináciou CAPOX, čo je capecitabín a oxaliplatina (17,14 %). Monoterapia capecitabínom sa podávala piatim pacientom (14,29 %). 5-fluorouracil + leukovorin + oxaliplatina (FOLFOX) v kombinácii s becacizumabom bol použitý v 4 prípadoch (11,43 %). Kombinácia 5-fluorouracil + leukovorin sa podávala 4 pacientom (11,43 %). 3 pacienti (8,57 %) boli liečení kombináciou FOLFOX + cetuximab. 5,71 % pacientov (2

osoby) sa liečili kombinovanou terapiou 5-flurouracil + leukovorin + irinotekan (FOLFIRI) + bevacizumab. FOLFOX bol použitý v jednom prípade (2,86 %). Rovnako jeden pacient (2,86 %) sa liečil kombináciou capecitabín + bevacizumab (viď graf 8).

DISKUSIA

Druhou najčastejšou príčinou úmrtia na Slovensku sú nádorové ochorenia. Napriek rozvoju vedy a medicíny zaznamenávame každým rokom pribúdanie týchto chorôb. Zaujímavosťou je, že ich výskyt je častejší vo vyspelých krajinách. Špecifické postavenie medzi nádorovými ochoreniami má karcinóm hrubého čreva a konečníka. Hlavnými príčinami jeho vzniku je zanedbávaná prevencia, nezdravý životný štýl a podceňovanie varovných príznakov. Spolu s karcinómom pľúc a karcinómom prsníka patrí medzi tri najčastejšie vyskytujúce sa nádorové ochorenia na Slovensku. Potešujúce pre slovenskú onkológiu je schválenie Národného onkologického programu (NOP) vládou Slovenskej republiky v roku 2018. Prioritným cieľom tohto programu je zníženie úmrtnosti v dôsledku nádorových ochorení. Naplnenie tohto cieľa vyžaduje prijatie mnohých opatrení nielen v oblasti medicíny, ale aj vo všetkých ostatných rezortoch. V rámci Národného onkologického programu bol v roku 2018 zahájený organizovaný skríning troch najčastejšie sa vyskytujúcich nádorových ochorení. Okrem popisu a mapovaniu slovenskej onkológie sa venuje aj podpore paliatívnej medicíny (NOP, 2018).

V štúdii sme sa zaoberali možnosťami liečby jedného z najčastejších nádorových ochorení na Slovensku, ale aj vo svete, liečbe metastatického kolorektálneho karcinómu mKRK. Z dôvodu získania informácií a reálnych podkladov sme navštívili onkologickú ambulanciu vo Vranove nad Topľou. Zo zdravotnej dokumentácie pacientov liečených v tejto ambulancii sme vybrali 35 pacientov s nádorovým ochorením hrubého čreva a konečníka. V čase zisťovania údajov bolo vo IV. štádiu choroby 9 pacientov, z toho 4 ženy. Podľa údajov z Národného onkologického registra je väčšina pacientov (80 – 90 %) s nádorovým ochorením kolorektálneho karcinómu starších ako 50 rokov. Zriedkavo sa môže vyskytovať aj u mladších pacientov, výnimočne u osôb do 40 rokov. Z našej vzorky 35 pacientov bolo 28 starších ako 50 rokov, čo predstavuje 80 %. Iba 7 pacientov (20 %) bolo mladších ako 50 rokov, dokonca dvaja z nich mladší ako 40 rokov. Najmladší pacient mal 38 rokov, najstarší 86 rokov. Obaja muži. Vekový priemer vo vzorke bol 64,1 roka.

Štatistiky v Národnom onkologickom registri uvádzajú častejší výskyt tohto ochorenia u mužského pohlavia. Aj v našej vzorke mali väčšinové zastúpenie muži. Z 35 pacientov bolo 20 mužov (57,14 %) a 15 žien (42,86 %). Pri skúmaní príčin úmrtia na nádorové ochorenie je kolorektálny karcinóm na druhom mieste u mužov aj u žien. U mužov je na prvom mieste karcinóm pľúc a u žien karcinóm prsníka.

Kolorektálny karcinóm bol v našej vzorke najrozšírenejší vo vekovej kategórii od 61 do 70 rokov u mužov aj u žien. Keď sme sledovali výskyt karcinómu konečníka, tak u mužov našej vzorky bola incidencia tohto ochorenia (61,54 %) vyššia ako u žien (38,46 %). Pri karcinóme hrubého čreva nebol rozdiel až taký výrazný. U mužov bol 54,55 % a u žien 45,45 %. Pri liečbe ochorenia u vybraných pacientov nebola použitá monoterapia biologickými preparátmi, iba v kombinácii s chemoterapiou. Najčastejším používaným chemoterapeutikom bola oxaliplatina a 5-fluorouracil. Išlo o dvojkombináciu + biologická liečba alebo o trojkombináciu + biologická liečba. Z biologických liečiv bol používaný cetuximab a bevacizumab.

Andrezálová-Vochyanová (2015) uvádza, že v čase diagnostikovania kolorektálneho karcinómu bolo 15 % pacientov v I. štádiu, 20 – 30 % pacientov v II. štádiu, 30 – 40 % pacientov v III. štádiu a 20 – 25 % vo IV. štádiu. Metastatické štádium sa vyvinie u 50 – 60 % pacientov, u ktorých bolo toto ochorenie indikované. Pri liečbe mKRK sa používa systémová terapia. Môže to byť monoterapia – chemoterapia alebo cielená liečba, ale aj kombinácia chemoterapie a biologickej liečby (Dolinský, 2011). V kombinácii s chemoterapiou sa najčastejšie používajú tri cielené liečivá. Bevacizumab (proti VEGF),

ktorý sa môže používať aj v skorších štádiách ochorenia. Je efektívny nezávisle od KRAS mutačného stavu. Účinnosť cetuximabu a panitumumabu (anti-EGFR) je limitovaná prítomnosťou mutácií KRAS onkogénu. Súčasné použitie monoklonových protilátok (anti-EGFR a VEGF) sa neodporúča vzhľadom na negatívne výsledky. Je potrebné používať tieto liečivá jednotlivo. Keďže cielená liečba pôsobí proti špecifickej molekule, očakáva sa od nej zvýšená efektivita a nižšia toxicita.

Metastatický kolorektálny karcinóm je vážne a v pokročilej fáze neliečiteľné ochorenie. Použitie akýchkoľvek medicínskych postupov v tomto štádiu chorobu nevylieči, iba o niekoľko mesiacov predĺži život a zlepší kvalitu života počas ochorenia. Nájsť optimálne riešenie pre každého jednotlivca nie je jednoduchá úloha. Je potrebné do istej miery zohľadniť aj ekonomické hľadisko. Účinné látky biologickej liečby sú finančne náročnejšie ako sú chemoterapeutiká. Použitie cielenej liečby teda zvyšuje náklady, preto je potrebné zvážiť, či ich použitie zvýši efektivitu liečby.

V prípadoch, keď nie je možné dosiahnuť úplné vyliečenie mKRK, je možné použiť aj postupy paliatívnej chemoterapie. Ak ochorenie pacienta neodpovedá na kuratívnu liečbu, vtedy je potrebné použiť paliatívnu chemoterapiu. Jej cieľom je zmierniť príznaky ochorenia, poskytnúť úľavu od bolesti a spolu s použitím iných liečebných postupov pomôcť pri predĺžení života. Hľadanie optimálneho liečebného režimu je závislé od mnohých faktorov: veku pacienta, štádia ochorenia, druhu nádoru, odpovede organizmu na liečbu a podobne.

ZÁVER

Hovorí sa, že zdravý človek má veľa želaní, ale chorý iba jedno: byť zdravý. V čase, keď nemáme žiadne zdravotné problémy, tak si svoje zdravie v podstate ani neuvedomujeme.

Cieľom našej štúdie bolo zhrnúť na základe dnes dostupných informácií možnosti biologickej liečby metastatických kolorektálnych nádorov. Za posledné desaťročie sa možnosti liečby rozšírili, najmä kombinovaná liečba pomocou chemoterapie s biologickými preparátmi a nové operačné techniky. Nie je možné definovať pre liečbu mKRK všeobecne platný postup. Výber systémovej liečby ovplyvňuje vek pacienta, jeho fyzická kondícia, výkonnostný stav, rozsah ochorenia, toxicita liečby, symptómy ochorenia a génový profil nádoru.

Kolorektálny karcinóm je ochorenie, ktoré sa môže týkať nás všetkých. Všetci sme potencionálnymi pacientmi. Veľký význam v boji s týmto ochorením má prevencia a skríning, ktorých cieľom je predchádzať vzniku nádorového ochorenia alebo ho zachytiť v skoršom, ešte liečiteľnom štádiu. V ostatnom období sa dostáva do popredia liečba, ktorú môžeme označiť ako prelomovú. Ide o modernú imunoterapiu, ktorej podstatou sú inhibítory kontrolných bodov imunitnej reakcie. Cieľom je naštartovať a obnoviť imunitný systém, ktorý by prispel k nastoleniu rovnováhy.

ZOZNAM M LITERATÚRY

Andrezálová-Vochyanová, I.: Optimalizácia liečby kolorektálneho karcinómu [Optimization of colorectal cancer treatment]. *Onkológia*, 2015, 10 (5), 308 – 312.

Beržinec, P.: Cielená biologická liečba najčastejších nádorových ochorení a jej vedľajšie účinky [Targeted biological treatment of the most common cancers and its side effects]. *Paliatívna medicína a liečba bolesti*, 2009, 2 (2),80 – 83.

Dobrovodská, P.: Krvácanie z dolnej časti gastrointestinálneho traktu [Bleeding from the lower gastrointestinal tract]. *Via practica*, 2017, 14 (3), 140 – 144.

Dolinský, J.: Biologická liečba kolorektálneho karcinómu [Biological treatment of colorectal cancer]. *Onkológia*, 2011, 6 (2), 92 – 98.

Doll, R., Peto, J.: Avoidables risks of cancer in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1981, 66, 1191 – 1193.

ESMO/ACF. Pacientské príručky [Patient

manuals], 2016. https://www.esmo.org. [cit. 2020-02-29].

Giovannucci, E., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Ascherio, A., Kearney, J., Willett, W. C.: A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal carcinoma in U.S women. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1994, 86, 192 – 199.

Giovannucci, E., Stampfer, M. J., Colditz, G., Rimm, E. B., Willett, W. C.: Relationship of diet to risk of colorectal adenoma in men. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84, 1992, 91 – 98.

Jurga, Ľ. M.: *Klinická a radiačná onkológia* [Clinical and radiation oncology]. 2. diel. Martin: Osveta, 2010. 938 – 940, 942 – 945.

Kocan, D., Babál, P.: Úloha imunitnej odpovede v prognóze kolorektálneho karcinómu.[The role of the immune response in the prognosis of colorectal cancer]. *Newslab.*, 2019, 10 (2), 90 – 93. https://www.newslab.sk/wp-content/uploads/2019/10/NEWSLAB_2-2019_Kocan.pdf. Accessed March 23, 2020.

Kohútek, F., Bystrický, B.: Anti-EGFR liečba pri kolorektálnom karcinóme: aká je jej úloha v súčasnosti a budúcnosti? [Anti-EGFR treatment for colorectal cancer: what is its role now and in the future?] *Onkológia*, 2019, 14 (5), 343 – 350.

Kolorektálny karcinóm: Príručka pre pacientov [Colorectal cancer: patient manual]. ESMO: European Society for Medical Oncology, 2016. http://www.esmo.org. [cit. 2020-02-26].

Národný onkologický program Slovenskej republiky [National Oncology Program of the SR]. Bratislava: Ministerstvo zdravotníctva, 2018. https://www.slov-lex.sk/legislativne-procesy/-/SK/LP/2018/446. [cit. 2020-03-05].

Národný onkologický register Slovenskej republiky, *Prezentácia výstupov* [National Oncology Register, Presentation of outputs]. Bratislava: Národné centrum zdravotníckych informácií, 2020. https://iszi.nczisk.sk/nor.sr/uvod. [cit. 2020-02-29].

Papaconstantinou, H. T., Sklow, B., Hanaway, M. J., Gross, T. G., Beebe, T. M., Trofe, J., Alloway, R. R., Woodle, E. S., Buell, J. F.: Characteristics and survival patterns of solid organ transplant patients developing *de novo* colon and rectal cancer. *Dis. Colon Rectum*, 2004, 47, 1898 – 1903.

Pedersen, A., Johansen, C., Gronbaek, M.: Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut*, 2003, 52, 861 – 867.

Prochotský, A.: *Karcinóm hrubého čreva a konečníka* [Colorectal cancer]. 1. vyd. Bratislava: Litera Medica, 2006. 652 s.

Reenstein, A. J., Sachar, D. B., Smith, H., Janowitz, H. D., Aufses, A. H. Jr.: A comparison of cancer risk in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Cancer*, 1981, 48, 2742 – 2745.

Shimoda, T., Ikegami, M., Fujisaki, J., Matsui, T., Aizawa, S., Ishikawa, E.: Early colorectal carcinoma with special reference to its development *de novo*. *Cancer*, 1989, 64, 1138 – 1146.

Šálek, T.: Nové možnosti v 3. a 4. línii liečby metastatického kolorektálneho karcinómu [New possibilities in the 3rd and 4th line of treatment of metastatic colorectal cancer]. *Onkológia*, 2017, 12 (4), 287 – 292.

Vavrečka, A.: Nové možnosti v 3. a 4. línii liečby metastatického kolorektálneho karcinómu [Nové možnosti v 3. a 4. línii liečby metastatického kolorektálneho karcinómu]. *Via practica*, 2010, 7 (1), 10 – 13.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, IV., 2: 82 – 95, 2022

FARMAKOLOGICKÉ ASPEKTY VYUŽITIA STRIEBORNÝCH NANOČASTÍC PRIPRAVENÝCH ZELENOU SYNTÉZOU

PHARMACOLOGICAL ASPECTS OF THE USE OF SILVER NANOPARTICLES PREPARED BY GREEN SYNTHESIS

Salayová, Aneta[1]; Filčáková, Zuzana[1]; Nosálová, Natália[2]; Stahorský, Martin[3]; Tkáčiková, Ľudmila[4]

[1]Katedra chémie, biochémie a biofyziky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
[2]Ústav farmakológie, Lekárska fakulta
Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Trieda SNP 1, 040 01 Košice
[3]Ústav geotechniky SAV
Slovenská Akadémia Vied, Watsonova 45, 040 01 Košice
[4]Katedra mikrobiológie a imunológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

aneta.salayova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Syntéza strieborných nanočastíc (AgNPs) pomocou rastlinného extraktu šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*) je spojením nanotechnológie a biotechnológie. Nanočastice pripravené zelenou syntézou pomocou rastlinných extraktov, enzýmov alebo mikroorganizmov predstavujú ekologickú alternatívu k fyzikálnym a chemickým metódam syntézy. Takto pripravené nanočastice majú potenciál pre biologické a lekárske aplikácie. Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať rôzne možnosti farmakologického využitia strieborných nanočastíc pripravených zelenou syntézou so zameraním na štúdium antimikrobiálnej, protinádorovej a antioxidačnej aktivity pripravených nanočastíc. Strieborné nanočastice (AgNPs) boli syntetizované redukciou prekurzora $AgNO_3$ s rôznou koncentráciou (1, 2 a 5 mmol.l^{-1}) vodným extraktom *Salvia officinalis* pri teplote 80 °C. Na charakterizáciu nanočastíc boli využité UV-Vis a fotónová krížovo-korelačná spektroskopia (PCCS). Antimikrobiálna aktivita bola stanovená voči dvom kmeňom (*S. aureus* a *E. coli*) pomocou agarovej difúznej metódy a protinádorová aktivita pomocou kolorimetrického MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-

-difenyltetrazolium bromid] testu na štyroch nádorových a dvoch nenádorových bunkových líniách. Pri stanovení antioxidačnej aktivity boli použité metódy DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl), FRAP (Ferric reducing antioxidant power) a ABTS [kyselina 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolín-6-sulfónová)] a bol stanovený aj celkový obsah fenolických látok (TPC) a flavonoidov (TFC). Zelený prístup k syntéze nanočastíc použitý v tejto štúdii je jednoduchý, lacný, bezpečný a neznečisťuje životné prostredie.

Kľúčové slová: antimikrobiálna aktivita; antioxidačná aktivita; *Salvia officinalis*; strieborné nanočastice; zelená syntéza

ABSTRACT

Synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using plant extract of sage (*Salvia officinalis*) is a combination of nanotechnology and biotechnology. Nanoparticles prepared by a green synthesis using plant extracts, enzymes or microorganisms represent an eco-friendly alternative to the physical and chemical methods of synthesis. The nanoparticles thus prepared have the potential for biological and medical applications. The aim of this study was to investigate various possibilities of pharmacological use of silver nanoparticles prepared by green synthesis with a focus on the study of antimicrobial, antitumor and antioxidant activity of prepared nanoparticles. Silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized by reducing a precursor $AgNO_3$ with different concentrations (1, 2 and 5 mmol.l^{-1}) with an aqueous extract of S*alvia officinalis* at 80 °C. UV-Vis and photon cross-correlation spectroscopy (PCCS) were used to characterize the nanoparticles. Antimicrobial activity was determined against two strains (*S. aureus* and *E. coli*) by agar well diffusion assay and antitumor activity by colorimetric MTT [3-(4,5-dimethylthiazol--2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide] assay on four tumor and two non-tumor cell lines. The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (Ferric reducing antioxidant power) and ABTS [2,2′-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] methods were used to determine the antioxidant activity, and the total content of phenolic substances (TPC) and flavonoids (TFC) were also determined. The green approach to nanoparticle synthesis used in this work is simple, cheap, safe and does not pollute the environment.

Key words: antimicrobial activity; antioxidant activity; green synthesis; *Salvia officinalis*; silver nanoparticles

ÚVOD

Nanotechnológia je jednou z najaktívnejších oblastí výskumu modernej vedy. Stredobodom záujmu nanotechnológií sú kovové nanočastice pre ich jedinečné fyzikálne, chemické a biologické vlastnosti, čím sa stali sľubným kandidátom na využitie vo farmaceutickom priemysle a medicíne (Gherasim a kol., 2020). Na prípravu kovových nanočastíc sa používajú rôzne metódy, ktoré sú rozdelené do dvoch hlavných skupín podľa veľkosti východiskových materiálov. Pri metóde zhora nadol (top-down) sa východiskové materiály zmenšujú na nano rozmery rôznymi fyzikálnymi, chemickými alebo mechanickými metódami, zatiaľ čo pri metódach zdola nahor (bottom-up) sú východiskovým materiálom atómy alebo molekuly. Sem patria aj metódy zelenej syntézy pomocou rôznych biologických systémov (Jamkhande a kol., 2019). Nanočastice pripravené zelenou syntézou prostredníctvom rastlinného extraktu sú oproti nanočasticiam pripraveným fyzikálnymi a chemickými metódami za použitia rôznych chemických činidiel netoxické a šetrnejšie k životnému prostrediu (Moulton a kol., 2010). Viaceré literatúry poukazujú na fakt, že nanočastice syntetizované pomocou rastlinného extraktu majú sľubné využitie v medicíne a farmácii najmä vďaka svojim antimikrobiálnym, antioxidačným a v neposlednom rade protinádorovým účinkom (Rafique a kol., 2017).

Striebro je známe už po stáročia svojimi antimikrobiálnymi účinkami. Ak je striebro transformované na nanočastice, jeho antimikrobiálne vlastnosti sú zintenzívnené, čo je využiteľné na účinnú elimináciu plesní, baktérií a vírusov (Ajayi a kol., 2017; Nisar a kol., 2019). Nanočastice striebra sa v súčasnosti osvedčili ako sľubná alternatíva k antibiotickej terapii z dôvodu možnosti ich použitia pri probléme s rozvojom rezistencie patogénnych mikroorganizmov voči bežne používaným liečivám. Z tohto dôvodu ich môžeme považovať za novú generáciu antimikrobiálnych látok (Rai a kol., 2012).

Rastlinný extrakt šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*) obsahuje množstvo látok, ktoré pôsobia nie len ako redukčné a stabilizačné činidlá počas syntézy, ale mnohé z nich aj ako prirodzené antioxidanty (Elia a kol., 2014). Podľa viacerých autorov sú tieto látky počas syntézy absorbované na povrchu nanočastíc, čím zabezpečujú ich antioxidačné vlastnosti (Bedlovičová a kol., 2020). Niekoľko štúdií odhalilo, že kovové nanočastice, ako napríklad striebro, vykazujú jedinečné cytotoxické účinky pri rakovinových bunkách bez významnej toxicity na zdravé bunky, čo v budúcnosti umožňuje ich využitie pri terapii rakoviny (Acharya a kol., 2021).

Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať možnosti syntézy kovových nanočastíc na báze striebra pomocou zelenej syntézy sprostredkovanej extraktom šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*). Následne boli študované optické vlastnosti (UV-Vis spektroskopia) a veľkosť častíc (PCCS metóda) pripravených strieborných nanočastíc. Farmakologické vlastnosti AgNPs boli študované z hľadiska ich antimikrobiálnej, antiproliferatívnej a antioxidačnej aktivity.

MATERIÁL A METÓDY

Chemikálie

Činidlá a rozpúšťadlá dusičnan strieborný (Slavus s. r. o., Slovenská republika); metanol p. a. (Mikrochem s. r. o., Slovenská republika); 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl – DPPH (Sigma Aldrich, USA); kyselina 2,2‘-azino-bis(3-etylbenzotiazolín-6-sulfónová) – ABTS (Sigma Aldrich, USA); 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboxylová kyselina – Trolox (Sigma Aldrich, USA); kyselina askorbová (Lach-Ner s. r. o., Slovenská republika); peroxodisíran draselný – $K_2S_2O_8$ (Acros Organics, Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvánia); uhličitan sodný, bezvodý (Mikrochem s. r. o., Slovenská republika); Folin–Ciocalteu reagenčné činidlo (Sigma Aldrich, USA); 2,4,6-tris(2-pyridyl)-*s*-triazín – TPTZ (Sigma Aldrich, USA); chlorid železitý (Mach chemikálie s. r. o, Česká republika); octan sodný (Lach-Ner s. r. o, Česká republika); kyselina chlorovodíková 35 % (Slavus s. r. o., Slovenská republika); kvercetín (Sigma Aldrich, USA); kyselina galová (Sigma Aldrich, USA); dusitan sodný p. a. (CentralChem s. r. o, Slovenská republika); hydroxid sodný, perličky (Mikrochem s. r. o, Slovenská republika); hexahydrát chloridu hlinitého (Acros Organics, Belgicko) a gentamicín sulfát (Sigma-Aldrich, USA) boli použité ako komerčné chemikálie bez ďalšieho čistenia. Zakúpená vzorka rastliny šalvia lekárska – vňať (Juvamed spol. s. r. o, Slovenská republika) bola použitá pre všetky experimenty bez ďalšieho sušenia.

Príprava extraktu šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*)

Extrakt bol pripravený v pomere 1 g vňate šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*) homogenizovanej v elektrickom mlynčeku (Bosch, Nemecko) a 20 ml destilovanej vody sonifikáciou počas 30 minút v ultrazvukovej vani (Sonorex Digitec, Bandelin electronic, Nemecko). Po ochladení bola suspenzia prefiltrovaná cez filtračný papier (Whatman č. 1) a extrakt použitý na syntézu nanočastíc a následné analýzy.

Príprava roztokov prekurzorov

Roztoky dusičnanu strieborného boli pripravené s koncentráciou 1,11; 2,22 a 5,55 mmol.l^{-1} v objeme 50 ml (resp. 250 ml). Takto pripravené roztoky dusičnanu strieborného boli uchovávané na tmavom mieste a použité na syntézu strieborných nanočastíc v deň prípravy.

Biosyntéza strieborných nanočastíc

Biosyntéza strieborných nanočastíc prebiehala priamo v kyvete v UV-Vis spektrofotometri s Peltierovým ohrevom (Cary 60, Agilent Technologies, USA). K syntéze strieborných nanočastíc boli použité rôzne koncentrované roztoky dusičnanu strieborného a extrakt šalvie lekárkej (*Salvia officinalis*). Najskôr sa v kremennej kyvete zahrialo 2700 µl roztoku dusičnanu strieborného na príslušnú teplotu (80 °C) a následne sa pridalo 300 µl vodného extraktu šalvie lekárskej. Priebeh reakcie bol zaznamenávaný meraním absorbancie v minútových intervaloch v rozsahu vlnových dĺžok 350 – 750 nm. Strieborné nanočastice boli pripravované aj vo väčšom objeme na potreby ďalšieho skúmania pridaním 27,8 ml vodného extraktu šalvie lekárskej k 250 ml roztoku $AgNO_3$ (5 mmol.l^{-1}) a zahrievaní pri teplote 80 °C po dobu jednej minúty. Roztok bol tri dni uchovávaný na tmavom mieste a následne centrifugovaný (Centrifuge 5430, Eppendorf, Hamburg, Nemecko) pri 7300 otáčkach po dobu 15 minút, dvakrát premytý vodou a vysušený v sušiarni do 45 °C. Izolované množstvo strieborných nanočastíc bolo 97 mg.

Antimikrobiálna aktivita

Antimikrobiálna aktivita strieborných nanočastíc bola stanovená pomocou agarovej difúznej metódy proti vybraným klinicky významným mikroorganizmom (*Staphylococcus aureus* CCM 4223, *Escherichia coli* CCM 3988), ktoré boli získané z českej zbierky mikroorganizmov (CCM, Brno, Česká republika). Vybrané baktérie boli za miešania aeróbne kultivované v živnom médiu (Oxoid, Basingstoke, UK) pri 37 °C a následne prenesené do kvapalného média. Pred použitím sa pripravené bakteriálne kultúry inkubovali 24 hodín a následne subkultivovali v kvapalnom médiu a opätovne inkubovali 24 hodín. Po inkubácii boli použité ako zdroj inokula pre stanovenie antimikrobiálnej aktivity. Po ukončení autoklávovania sa agarové médium ochladilo na 42 °C. Pred vyliatím 20 ml objemu média na Petriho misky o priemere 90 mm sa médium naočkovalo kvapalnou bakteriálnou kultúrou na bunkovú hustotu 5×10^5 CFU ml^{-1} a nechalo stáť cez noc. Do stuhnutého agaru boli následne vyrezané jamky o priemere 5,5 mm a naplnené 50 µl vzoriek. Ako štandard bol použitý gentamicín sulfát (10 mmol.l^{-1}). Po 24-hodinovej inkubácii pri teplote 37 °C boli vzorky vyhodnotené. Priemer inhibičnej zóny (IZD) sa meral z fotografií platní softvérom ImageJ 1.53e (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Priemerná hodnota IZD bola získaná z 3 stanovení. Antibakteriálna aktivita bola vypočítaná pomocou rovnice

$$\text{RIZD} = \frac{\text{IZD vzorka} - \text{IZD negatívna kontrola}}{\text{IZD gentamicín sulfát} - \text{IZD negatívna kontrola}} \text{ x } 100$$

kde RIZD je priemer relatívnej inhibičnej zóny (%) a IZD je priemer inhibičnej zóny (mm). Rastlinný extrakt bol použitý ako negatívna kontrola a gentamicín sulfát ako pozitívna kontrola. Výsledné hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± štandardná odchýlka (Salayová a kol., 2021).

Protinádorová aktivita

Stanovenie protinádorovej aktivity pripravených strieborných nanočastíc bolo v rámci spolupráce s Ústavom farmakológie Lekárskej fakulty UPJŠ v Košiciach. Testy boli uskutočnené na nádorových bunkách HeLa (bunky karcinómu krčka maternice), Jurkat (bunky akútnej T-lymfoblastovej leukémie), HCT (bunky kolorektálneho karcinómu), MCF-7 (bunky karcinómu prsníka ER-pozitívneho) a nenádorových HaCaT (nenádorové keratinocyty kože) a 3T3 (nenádorové myšacie fibroblasty). Proliferácia a viabilita buniek bola stanovená pomocou MTT kolorimetrického testu spektrofotometrickou analýzou po 72-hodinovej inkubácii. Nanočastice boli pripravené v koncentračnom rozmedzí 1 – 100 µmol.l^{-1} a výsledky boli vyhodnotené ako IC_{50}.

Stanovenie antioxidačnej aktivity DPPH metódou

Antioxidačná aktivita (AA_{DPPH}) bola stanovená spektrofotometricky na UV-Vis spektrometri (Shimadzu UV-1280, Shimadzu, Japonsko) s použitím stabilného radikálu DPPH (Brand-Williams a kol.,

1995). Pracovné roztoky boli pripravené zmiešaním 500 µl jednotlivých roztokov kyseliny askorbovej (1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 mmol.l^{-1}), 500 µl metanolu a 2 ml metanolového roztoku DPPH (0,1 mmol.l^{-1}). Rovnakým spôsobom bola stanovená aj antioxidačná aktivita čistého extraktu šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*) zriedeného 1 : 9, nanočastíc striebra a supernatantu po centrifugácii AgNPs s koncentráciou 2 a 5 mmol.l^{-1}. Kontrolný roztok DPPH (A_0) bol pripravený zmiešaním 1 ml metanolu a 2 ml roztoku DPPH (0,1 mmol.l^{-1}). Po 30 minútach státia v tme boli namerané absorbancie (A) pri 517 nm oproti metanolu trikrát pre každú vzorku. Schopnosť vychytávania DPPH radikálu (AA_{DPPH}) bola vyhodnotená podľa kalibračnej krivky a vyjadrená ako ekvivalent kyseliny askorbovej v mmol AAE/l.

Stanovenie antioxidačnej aktivity ABTS metódou

Antioxidačná aktivita (AA_{ABTS}) bola stanovená spektrofotometricky na UV-Vis spektrometri (Shimadzu UV-1280, Shimadzu, Japonsko) s použitím katiónradikálu $ABTS^{\bullet+}$, ktorý sa pripravil zmiešaním rovnakých objemov roztoku kyseliny 2,2‘-azino-bis(3-etylbenzotiazolín-6-sulfónovej – ABTS (7 mmol.l^{-1}) a $K_2S_2O_8$ (2,45 mmol.l^{-1}). Po 12 hodinách státia pri laboratórnej teplote sa 10 ml zásobného roztoku zriedilo metanolom na objem 100 ml. Takto pripravený pracovný roztok sa uchovával v chladničke a spotreboval do 16 hodín. Pracovné roztoky boli pripravené zmiešaním 100 µl jednotlivých roztokov Troloxu (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,025 mmol.l^{-1}) a 2700 µl pracovného roztoku $ABTS^{\bullet+}$. Rovnakým spôsobom bola stanovená aj antioxidačná aktivita čistého extraktu šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*) zriedeného 1 : 9, nanočastíc striebra a supernatantu po centrifugácii AgNPs s koncentráciou 2 a 5 mmol.l^{-1}. Po 120 minútach státia na tmavom mieste v uzavretých skúmavkách boli namerané absorbancie (A) pri vlnovej dĺžke 734 nm trikrát pre každú vzorku. Kontrolný roztok (A_0) bol pripravený zriedením 2700 µl pracovného roztoku ABTS so 100 µl vody. Antioxidačná aktivita (AA_{ABTS}) jednotlivých testovaných vzoriek bola vyhodnotená podľa kalibračnej krivky a vyjadrená ako ekvivalent Troloxu v mmol TE/l (Thaipong a kol., 2006).

Stanovenie antioxidačnej aktivity FRAP metódou

Antioxidačná aktivita (AA_{FRAP}) bola stanovená spektrofotometricky na UV-Vis spektrometri (Shimadzu UV-1280, Shimadzu, Japonsko) s použitím činidla FRAP, ktoré sa pripravilo zmiešaním 50 ml acetátového pufru, 5 ml roztoku 2,4,6-tris(2-pyridyl)-*s*-triazínu (TPTZ) a 5 ml $FeCl_3$ čerstvo pred použitím. Ku 100 µl jednotlivých roztokov štandardov kyseliny galovej (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,7 a 1 mmol.l^{-1}) sa pridalo 0,5 ml vody a následne 2 ml činidla FRAP. Rovnakým spôsobom bola stanovená aj antioxidačná aktivita čistého extraktu šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*) zriedeného v pomere 1 : 9, nanočastíc striebra a supernatantov po centrifugácií AgNPs s koncentráciou 2 a 5 mmol.l^{-1}. Po dôkladnom premiešaní a státí po dobu 30 minút na tmavom mieste boli namerané absorbancie pri 593 nm trikrát pre každú vzorku. Antioxidačná aktivita (AA_{FRAP}) bola vyhodnotená podľa kalibračnej krivky a vyjadrená ako ekvivalent kyseliny galovej v mmol GAE/l (Szydłowska-Czerniak a kol., 2012).

Stanovenie celkového obsahu fenolických látok (TPC)

Obsah celkových fenolických látok (TPC) bol stanovený spektrofotometricky na UV-Vis spektrometri (Shimadzu UV-1280, Shimadzu, Japonsko) s použitím Folin–Ciocalteu činidla. Roztoky štandardov boli pripravené zmiešaním 20 µl roztokov kyseliny galovej (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,7 a 1 mmol.l^{-1}), 1,6 ml destilovanej vody a 100 µl Folin–Ciocalteu činidla. Po 5 minútach sa k roztokom pridalo 300 µl roztoku uhličitanu sodného a po 2 hodinách státia sa merala absorbancia pri vlnovej dĺžke 765 nm oproti slepej vzorke trikrát pre každú vzorku. Rovnakým spôsobom boli na stanovenie pripravené vzorky čistého extraktu šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*) zriedeného 1 : 9, strieborných nanočastíc 2 a 5 mmol.l^{-1} a tiež supernatantov po centrifugácii AgNPs s koncentráciou 2 a 5 mmol.l^{-1}. Kvantifikácia celkových fenolických

látok (TPC) sa uskutočnila pomocou kalibračnej krivky kyseliny galovej a výsledky boli vyjadrené ako ekvivalent kyseliny galovej v mg GAE/ml (Benedec a kol., 2018).

Stanovenie celkového obsahu flavonoidov (TFC)

Celkový obsah flavonoidov (TFC) sa stanovil kolorimetrickým testom pomocou chloridu hlinitého na UV-Vis spektrometri (Shimadzu UV-1280, Shimadzu, Japonsko). Pracovné roztoky štandardov boli pripravené zmiešaním 500 µl roztokov kvercetínu (0,05; 0,5; 5 a 10 mmol.l^{-1}), 2 ml destilovanej vody a 150 µl roztoku dusitanu sodného. Po 5 minútach sa do jednotlivých skúmaviek pridalo 150 µl roztoku chloridu hlinitého a v 6. minúte 1 ml hydroxidu sodného (1 mol.l^{-1}). Po doplnení objemu v skúmavkách na 5 ml destilovanou vodou bola po 30 minútach stanovená absorbancia pri vlnovej dĺžke 510 nm oproti slepej vzorke trikrát pre každú vzorku. Rovnakým spôsobom boli na stanovenie pripravené vzorky čistého extraktu šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*) zriedeného 1 : 9, strieborných nanočastíc 2 a 5 mmol.l^{-1} a tiež supernatantov po centrifugácii AgNPs s koncentráciou 2 a 5 mmol.l^{-1}. Kvantifikácia celkových flavonoidov (TFC) sa uskutočnila pomocou kalibračnej krivky kvercetínu a výsledky boli vyjadrené ako ekvivalent kvercetínu v mmol QE/ml (Olteanu a kol., 2017).

Stanovenie veľkosti nanočastíc

Distribúcia veľkosti častíc v jednotlivých vzorkách bola stanovená pomocou PCCS metódy (Photon Cross Correlation Spectroscopy) za použitia prístroja Nanophox (Sympatec GmbH, Nemecko). Distribúciu strieborných nanočastíc sme stanovovali v roztokoch s koncentráciou 1, 2 a 5 mmol.l^{-1} pripravených pri teplote 80 °C. Analýzy boli uskutočnené s použitím vody ako rozpúšťadla s indexom lomu 1,33. Časť každej nanosuspenzie sa zriedila, aby sa dosiahla vhodná koncentrácia na meranie. Merania sa opakovali trikrát pre každú vzorku.

Spracovanie výsledkov a štatistická analýza

Na vyhodnocovanie nameraných dát pri stanovení antioxidačnej aktivity DPPH metódou bol použitý program GraphPad Prism 5 a pri metódach ABTS, FRAP, TPC a TFC program MS Excel.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

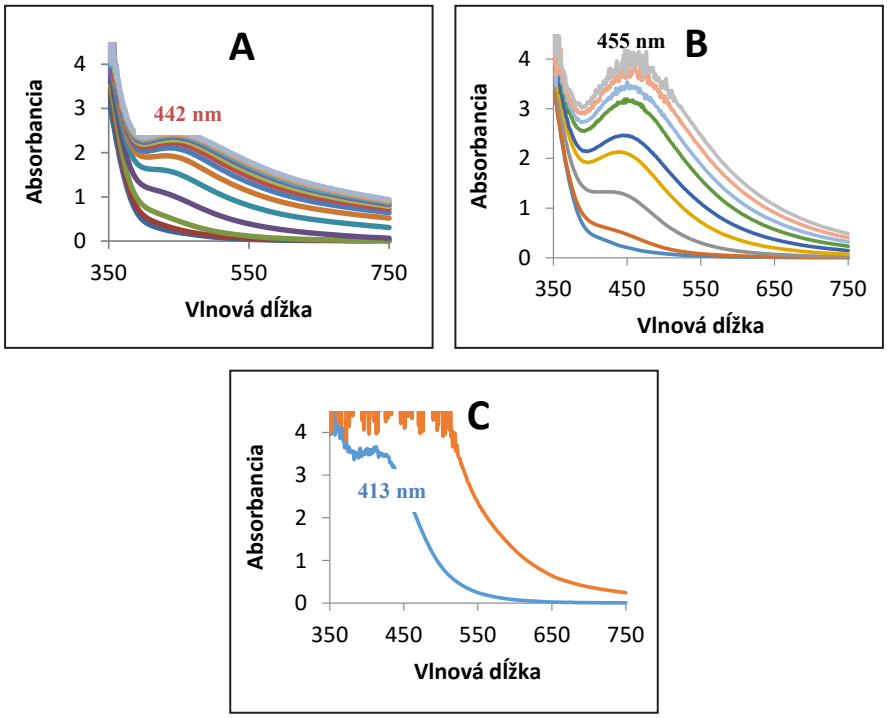
Rastlinami sprostredkovaná syntéza AgNPs je veľmi rýchla, jednoduchá, spoľahlivá, netoxická a ekologická. Viaceré štúdie prišli k záveru, že hydroxylové a karboxylové skupiny prítomné v sacharidoch, flavonoidoch, terpenoidoch a fenolových zlúčeninách sú silnými redukčnými činidlami a môžu byť zodpovedné za bioredukciu iónu Ag^{+} na Ag^{0}, čo vedie k syntéze nanočastíc striebra (Vilchis-Nestor a kol., 2008; Amin a kol., 2012). Štúdia Ajitha a kol. (2015) potvrdzuje, že karbonylové skupiny aminokyselinových zvyškov a peptidy z proteínov majú silnú schopnosť viazať kovy a sú schopné vytvoriť na povrchu nanočastíc ochrannú membránu, aby sa zabránilo aglomerácii a vzniknuté nanočastice sa stabilizovali.

Biosyntéza strieborných nanočastíc

V rámci tejto štúdie boli syntetizované strieborné nanočastice za optimalizovaných podmienok, a to pomocou 10 % prídavku rastlinného extraktu šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*) s použitím prekurzora dusičnanu strieborného s finálnou koncentráciou 1, 2 a 5 mmol.l^{-1} pri teplote 80 °C. Syntéza prebiehala v kremennej kyvete a bola monitorovaná pomocou UV-Vis spektrofotometra s Peltierovým ohrevom, čo nám umožnilo kontrolu teploty prebiehajúcej syntézy. Priebeh syntézy bol zaznamenávaný v minútových intervaloch a jednotlivé namerané UV-Vis spektrá sú znázornené v grafe 1.

Tvorba nanočastíc striebra bola pozorovaná aj vizuálne zmenou farby reakčnej zmesi zo svetlohnedej na tmavohnedú a súčasným zaznamenaním nárastu pásu povrchovej plazmónovej rezonancie (SPR) pomocou UV-Vis spektrofotometrie v stanovených časových intervaloch v závislosti od koncentrácie použitého prekurzora 1 mmol.l^{-1} (14 min), 2 mmol.l^{-1} (9 min) a 5 mmol.l^{-1} (2 min). Z nameraných hodnôt vy-

Graf 1: UV-Vis spektrá biosyntetizovaných AgNPs pri teplote 80 °C A (1 mmol.l^{-1} počas 14 min), B (2 mmol.l^{-1} počas 9 min), C (5 mmol.l^{-1} počas 2 min)



plýva, že reakčný čas syntézy nanočastíc sa skracoval s rastúcou koncentráciou prekurzora. Vlnové dĺžky, ktoré predstavujú maximum absorbancie prislúchajúcej SPR, boli 442 nm pri 1 mmol.l^{-1}, 455 nm pri 2 mmol.l^{-1} a 413 nm pri koncentrácii 5 mmol.l^{-1} prekurzoru $AgNO_3$. Konkrétna poloha maxima prislúchajúca SPR závisí od morfológie, tvaru, veľkosti a povrchovej vrstvy syntetizovaných nanočastíc (Jain a kol., 2017). Mechanizmus tvorby AgNP pozostáva hlavne z troch krokov: redukcia iónov na atómy kovu, zhlukovanie niektorých atómov, čo vedie k tvorbe malých zhlukov, rast týchto zhlukov a nakoniec uzatváranie povrchu vytvorených NP stabilizačným činidlom, aby sa zabránilo agregácii. Všetky tieto kroky závisia od koncentrácie prekurzora ($AgNO_3$), koncentrácie redukčného a stabilizačného činidla v rastlinnom extrakte, pH média, teploty a rýchlosti miešania (Alahmad a kol., 2021).

Strieborné nanočastice boli úspešne syntetizované pri rôznych podmienkach pomocou extraktu šalvie lekárskej a opísané vo viacerých štúdiách. Zmiešaním rastlinného extraktu šalvie s 1 mmol.l^{-1} $AgNO_3$ v pomere 1 : 9 pri teplote 70 °C boli syntetizované strieborné nanočastice, ktorých charakteristická povrchová plazmónová rezonancia (SPR) sa pozorovala pri 468 nm (Ibrahim a kol., 2020). V inej štúdii autori syntetizovali nanočastice redukciou 10 ml roztoku dusičnanu strieborného (2,5 mmol.l^{-1}) pomocou 0,5 ml vodného extraktu šalvie lekárskej ako redukčného činidla pri teplote 37 °C počas 3 hodín. Nanočastice boli charakterizované pomocou UV-Vis spektrofotometra a vykazovali SPR okolo 430 nm (Baharara a kol., 2014).

Bioredukcia prekurzoru je zdôvodnená prítomnosťou redukčných obsahových látok v extrakte. Vodný extrakt *S. officinalis* je bohatý na rôzne flavonoidy, najmä na kyselinu rozmarínovú a luteolín-7-glukozid. Podľa literatúry práve flavonoidy a fenoly prítomné v rastlinných extraktoch majú schopnosť interagovať s iónmi Ag^+ prostredníctvom hydroxylovej skupiny (-OH), čo môže viesť k bioredukcii na AgNPs (Royji Albeladi a kol., 2020).

Tab. 1: Distribúcia veľkosti častíc AgNPs

	Pík 1: x [nm] (množstvo [%])	Pík 2: x [nm] (množstvo [%])	x_{50} (nm)
1 mM AgNPs	88 (81 %)	222 (19 %)	88
2 mM AgNPs	–	–	113
5 mM AgNPs	–	–	206

Tab. 2: Antimikrobiálna aktivita strieborných nanočastíc

Vzorka	Koncentrácia (mmol.l^{-1})	RIZD (% ± SD)	
		S. aureus	*E. coli*
$AgNO_3$	2	91 ± 6	89 ± 7
	5	118 ± 3	100 ± 5
***Salvia* off. AgNPs**	2	74 ± 6	60 ± 6
	5	83 ± 4	74 ± 4

Stanovenie veľkosti nanočastíc

V štúdii bola stanovená aj veľkosť pripravených strieborných nanočastíc pomocou PCCS metódy. Pri suspenzii AgNPs s koncentráciou 1 mmol.l^{-1} nameranej priamo po biosyntéze boli zistené nanočastice s bimodálnou distribúciou, teda pripravené nanočastice vznikali v dvoch veľkostiach 88 nm (81 %) a 222 nm (19 %, viď tab. 1). Pri vyššej koncentrácii suspenzií (2 a 5 mmol.l^{-1}) bola distribúcia nanočastíc unimodálna s priemernou hodnou 113 nm (2 mmol.l^{-1}) a 206 nm (5 mmol.l^{-1}). Z nameraných hodnôt distribúcie strieborných nanočastíc vyplýva, že veľkosť nanočastíc rastie s koncentráciou použitého prekurzora pri syntéze.

V literatúre boli opísané rôzne veľkosti nanočastíc pripravených pomocou extraktu šalvie, napríklad pri koncentrácii prekurzora 1 mmol.l^{-1} vznikali sférické nanočastice s veľkoťou 73,4 nm (Ibrahim a kol., 2020); resp. okolo 80 nm (Barbinta-Patrascu a kol., 2013); pri koncenrácii prekurzora 10 mmol.l^{-1} nanočastice s veľkosťou 40 nm (Royji Albeladi a kol., 2020). Na stanovenú hodnotu veľkosti nanočastíc má výrazný vplyv zvolená metóda, a preto sú často hodnoty získané rôznymi metódami nesprávne porovnávané. Zatiaľ čo TEM, UV-Vis a XRD uvádzajú výsledky veľkosti jednotlivých nanočastíc, metódy SEM, PCCS alebo DLS uvádzajú veľkosť zhlukov, aglomerátov (Kováčová a kol., 2020).

Antimikrobiálna aktivita

Klasické liečivá sú často obmedzené svojimi fyzikálno-chemickými, farmakodynamickými a farmakokinetickými vlastnosťami, ako je napríklad zlá rozpustnosť, nízka biologická dostupnosť, nízka účinnosť alebo nedostatočná selektivita. Nanotechnológia je novou príležitosťou pre opätovné preskúmanie biologických vlastností už známych antimikrobiálnych zlúčenín, ako je striebro, a to manipuláciou s jeho veľkosťou. V rámci štúdie sme stanovovali antimikrobiálnu aktivitu strieborných nanočastíc (2 a 5 mmol.l^{-1}), ale aj samotného prekurzora $AgNO_3$ (2 a 5 mmol.l^{-1}), pričom obe vykazovali významnú antimikrobiálnu aktivitu (viď tab. 2). Antimikrobiálna aktivita kovových nanočastíc je závislá od koncentrácie, pri nanočasticiach pripravených pomocou prekurzora s vyššou koncentráciou bola všeobecne vyššia. Závislosť antimikrobiálnej aktivity od koncentrácie AgNPs bola pozorovaná aj v iných štúdiách (Ibrahim a kol.,

Tab. 3: Protinádorová aktivita strieborných nanočastíc

Bunková línia	HeLa	Jurkat	HCT	MCF -7	HaCaT	3T3
IC_{50} ± SD (10^{-6} mol.l^{-1})	169 ± 61	448 ± 387	203 ± 40	227 ± 171	223 ± 149	587 ± 384

Tab. 4: Antioxidačná aktivita (AA) stanovená metódou DPPH, ABTS a FRAP

Metóda	AA_{DPPH} mmol AAE/l ± SD	AA_{ABTS} mmol TE/l ± SD	AA_{FRAP} mmol GAE/l ± SD
S. officinalis	0,183 ± 0,002	1,73 ± 0,06	0,49 ± 0,03
2 mM AgNPs	0,090 ± 0,013	1,95 ± 0,02	0,44 ± 0,15
supernantant (2 mM AgNPs)	0,178 ± 0,001	1,18 ± 0,03	0,28 ± 0,05
5 mM AgNPs	0,062 ± 0,022	2,32 ± 0,37	0,37 ± 0,04
supernantant (5 mM AgNPs)	0,172 ± 0,001	0,92 ± 0,04	0,21 ± 0,01

2020). V literatúre sú opísané rozdielne antimikrobiálne aktivity strieborných nanočastíc voči gram--pozitívnym a gram-negatívnym kmeňom s odlišnými výsledkami. Pri štúdiu strieborných nanočastíc pripravených pomocou piatich rôznych rastlinných extraktov bola vyššia aktivita vo všeobecnosti pozorovaná proti *S. aureus* ako proti *E. coli* (Salayová a kol., 2021). Naše výsledky korešpondujú s uvedenou literatúrou, kde pri oboch koncentráciách bola mierne vyššia aktivita proti *S. auerus* ako *E. coli*.

Protinádorová aktivita

Nanočastice predstavujú novú perspektívu s možnosťou zlepšenia diagnostiky a liečby rakoviny (Anjum a kol., 2016). V rámci štúdie sme preto sledovali aj protinádorový účinok strieborných nanočastíc pripravených zelenou syntézou. Z výsledkov vyplýva, že najvyšší cytotoxický efekt bol zaznamenaný proti bunkám karcinómu krčka maternice (HeLa), a najnižšia voči nenádorovým myšacím fibroblastom (3T3). Výsledky sú zobrazené v tabuľke 3. Cytotoxický efekt strieborných nanočastíc pripravených zelenou syntézou bol pozorovaný aj v iných štúdiách, proti HeLa bunkám s IC_{50} 200 µg.ml^{-1} a MCF–7 bunkám s IC_{50} 100 µg.ml^{-1} (Murugesan a kol., 2019), proti HCT bunkám s cytotoxickou koncentráciou CC_{50} 48,84 ± 0,78 µg.ml^{-1} (Acharya a kol., 2021) a proti bunkovým líniam karcinómu pľúc (A549), bunkám karcinómu prsníka (MCF-7) a bunkovej línii hepatocelulárneho karcinómu (HepG2) (Castro-Aceituno a kol., 2016). Bežne používané protinádorové liečivá ako doxorubicín a etopozid vykazovali výrazne vyššiu protinádorovú aktivitu napríklad voči HeLa bunkám s IC_{50} 0,2 a 3,9 µmol.l^{-1} (Kutschy a kol., 2009).

Stanovenie antioxidačnej aktivity DPPH, ABTS a FRAP metódou

Okrem antimikrobiálnej a protinádorovej aplikácie strieborných nanočastíc je v poslednom desaťročí publikované veľké množstvo článkov zaoberajúcich sa ich antioxidačnými vlastnosťami. Ukázalo sa, že nanočastice striebra majú schopnosť znižovať oxidačný stres vďaka svojim redoxným vlastnostiam. Navyše pri zelenej syntéze použité rastlinné extrakty tiež obsahujú bioaktívne fytochemikálie ako polyfenoly, ktoré by mohli vykazovať potenciálnu antioxidačnú aktivitu (Alahmad a kol., 2021). Šalvia lekárska (*Salvia officinalis*) je známa pre svoje významné antioxidačné účinky, ktoré súvisia najmä s obsahom kyseliny karnozovej, karnozolu a kyseliny rozmarí-

novej (Wang a kol., 1998). Metódy stanovenia antioxidantov sú rôzne, založené buď na prenose jedného elektrónu alebo atómu vodíka v závislosti od princípu použitého antioxidačného testu a je ťažké porovnávať jednu metódu s druhou. Preto nemožno celkovú antioxidačnú kapacitu posúdiť na základe jedinej metódy a je vždy užitočné použiť kombináciu rôznych testov antioxidačnej aktivity (Alam a kol., 2013).

Na základe predpokladu, že fytochemikálie prítomné v extrakte a syntetizované nanočastice striebra môžu byť schopné deaktivovať voľné radikály a slúžiť ako antioxidanty, sme v rámci tejto štúdie stanovili a porovnali antioxidačnú aktivitu samotného rastlinného extraktu so suspenziou po syntéze nanočastíc a taktiež so supernatantom získaným po centrifugácii syntetizovaných nanočastíc. Výsledné hodnoty antioxidačných aktivít sú vyjadrené na základe kalibračných kriviek príslušných štandardov pre jednotlivé metódy a výsledky sú uvedené v tabuľke 4.

Z výsledkov vyplýva výrazná antioxidačná aktivita extraktu šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*), ktorá bola 0,183 ± 0,002 mmol AAE/l (DPPH metóda), 1,73 ± 0,06 mmol TE/l (ABTS metóda) a 0,49 ± 0,03 mmol GAE/l (FRAP metóda). Výsledky ukazujú, že pri DPPH a FRAP teste bola vyššia antioxidačná aktivita pre samotný extrakt šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*) ako pre strieborné nanočastice, naopak pri ABTS metóde bola antioxidačná aktivita AgNPs mierne vyššia. Pri všetkých metódach sa však dokázala znížená antioxidačná aktivita supernatantu získaného po syntéze nanočastíc, čo potvrdzuje participáciu antioxidantov na syntéze nanočastíc.

Viacerí autori pozorovali vyššiu antioxidačnú aktivitu rastlinných extraktov v porovnaní s nanočasticami striebra (Ahn a kol., 2019) a iní naopak vyššiu pre nanočastice (Demirbas a kol., 2016; Elemike a kol., 2017). V literatúre je opísaná výrazná antioxidačná aktivita vodného extraktu šalvie (94,7 %) kvôli polyfenolickým zlúčeninám a iným významným bioaktívnym látkam v extrakte. Mierne vyššia aktivita však bola stanovená pri suspenzii nanočastíc pripravených pomocou tohto rastlinného extraktu (98,6 %) (Barbinta-Patrascu a kol., 2013). V iných štúdiách naopak stanovili nižšiu antioxidačnú aktivitu siedmych vzoriek pripravených AgNPs pomocou DPPH testu oproti siedmim rastlinným extraktom, prostredníctvom ktorých boli nanočastice syntetizované (Ahn a kol., 2019).

Stanovenie celkových fenolických látok (TPC) a flavonoidov (TFC)

Fenolické látky sú skupinou látok s významnou antioxidačnou aktivitou. Práve tieto látky sú považované za bio-redukčné činidlá zodpovedné za redukciu strieborných iónov počas ich zelenej syntézy (Royji Albeladi a kol., 2020). Pri biosyntetizovaných nanočasticiach pomocou extraktu z čajovníkových listov autori pripisujú ich antioxidačnú aktivitu polyfenolom a flavonoidom na povrchu týchto nanočastíc (Moulton a kol., 2010). Na základe týchto poznatkov bol spektrofotometrickou metódou stanovený a porovnaný celkový obsah fenolických látok (TPC) a ich podskupiny flavonoidov (TFC) v rastlinnom extrakte šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*), ako aj vo vzorkách AgNPs po zelenej syntéze (2 a 5 mmol.l^{-1}) a v supernantantoch získaných po ich centrifugácii (viď tab. 5).

Z výsledkov stanovenia vyplýva, že danou metódou sa stanovilo množstvo celkových fenolických látok v extrakte šalvie (*S. officinalis*) na 215 ± 23 mg GAE/ml. Porovnateľné hodnoty boli stanovené pre strieborné nanočastice 2 a 5 mmol.l^{-1}, a to 221 ± 12 a 220 ± 32 mg GAE/ml. V supernatantoch získaných po centrifugácii nanočastíc s koncentráciou 2 a 5 mmol.l^{-1} sme zistili pokles celkových fenolických látok oproti extraktu (164 ± 20 a 131 ± 13 mg GAE/ml), čo naznačuje, že práve táto skupina látok môže byť zodpovedná za bioredukciu strieborných iónov pri ich syntéze.

Naopak pri metóde stanovenia flavonoidov (TFC) sme pozorovali nárast množstva flavonoidov pre AgNPs pri koncentrácii 2 aj 5 mmol.l^{-1} (11,87 ± 1,01 resp. 16,9 ± 1,33 mmol QE/l) oproti extraktu *S. officinalis* 6,98 ± 0,12 mmol QE/l. Tieto výsledky si vysvetľujeme tak, že pri danej metodike môže byť výsledná absorbancia roztokov pri 510 nm ovplyv-

Tab. 5: Celkové množstvo fenolických látok (TPC) a flavonoidov (TFC)

Metóda	TPC mg GAE/ml ± SD	TFC mmol QE/l ± SD
S. officinalis	215 ± 23	6,98 ± 0,12
2 mM AgNPs	221 ± 12	11,87 ± 1,01
supernantant (2 mM AgNPs)	164 ± 20	3,06 ± 0,09
5 mM AgNPs	220 ± 32	16,98 ± 1,33
supernantant (5 mM AgNPs)	131 ± 13	5,87 ± 0,85

nená absorbanciou SPR suspenzie nanočastíc. Pri supernatantoch po odstránení nanočastíc centrifugáciou sme pozorovali pokles množstva flavonoidov na 3,06 ± 0,06 (pre 2 mmol.l^{-1} AgNPs) a 5,87 ± 0,85 mmol QE/l (pre 5 mmol.l^{-1} AgNPs) oproti rastlinnému extraktu. Rovnako ako pri metóde TPC, táto skutočnosť podporuje predpoklad, že flavonoidy sú rovnako zodpovedné za bioredukciu počas syntézy AgNPs. Extrakt šalvie je charakterizovaný vysokým celkovým obsahom fenolických látok a flavonoidov a je využiteľný na rýchlu a jednoduchú biosyntézu strieborných nanočastíc.

Celkové množstvo fenolických látok (TPC) pre metanolový extrakt šalvie bol podľa literatúry 5,95 ± 2,65 mg GAE/g suchého extraktu (Roby a kol., 2013). V inej štúdii bol obsah celkových fenolických látok 170,9 ± 2,44 mg GAE/ml extraktu vo vodnom extrakte šalvie lekárskej pripraveného z 1 g suchej rastliny a 15 ml destilovanej vody extrakciou počas 72 hodín (Nicolescu a kol., 2017). Nami zistené hodnoty (215 ± 23 mg GAE/ml) môžu byť vyššie kvôli použitiu ultrazvuku na extrakciu, nakoľko sonifikácia zvyšuje množstvo extrahovaných fenolických látok oproti macerácii (Salayová a kol., 2020). V rovnakej štúdii tiež stanovili celkové množstvo flavonoidov (304,60 ± 3,40 mg.ml^{-1}) vyjadrené v mg katechínu/ml (Nicolescu a kol., 2017).

Fenolické látky sú pravdepodobne zodpovedné za vysokú antioxidačnú aktivitu extraktu, pričom bola zistená vysoká aktivita kyseliny rozmarínovej voči DPPH radikálu a jej derivátov (okolo 90 %), avšak nižšia pre flavonoidy obsiahnuté v extrakte šalvie, glukozidy luteolínu a apigenínu (Lu a kol., 2001). Bolo publikované, že antioxidačná aktivita polyfenolov súvisí s ich hydroxylovou skupinou a je známe, že prítomnosť druhej hydroxylovej skupiny v *orto* alebo *para* polohe zvyšuje antioxidačnú aktivitu v dôsledku dodatočnej rezonančnej stabilizácie *o*-chinónu alebo *p*-chinónu (Chen a kol., 1997). Medzi najvýznamnejšie antioxidanty v extrakte šalvie boli zaradené kyselina rozmarínová a luteolín-7-*O*-*β*-glukopyranozid (Wang a kol., 1998).

ZÁVER

V štúdii je opísaná syntéza strieborných nanočastíc s koncentráciou 1, 2 a 5 mmol.l^{-1} pomocou rastlinného extraktu šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*) a zistilo sa, že reakčný čas syntézy sa skracuje so zvyšovaním koncentrácie prekurzora $AgNO_3$. S rastúcou koncentráciou prekurzora bol pozorovaný aj nárast strednej veľkosti pripravených nanočastíc pomocou PCCS metódy. Antimikrobiálna aktivita bola stanovená agarovou difúznou metódou proti *S. aureus* a *E. coli* oproti antibiotiku gentamicín sulfátu, kde bol pozorovaný nárast antimikrobiálnej aktivity s rastúcou koncentráciou testovaných nanočastíc. Výraznejšia aktivita bola pozorovaná proti patogénu *S. aureus*.

Antioxidačnú aktivitu AgNPs a extraktu šalvie lekárskej sme stanovovali metódami DPPH, ABTS a FRAP a tiež sme stanovili celkový obsah flavonoidov (TFC) a celkový obsah fenolických látok (TPC).

Suspenzia extraktu šalvie lekárskej (*Salvia officinalis*) s nanočasticami striebra, ako aj supernatant po ich centrifugácii mali preukázateľnú antioxidačnú aktivitu. Stanovením obsahu celkových fenolických látok sme prišli k záveru, že fenolické látky prítomné v rastlinnom extrakte nie sú len antioxidačným činidlom, ale sú zodpovedné aj za bioredukciu kovu počas syntézy nanočastíc, nakoľko bol zistený ich pokles v supernatantoch získaných po syntéze nanočastíc. Preto extrakt šalvie charakterizovaný vysokým obsahom flavonoidov a celkovým obsahom fenolických látok je využiteľný na rýchlu a jednoduchú biosyntézu strieborných nanočastíc.

Protinádorová aktivita bola stanovená proti rôznym bunkovým líniám rakovinových a nerakovinových buniek a vyhodnotená pomocou MTT kolorimetrického testu. Nanočastice striebra mali miernu protinádorovú aktivitu proti všetkým bunkovým líniám. Najvyšší cytotoxický efekt bol zaznamenaný proti bunkám karcinómu krčka maternice (HeLa), bunkám kolorektálneho karcinómu (HCT) a bunkám karcinómu prsníka (MCF-7). Avšak protinádorová aktivita pripravených nanočastíc je v porovnaní s bežne používanými chemoterapeutikami výrazne nižšia. Tieto zistenia sú ale zaujímavým predmetom budúceho výskumu, ktorým by mohlo byť sledovanie synergického účinku klasického chemoterapeutika a nanočastice ako jeho nosičového systému.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia vznikla za podpory projektu VEGA 2/0044/18 „Vysoko-energetické mletie pre syntézu nanomateriálov bio-prístupom a vybrané environmentálne aplikácie“ a VEGA 2/0112/22 „Vysoko-energetické mletie vaječného odpadu na báze kalcitu a vybraných rastlín pre prípravu nanokryštalických minerálov a environmentálne aplikácie“. Poďakovanie patrí aj RNDr. Valérii Verebovej, PhD. z Katedry chémie, biochémie a biofyziky UVLF za umožnenie použitia UV-Vis spektrofotometra.

ZOZNAM LITERATÚRY

Ahn, E.-Y., Jin, H., Park, Y.: Assessing the antioxidant, cytotoxic, apoptotic and wound healing properties of silver nanoparticles green-synthesized by plant extracts. *Mater. Sci. Eng. C.*, 2019, 101, 204 – 216.

Acharya, D., Satapathy, S., Somu, P., Parida, U. K., Mishra, G.: Apoptotic effect and anticancer activity of biosynthesized silver nanoparticles from marine algae chaetomorpha linum extract against human colon cancer cell HCT-116. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2021, 199 (5), 1812 – 1822.

Ajayi, E., Afolayan, A.: Green synthesis, characterization and biological activities of silver nanoparticles from alkalinized Cymbopogon citratus Stapf. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, 2017, 8 (1), 15 017.

Ajitha, B., Ashok Kumar Reddy, Y., Sreedhara Reddy, P.: Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Lantana camara* leaf extract. *Mater. Sci. Eng. C.*, 2015, 49, 373 – 381.

Alahmad, A., Feldhoff, A., Bigall, N. C., Rusch, P., Scheper, T., Walter, J.-G.: *Hypericum perforatum* L. – Mediated green synthesis of silver nanoparticles exhibiting antioxidant and anticancer activities. *Nanomaterials*, 2021, 11 (2), 487.

Alam, M. N., Bristi, N. J., Rafiquzzaman, M.: Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.*, 2013, 21 (2), 143 – 152.

Amin, M., Anwar, F., Janjua, M. R. S. A., Iqbal, M. A., Rashid, U.: Green synthesis of silver nanoparticles through reduction with *Solanum xanthocarpum* L. berry extract: Characterization, antimicrobial and urease inhibitory activities against *Helicobacter pylori*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, 13 (8), 9923 – 9941.

Anjum, S., Abbasi, B. H., Shinwari, Z. K.: Plant-mediated green synthesis of silver nanoparticles for biomedical applications: Challenges and opportunities. *Pak. J. Bot.*, 2016, 48 (4), 1731 – 1760.

Baharara, J., Namvar, F., Mousavi, M., Ramezani, T., Mohamad, R.: Anti-angiogenesis effect

of biogenic silver nanoparticles synthesized using *Saliva officinalis* on chick chorioalantoic membrane (CAM). *Molecules*, 2014, 19 (9), 13 498 – 13 508.

Barbinta-Patrascu, M. E., Bunghez, I. R., Iordache, S. M., Badea, N., Fierascu, R. C., Ion, R. M.: Antioxidant properties of biohybrids based on liposomes and sage silver nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2013, 13 (3), 2051 – 2060.

Bedlovičová, Z., Strapáč, I., Baláž, M., Salayová, A.: A brief overview on antioxidant activity determination of silver nanoparticles. *Molecules*, 2020, 25 (14), 3191.

Benedec, D., Oniga, I., Cuibus, F., Sevastre, B., Stiufiuc, G., Duma, M., Hanganu, D., Iacovita, C., Stiufiuc, R., Lucaciu, C. M.: *Origanum vulgare* mediated green synthesis of biocompatible gold nanoparticles simultaneously possessing plasmonic, antioxidant and antimicrobial properties. *Int. J. Nanomedicine*, 2018, 13, 1041 – 1058.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C.: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Sci. Technol.*, 1995, 28, 25 – 30.

Castro-Aceituno, V., Ahn, S., Simu, S. Y., Singh, P., Mathiyalagan, R., Lee, H. A., Yang, D. C.: Anticancer activity of silver nanoparticles from *Panax ginseng* fresh leaves in human cancer cells. *Biomed. Pharmacother.*, 2016, 84, 158 – 165.

Demirbas, A., Welt, B. A., Ocsoy, I.: Biosynthesis of red cabbage extract directed Ag NPs and their effect on the loss of antioxidant activity. *Mater. Lett.*, 2016, 179, 20 – 23.

Elemike, E., Fayemi, O., Ekennia, A., Onwudiwe, D., Ebenso, E. E.: Silver nanoparticles mediated by *Costus afer* leaf extract: Synthesis, antibacterial, antioxidant and electrochemical properties. *Molecules*, 2017, 22 (5), 701.

Elia, P., Zach, R., Hazan, S., Kolusheva, S., Porat, Z., Zeiri, Y.: Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. *Int. J. Nanomedicine*, 2014, 9 (1), 4007 – 4021.

Gherasim, O., Puiu, R. A., Bîrca, A. C., Burduşel, A. C., Grumezescu, A. M.: An updated review on silver nanoparticles in biomedicine. *Nanomaterials*, 2020, 10 (11), 1 – 44.

Chen, J. H., Ho, C. T.: Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45 (7), 2374 – 2378.

Ibrahim, S. K., Al-Niaame, A. E.: Formulation and evaluation of hydrogel incorporated with biosynthesis silver nanoparticles using aqueous extract of *Salvia officinalis* L. against *S. aureus* isolated from wounds from some Baghdad hospitals. *Plant Arch.*, 2020, 20 (Suppl. 1), 449 – 456.

Jain, S., Mehata, M. S.: Medicinal plant leaf extract and pure flavonoid mediated green synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial property. *Sci. Rep.*, 2017, 7, 1 – 13.

Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., Kalaskar, M. G.: Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2019, 53, 101 174.

Kováčová, M., Daneu, N., Tkáčiková, Ľ., Búreš, R., Dutková, E., Stahorský, M., Bujňáková, Z. L., Baláž, M.: Sustainable one-step solid-state synthesis of antibacterially active silver nanoparticles using mechanochemistry. *Nanomaterials*, 2020, 10 (11), 1 – 17.

Kutschy, P., Salayová, A., Čurillová, Z., Kožár, T., Mezencev, R., Mojžiš, J., Pilátová, M., Balentová, E., Pazdera, P., Sabol, M., Zburová, M.: 2- (Substituted phenyl) amino analogs of 1-methoxyspirobrassinol methyl ether: Synthesis and anticancer activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, 17 (10), 3698 –3712.

Lu, Y., Foo, L. Y.: Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.*, 2001, 75 (2), 197–202.

Moulton, M. C., Braydich-Stolle, L. K., Nadagouda, M. N., Kunzelman, S., Hussain, S. M., Varma, R. S.: Synthesis, characterization and biocompatibility of "green" synthesized silver nanoparticles using tea polyphenols. *Nanoscale*, 2010, 2 (5), 763 – 770.

Murugesan, K., Koroth, J., Srinivasan, P. P., Singh, A., Mukundan, S., Karki, S. S., Choudhary, B., Gupta, C. M.: Effects of green synthesised silver nanoparticles (ST06-AgNPs) using curcumin derivative (ST06) on human cervical cancer cells (HeLa) *in vitro* and EAC tumor bearing mice models. *Int. J. Nanomedicine*, 2019, 14, 5257 – 5270.

Nicolescu, C. M., Olteanu, R. L., Bumbac, M.: Growth dynamics study of silver nanoparticles obtained by green synthesis using *Salvia officinalis* extract. *Anal. Lett.*, 2017, 50 (17), 2802 – 2821.

Nisar, P., Ali, N., Rahman, L., Ali, M., Shinwari, Z. K.: Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2019, 24 (7), 929 – 941.

Olteanu, R. L., Nicolescu, C. M., Bumbac, M.: Influence of phytochemical reductive capacity on ultraviolet–visible spectroscopic behavior of silver nanoparticles. *Anal. Lett.*, 2017, 50 (17), 2786 – 2801.

Rafique, M., Sadaf, I., Rafique, M. S., Tahir, M. B.: A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, 2017, 45 (7), 1272 – 1291.

Rai, M. K., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., Gade, A. K.: Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 2012, 112 (5), 841–852.

Roby, M. H. H., Sarhan, M., Selim, K. A.-H., Ibrahim, K.: Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L .) extracts. *Ind. Crop Prod.*, 2013, 43 (1), 827 – 831.

Royji Albeladi, S. S., Malik, M. A., Al-thabaiti, S. A.: Facile biofabrication of silver nanoparticles using *Salvia officinalis* leaf extract and its catalytic activity towards Congo red dye degradation. *J. Mater. Res. Technol.*, 2020, 9 (5), 10 031 – 10 044.

Salayová, A., Bedlovičová, Z., Daneu, N., Baláž, M., Lukáčová Bujňáková, Z., Balážová, Ľ., Tkáčiková, Ľ.: Green synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity using various medicinal plant extracts: Morphology and antibacterial efficacy. *Nanomaterials*, 2021, 11 (4), 1005.

Salayová, A., Palkovičová, V.: Antioxidačná aktivita a celkový obsah fenolických látok v extraktoch *Capsella bursa-pastoris* a *Brassica nigra* [Antioxidant activity and total phenolic content in extracts of *Capsella bursa-pastoris* and *Brassica nigra*]. *Folia Pharm. Cassoviensia*, 2020, 2 (1), 70 – 76.

Szydłowska-Czerniak, A., Tułodziecka, A., Szłyk, E.: A silver nanoparticle-based method for determination of antioxidant capacity of rapeseed and its products. *Analyst*, 2012, 137 (16), 3750 – 3759.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D.: Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.*, 2006, 19 (6 – 7), 669 – 675.

Vilchis-Nestor, A. R., Sánchez-Mendieta, V., Camacho-López, M. A., Gómez-Espinosa, R. M., Camacho-López, M. A., Arenas-Alatorre, J. A.: Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. *Mater. Lett.*, 2008, 62 (17 – 18), 3103 – 3105.

Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., LaVoie, E. J.: Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46 (12), 4869 – 4873.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, IV., 2: 96 – 106, 2022

PRÍNOS INTRAVITREÁLNYCH INJEKCIÍ ANTIRASTOVÝMI FAKTORMI V TERAPII VEKOM PODMIENENEJ DEGENERÁCIE MAKULY (KAZUISTIKA)

CONTRIBUTION OF INTRAVITREAL INJECTIONS BY ANTIGROWTH FACTORS IN AGE-BASED DEGENERATION OF THE MACULA (CASE REPORT)

Kolesárová, Mária; Verešová, Blanka

Katedra farmakológie a toxikológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

maria.kolesarova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Farmakoterapeutické pokroky v liečbe retinovaskulárnych porúch oka boli za posledných 25 rokov veľmi významné. Liečivá aplikované do oka si vyžadovali intravitreálne podanie (IVT), ktoré sa v priebehu rokov stalo zlatým štandardom terapie mnohých ochorení sietnice, vrátane vekom podmienenej degenerácie makuly (VPDM). IVT injekciami sa aplikuje do sklovca oka široké spektrum liečiv, vrátane antibiotík, antivirotík, antimykotík, kortikosteroidov a látok proti vaskulárnemu endoteliálnemu rastovému faktoru (VEGF).

Cieľom štúdie bolo preukázať účinnosť dostupnej anti-VEGF terapie liečivom aflibercept u 62-ročnej pacientky s vlhkou formou vekom podmienej degenerácie makuly. Kazuistika bola získaná na Oftalmologickej klinike v Košiciach. V terapii bolo použité liečivo anti-VEGF aflibercept, ktoré bolo aplikované v dávke 2 mg jednou IVT injekciou raz mesačne, po dobu troch mesiacov. Následne sa pokračovalo režimom „treat and extend," jednou injekciou každé dva mesiace. Primárnym cieľovým ukazovateľom zlepšenia stavu boli hodnoty zmeny centrálnej hrúbky sietnice, zastavenie patologickej neovaskularizácie tkaniva, ústup edému a celkové zlepšenie zrakovej ostrosti v počte písmen celkovo + 13 písmen. V priebehu liečby pacientky bol zaznamenaný ústup edému a zmenšenie hrúbky sietnice o 223 µm.

Kľúčové slová: anti-VEGF látky; intravitreálna aplikácia; vekom podmienená degenerácia makuly

ABSTRACT

Pharmacotherapeutic advances in the treatment of retinal disorders of the eye have been very significant over the last 25 years. Drugs administered to the eye required intravitreal (IVT) administration, which over the years has become the gold standard for the treatment of many retinal diseases, including age-related macular degeneration (AMD). A wide range of drugs, including antibiotics, antivirals, antifungals, corticosteroids and anti-vascular endothelial growth factor (VEGF), are administered by IVT injections.

The aim of this study was to demonstrate the efficacy of available anti-VEGF therapy with aflibercept in a 62-year-old patient with a wet form of age-related macular degeneration. The case report was obtained at the Ophthalmology Clinic in Košice. The anti-VEGF drug aflibercept was used in the therapy at a dose of 2 mg by one IVT injection once a month for three months, followed by a treat and extend regimen, one injection every two months. The primary aims were the improvement in central retinal thickness, cessation of pathological tissue neovascularization, remission of edema, and overall improvement in visual acuity in letters + 13 letters in total. During the treatment, the patient experienced an improvement in edema and a reduction in retinal thickness of 223 µm.

Key words: anti-VEGF agents; age-related macular degeneration; intravitreal administration

ÚVOD

Vekom podmienená degenerácia makuly (VPDM) patrí vo vyspelých krajinách medzi najčastejšie ochorenia, ktoré vedú k strate videnia (De Jong, 2006). VPDM je multifaktoriálne ochorenie, pri ktorom dochádza k postupnej deštrukcii buniek sietnice, hlavne v jej centrálnej časti, ktorá sa nazýva makula alebo žltá škvrna. Deštrukcia buniek sietnice má za následok zhoršenie alebo úplnú stratu ostrého videnia (Černák a kol., 2009). Aj keď príčina vzniku VPDM stále nie je presne známa, na jej vzniku sa podieľajú viaceré rizikové faktory, akými sú vek, familiárny výskyt, rasová predispozícia, slnečné žiarenie, nedostatok antioxidantov v potrave, fajčenie, hypertenzia, obezita a hypercholesterolémia (Clemons a kol., 2005; Černák a Trnavec, 2008). VPDM môže prebiehať v dvoch formách, a to suchá (tiež nazývaná atrofická) alebo vlhká forma. Suchá forma VPDM sa vyskytuje v 80 % všetkých VPDM. V začiatočných štádiách v centrálnej časti sietnice sa vyskytujú drúzy Bruchovej membrány, ktoré vyzerajú ako žltavé bodky v sietnici. V tomto štádiu je videnie normálne. Postupne pribúdajú drúzy a dochádza k atrofii buniek sietnice. Videnie sa zhoršuje, pred okom sa objavuje tmavý fľak a pacienti nie sú schopní čítať a písať, zostáva im len periférne videnie. Vlhká forma VPDM sa vyskytuje v 20 % prípadov. Táto forma VPDM je nepriaznivejšia ako suchá, pretože pri nej dochádza k výraznejšiemu zhoršeniu videnia. Vlhká forma VPDM je spôsobená neovasklularizáciou chorioidey (abnormálnym rastom krvných ciev pod makulou), pričom môže presakovať tekutina a krv a spôsobovať tak opuch (EMA, 2020). To sa prejaví náhlym zhoršením videnia. Pri menšom opuchu sietnice pacienti rozoznávajú pokrivené a deformované predmety. Pri väčšom náleze dochádza k strate videnia. Centrálna časť sietnice je nadvihnutá, edematózna s často prítomným krvácaním (Černák a kol., 2009).

Liečba vlhkej formy VPDM je zložitá. Ak sa diagnostickými metódami zaznamená prítomnosť patologickej vaskularizácie, je liečba zameraná na jej elimináciu. Terapia sa môže uskutočniť viacerými spôsobmi, a to: laserová liečba, fotodynamická terapia (PTD) a intravitreálne podanie liečiv proti vaskulárnemu endoteliálnemu faktoru (VEGF).

Laserová terapia prostredníctvom zelených laserov je obmedzená len na neovaskularizácie mimo centrálnej časti sietnice, kvôli deštrukčnému efektu na sietnicu. V minulosti sa používala termoterapia pomocou červeného laseru, ktorá dnes už patrí medzi obsolentné metódy pre jej slabý efekt (Černák a kol., 2009).

Skutočnou prvou účinnou liečbou vlhkej formy VPDM bola PTD. Princíp tejto liečby spočíva v intravenóznom podaní proliečiva verteporfínu formou pomalej infúzie, ktoré sa hromadí v novovzniknutých cievach. Aktiváciou verteporfínu dochádza pomocou diódového lasera k vzniku metabolitov, ktoré toxicky pôsobia na rýchlo sa proliferujúce bunky endotelu novovytvorených ciev. V súčasnosti sa táto metóda používa zriedkavejšie alebo ako adjuvantná terapia s anti-VEGF liečbou (Černák a kol., 2009; Švihovec a kol., 2018). Spomínané obidve metódy u pacientov účinne spomaľovali progres neovaskularizácie ochorenia, avšak neponúkali šancu na výrazné zlepšenie videnia pacienta.

Najúčinnejšou liečbou vlhkej formy VPDM je v súčasnosti blokáda angiogenézy pomocou liečiv zameraných proti VEGF. VEGF je jedným z najvýznamnejších regulátorov angiogenézy, ktorý reguluje proliferáciu a permeabilitu endotelu (Avery a kol., 2017). Angiogenéza alebo neovaskularizácia predstavuje rast nových krvných ciev už z existujúcich ciev. Je to zložitý proces, kedy nové cievy vychádzajú už z existujúceho vaskulárneho riečiska sietnice a priliehajú k nemu. Nekontrolovaná angiogenéza v tele podporuje neoplastické ochorenia, retinopatie, nefropatie a niekoľko patologických stavov vrátane psoriázy (Georghe a kol., 2015). Včasná inhibícia faktorov vrátane VEGF, ktoré spôsobujú aktívnu vaskulárnu proliferáciu, môže zabrániť strate zraku. Strata zraku v tomto okamihu je výsledkom krvácania do sklovca alebo vylučovania tekutín z krehkých nových ciev pri neovaskularizácii tkaniva (Avery a kol., 2017).

V terapii viacerých chorôb sietnice priniesla revolúciu intravitreálna terapia (IVT), ktorá predstavuje štandardnú cestu podania liečiva do zadného segmnetu oka tak, aby sa dosiahli požadované koncentrácie liečiva. Je to invazívna metóda, ktorá umožňuje podanie molekuly liečiva priamo do sklovca oka (Agrahari a kol., 2016). Medzi výhody intravitreálneho podania liečiv patrí obchádzanie niekoľkých očných bariér (napr. epitel rohovky, stróma a bariéra krv-voda) a hematoencefalickej bariéry a znížené systémové účinky. Intravitreálna aplikácia sa používa v podávaní antibiotík, napr. penicilínu v terapii endoftalmitídy alebo anti-VEGF liečiv na zastavenie chorioidálnej neovaskularizácie, ktorá vedie k strate videnia a vyskytuje sa pri rôznych typoch retinopatie ako diabetická retinopatia, VPDM a oklúzia sietnicovej žily. Nedávno boli do praxe zavedené intravitreálne dexametazónové implantáty (Vries a kol., 2020).

Jednou z nevýhod intravitreálneho podania liečiva je aj častejšia aplikácia, čo môže byť pre pacientov problematické. Opakované dávkovanie môže poškodiť očné štruktúry vedúce k odlúčeniu sietnice, hyperémii, katarakte alebo endoftalmitíde (Agrahari a kol., 2016). Zároveň pri vstreknutí liečiva do oka dochádza k akútnym výkyvom vnútroočného tlaku, ktoré súvisia so zákrokom a trvajú maximálne niekoľko hodín. Obzvášť riziková skupina pacientov je už s existujúcim glaukómom oka (Vries a kol., 2020). Možné systémové nežiaduce účinky (NÚ) môžu vyplývať zo systémovej supresie VEGF pri intravenóznom podaní anti-VEGF. To zahrňuje hypertenziu, nefrotický syndróm, tromboembolické príhody, perforáciu čreva a oneskorené hojenie rán (Steward, 2012).

V súčasnosti sú v Európskej liekovej agentúre (EMA) na liečbu vlhkej formy VPDM registrované tri anti-VEGF liečivá: aflibercept, ranibizumab a brolucizumab (Quist a kol., 2021). Bevacizumab je anti-VEGF liečivo s rovnakou klinickou účinnosťou, ktorý nie je oficiálne registrovaný na liečbu vlhkej formy VPDM. V niekoľkých krajinách vrátane Holandska sa však bevacizumab od roku 2005 používa ako off-label liečba. Hoci v Holandsku sa bevacizumab odporúča ako liečba prvej voľby, bevacizumab je stále predmetom hodnotenia EMA v terapii vlhkej formy VPDM (Quist a kol., 2021). Klinické štúdie nepreukázali významný rozdiel v účinnosti a bezpečnosti medzi afliberceptom, ranibizumabom a bevacizumabom. Štvrtý anti-VEGF, brolucizumab, ktorý bol nedávno zaregistrovaný v EMA, sa ukázal byť rovnako účinný ako ostatné anti-VEGF (Ouist a kol., 2021).

Ranibizumab je fragment rekombinantnej humanizovanej monoklonálnej protilátky (Fab), ktorý je schopný väzby na proteín VEGF-A, a tak inhibuje proces angiogenézy. Ranibizumab bol schválený

FDA v roku 2006. Preukázal vynikajúce výsledky v liečbe neovaskulárnej (vlhkej) VPDM. Spomaľuje stratu videnia, a tiež zlepšuje zrakovú ostrosť u pacientov s neovaskulárnou VPDM (Joussen a Bornfeld, 2009).

Bevacizumab je rekombinantná humanizovaná myšia kompletná protilátka, ktorá sa viaže na VEGF-A a blokuje jeho pôsobenie (Avery a kol., 2017). V roku 2004 bol schválený FDA na liečbu kolorektálneho karcinómu (Stewart, 2012). V roku 2005 bol schválený a registrovaný EMA na liečbu kolorektálneho karcinómu, rakoviny pľúc, prs, obličiek a rakoviny CNS. Malá perspektívna štúdia s intravenóznym podávaním bevacizumabu preukázala jeho účinnosť proti vlhkej forme VPDM, ale obavy zo systematických nežiaducich účinkov zastavili ďalšie podávanie bevacizumabu pre očné ochorenia (Steward, 2012). V roku 2005 sa uskutočnili prvé úspešné podania jednodávkovej injekčnej liekovky s intravitreálnym bevacizumabom u pacientov s oklúziou sietnicovej žily a vlhkou formou VPDM a off-label použitie sa rýchlo rozšírilo medzi oftalmológov po celom svete (Stewart, 2012). Retrospektívna štúdia preukázala účinnosť bevacizumabu v liečbe neovaskulárnej VPDM so zlepšením priemerného videnia (Arevalo a kol., 2010).

Aflibercept bol schválený v roku 2011 FDA a v roku 2012 agentúrou EMA na liečbu neovaskulárnej VPDM. Aflibercept je rekombinantný fúzny proteín s molekulovou hmotnosťou 115 kDa, ktorý zastavuje patologickú choroidálnu neovaskularizáciu a bráni zhrubnutiu sietnice, vzniku edému a následnej strate zrakovej ostrosti. Jeho mechanizmus účinku spočíva v blokovaní väzby predovšetkým VEGF-A/-B a placentárneho rastového faktora (PIGF) na endotelové receptory VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, čím znižuje aktiváciu kaskády angiogenézy (Trichonas a Kaiser, 2013).

Brolucizumab je najnovšie intravitreálne liečivo schválené FDA v roku 2019 a agentúrou EMA v septembri v roku 2020. Je to humanizovaný nízkomolekulárny jednoreťazcový fragment, ktorý sa viaže na všetky izoformy VEGF-A a následne inhibuje neovaskularizáciu. Je najmenší z anti-VEGF protilátok s molekulovou hmotnosťou 26 kDa. Bol vyvíjaný na liečbu vlhkej VPDM, diabetického makulárneho edému a oklúziu retinálnej žily (Markham, 2019). Predklinické a klinické údaje o brolucizumabe poskytujú dôkaz o trvalej kontrole ochorenia s dlhšími injekčnými intervalmi, čím sa potenciálne znižuje liečebná záťaž u pacientov s neovaskulárnou VPDM (Tadayoni a kol., 2021).

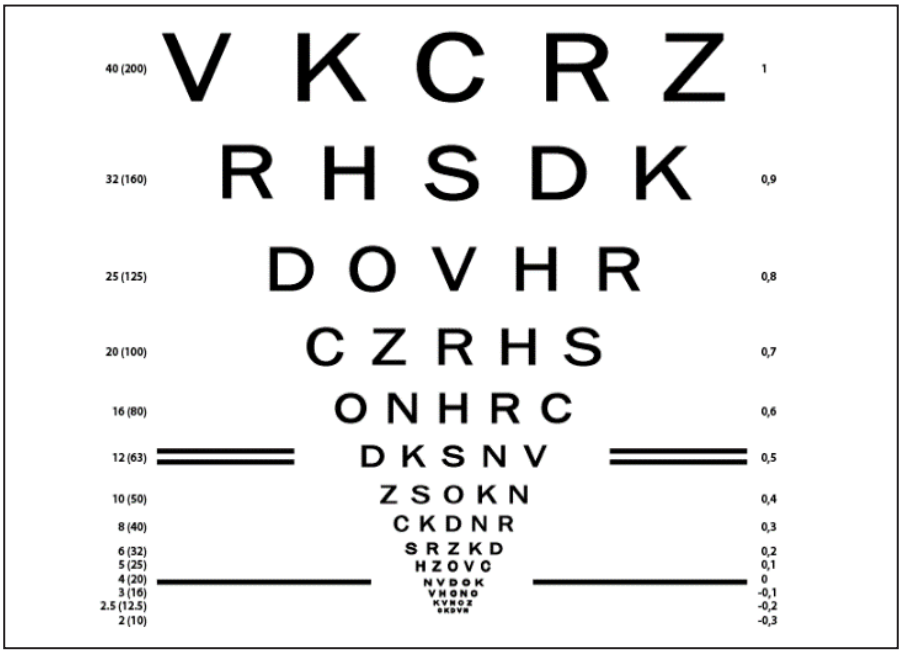
Avšak krátko po schválení FDA sa začali objavovať informácie o zápale po intravitreálnom podaní brolucizumabu pri terapii neovaskulárnej VPDM. Okrem prípadov vnútroočného zápalu bolo hlásených niekoľko prípadov retinálnej vaskulitídy, ktorá často vyústila do vaskulárnej oklúzie a výraznej straty zraku (Witkin a kol., 2020).

Cieľom štúdie bolo preukázať účinnosť intravitreálnej aplikácie afliberceptu u pacientky s diagnózou vlhkej formy VPDM na pravom oku prostredníctvom kazuistiky. Primárnym cieľovým ukazovateľom zlepšenia stavu boli hodnoty zmeny centrálnej hrúbky sietnice (CRT), zastavenie patologickej neovaskularizácie tkaniva, ústup edému a celkové zlepšenie zrakovej ostrosti.

Manažment liečby VPDM

Manažment liečby VPDM, ktorý je využívaný celosvetovo, má za úlohu maximalizovať výsledky zrakovej ostrosti a minimalizovať frekvenciu recidív v terapii ochorenia. Manažment aplikácie IVT je jednoduchý. Liečebný postup pozostáva z podávania jednej injekcie 1 x mesačne v troch po sebe nasledujúcich dávkach 2 mg afliberceptu. Na základe kontroly a výsledkov vyšetrenia zraku Fundus kamerou a optickou koherentnou tomografiou je interval liečby udržiavaný v dvoch mesiacoch alebo ďalej predlžovaný režimom **„treat and extend."** Vtedy dochádza k predlžovaniu intervalov medzi jednotlivými injekciami o 2 alebo 4 týždne. Intervaly sú predlžované tak, aby boli udržané stabilné hodnoty výsledkov vyšetrení zraku pacienta. Režim „treat and extend" zaručuje menší počet aplikovaných injekcií bez zmeny účinnosti pri liečbe pacienta so zámerom optimalizá-

Obr. 1: Optotypová tabuľa logMAR ETDRS



Zdroj: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/js16/refrakcni_vady/web/pages/03-naturalni-zrakova-ostrost.html

cie liečby (Georghe a kol., 2015).

Použité metodiky na diagnostiku ochorenia

Test zrakovej ostrosti

Testy zrakovej ostrosti sú súčasťou komplexného oftalmologického vyšetrenia pacienta. Hodnota zrakovej ostrosti je dôležitým vstupným a výstupným údajom u väčšiny klinických štúdií (Veselý a Synek, 2012). Cieľom testu zrakovej ostrosti je rýchlo a efektívne zistiť jasnosť alebo ostrosť videnia. Testovanie zrakovej schopnosti skúma schopnosť pacienta rozlíšiť rôzne optotypy (rozpoznateľné písmená alebo symboly) na štandardnú vzdialenosť. Často preferovaným testom zrakovej ostrosti je **graf LogMAR,** známy ako **ETDRS** (viď obr. 1). Písmená v ETDRS grafe sú bodované v písmenovej tabuľke, so zmenšujúcou sa veľkosťou, zhora nadol. V každom zo 14 riadkov je 5 písmen (viď obr. 1). Počet písmen, ktorý je pacient schopný prečítať v tabuľke, mu určuje ostrosť zraku. Vyšetruje sa vždy každé oko samostatne.

Výsledky zrakovej ostrosti sa klasicky uvádzajú pomocou hodnoty 20/20 (t. j. 6 / 6 pri použití metrov) pre štandardné videnie. Čitateľ popisuje vzdialenosť od mapy, zvyčajne 20 stôp (6 m). Menovateľ popisuje vzdialenosť, na ktorú môže jednotlivec s normálnym zrakom (zrak 20/20) prečítať rovnaký riadok v tabuľke. Takže zraková ostrosť sa označuje ako číslo, kde štandardné videnie je 20/20. Zraková ostrosť klesá so zvyšujúcim sa počtom hodnoty v menovateli a zlepšuje sa so znižujúcim sa počtom hodnoty v menovateli. Jednou z najbežnejších príčin zmeneného videnia je refrakčná chyba, ako je krátkozrakosť, ďalekozrakosť, ale aj ďalšie príčiny poškodenia zraku ako sú astigmatizmus, amblyopia, odlúčenie sietnice, ma-

kulárna degenerácia, katarakta, glaukóm a ischémia. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) popisuje jednotlivcov so slabým zrakom ako s najlepšie korigovaným zrakom 20/60 alebo horším a slepých ako s najlepšie korigovaným zrakom horším ako 20/400, zatiaľ čo legálna slepota je v Spojených štátoch identifikovaná ako 20/200 (Daiber a Gnugnoli, 2020).

Fundus kamera

Fundus retinálna kamera patrí medzi štandardné zobrazovacie prístroje. Fundus kamera je špecializovaný mikroskop s nízkou spotrebou energie s pripojenou kamerou určenou na zaznamenávanie vnútorného povrchu oka, vrátane sietnice a jej vaskulatúry. Sietnicu je možné vyfotografovať priamo, pretože predstavuje vstup aj výstup pre svetelné lúče z fundusovej kamery. Pacient sedí pri fundusovej kamere s bradou a čelom opretým o tyč. Fotograf zaostrí a stlačením spúšte sa vytvorí fotografia očného pozadia. V oftalmológii sa tieto fotografie používajú na sledovanie a diagnostiku rôznych očných ochorení. Oči pacienta sa zvyknú pred fotografiou rozkvapkať parasympatolytikom, aby sa dosiahla mydriáza, kvôli výhode lepšieho zobrazenia zadnej časti pozorovanej oblasti oka (Saine a Tyler, 2020).

Optická koherentná tomografia

Optická koherentná tomografia (OCT) predstavuje základnú zobrazovaciu techniku v diagnostike a sledovaní vaskulárnych chorôb sietnice oka. OCT je neinvazívna optická vyšetrovacia metóda, ktorá zobrazuje sietnicu v reze *in vivo* v rozlíšení 3 – 5 µm. OCT meria hrúbku sietnice, umožňuje rozlíšenie presakujúcich mikroaneuryziem od nepresakujúcich, taktiež zobrazuje voľnú tekutinu v jednotlivých vrstvách sietnice (Molnárová, 2019).

Optická koherentná tomografická angiografia

Optická koherentná tomografická angiografia (OCTA) je novšia zobrazovacia modalita, ktorá poskytuje neinvazívne hodnotenie sietnicovej a choroidálnej vaskulatúry a prebiehajúcu subretinálnu neovaskularizáciu (SRN). Vyšetrenie funguje ako typ optickej biopsie a je výkonnou zobrazovacou technológiou pre lekársku diagnostiku (Fujimoto a kol., 2000).

KAZUISTIKA

Kazuistka pacientky s VPDM bola poskytnutá MUDr. Galinou Maťušovou z ambulancie Mikrochirurgie oka, 3F s. r. o. v Košiciach.

Anamnéza pacienta: 62-ročná žena, pacientka pociťuje za posledné mesiace pokles videnia v pravom oku (PO). Ľavé oko (ĽO) je bez zmeny. Pred dvoma rokmi bola vykonaná úspešná operácia šedého zákalu na obidvoch očiach (artefakia). Objektívny stav zrakovej ostrosti pacientky bol meraný a stanovený podľa optotypovej tabule **logMAR ETDRS**.

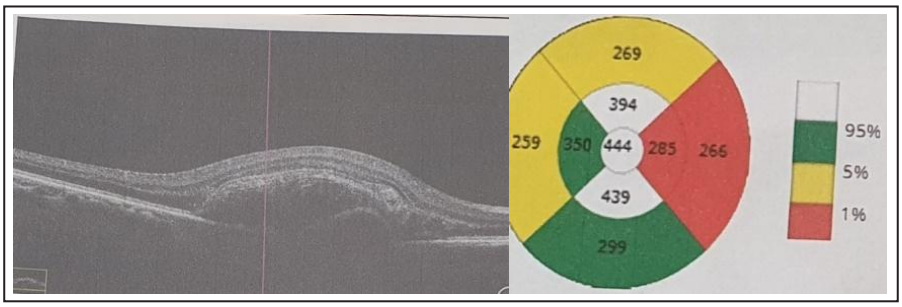
Prvé vyšetrenie

Objektívny nález: Najlepšie korigovaná zraková ostrosť (NKZO):
PO: 20/160 (40 písmen)
ĽO: 20/20 (85 písmen)

Prvé vyšetrenie očného pozadia PO pacientky preukazuje kolorovaný a ohraničený zrakový nerv. Retinálny pigmentový epitel je presiaknutý tekutinou, zároveň je zhrubnutý a atrofovaný. V cievach sú pozorované sklerotické zmeny. V makule sú pozorované fyziologické zmeny vplyvom ochorenia VPDM. Zároveň je tam lokalizovaný edém, drúzy a hemorágie s prebiehajúcou subretinálnou neovaskulaizáciou. OCT potvrdila centrálnu hrúbku sietnice na úrovni **444 µm.** OCTA potvrdila aktívnu subretinálnu neovaskularizáciu na úrovni *choriocapillaris.* Pacientke je diagnostikovaná podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb 10 (MKCH 10) diagnóza **H35.3 Degenerácia makuly a zadného pólu oka (PO)** (vlhká forma ochorenia VPDM). Pacientka je objednaná na aplikáciu lieku Eylea inj., ktorý obsahuje liečivo aflibercept, v lokálnej anestézii.

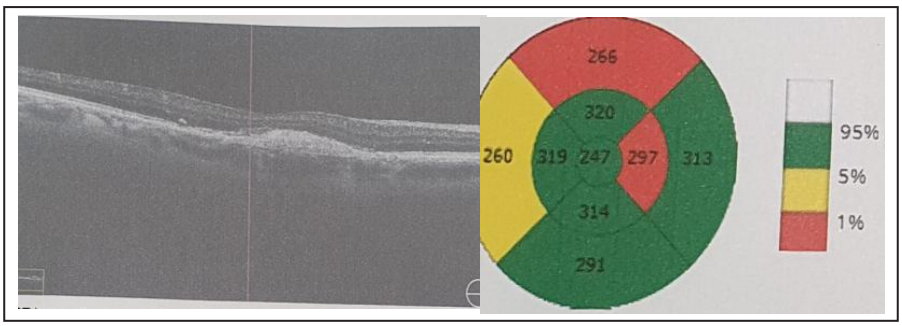
Obr. 2: OCT snímky makuly sietnice

A: Prvé vyšetrenie PO pacientky



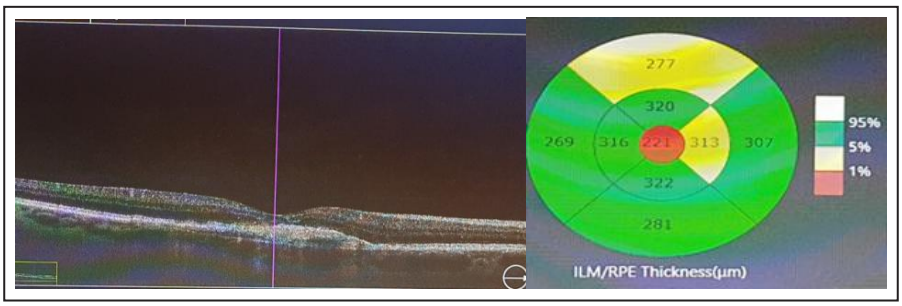
6 mm lineárny sken makuly sietnice PO pacientky. Snímok zobrazuje zjazvenie tkaniva makuly a edém makuly približne 3 mm naľavo od fovey. Centrálna hrúbka sietnice je **444 µm**.

B: po 3 IVT aplikáciách afliberceptu



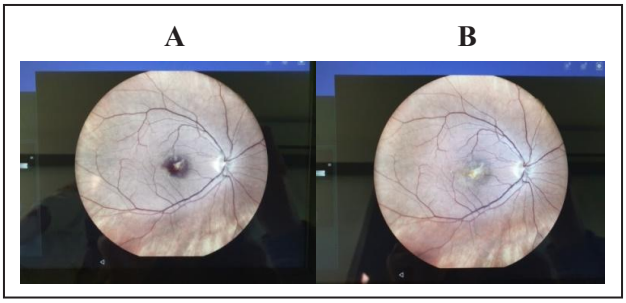
5 mm lineárny sken makuly sietnice PO pacientky zobrazuje mierny pokles edému makuly po 3 IVT aplikáciách afliberceptu, Centrálna hrúbka sietnice je **247 µm**.

C: po 6 IVT aplikáciách afliberceptu



Snímok zobrazuje výrazný ústup zjazvenia a edému v makule sietnice PO po 6 IVT aplikáciách afliberceptu, Centrálna hrúbka sietnice je **221 µm**.

Obr. 3: Fotografie pravého oka pacientky pri prvom vyšetrení (A) a po 6 IVT aplikáciách afliberceptu (B)



Fotografie zobrazujú hemoragie v oblasti makuly sietnice PO pacientky pred podaním afliberceptu (A) a vstrebané intraretinálne hemoragie po 6 IVT aplikáciách afliberceptu

Tab. 1: Efektívnosť terapie afliberceptu

Sledované parametre na PO		
	NKZO	**CRT**
Pred aplikáciou	20/160 (40 písmen)	444 µm
3 IVT aplikácie afliberceptu	20/125 (47 písmen) **→ zisk 7P**	247 µm
6 IVT aplikácií afliberceptu	20/100 (53 písmen) **→ zisk 6P**	221 µm
Celkové zlepšenie	**o 13 písmen**	**– 223 µm**

NKZO – najlepšie korigovaná zraková ostrosť, CRT – centrálna hrúbka sietnice, PO – pravé oko, P – písmeno

Kontrola pacientky po 3 IVT aplikáciách afliberceptu

Po 3 IVT aplikáciách afliberceptu došlo u pacientky k výraznému zlepšeniu najlepšej korigovanej zrakovej ostrosti so ziskom **7 písmen.** Pacientka pociťuje mierne zlepšenie videnia PO.

NZKO:
PO: 20/125 (47 písmen) → **zisk 7 písmen**
ĽO: 20/20 (85 písmen)

Očné pozadie preukazuje nezmenený kolorovaný a ohraničený zrakový nerv. Retinálny pigmentový epitel ostáva presiaknutý tekutinou a atrofovaný, podobne aj v cievach pretrvávajú sklerotické zmeny. V makule pretrváva edém, drúzy, preretinálna hemorágia a aktívna subretinálna neovaskularizácia. OCT zaznamenáva minimálne intraretinálne hemorágie, avšak centrálna hrúbka sietnice klesla na **247 µm.** Odporúčané je ďalšie pokračovanie v anti-VEGF liečbe.

Kontrola pacientky po 6 IVT aplikáciách afliberceptu

Po ďalších 3 IVT aplikáciách afliberceptu sa NKZO zlepšila o ďalších 6 písmen, celkovo sa u pacientky od začiatku liečby zlepšila zraková ostrosť o **13 písmen.** Pacientka pociťuje zlepšenie videnia PO.

NKZO:
PO: 20/100 (53 písmen) → **zisk 6 písmen**
ĽO: 20/20 (85 písmen)

Po 6 IVT injekciách afliberceptu vyšetrenie očného pozadia ukazuje kolorovaný a ohraničený zrakový nerv. Retinálny pigmentový epitel je už spevnený bez presiaknutej tekutiny. Sklerotické zmeny v cievach pretrvávajú aj naďalej. Avšak makula je bez edému a subretinálna neovaskularizácia je neaktívna. OCT potvrdila vstrebané intraretinálne hemorágie a centrálna hrúbka sietnice sa znížila na úroveň **221 µm.**

Obrázok 2 znázorňuje snímky makuly sietnice PO pacientky prostredníctvom optickej koherentnej tomografie z prvého očného vyšetrenia (A), po 3 IVT aplikáciách (B) a 6 IVT aplikáciách afliberceptu (C).

Fotografie pravého oka pacientky nasnímané prostredníctvom Fundus kamery znázorňuje obr. 3.

Efektívnosť terapie afliberceptu prostredníctvom sledovaných parametrov NKZO a CRT pravého oka pacientky zobrazuje tabuľka 1.

Zraková ostrosť PO u pacientky sa od začiatku liečby zlepšila celkovo **13 písmen**, centrálna hrúbka sietnice sa celkovo znížila o **223 µm.**

DISKUSIA

Vekom podmienená degenerácia makuly patrí medzi najčastejšie ochorenie vo vyspelých krajinách. Postihuje milióny ľudí na celom svete. Najväčším rizikovým faktorom rozvoja ochorenia je vek pacienta. Až 30 % populácie staršej ako 75 rokov je postihnutá týmto ochorením (Novák a Sverák, 2007). Predpokladá sa, že prevalencia VPDM vzrastie na 22 miliónov do roku 2050 (Nov a Moisseiev, 2020).

Liečba chorôb sietnice ako je VPDM je náročná, a preto je potrebné hľadať nové neinvazívne spôsoby podania liekov. Intravitreálne injekcie sú v súčasnosti akceptovanou metódou pre podávanie vnútroočných liekov a stali sa neoddeliteľnou súčasťou oftalmologickej praxe (Nov a Moisseiev, 2020).

Intravitreálne podávanie liečiv injekciami do sklovca oka prinieslo revolúciu v liečbe viacerých chorôb sietnice. Intravitreálne injekcie anti-VEGF liečivami sa stali 1. voľbou liečby väčšiny chorôb zadného segmentu oka za posledných 15 rokov ich používania v oftalmológii (Quist a kol., 2021). Liečivo sa pri intravitreálnej aplikácii rýchlo distribuuje do sietnice a pomaly sa absorbuje systémovou cirkuláciou, pričom koncentrácie sú približne po 2 týždňoch nedetekovateľné.

V terapii vlhkej formy VPDM 62-ročnej pacientky bolo indikované anti-VEGF liečivo aflibercept intravitreálnymi injekciami. Jednou z hlavných výhod v mechanizme pôsobenia afliberceptu je schopnosť viazať a účinne blokovať vaskulárne endoteliálne rastové faktory VEGF-A, VEGF-B a PIGF, a tak zastaviť patologickú neovaskularizáciu tkaniva. V porovnaní s inými anti-VEGF liečivami má aflibercept lepšiu schopnosť inhibovať subretinálnu neovaskularizáciu tkaniva, zabrániť presakovaniu z ciev a následnej tvorbe edému tkaniva (Wang a Lo, 2018).

Tieto účinky afliberceptu sa potvrdili aj v terapii pacientky s VPDM. V popisovanej kazuistike 62-ročnej pacientky zdravotná poisťovňa schválila liečbu 6 intravitreálnymi injekciami afliberceptom. Celkovo po 6 intravitreálnych aplikáciách liečiva sa zraková ostrosť u pacientky od začiatku liečby zlepšila o **13 písmen** a centrálna hrúbka sietnice sa znížila o **223 µm**. Taktiež bol zaznamenaný výrazný ústup edému makuly sietnice, subretinálna neovaskularizácia bola neaktívna a hemorágie v oblasti makuly boli vstrebané. Pacientka je ďalej sledovaná bez potrebnej liečby. Aflibercept predstavuje dobre tolerované liečivo s minimálnym výskytom nežiaducich účinkov vrátane arteriálnych tromboembólií (ATE). Výskyt ATE bol zaznamenaný na úrovni 1,8 % počas prvého roka klinických skúšok a predstavovali výskyt nefatálnej mozgovej príhody, či infarktu myokardu. Medzi ďalšie výhody afliberceptu patrí dlhší biologický polčas a vyššia afinita k VEGF-A, čo môže viesť k zníženiu počtu vnútroočných injekcií a k redukcii návštev u oftalmológa (Trichonas a Kaiser, 2013).

ZÁVER

V závere štúdie môžeme potvrdiť účinnosť terapie intravitreálnymi injekciami afliberceptom u 62-ročnej pacientky s vlhkou formou VPDM. Po aplikácii 6 intravitreálnych injekcií afliberceptu bolo zaznamenané v priebehu jej liečby zlepšenie celkovej zrakovej ostrosti o 13 písmen, ústup edému, zastavenie neovaskularizácie a zmenšenie hrúbky sietnice o 223 µm.

Avšak doposiaľ ani jedno anti-VEGF liečivo nespôsobuje úplnú regresiu choriodálnej neovaskularizácie. V ďalšej dekáde je potrebné výskum zamerať na molekuly, ktoré budú pôsobiť preventívne alebo reverzne v chorioidálnej revaskularizácii. Tiež je potrebné rozvíjať dlho pôsobiace terapie očných ochorení.

POĎAKOVANIE

Za poskytnutie kazuistiky a odborných materiálov patrí poďakovanie MUDr. Galine Maťušovej z Mikrochirurgie oka 3F v Košiciach.

ZOZNAM LITERATÚRY

Arevalo, J. F., Sanchez, J. G., Wu, L., Berrocal, M. H., Alezzandrini, A. A., Restrepo, N., Maia, M., Farah, M. E., Brito, M., Díaz-Llopis, M., Rodríguez, F. J., Reategui, G., Iturralde-Iraola, J., Udaondo-Mirete, P., Pan-American Collaborative Retina Study Group: Pan-American Collaborative Retinal Study Group. Intravitreal bevacizumab for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration at twenty-four months: the Pan-American Collaborative Retina Study. *Ophthalmology*, 2010, 117 (10), 1974 – 1981.

Agrahari, V., Mandal, A., Agrahari, V., Trinh, H. M., Ray, M. J. A., Hadji, H., Mitra, R., Pal, D., Mitra, A. K.: A comprehensive insight on ocular pharmacocinetics. *Drug. Deliv. Trans.l Res.*, 2016, 6 (6), 735 – 754.

Avery, L. R., Castellarin, A., Steinie, N., Dhoot, D., Pieramici, D., See, R., Couvillion, S., Nasir, M., Rabena, M.: Systematic pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravitreal aflibercept, bevacizumab and ranibizumab. *Retina*, 2017, 37 (10), 1847 – 1858.

Clemons, T. E., Milton, R. C. Klein, R., Seddon, J. M., Ferris, F. L.: Age-related Eye Disease Study Research Group.: Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophtalmology*, 2005, 112 (4), 533 – 539.

Černák, A, Černák, M., Trnavec, B.: Vekom podmienená degenerácia makuly [Age related macular degeneration]. *Med. Pro Praxi*, 2009, 6 (2), 81 – 84.

Černák A., Trnavec, B.: Vekom podmienená degenerácia makuly [Age related macular degeneration]. *Bedeker zdravia*, 2008, 1, 60 – 61.

Daiber, H., Gnugnoli, D. M.: *Visual Acuity*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2020. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563298/. Accessed May 4, 2022.

De Jong, P. T.: Age-relatedmacular degeneration. *N. Engl. J. Med*., 2006, 14, 1474 – 1485.

European medicines agency: Eylea (aflibercept). Prehľad o lieku Eylea a prečo bol povolený v EÚ. EMA/433530/2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/eylea-epar-medicine-overview_sk.pdf. [cit. 2022-05-13].

Fujimoto, J., Pitris, C., Boppart, S., Brezinski, M.: Optical Coherence Tomography: An emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy. *Neoplasia*, 2000, 2 (1 – 2), 9 – 25.

Gaudana, R., Anathula, H., Parenky, A., Mitra, A.: Ocular drug delivery, Article review. *AAPS Journal*, 2010, 12, 348 – 360.

Gheorghe, A., Mahdi, L., Musat, O.: Age-related macular degeneration. *Rom. J. Ophthalmol.*, 2015, 59 (2), 74 – 77.

Joussen, A. M., Bornfeld, N.: The treatment of Wet Age-Related Macular Degeneration. *Dtsch. Arztebl. Int*., 2009, 106 (18), 312 – 317.

Markham, A.: Brolucizumab: First Approval. *Drugs*, 2019, 79 (18), 1997 – 2000.

Molnárová, M.: Súčasné možnosti diagnostiky a liečby diabetickej retinopatie a diabetického edému makuly [Current options for diagnosing and treatment of diabetic retinopathy and diabetic macular edema]. *Forum Diab*., 2019, 8 (2), 106 – 110.

Nov, E., Moisseiev, E.: The Top 100 most-cited papers on intravitreal injections: A bibliographic perspective. *Clin. Ophthalmol.*, 2020, 14 (2), 2757 – 2772.

Novák J., Sverak, J.: *Česká a slovenská oftalmológia*, 2007, 4, 299 – 302.

Quist, S., Jong, L., Asten, F., Konester, P., Postma, M., Freriks, R.: Cost- minimisation analysis of treat-and-extend regimen with anti-VEGF in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Graefers Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2021,

13, 1 – 13.

Saine, P., Tyler, M. E.: *Fundus photography overview. Excerpted from: Ophthalmic Photography: Retinal Photography, Angiography and Electric Imaging*. 2nd Edn. Butterworth-Heinemann Medical, 2020. https://www.opsweb.org/page/fundusphotography. Accessed May 4, 2022.

Stewart, M.: The expanding role of vascular endothelial growth factor inhibitors in ophthalmology. *Mayo Clin. Proc*., 2012, 87 (1), 77 – 88.

Schmidt-Erfurth, U., Arumbi, J., Gerendas, B., Midena, E., Sivaprasad, S., Tadayoni, R., Wolf, S.: Guidlines for the management of retinal vein occlusion by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). *Ophthalmologica*, 2019, 242, 123 – 162.

Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., Votava, M.: *Farmakologie* [Pharmacology]. Praha: Grada Publishing, a. s., 2018. 962 s.

Veselý, P., Synek, S.: Repeatability and reliability of the visual acuity examination on logMAR ETDRS and Snell chart. *Čes. a slov. Oftal*., 2012, 68 (2), 71-75.

Tadayoni, R., Sararols, L., Weissgerber, G., Verma, R., Clemens, A., Holz, F. G.: Brolucizumab: A newly developed anti-VEGF molecule for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmologica*, 2021, 244, 93 – 101.

Trichonas, G., Kaiser, P.: Aflibercept for the treatment of age-related macular degeneration. *Ophthalmol. Ther.*, 2013, 2, 89 – 98.

Vries, V., Bassil, F., Ramdas, W.: The effects of intravitreal injections on intraocular pressure and retinal nerve fiber layer: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.*, 2020, 10, 132 – 148.

Wang, W., Lo, A. C. Y.: Review: Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments. *Int. J. of Molecular Science*, 2018, 19, 1816.

Witkin, A. J., Hahn, P., Murray, T. G., Arevalo, J. F., Blinder, K. J., Choudhry, N., Emerson, G. G., Goldberg, R. A., Kim, S. J., Pearlman, J., Schneider, W., Tabandeh, H., Wong, R. W.: Occlusive retinal vasculitis following intravitreal brolucizumab. *J. Vitreoretin. Dis.*, 2020, 4 (4), 269 – 279.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, IV., 2: 107 – 113, 2022

EFFECT OF EPOXICONAZOLE ON BOVINE ACETYLCHOLINE ESTERASE GENE EXPRESSION

Holečková, Beáta; Koleničová, Simona; Galdíková, Martina; Halušková, Jana; Schwarzbacherová, Viera

Department of Biology and Physiology
University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice
The Slovak republic

beata.holeckova@uvlf.sk

ABSTRACT

Conazoles are ergosterol-biosynthesis-inhibiting (EBI) fungicides used largely in many European countries in the cultivation of crops. Exposure to these compounds may cause many adverse effects including hepatotoxicity, carcinogenicity, reproductive toxicity and endocrine disruption. However, the possible effects of conazoles on the acetylcholine pathway are poorly understood. Epoxiconazole is a conazole fungicide relatively frequently applied in the agriculture of the EU. In our study, we focused on investigating the potential effect of epoxiconazole on bovine acetylcholine esterase (*AChE*) gene expression, because AChE enzyme plays a crucial role in the metabolization of the neurotransmitter acetylcholine. We used bovine cells as the source of information: it is generally accepted that cattle are a useful biological indicator of pollution in the environment. Whole blood cultures of two healthy donors (bulls) were treated with a set of different epoxiconazole amounts (2.5, 5.0, 10, 25, 50 and 100 µg.ml^{-1}) for 24 h and 48 h. Quantitative real-time PCR was used as a method of gene expression investigation. The results indicated that the level of bovine *AChE* gene expression increased after treatment for 24 h. Prolonged 48 h exposure caused the significantly higher expression level of the *AChE* gene only in cells treated with lower 2.5 and 5.0 µg.ml^{-1} ($p < 0.01$) doses. On the contrary, the highest epoxiconazole amounts (25 and 50 µg.ml^{-1}) resulted in inhibition of acetylcholine esterase gene expression (50 µg.ml^{-1}; $p < 0.05$) when compared with negative control. Our results suggest that epoxiconazole probably has the potential to affect *AChE* gene expression in bovine cell cultures.

Key words: acetylcholine esterase gene; bovine lymphocytes; fungicide epoxiconazole

INTRODUCTION

Triazole pesticide epoxiconazole (EPX) is used worldwide as a fungicide for plant protection. It is known to combat various target fungal diseases in cereals, rice, sugar beets and other plants. In Europe, epoxiconazole is part of several commercially successful one-compound fungicide formulations (Epic, Opus) or two-compound formulations composed of combinations of EPX with different pesticide (Splice, Swing Gold, Tango Super, Venture).

Together with tebuconazole, glyphosate, boscalid and DDTs, epoxiconazole belongs to the most frequently found agents in agricultural soil samples of 11 member states of the European Union (EU) (Silva et al., 2019). This contribution might be a result of the low biodegradability and photochemical stability of the EPX molecule that makes it very persistent in soil and aquatic sediment (Passeport et al., 2011) and allows entering multiple environmental media through spray drift or surface runoff (Potter et al., 2014). Bovine farm animals are exposed to chemical agents through grazing; as mentioned by Ferré et al. (2018), diet represents the main source of chronic exposure of these animals to pesticides. Therefore, ruminants are one of the first animals in which adverse effect of this exposure may occur. For this reason, bovine cells such as cultured blood lymphocytes are a useful source for experimental observations of the cytostatic, cytotoxic and genotoxic potential of pesticides (Ferré et al., 2020) and the molecular mechanism by which pesticides exert their adverse effects.

Acetylcholine esterase (AChE) is a crucial metabolizing enzyme of acetylcholine, an important neurotransmitter for central nervous system (CNS) function. Although conazoles are not typical inhibitors of acetylcholine esterase, these effects may not be completely ruled out. Related to acetylcholine esterase (*AChE*) gene, Zhang and Greenberg (2012) observed that changes in the expression of the human *AChE* gene could be linked with apoptotic processes in cells. To reveal the potential effect of EPX on the bovine *AChE* gene expression, we focused on the assessment of bovine cultures of whole blood exposed to various doses of epoxiconazole.

MATERIAL AND METHODS

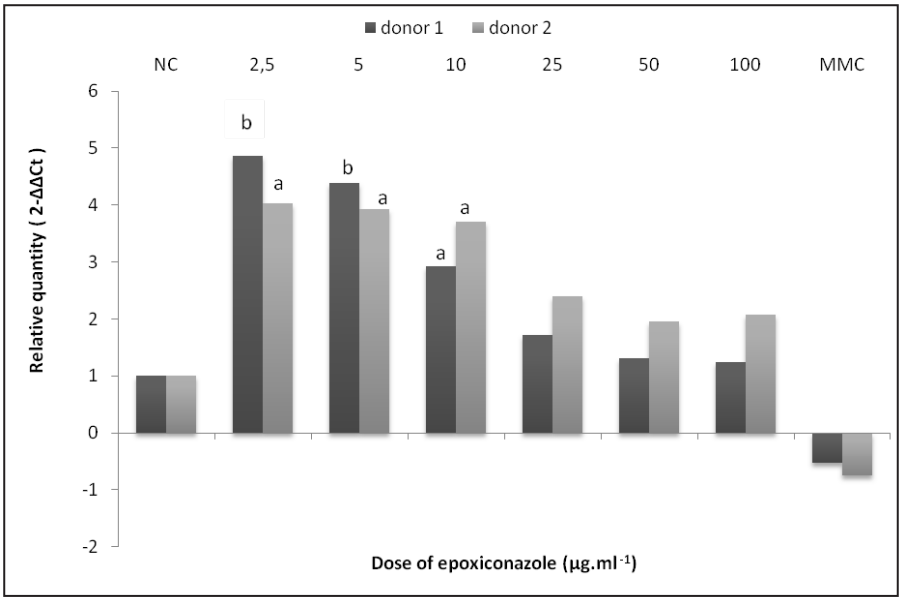
Blood collection and cultivation

Blood samples were aseptically taken from the *vena jugularis* of two clinically healthy bulls (6-month-old, Slovak-spotted cattle), in accordance with national and institutional rules for the protection of humans and animals. The whole blood was cultivated under sterile conditions in 4 ml RPMI-1640 supplemented with L-glutamine, 15 µM HEPES (Sigma, St. Louis, MO, USA), 15 % fetal bovine serum (Sigma, St. Louis, MO, USA), antibiotic-antimycotic mixture (100 $U.ml^{-1}$ penicillin; 0.1 $mg.ml^{-1}$ streptomycin; 0.25 $\mu g.ml^{-1}$ amphotericin B; Sigma, St. Louis, MO, USA) and phytohaemagglutinin (PHA; Welcome, Dartford, Germany) to stimulate mainly T-lymphocytes division. The tested fungicide epoxiconazole (CAS 133855-98-8; 99 % of purity) was dissolved in solvent dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, St. Louis, MO, USA) and added to medium 48 h (approximately two cell cycles) and 24 h (approximately one cell cycle) before the total end of cultivation (72 h). The amounts of epoxiconazole investigated were determined in our previous study (Šiviková et al., 2018) and were as follows: 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, and 100 $\mu g.ml^{-1}$. Mitomycin C (MMC; Sigma, 0.4 µM) was used as positive control. Blood cultures with DMSO (1 %) were used as negative controls (NC).

Isolation of RNA and Real-time PCR reaction

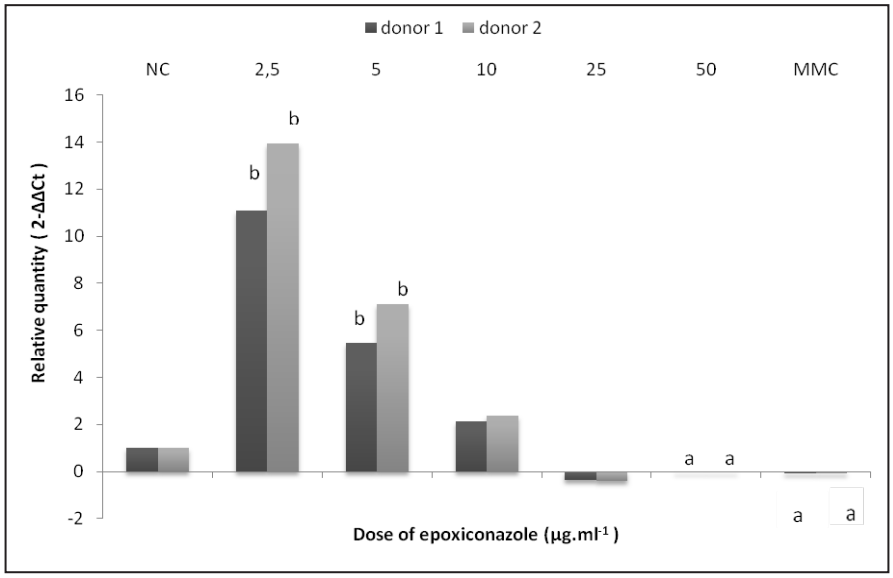
The Aurum TM Total RNA Mini Kit (BioRad, USA) was used for RNA isolation from cultured cells. The cDNA was prepared by reverse transcription of RNA using iScript TM cDNA Synthesis kit (BioRad, USA). Primers and fluorescence labelled probe for detection of bovine *AChE* gene were designed and prepared by Generi Biotech (Czech republic). Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A (*POLR2A)* gene was applied as a reference one. Real-time PCR was conducted using a thermo-

Fig. 1: Changes in *AChE* gene expression in cultured bovine lymphocytes exposed to epoxiconazole for 24 hours in two bovine donors



a ($p < 0.05$), b ($p < 0.01$), c ($p < 0.001$)

Fig. 2: Changes in *AChE* gene expression in cultured bovine lymphocytes exposed to epoxiconazole for 48 hours in two bovine donors



a ($p < 0.05$), b ($p < 0.01$), c ($p < 0.001$)

cycler CFX96 Touch Real Time PCR System (Bio-Rad, USA). The initial denaturation at 95 ºC/3 min was followed by 40 cycles of alternation of denaturation at 95 ºC/10 s and hybridization. Extension was performed at 60 ºC/20 s. The method of Livak and Schmittgen (2001) was used for the relative quantification (RQ) determination. RQ were calculating using the formula $RQ = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ where $\Delta\Delta Ct = (Ct_{GOI} - Ct_{REF})_{Time\ x} - (Ct_{GOI} - Ct_{REF})_{Time\ 0.}$ In the formula, Ct denoted value of threshold cycle, GOI denoted gene of interest and REF indicated reference gene. Statistical analysis was carried out by the ANOVA and Dunnet's test.

RESULTS AND DISCUSSION

As shown in Fig. 1, 24 h treatment of cultured bovine cells revealed a statistically significant increase in bovine *AChE* gene expression at doses of 2.5, 5.0 and 10.0 µg.ml^{-1} (mostly $p < 0.05$) in both donors. The doses higher than 10.0 µg.ml^{-1} (25, 50 and 100 µg.ml^{-1}) induced slightly increased expression, but statistical significance was not recorded when compared with negative control. Prolonged time of exposure (48 h) caused significantly higher expression of the *AChE* gene in cells treated with two lowest concentrations of 2.5 and 5.0 µg.ml^{-1} ($p < 0.01$) in comparison with negative control. Conversely – with increasing doses (25, 50), a gradual inhibition of bovine acetylcholinesterase gene expression was noted (see Fig. 2): application of a dose of 50 µg.ml^{-1} induced statistically significant inhibition of bovine acetylcholinesterase gene expression ($p < 0.05$). The highest dose of 100 µg.ml^{-1} of epoxiconazole caused fluorescence signal, which was not measurable during the real-time PCR process; this observation may indicate a strong inhibition of bovine *AChE* gene expression after prolonged 48 h exposure.

The important properties of conazoles include inhibition of ergosterol synthesis: according to European Commission (2015), they are candidates for substitution because of their toxicity for reproduction and endocrine disruption potential. There is evidence that conazole fungicides tend to form long-term residues in soil and they are suspected carcinogens (European Comission, 2015; Chambers et al., 2014).

As reported by Hvězdová et al. (2018), after triazine herbicides (89 % of soils), conazole fungicides showed the second most frequent occurrence in soils (73 % of soils) and also high levels (53 % of soils with total conazoles above 0.01 mg.kg^{-1}) in Central Europe. The most frequent were epoxiconazole (48 % of soils) and tebuconazole (36 % of soils); these conazoles also frequently exceed 0.01 mg.kg^{-1} (in 25 % and 11 % of soils, respectively). The measured levels of epoxiconazole together with frequent presence in soils represent a risk for the agroecosystems (Vašíčková et al., 2019). Using *in silico / in vitro* approach, Akram et al. (2019) demonstrated the ability of epoxiconazole to inhibit human 11β-hydroxylase (CYP11B1) and aldosterone synthase (CYP11B2), which calalyze the formation of cortisol and aldosterone in the adrenal cortex. Disruption of their synthesis could contribute to cardio-metabolic diseases, chronic kidney disease, osteoporosis and immune-related disorder. On the other hand, the authors presumed that epoxiconazole concentrations to inhibit CYP11B1 and CYP11B2 are unlikely reached through environmental exposure in the general population: however, a contribution to effects of mixtures and of occupational exposure needs to be investigated.

Many pesticides exert toxicity by inhibiting the enzyme acetylcholine esterase (AChE) (Bolton and Lim, 1991) which degrades acetylcholine (ACh), an essential neurotransmitter in the central nervous system (CNS) of insects, rodents, and humans. The overexposure to pesticides results in the AChE inhibition at brain and nervous system nerve endings; as a consequence, the ACh concentration increases its effects. The reason to perform our preliminary experiments was that only scarce information is available related to inhibiting or stimulating potential of epoxiconazole on bovine acetylcholine esterase expression. In our study, not inhibition but increased levels of *AChE* gene expression were observed in bovine lymphocytes after 24 h exposure to EPX.

The increased level of *AChE* gene expression may be related to apoptosis as documented in our previous study (Šulik and Holečková, 2015). This agrees with findings of Šiviková et al. (2018) who revealed that EPX had the ability to induce apoptosis and significantly affect cell-cycle kinetics. The enhanced expression of *AChE* gene and elevated activity of AChE enzyme were also detected in apoptotic cells of various human primo cultures and cell lines by Zhang and Greenberg (2012). Also previous *in vitro* and *in vivo* studies of Zhang et al. (2002) and Jing et al. (2008) have shown that so-called synaptic acetylcholinesterase ($AChE_S$) in humans is upregulated in response to various apoptotic stimuli. They also stated that apoptosis is attenuated by knockdown of its expression either by antisense RNA, small interfering RNA, or by heterozygous deletion of the *AChE* gene. The observations of Du et al. (2015) confirm that $AChE_S$ mediates apoptosis via its DNase activity.

In contrast to the 24 h epoxiconazole exposure, inhibition of *AChE* gene expression at the two highest concentrations tested (25.0 and 50.0 $\mu g.ml^{-1}$) was observed after prolonged 48 h exposure during our experiment. We suppose that this inhibition was probably caused by a relatively high level of DNA damage as demonstrated by Koleničová et al. (2021) using identical EPX concentrations in an alkaline comet assay. Similarly to mentioned authors, Hamdi et al. (2018) confirmed that epoxiconazole was able to induce a concentration-dependent increase in DNA damage in the human colon carcinoma cell line (HCT116), probably as a consequence of the generation of reactive oxygen species (ROS). As a consequence of free radical formation, the activity of AChE can be inhibited (Tsakiris et al., 2000). Recently, some commercially available pesticides (atrazine, simazine, propazine, carbofuran, monocrotophos, dimethoate, carbaryl, tebufenozide, imidacloprid, acetamiprid, diuron, monouron, linuron) have been examined as mouse and human acetylcholinesterase inhibitors by means of advanced *in silico* approaches such as ligand-based (LB) and structure-based (SB) methods (Mladenovic et al., 2018). Despite the constant development of sophisticated methods, very little is still known about the pharmacology of most pesticides that act as AChE inhibitors.

CONCLUSION

Acetylcholine esterase (AChE) is an enzyme whose primary function is to degrade acetylcholine (ACh) and terminate neurotransmission. Apart from its role in synaptic transmission, AChE has several non-classical functions in non-neuronal cells; it plays a key role in apoptosis, cellular growth, inflammation, drug resistance and response to stress induced by some agents including pesticides. Although epoxiconazole fungicide is not a classic inhibitor of acetylcholine esterase, its effect on this enzyme is not completely ruled out in mammals. Our study was aimed at investigating the potential effect of epoxiconazole on the expression of the acetylcholine esterase (*AChE*) gene in bovine cultured blood cells that are good indicators of *in vitro* exposure. The enhanced levels of *AChE* gene expression were detected after 24 h exposure by quantitative real-time PCR. Results after prolonged exposure time (48 h) revealed elevated expression quantity only at lowest epoxiconazole concentration tested; the higher amounts of fungicide caused inhibition of expression of *AChE* gene. Our observations pointed to the likely potential of epoxiconazole to influence the levels of expression of the acetylcholine esterase gene in cultured bovine blood cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by project of the Grant Agency of the Slovak Republic (VEGA) No. 1/0166/21.

REFERENCES

Akram, M., Patt, M., Kaserer, T., Temml, V., Waratchareeyakul, W., Kratschmar, D. V., Haupenthal, J., Hartmann, R. W., Odermatt, A., Schuster, D.: Identification of fungicide epoxiconazole by virtual

screening and biological assessment as inhibitor of human 11 β-hydroxylase and aldosterone synthase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*., 2019, 192, 1 − 12.

Du, A., Xie, J., Guo, K., Yang, L., Wan, Y., OuYang, Q., Zhang, X., Niu, X., Lu, L., Wu, J., Zhang, X.: A novel role for synaptic acetylcholinesterase as an apoptotic deoxyribonuclease. *Cell Discovery*, 2015, 1, 1 − 17.

European Commission. List of candidates for substitution, 2015. http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/index_en.htm. Accessed May 21, 2022.

Ferré, D. M., Quero, A. A. M., Hernández, A. F., Hynes, V., Tornello, M. J., Luders, C., Gorla, N. B. M.: Potential risk of dietary exposure to chlorpyrifos and cypermethrin from their use in fruit / vegetable crops and beef cattle productions. *Environ. Monit. Assess.*, 2018, 190 (5), 1 − 10.

Ferré, D. M., Luduena, H. R., Romano, R. R., Gorla, N. B. M.: Evaluation of the genotoxic potential of cypermethrin, chlorpyrifos and their subsequent mixture, on cultured bovine lymphocytes. *Chemosphere*, 2020, 243, 1− 9.

Hamdi, H., Salem, I. B., Othméne, Y. B., Annabi, E., Abid-Essefi, S.: The involvement of ROS generation on epoxiconazole-induced toxicity in HCT116 cells. *Pestic. Biochem. Phys.*, 2018, 148, 62 − 67.

Hvězdová, M., Kosubová, P., Košíková, M., Scherr, K. E., Šimek, Z., Brodský, L., Šudoma, M., Škulcová, L., Sáňka, M., Svobodová, M., Krkošková, L., Vašíčková, J., Neuwirthová, N., Bielská, L., Hofman, J.: Currently and recently used pesticides in Central European arable soils. *Sci. Total Environ*., 2018, 613 – 614, 361 − 370.

Chambers, J. E., Greim, H., Kendall, R. J., Segner, H., Sharpe, R. M., Van Der Kraak, G: Human and ecological risk assessment of a crop protection chemical: a case study with azole fungicide epoxiconazole. *Crit. Rev. Toxicol.*, 2014, 44 (2), 176 − 210.

Jing, P, Jin, Q. H., Wu, J., Zhang, X. J.: GSK3 beta mediates the induced expression of synaptic acetylcholinesterase during apoptosis. *J. Neurochem.*, 2008, 104 (2), 409 – 419.

Koleničová, S., Holečková, B., Galdíková, M., Schwarzbacherová, V., Drážovská, M.: Genotoxicity testing of bovine lymphocytes exposed to epoxiconazole using alkaline and neutral comet assay. *Caryologia*, 2021, 73 (4), 99 − 109.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ddCT method. *Methods*, 2001, 25 (4), 402 408.

Mladenović, M., Arsi, B. B., Stanković, N., Mihović, N., Rino Ragno, R., Regan, A., Milićević, J. S., Trtić-Petrović, T., M., Micić, R.: The targeted pesticides as acetylcholinesterase inhibitors: Comprehensive cross-organism molecular modelling studies performed to anticipate the pharmacology of harmfulness to humans *in vitro*. *Molecules*, 2018, 23 (9), 2 − 37.

Passeport, E., Benoit, P., Bergheaud, V., Coquet, Y., Tournebize, J.: Epoxiconazole degradation from artificial wetland and forest buffer substrates under flooded conditions. *Chem. Eng. J.*, 2011, 173, 760 − 765.

Potter, T. L., Bosch, D. D., Strickland, T. C.: Comparative assessment of herbicide and fungicide runoff risk: a case study for peanut production in the southern atlantic coastal plain (USA). *Sci. Total Environ*., 2014, 490, 1 – 10.

Silva, V., Mol, H. G. J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C. J., Geissen, V.: Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality. *Sci. Total Environ.*, 2019, 653, 1535 − 1545.

Šulik, P., Holečková, B.: Evaluation of fragmentation of DNA and expression of acetylcholine esterase gene in culture of bovine lymphocytes exposed to thiacloprid. *Folia Vet.*, 2015, 59 (2), 144 – 147.

Šiviková, K., Holečková, B., Schwarzbacherová, V., Galdíková, M., Dianovský, J.: Potential chromosome damage, cell-cycle kinetics / and apoptosis induced by epoxiconazole in bovine peripheral lymphocytes *in vitro*. *Chemosphere*, 2018, 193, 82 – 88.

Tsakiris, S., Angelogianni, P., Schulpis, K. H., Stavridis, C.: Protective effect of L-phenylalanine on rat brain acetylcholineesterase inhibition induced by free radicals. *Clin. Biochem*., 2000, 33 (2), 103 – 106.

Vašíčková, J., Hvězdová, M., Kosubová, P., Hofman, J.: Ecological risk assessment of pesticide residues in arable soils of the Czech Republic. *Chemosphere*, 2019, 479 – 487.

Zhang, X. J., Yang, L., Zhao, Q., Caen, J. P., He, H. Y., Jin, Q. H., Guo, L. H., Alemany, M., Zhang, L. Y., Shy, Y. F.: Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ*., 2002, 9 (8), 790 – 800.

Zhang, X. J., Greenberg, D. S.: Acetylcholine esterase involvement in apoptosis. *Front. Mol. Neurosci*., 2012, 5, 1 – 6.

POKYNY PRE AUTOROV

ZAMERANIE ČASOPISU

Folia Pharmaceutica Cassoviensia je vedecký časopis založený v roku 2019 a vydávaný Univerzitou veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, SR. Časopis je vydávaný štvrťročne a uverejňuje pôvodné štúdie prinášajúce najnovšie poznatky z farmaceutickej a biomedicínskej oblasti, prehľadové články a kazuistiky z lekárenskej a z klinickej praxe. Okrem toho sa v časopise publikujú aj krátke oznámenia zamerané na rýchle uverejnenie poznatkov o aktuálnych vedeckých problémoch a objavoch vo farmácii a medicíne. Časopis neuverejňuje správy o vedeckých podujatiach a redakciou nevyžiadané recenzie.

Autori sú zodpovední za originalitu zaslaných príspevkov, správnosť ich obsahu a za to, že predkladaná práca alebo jej časti neboli publikované alebo zaslané na publikovanie inde.

Autori zasielajú príspevky elektronicky vo formáte textového procesora MS Word alebo vo formáte RTF. O zaradení príspevkov do časopisu rozhoduje redakčná rada na základe posudkov aspoň dvoch anonymných recenzentov. Príspevky schválené na publikovanie sa zasielajú autorovi spolu s recenznými posudkami na prípadné doplnenie alebo prepracovanie. Autor vráti redakcii upravený rukopis a pripojí písomné stanovisko k návrhom a pripomienkam recenzentov. Rozhodnutie redakčnej rady o prijatí alebo zamietnutí príspevku je konečné.

Za uverejnenie článku v časopise sa nevyžadujú žiadne poplatky.

VŠEOBECNÉ ZÁSADY

Príspevky sa uverejňujú v slovenskom, českom alebo anglickom jazyku. Ak je príspevok písaný v inom ako anglickom jazyku, vyžaduje sa názov práce, abstrakt a kľúčové slová v angličtine.

Kompletný text rukopisu vrátane fotografií, obrázkov, tabuliek a grafov sa zasiela v elektronickej forme na nasledovnú adresu: **folia.pharma@uvlf.sk** alebo **zuzana.holeckova@uvlf.sk**. Ak rukopis nespĺňa pokyny pre autorov, redakčná rada si vyhradzuje právo vrátiť rukopis autorom pred jeho posúdením recenzentmi.

Pri písaní príspevku (včítane grafov, tabuliek a pod.) je potrebné zachovávať jednotný štýl a formát práce (**Times New Roman**, veľkosť písma 12 bodov, riadkovanie 1,5, okraje 2,5 cm, zarovnanie podľa okrajov).

Pri zasielaní rukopisu autori pripájajú prehlásenie, že ich článok je pôvodný, nebol publikovaný ani zaslaný na publikáciu inde.

Ak štúdia hodnotí farmaceutický produkt, lekárske alebo vedecké zariadenie/pomôcku, alebo iný komerčný výrobok, autori informujú vydavateľa dôverným listom o akomkoľvek finančnom zainteresovaní, ktoré existuje v rámci spoločnosti, ktorá takýto produkt vyrába, alebo prípadnej konkurenčnej spoločnosti.

Používanie jednotiek. V texte sa zásadne používa medzinárodný systém jednotiek (SI). Iné jednotky je nevyhnutné vysvetliť a definovať.

Skratky a symboly. Pri voľbe fyzikálnych alebo fyzikálno-chemických symbolov je záväzný IUPAC Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units (Pergamon Press, Oxford, 1993). Používajú sa len štandardné skratky. Odporúča sa vyhýbať sa skratkám v názve a v abstrakte. Skratky by sa mali používať len pri ich častom opakovaní. Pri prvom použití skratky v texte sa pripojí jej vysvetlenie v zátvorke, pokiaľ sa nejedná o štandardnú jednotku merania.

Názvoslovie a terminológia. V texte je potrebné používať štandardné slovenské názvoslovie v zmysle platných odporúčaní IUPAC. Detailné inštrukcie pre

anglicky písaný text sa nachádzajú v publikáciách IUPAC *Brief Guide to the Nomenclature of Inorganic Chemistry IUPAC 2015, Pure App. Chem. 87, 1039-1049*, © IUPAC & De Gruyter 2015 and *Nomenclature of Organic Chemistry, IUPAC Recommendations and Preferred Names 2013*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 2014. Je vhodné vyhnúť sa novým triviálnym názvom. Nové zlúčeniny musia byť pomenované systémovým názvoslovím podľa IUPAC.

Pri uvádzaní látok izolovaných z prírodných zdrojov sa latinsky uvedie názov zdroja (napr. rodový a druhový názov rastliny) a príslušná čeľaď. Liečivá sa uvádzajú INN názvom v slovenskej, českej, resp. v anglickej mutácii a to podľa jazyka, v ktorom je rukopis napísaný. Ak je známy liekopisný názov, tak sa uprednostní, resp. prípustné sú obidva.

Príklady: paracetamol (nie acetaminofén), bisfosfonát (nie bifosfonát), adrenalín/liekopis (nie epinefrín/INN), hydroxykarbamin (nie hydroxyurea), kromoglykán (nie chromoglykán), cholestyramín (nie colestyramín, kolestyramín), lítium (lithium), manitol (nie mannitol).
Latinské termíny sa píšu kurzívou.

V texte treba rozlišovať pojmy „liečivo“ a „účinná látka“. „Účinná látka“ je látka alebo zmes použitá ako vstupná surovina pri výrobe lieku, ktorá sa po skončení výrobného procesu lieku stane liečivom. „Liečivo“ je chemicky jednotná alebo nejednotná látka ľudského, rastlinného, živočíšneho alebo chemického pôvodu, ktorá je nositeľom biologického účinku využiteľného na ochranu pred chorobami, na diagnostiku chorôb, liečenie chorôb alebo na ovplyvňovanie fyziologických funkcií.

Pre lieky sa uvádza firemný názov a držiteľ registrácie, resp. výrobca a krajina (pri ich prvom použití), *Príklad:* Panadol Junior (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare Czech Republic s.r.o., Česká republika), IMMODIN (IMUNA PHARM, a.s., Slovensko), Azibiot (KRKA, d.d., Novo mesto, Slovinsko).

Fotografie, obrázky, grafy. Aby sa vyhlo prípadným nepresnostiam či chybám, odporúčame zaslať fotografie, obrázky a grafy zvlášť v osobitnej prílohe (aj v prípade, že ich už autori majú v texte) a uviesť zdrojový program, v ktorom boli vypracované (napr. tabuľka – MS Word, graf – MS Excel). V texte sa uvádza odkaz na príslušnú fotografiu, obrázok a graf, napr. (viď obr. 1). Odkaz sa uvedie aj vtedy, keď autor zašle fotografie, obrázky a grafy iba v prílohe, aby bolo jasne označené miesto, kde sa má príslušná fotografia, obrázok alebo graf v texte nachádzať. Fotografie majú mať minimálne rozlíšenie na úrovni 300 dpi a musia byť jasné a ostré. Vzhľadom na technické komplikácie, ku ktorým môže dôjsť pri konvertovaní farebných obrázkov pre potreby čiernobielej tlače sa odporúča zaslať obrázky a ilustrácie vo verzii vhodnej pre takúto tlač. V časopise môžu mať obrázky a ilustrácie šírku len 8,5 cm a nachádzať sa na strane širokej 17,5 cm, preto by veľkosť písmen v legende mala zodpovedať týmto rozmerom (Times New Roman 10). Obrázky, fotografie a grafy majú byť orámované, priebežne očíslované a má k nim byť pripojený príslušný text týkajúci sa obsahu a prípadne aj zdroja. Číslo a text nemá byť súčasťou fotografie/obrázku/grafu. Číslo a názov obrázku, fotografie a grafu sa má umiestniť nad a príslušný text týkajúci sa obsahu a prípadne aj zdroja (legenda) sa má umiestniť pod nimi. Pri mikrofotografiách text obsahuje aj údaje o mierke a technike farbenia. Hlavné objekty, zmeny a zistenia sa v mikrofotografiách označujú šípkou alebo iným symbolom, ktorý je vysvetlený v legende.

Ak sa nejedná o vlastný obrázok/fotografiu, pre každý obrázok/fotografiu sa v legende uvádza zdroj.

Tabuľky je kvôli prípadným technickým komplikáciám potrebné vyhotoviť v programe MS Word (nesmú byť do textu vložené ako obrázok).

Etické aspekty. Pri popise experimentov vykonávaných na zvieratách sa uvádza, či boli schválené etickou komisiou a či boli dodržané príslušné aktuálne legislatívne opatrenia, ktoré sa vzťahujú na túto oblasť ako aj číslo povolenia Štátnej veterinárnej a potravinovej správy SR. Pri klinických štúdiách sa uvádza, či boli schválené príslušnou etickou komisiou.

Štatistika. Pri opise použitých štatistických metód sa uvádzajú informácie potrebné na to, aby si informovaný čitateľ mohol na základe pôvodných výsledkov overiť ich správnosť.

ŠTRUKTÚRA PRÍSPEVKOV

Každý príspevok má byť tematicky kompletný. Odporúčaný rozsah pre odborný článok (pôvodnú štúdiu) je 12 strán, pre prehľadový článok 15 strán a pre kazuistiku 7 strán.

Hlavný text príspevku sa začína názvom príspevku v slovenskom alebo v českom jazyku a následne sa uvedie názov v jazyku anglickom, ktorý má byť stručný a výstižný (veľké tučné písmená, veľkosť písma 14, zarovnanie na stred). Pod názvom sa uvádzajú celé mená autorov (priezvisko, krstné meno/mená), pod nimi pracovné zaradenie autorov (inštitúcia) a štát a nakoniec e-mailová adresa prvého/korešpondujúceho autora (všetko zarovnané na stred). Pri empiricky orientovaných štúdiách je potrebné dodržať usporiadanie rukopisu do nasledovných častí: **ABSTRAKT, ÚVOD, MATERIÁL A METÓDY, VÝSLEDKY, DISKUSIA, ZÁVERY, (POĎAKOVANIE), ZOZNAM LITERATÚRY**.

Každý nadpis sa uvádza na osobitnom riadku (veľké tučné písmo, veľkosť 12). Nad ním a pod ním sa vynechá voľný riadok. Každý odsek začína zarážkou

ABSTRAKT

Vyžaduje sa abstrakt v angličtine (tučné písmo, veľkosť 12). Jeho dĺžka by nemala presiahnuť 250 slov. Abstrakt stručne prezentuje cieľ a relevantnosť štúdie, základné postupy, hlavné zistenia a vyvodené závery. Zdôrazňuje nové a dôležité aspekty štúdie a pozorovaní.

Key words: Kľúčové slová (3−10) sa uvádzajú v slovenskom resp. českom a v anglickom jazyku v abecednom poradí pod abstraktom, od ktorého sú oddelené jedným voľným riadkom. Oddeľujú sa bodkočiarkou.

ÚVOD

Uvádza sa stručný prehľad problematiky. Namiesto podrobného literárneho prehľadu je vhodnejšie sústrediť sa na striktne relevantné zdroje bez zahrnutia podrobných údajov a záverov prezentovaných v týchto zdrojoch. Úvod sa má končiť cieľom, ktorý si autori vytýčili.

MATERIÁL A METÓDY

Prezentuje sa podrobný popis a charakteristika objektov pozorovania/experimentov, vrátane kontrol. Identifikujú sa použité metódy, prístroje (meno a adresa výrobcu v zátvorke) a postupy s dostatočnými podrobnosťami na to, aby ich bolo možné reprodukovať. Citujú sa zavedené metódy a ich zdroje a stručne sa opisujú metódy, ktoré boli publikované, ale nie sú veľmi známe. Poskytuje sa kompletný opis nových alebo podstatne modifikovaných metód, dôvody ich použitia a ich prípadné obmedzenia. Presne sa identifikujú všetky použité liečivá a chemikálie vrátane ich generického názvu, dávky a spôsobu podávania.

Poskytujú sa kompletné informácie o štatistických metódach a opatreniach použitých vo výskume.

VÝSLEDKY

Pri uvádzaní výsledkov sa používa medzinárodný systém jednotiek (SI).

Prezentácia výsledkov má byť výstižná, s logickou nadväznosťou a využívaním tabuliek a názorných grafov. V tabuľkách a grafoch je potrebné vyhnúť sa duplicite prezentovaných výsledkov. V texte sa zdôrazňujú a sumarizujú len dôležité pozorovania. Tam, kde je to vhodné/potrebné, tabuľky majú obsahovať výsledky štatistickej analýzy (hladiny významnosti

DISKUSIA

Zdôrazňujú sa nové a dôležité aspekty štúdie, ktoré vedú ku konečným záverom. Je potrebné sa vyhnúť podrobnému opakovaniu údajov už spomenutých v častiach Úvod a Výsledky. Diskusia má obsahovať zhrnutie prezentovaných zistení,

relevantné obmedzenia a význam týchto zistení pre ďalší výskum. Výsledky štúdie sú porovnávané s publikovanými výsledkami iných autorov.

ZÁVERY

Dávajú sa do súvislosti závery s cieľom štúdie. Je potrebné sa vyhnúť nekvalifikovaným vyhláseniam a záverom, ktoré nie sú plne podporované získanými údajmi. Tam, kde je to vhodné, môžu sa uvádzať odporúčania.

POĎAKOVANIE

(Kurzívou) Ak je to potrebné, uvádza sa poďakovanie (grant, špeciálne analýzy, technická podpora...).

ZOZNAM LITERATÚRY

Všetky zdroje uvedené v zozname musia byť citované v texte.

Použité zdroje sa v zozname uvádzajú v abecednom poradí (podľa priezviska prvého autora), a každý z nich sa začína písať na nový riadok s odsadením. Zdroje musia obsahovať priezviská a iniciály všetkých autorov. Neodporúča sa použiť nadmerný počet citácií na podporu jedného vyhlásenia.

Od autorov sa vyžaduje použitie iba overiteľných a recenzovaných zdrojov z celosvetovo akceptovaných vedeckých databáz.

V texte sa cituje/ú autor/i priezviskom a rok publikovania. V slovenskom a českom jazyku sa používajú spojky „a“ a „a kol.“, ak je rukopis v anglickom jazyku spojky „and“ a „et al.“. Viacnásobné citácie sa uvádzajú v chronologickom poradí (od najstaršej po najnovšiu).

Pri písaní zdrojov štýl a interpunkcia má zodpovedať príkladom uvedeným nižšie:

Časopis (vedecký/odborný): Priezvisko/á a iniciála/y autora /ov. Celý názov článku, názov časopisu (kurzívou), rok publikácie, ročník a príslušné strany. Číslo časopisu sa uvedie (v zátvorke) len vtedy, keď sa v časopise neuvádza ročník. Možno uviesť skrátený názov časopisu, ak sa takýto nachádza v štandardnom ISO zozname skrátených názvov časopisov. ISSN číslo sa nevyžaduje:

Bagirova, V. L., Miťkina, L. I.: Determination of Tartrazine in drugs. *Pharm. Chem. J.* 2003, 37, 558 – 559.

Vetulani, J.: Drug addiction, part II. Neurobiology of addiction. *Pol. J. Pharmacol.*, 2001, 53 (4), 303 – 317.

Pri zdrojoch v slovenskom alebo českom jazyku je potrebné do hranatej zátvorky uviesť názov článku/ knihy a i.

Zummerová, A., Kolesárová, M.: Adherencia pacientov k liečbe reumatoidnej artritídy [Adherence of patients to the therapy of rheumatoid arthritis]. *Folia Pharmaceutica Cassoviensia*, 2020, 2 (3), 69 – 78.

Kniha (editovaná, needitovaná):

Mená a iniciály autorov citovanej časti knihy, autori/editori knihy, názov knihy (kurzívou), miesto vydania, vydavateľ, rok vydania, celkový počet strán alebo citované strany (ISBN sa nevyžaduje):

Choi, C. K., Dong, M. W.: Chapter 5 – Sample preparation for HPLC analysis of drug products. In Ahuja, S., Dong, M. W. (Eds.). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. United Kingdom: Elsevier, 2005. 123–144.

Podczeck, F., Jones, B. E.: Pharmaceutical Capsules, 2nd edn., *Pharmaceutical Press*, 2004. 66–67.

Zborník z konferencie: Mená a iniciály autorov. Celý názov článku. Názov zborníka/konferencie, miesto a dátum konania, rok publikácie, celkový počet strán alebo citované strany:

Canganella, F., Balsamo, R.: Isolation and selection of probiotic microorganisms with antagonistic activity against *Paenicibacillus larvae* and *Paenicibacillus alvei*. In *Proceedings of the International Probiotic Conference: Probiotics for the 3rd Millenium, High Tatras*, Slovakia, June 4 – 7, 2008, 28 – 29.

Online časopis:

Simon, J. A., Hudes, E. S.: Relationship of

ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA* 1999, 281, 2289 – 2293. http://url. Accessed July 11, 2009.

Pri zdroji v slovenskom/českom jazyku sa uvádza [cit. 2021-01-30].

Online website:

King, M. W.: *The Medical Biochemistry Page*. http://themedicalbiochemistrypage.org. Updated July 14, 2009. Accessed July 14, 2009.

PREHĽADOVÉ ČLÁNKY

Publikujú sa aj články, ktoré prezentujú súhrnné informácie o významných aspektoch vo farmácii a medicíne s relevantnou historickou perspektívou. Odporúčaná štruktúra prehľadových článkov je nasledovná:

NÁZOV/AUTORI – názov (aj v angličtine) má byť stručný a informatívny.

ABSTRAKT (v angličtine) – uvádza ciele a výsledky prehľadu s kľúčovými slovami (3-10).

ÚVOD – poskytuje informácie o kontexte, indikuje motiváciu autora/autorov prehľadu, definuje príslušné zameranie a otázky pre výskum a vysvetľuje štruktúru textu.

MATERIÁL A METÓDY – opisuje/sumarizuje metódy použité pre lokalizáciu, získavanie, selekciu a syntetizovanie údajov.

Hlavná časť prehľadového článku – pre prehľadnosť sa používajú relevantné podnadpisy.

ZÁVER – Zodpovedanie otázok pre výskum, položených v úvode.

ZOZNAM LITERATÚRY – Potvrdzuje práce iných vedcov – zabraňuje obvineniam z plagiátorstva. Neodporúča sa použiť viac ako 100 literárnych zdrojov.

KAZUISTIKY

Publikujú sa aj články, ktoré prezentujú správy o výnimočnom prípade určitého liečiva, resp. substancie či zmesi a jej neobvyklého účinku alebo opis zaujímavého klinického prípadu, choroby a pod. Odporúčaná štruktúra kazuistík je nasledovná:

NÁZOV/AUTORI – názov (aj v angličtine) má byť stručný a informatívny.

ABSTRAKT (v angličtine) – skrátená verzia celého textu s kľúčovými slovami (3-10)

ÚVOD – vysvetľuje dôvody, pre ktoré bol daný prípad opísaný

OPIS PRÍPADU/PRÍPADOV – hlavná časť kazuistiky - uvádza sa priebeh, liečba, prognóza a ukončenie prípadu

DISKUSIA – zdôrazňujú sa zaujímavé aspekty prípadu

ZÁVER – opisujú sa súvislosti medzi hlavnými zisteniami/pozorovaniami a cieľom práce

ZOZNAM LITERATÚRY

RECENZIA

Publikujú sa aj kritické rozbory odborného diela (napr. knihy, článku), ktoré obsahujú odôvodnené hodnotenie. Odporúčaná štruktúra recenzie je nasledovná:

ZÁKLADNÉ INFORMÁCIE – uvádza sa názov knihy (článku, časopisu), mená autorov (priezvisko, iniciály), miesto vydania a názov vydavateľstva, rok vydania, počet strán, odporúčaná cena, ISBN

OBSAH KNIHY (ČLÁNKU, ČASOPISU) – opisujú sa dôležité informácie, napr. čím kniha (článok, časopis) recenzenta zaujala/sklamala.

VÝZNAM KNIHY (ČLÁNKU, ČASOPISU) – uvádza sa jej využitie pre odbornú verejnosť.

Redakčná rada

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA je vedecký časopis vydávaný Univerzitou veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika. Časopis je vydávaný štvrťročne s príspevkami v slovenskom, českom alebo anglickom jazyku s abstraktom v angličtine.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA is a scientific journal issued by the University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, the Slovak Republic. The journal is published quarterly with articles in English, or Slovak or Czech with English abstracts.

Šéfredaktorka/Editor-in-Chief: *Jana Mojžišová*
Výkonná redaktorka/Deputy/Managing Editor: *Zita Faixová*
Redakčná rada/Editorial Board: *Abu-Darwish, M. S. (Shoubak, Jordan), Boknik, P. (Münster, Germany), Castejon, A. M. (Fort Lauderdale, Florida, USA), Csöllei, J. (Brno, Czech Republic), Deelman, L. E. (Groningen, Netherlands), Devinyak, O. (Uzhhorod, Ukraine, El Naggar, El M. B. A. (Damanhour, Egypt), Getova, D. (Plovdiv, Bulgaria), Kyselovič, J. (Bratislava, Slovak Republic), Leddy, J. J. (Ottawa, Canada), Mojžiš, J. (Košice, Slovak Republic), Klimas, J. (Bratislava, Slovak Republic), Mučaji, P. (Bratislava, Slovak Republic), Opatřilová, R. (Brno, Czech Republic), Pirník, Z. (Bratislava, Slovak Republic), Pistl, J. (Košice, Slovak Republic), Şekeroğlu, N., (Turkey, Kilis), Šimůnek, T. (Hradec Králové, Czech Republic), Zitterl, K. (Vienna, Austria)*

Vydavateľ/Publisher:
© Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2019
Adresa redakcie/Editor Address:
Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, e-mail: folia.pharma@uvlf.sk
Technická redaktorka/Technical Editor:
Holečková, Z., tel.: +421 917 729 873, e-mail: zuzana.holeckova@uvlf.sk
Grafická úprava/graphic design:
Báštiová, I.

ISSN: 2585-9609
EVČ: EV 5741/18
IČO: 00 397 474

On-line verzia časopisu sa nachádza na web sídle Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach:
http://www.uvlf.sk/univerzitne-casopisy/folia-pharmaceutica-cassoviensia-vytlacky.

Jún 2022