FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis
UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609
ISSN 2729-790X

3

V • 2023

FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

VYDÁVA
UNIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE V KOŠICIACH
SLOVAKIA

FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA
V., 3, 2023

PUBLISHED BY
THE UNIVERSITY OF VETERINARY MEDICINE AND PHARMACY IN KOŠICE
2023

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 3, 2023

O B S A H

Boňková, Simona; Holécyová, Monika; Sukeľ, Ondrej:
INTERVENCIE FARMACEUTOV PRI PACIENTOCH UŽÍVAJÚCICH ANTIDEPRESÍVA
INTERVENTIONS BY PHARMACISTS IN PATIENTS TREATED WITH ANTIDEPRESSANTS 5

Faixová, Zita; Dutková, Miroslava; Faixová, Dominika; Gažová, Andrea; Szabóová, Renáta; Kyselovič, Ján:
PHARMACOTHERAPY OF ARTERIAL HYPERTENSION IN PATIENTS WITH TYPE 2 *DIABETES MELLITUS* 14

Rusnáková, Adriana; Maková, Zuzana:
SÚČASNÉ TERAPEUTICKÉ ALTERNATÍVY PREDSIEŇOVEJ FIBRILÁCIE
CURRENT THERAPEUTIC ALTERNATIVES OF ATRIAL FIBRILLATION 24

Macejová, Alexandra; Nosálová, Natália; Majirská, Monika; Bago Pilátová, MartinA:
TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL FINGOLIMODU V PROTINÁDOROVEJ LIEČBE (PREHĽADOVÝ ČLÁNOK)
THERAPEUTIC POTENTIAL OF FINGOLIMOD IN ANTICANCER TREATMENT (REVIEW ARTICLE) 35

Focková, Valentína; Lauková, Andrea:
INTERAKCIE INTESTINÁLNYCH BAKTÉRIÍ S BAKTERIOCÍNMI
INTERACTIONS OF INTESTINAL BACTERIA WITH BACTERIOCINS 50

Snaková, Marianna; Marcinčáková, Dana; Kolesárová, Mária; Miłek, Michał; Legáth, Jaroslav:
OVPLYVNENIE ANTICYTOTOXICKÝCH VLASTNOSTÍ EXTRAKTU REPÍKA LEKÁRSKEHO EXTRAKČNÝM ČINIDLOM
EFFECT OF EXTRACTION REAGENT ON BIOLOGICAL PROPERTIES OF SELECTED EXTRACTS OF AGRIMONY 59

Hudáková, Nikola; Gregušová, Jana; Beňová, Katarína; Čížková, Daša:
ŠTÚDIUM ÚČINKU *VALERIANA OFFICINALIS* NA *ARTEMIA FRANCISCANA*
A STUDY OF THE EFFECT OF *VALERIANA OFFICINALIS* ON *ARTEMIA FRANCISCANA* 66

Hudák, Alexander; Hudáková, Terézia; Čaráková, Natália:
POLYFENOLY V ZELENOM ČAJI
POLYPHENOLS IN GREEN TEA 76

Szabóová, Renáta; Herich, Róbert; Krivjančinová, Sidónia:
FARMAKOTERAPEUTICKÝ EFEKT CINAKALCETU U PACIENTOV S PRIMÁRNOU HYPERPARATYREÓZOU
PHARMACOTHERAPY EFFECT OF CINACALCET IN PATIENTS WITH PRIMARY HYPERPARATHYROISIS 87

Juhászová, Andrea; Galajda, Richard:
ABÚZUS NESTEROIDNÝCH ANTIFLOGISTÍK AKO JEDEN Z FAKTOROV VZNIKU GASTRODUODENÁLNEJ VREDOVEJ CHOROBY
ABUSUS OF NONSTEROIDAL ANTI-IFLAMMATORY DRUGS AS ONE OF THE FACTORS IN THE DEVELOPMENT OF GASTRODUODENAL ULCER DISEASE 96

Pokyny pre autorov 109

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 3: 5 – 13, 2023

INTERVENCIE FARMACEUTOV PRI PACIENTOCH UŽÍVAJÚCICH ANTIDEPRESÍVA

INTERVENTIONS BY PHARMACISTS IN PATIENTS TREATED WITH ANTIDEPRESSANTS

Boňková, Simona[1]; Holécyová, Monika[1]; Sukeľ, Ondrej[2]

[1]Katedra lekárenstva a sociálnej farmácie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
[2]Slovenská lekárnická komora, Nová Rožňavská 3, 831 04 Bratislava 3
Slovenská republika

monika.holecyova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Cieľom tejto štúdie bolo poukázať na význam farmaceutickej starostlivosti u citlivých psychiatrických pacientov, vyjadriť spotrebu antidepresív na Slovensku a preštudovať liekové interakcie u pacientov, ktorí užívali antidepresíva súčasne s inými liečivami. Na základe verejne dostupných štatistických údajov sme zistili, že antidepresíva tvorili 1,72 % balení zo všetkých vydaných balení liekov v roku 2021 v Slovenskej republike. V štúdii uvádzame zoznam piatich najviac vydávaných liečiv v skupine antidepresív za rok 2021 a tieto celoslovenské údaje porovnávame s údajmi získanými v sledovanej lekárni. Pri analýze získaných výsledkov sme sa stretli s určitými preskripčnými rozdielmi medzi predpisujúcimi lekármi v rámci Slovenska. Poukazujeme na významný vplyv liekových interakcií na správnosť farmakoterapie a hodnotíme liekové interakcie u vybraných pacientov v sledovanej lekárni. Dospeli sme k záveru, že u viacerých pacientov vstupuje antidepresívum do interakcie so súčasne užívanými liečivami, čo môže spôsobovať významný problém v liečbe. Z tohto dôvodu uvádzame aj možné opatrenia a intervencie zo strany farmaceuta na minimalizáciu liekových interakcií.

Kľúčové slová: antidepresíva; lekárenská starostlivosť; liekové interakcie; psychiatrická starostlivosť

ABSTRACT

The aim of this article was to highlight the significance of pharmaceutical care in this sensitive population, as well as to shed light on the use of antidepressants in Slovakia, and to investigate the

pharmacological interactions in patients who use antidepressants in conjunction with other types of medication. We identified that antidepressants made up 1.72 % of all administered medication in the year 2021 in Slovakia, based on publicly available statistics. Next, a list of five most frequently administered antidepressants in the year 2021 are highlighted; these population data from the whole country are then compared with statistics from a specific pharmacy. In analyzing these results, we found out some prescriptive preferences between doctors within Slovakia. The significant effects of given pharmaceutical interactions on pharmacology are discussed, followed by an evaluation of such interactions in selected patients in the specified pharmacy. The findings suggest that in the majority of patients, there is an interaction between antidepressants and current medication, which may have a significant negative impact on current treatment. To account for this issue, possible ways of minimizing such interactions are suggested.

Key words: antidepressants; drug interactions; pharmaceutical care; psychiatric treatment

ÚVOD

Antidepresíva predstavujú relatívne rozsiahlu skupinu psychofarmák, ktorá sa využíva na zmiernenie patologicky poklesnutej a depresívnej nálady. Mechanizmus pôsobenia antidepresív je spojený s rôznymi priamymi alebo nepriamymi farmakologickými účinkami na noradrenergné, sérotonínergné alebo dopamínergné systémy, ktoré sú počas depresie narušené (Marek a Vrablík, 2019).

V súčasnosti sa na liečbu depresie najčastejšie používa skupina antidepresív označovaná ako **selektívne inhibítory spätného vychytávania sérotonínu** (SSRI). Používajú sa ako liečivá prvej voľby pri terapii depresie, ale aj pri mnohých iných psychiatrických poruchách kvôli ich bezpečnosti, účinnosti a dobrej znášanlivosti. Mechanizmus účinku SSRI spočíva v znížení deficitu sérotonínu (5-HT), ktorého nedostatok sa považuje za príčinu depresie. Medzi SSRI zaradzujeme fluoxetín, sertralín, citalopram, escitalopram, fluvoxamín a paroxetín (Chu a Wadhwa, 2022).

V súčasnosti sú **inhibítory spätného vychytávania sérotonínu a noradrenalínu** (SNRI) druhou najčastejšou užívanou skupinou antidepresív. Hlavní zástupcovia tejto skupiny sú venlafaxín a duloxetín. Sú charakterizované duálnym mechanizmom účinku – selektívne inhibujú reuptake 5-HT a noradrenalínu (Švihovec a kol., 2018). Duloxetín sa navyše vyznačuje analgetickými účinkami, ktoré sú sprostredkované potenciáciou dráh, ktoré inhibujú prenos bolesti (Shelton, 2019).

Mirtazapín a mianserín sú klasifikované do skupiny antidepresív označovaných ako **noradrenergické a špecifické sérotonínergické antidepresíva** (NaSSA), ktorých mechanizmus účinku spočíva v antagonistickom pôsobení na noradrenergné α_2-autoreceptory a α_2-heteroreceptory. To spôsobuje zvýšené uvoľňovanie noradrenalínu a 5-HT (Racková, 2017).

Hlavným predstaviteľom skupiny **antidepresív so zdvojeným sérotonínovým účinkom** (SARI) je trazodón. Mechanizmus účinku trazodónu je definovaný jeho antagonistickým pôsobením na 5-HT_{2A} a 5-HT_{2C} receptory a slabým blokovaním reuptake 5-HT (Marek a Vrablík, 2019).

Tricyklické antidepresíva (TCA) boli prvýkrát uvedené na trh v roku 1959. Medzi hlavných zástupcov patrí amitriptylín, desipramín, dosulepín, imipramín, klomipramín a ďalší. Pri liečbe depresie vykazujú podobnú účinnosť s ostatnými antidepresívami, avšak TCA spôsobujú výraznejšie nežiaduce účinky a liekové interakcie (LI). Z týchto dôvodov sa TCA nevyužívajú v liečbe depresie v prvej línii (Moraczewski a Aedma, 2022).

Depresia patrí k hlavným problémom verejného zdravia so zvýšenou prevalenciou. Antidepresíva patria medzi najúčinnejšiu a najpoužívanejšiu formu liečby depresie. Napriek tomu, že v súčasnosti sú dostupné mnohé účinné antidepresíva, 50 % pacientov nedosiahne vyliečenie symptómov ochorenia a mnoho ráz dochádza k recidíve. To je hlavný dôvod, pre-

čo sa u veľkého počtu pacientov depresia stane chronickým ochorením. Pre požadovaný výsledok liečby tvorí zásadnú úlohu adherencia pacienta. Nedodržanie farmakoterapie a znížená adherencia je hlavný problém spojený s liečbou antidepresívami (Marasine a Sankhi, 2021).

Každý psychiatrický pacient vyžaduje trpezlivosť, porozumenie a samostatný prístup. Farmaceutická starostlivosť o pacientov s depresiou je efektívna a vedie k zlepšeniu stavu, zníženiu vedľajších účinkov, LI a v neposlednom rade aj k zlepšeniu kvality života. Vzájomná spolupráca medzi psychiatrom, farmaceutom a aktívnym zapájaním pacienta alebo príbuzného je účinná a skvalitňuje starostlivosť o pacientov s depresiou (Kamusheva a kol., 2022).

MATERIÁL A METÓDY

Pri spracovaní výsledkov sme vychádzali z verejne dostupných údajov získaných z Národného centra zdravotníckych informácií (NCZI) a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky.

Do hodnotenia spotreby vybraných liečiv sme zaradili 19 liečiv z ATC skupiny N06A, ktoré boli v priebehu roka 2021 zaradené v aspoň jednom Kategorizačnom zozname. Pre každé liečivo sme zaznamenali počet vydaných štandardných dávok liečiva (ŠDL) za rok 2021. Získané dáta sme porovnali s údajmi získanými v sledovanej lekárni, ktorá je poskytovateľ lekárenskej starostlivosti v meste Humenné bez priamej nadväznosti na poskytovateľov ambulantnej alebo ústavnej zdravotnej starostlivosti.

U pacientov v sledovanej lekárni sme zhodnotili výskyt LI medzi liečivami z ATC skupiny N06A a ostatnými užívanými liečivami a možnosti intervencie farmaceuta pri výdaji týchto liekov. Údaje pacientov sme anonymizovali, zaznamenali sme vek a pohlavie pacienta a identifikačné údaje o lieku vrátane dávky.

LI sme vyhodnotili pomocou webovej aplikácie Databáza liekových interakcií Drug Agency, a. s., ktorá obsahuje celkom 129 086 potencionálnych LI, ktorých zdroje pochádzajú z vedeckých článkov v odborných časopisoch, kazuistík alebo od informácií poskytnutých výrobcami liekov. Prístup k aplikácii nám umožnil poskytovateľ lekárenskej starostlivosti, ktorý má tento prístup zmluvne dohodnutý s vyššie uvedenou spoločnosťou.

VÝSLEDKY

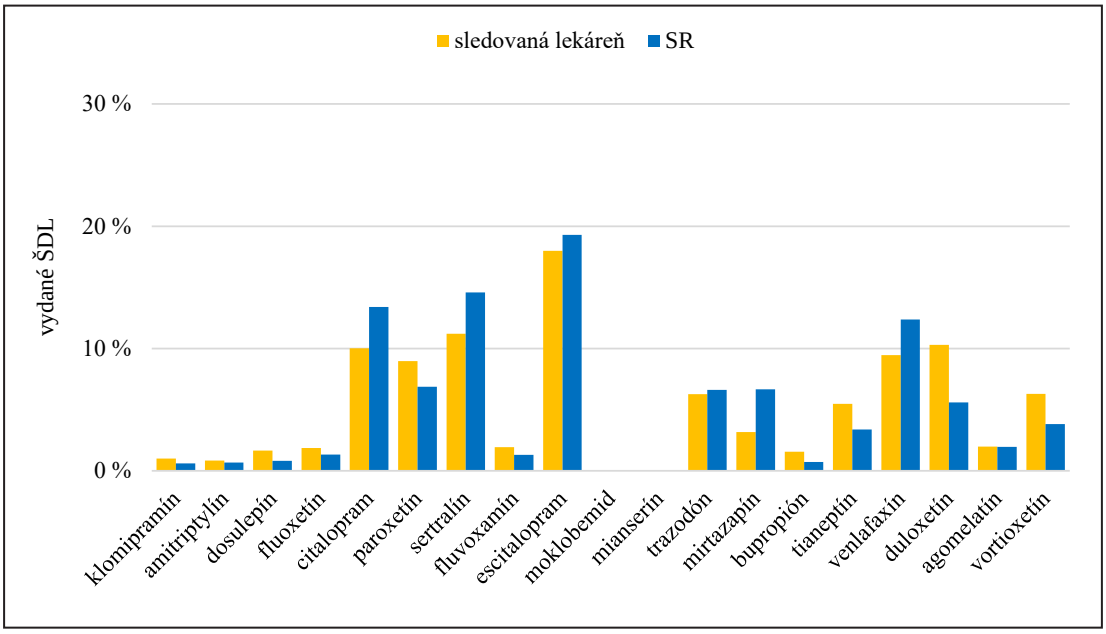
Porovnanie vydaných ŠDL z ATC skupiny N06A v sledovanej lekárni a celoslovensky

V úvodnej časti sme sa zaoberali spotrebou antidepresív v sledovanej lekárni a celoslovensky. Túto skupinu psychofarmák sme zvolili najmä kvôli rozmanitosti jednotlivých zástupcov a ich rôznych farmakologických vlastností. Ďalším dôvodom výberu bol fakt, že prevalencia predpisovania antidepresív a rovnako ich užívania sa neustále zvyšuje.

Pri porovnaní piatich najčastejšie vydávaných liečiv z ATC skupiny N0A6 z hľadiska ŠDL za rok 2021 v sledovanej lekárni a celoslovensky pozorujeme určité rozdiely (viď graf 1). V sledovanej lekárni (17,99 %) aj celoslovensky (19,29 %) bol najčastejšie vydávaným liečivom **escitalopram**. Na druhom mieste sa v sledovanej lekárni (11,21 %) aj celoslovensky (14,59 %) umiestnil **sertralín**. **Duloxetín**, ktorý bol v sledovanej lekárni tretím najvydávanejším liečivom (10,31 %); dosiahol v rámci SR až ôsme miesto (5,58 %). **Citalopram** bol celoslovensky tretím najvydávanejším liečivom (13,40 %); pričom v sledovanej lekárni predstavoval v rámci ATC skupiny N06A štvrté miesto (10,03 %). Piatym najvydávanejším liečivom v sledovanej lekárni (9,46 %) bol **venlafaxín**, pričom celoslovensky sa umiestnil na štvrtom mieste (12,38 %). **Paroxetín** obsadil v sledovanej lekárni šieste miesto (8,98 %); ale celoslovensky sa vyskytol na mieste piatom (6,86 %).

Podľa dát získaných z lekárne bolo za rok 2021 vydaných 36 496 balení liekov. Z tohto množstva predstavujú antidepresíva 903 balení, čo tvorí **2,47 %** všetkých vydaných balení liekov. Podľa štatistických údajov NCZI bol celoslovenský počet vydaných liekov v roku 2021 159 639 916 balení, z toho 2 746 597 balení antidepresív, čo predstavuje **1,72 %**.

Graf 1: Percentuálne zastúpenie vydanej jednotlivej ŠDL k celkovému počtu vydaných ŠDL z ATC skupiny N06A v sledovanej lekárni a v SR za rok 2021



Zdroj: NCZI, získané dáta sledovanej lekárne, vlastné spracovanie

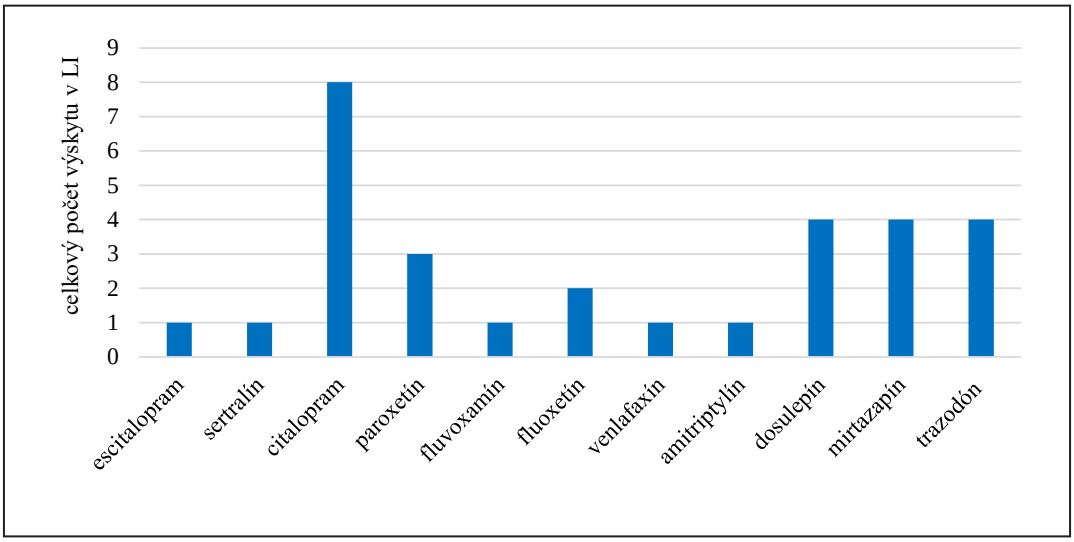
Vyhodnotenie kazuistík pacientov v sledovanej lekárni

Do analýzy bolo zaradených 32 pacientov, ktorí si súčasne vyberali 5 a viac liečiv. Túto podmienku sme určili z dôvodu, že s rastúcim množstvom užívaných liečiv rastie aj riziko vzniku LI, pričom pri súčasne dvoch užívaných liečivách je riziko vzniku LI 15 %, pri piatich 40 % a pri siedmich liečivách je riziko až 80 % (Abubakar a kol., 2015). Platilo, že aspoň jedno z týchto liečiv bolo z ATC skupiny N06A. LI sa celkovo vyskytli u 16 pacientov (11 žien). Vek pacientov, u ktorých sme analyzovali LI, bol rozmanitý. Najstarší pacient má 89 rokov a najmladší pacient 27 rokov.

U 16 pacientov sa v sledovaných LI vyskytlo 11 rôznych antidepresív (viď graf 2). Do najväčšieho počtu LI vstupoval citalopram, ktorý sa vyskytol v 8 LI. Po ňom nasleduje dosulepín, mirtazapín a trazodón v 4 LI. Na treťom mieste v počte výskytu LI sa umiestnil paroxetín v 3 LI a za ním fluoxetín v 2 LI. Iba 1 LI bola zaznamenaná u escitalopramu, sertralínu, fluvoxamínu, venlafaxínu a amitriptylínu. Z výsledkov vyplýva, že najväčší počet LI bol pozorovaný v skupine antidepresív označovaných ako **SSRI** – celkovo 16 prípadov z 30 prípadov interagujúcich antidepresív, čo tvorí viac ako 50 %.

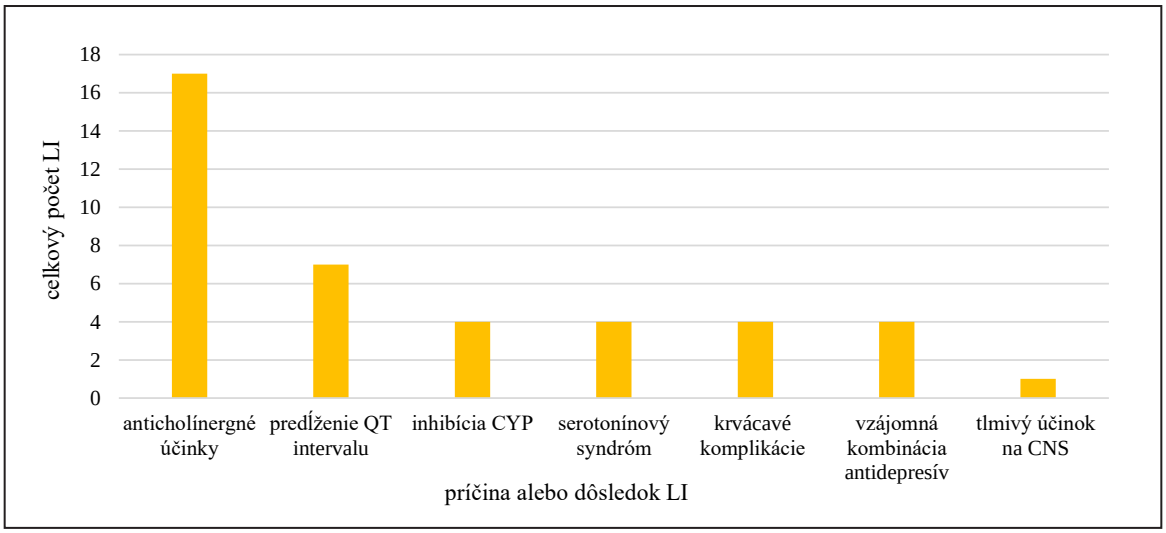
Celkový počet analyzovaných LI bol 26, pričom niektoré LI mali viacero príčin alebo dôsledkov (viď graf 3). Medzi najčastejšiu príčinu LI patria aditívne až synergické **anticholínergné nežiaduce účinky liečiv** (17 prípadov), ktoré sa vyskytovali pri súbežnom užívaní liečiv s anticholínergnými vlastnosťami. V siedmich prípadoch bolo ako následok LI zvýšené **riziko predĺženia QT intervalu** a možný vznik závažných arytmií typu *torsade de pointes*, najmä pri vzájomnom užívaní viacerých antidepresív alebo pri kombinácii antidepresív s antipsychotikami (levomepromazín). V štyroch prípadoch sa vyskytli LI ako následok **inhibície cytochrómu P450 (CYP)** antidepresívami zo skupiny SSRI. Podobne, v štyroch LI, bolo zaznamenané zvýšené riziko **sérotonínového syndrómu**, a to pri kombinácii antidepresív

Graf 2: Výskyt liečiv z ATC skupiny N06A v sledovaných LI



Zdroj: získané dáta sledovanej lekárne, vlastné spracovanie

Graf 3: Príčiny alebo dôsledky sledovaných LI



Zdroj: získané dáta sledovanej lekárne, vlastné spracovanie

s liečivami, ktoré zvyšujú hladinu 5-HT (tramadol). Riziko závažných **krvácavých komplikácií** sa taktiež vyskytuje v štyroch prípadoch, a to pri súčasnom užívaní SSRI s liečivami, ktoré ovplyvňujú hemostázu (warfarín, klopidogrel, kyselina acetylsalicylová) alebo, v jednom prípade, pri kombinácii s NSAID (meloxikam). Výskyt LI v dôsledku **vzájomnej kombinácie antidepresív** bol pozorovaný v štyroch prípadoch. Pri jednej LI sa vyskytlo riziko **zosilnenia tlmivého účinku** užívaných liečiv na centrálnu nervovú sústavu (CNS) (zolpidem a paroxetín).

Nasledujúci prehľad poukazuje na možné intervencie a opatrenia pri vyskytujúcich sa príčinách alebo dôsledkoch LI (viď graf 3), ktoré sú v kompetencii farmaceuta a je vhodné ich využiť pri dispenzácii interagujúcich antidepresív (viď graf 2):

- **LI ako príčina anticholínergných účinkov liečiv** – vždy je potrebné vopred zhodnotiť pomer benefitu a rizika takejto kombinácie dvoch liečiv s anticholínergným účinkom pre konkrétneho pacienta. Zvlášť citliví sú seniori a pacienti s poruchou funkcie orgánových systémov, ktoré môžu byť anticholínergnou aktivitou negatívne ovplyvnené (napr. pacienti so srdcovým zlyhaním, so sklonom ku glaukómu, so zápchou, pacienti s kognitívnym deficitom atď.). Farmaceut dokáže identifikovať rizikových pacientov podľa ich veku alebo užívaných liečiv, upozorniť ich na možný výskyt nežiaducich anticholínergných účinkov a v prípade ich výskytov kontaktovať lekára. Zároveň farmaceut edukuje pacienta, aby lieky bez predchádzajúcej konzultácie s lekárom v žiadnom prípade neprestal náhle užívať.
- **predĺženie QT intervalu ako dôsledok LI** – súčasné podávanie liečiv, o ktorých je známe, že predlžujú interval QT, nie je vhodné. Ak je nevyhnutné obe liečivá podávať, tak farmaceut má pacienta upozorniť na rizikové faktory vzniku arytmie *torsade de pointes* (hypokaliémia, hypomagneziémia a pod.), ktoré je nutné korigovať. Taktiež je vhodné venovať zvýšenú opatrnosť pri užívaní iných liečiv a prípravkov, ktoré môžu spôsobovať uvedené rizikové faktory.
- **sérotonínový syndróm ako dôsledok LI** – súčasné užívanie sérotonínergných liečiv je kontraindikované. Sérotonínový syndróm je život ohrozujúci stav, ktorý sa prejavuje potením, tachykardiou, ataxiou, hnačkou, horúčkou a zmenami duševného stavu. Je vhodné okamžite kontaktovať lekára, obzvlášť ak sú tieto lieky predpísané rôznymi predpisujúcimi lekármi, ktorí nemusia mať vedomosť o tejto nebezpečnej kombinácii.
- **krvácavé komplikácie ako dôsledok LI** – farmaceut pacienta upozorní na možný výskyt krvácavých komplikácií a vyzve ho, aby si dôkladne všímal prípadný vznik modrín, krvácanie z nosa, krv v stolici, krvácanie do tráviaceho ústrojenstva a pod. a tieto nežiaduce účinky hlásil lekárovi.
- **LI ako príčina vzájomného užívania antidepresív** – vzájomná kombinácia antidepresív je nevhodná a neúčelná. Na druhej strane, niektorí autori, ako napr. Henssler a kol. (2022), tvrdia, že kombinácia SSRI, SNRI alebo TCA s NaSSA sa zdá byť najúčinnejšou a najvýhodnejšou kombináciou antidepresív v dôsledku ich synergického účinku. Prikláňame sa k názorom, že takéto ombinácie by mali byť použité iba pri dlhotrvajúcej depresii, ktorá je rezistentná na liečbu a nie ako liečba prvej voľby, preto je vhodné konzultovať tento výber s lekárom – či už zo strany farmaceuta alebo pacienta.
- **tlmivý účinok na CNS ako dôsledok LI** – pri kombinácii antidepresív s liečivami, ktoré môžu zosilniť tlmivý účinok na CNS, treba pacientov upozorniť na možnosť ojedinelého výskytu halucinácií a na zhoršenú spôsobilosť na riadenie dopravných prostriedkov a obsluhu strojov. Najmä na začiatku kombinovanej liečby musí farmaceut dôkladne zdôrazniť, že pacienti nemajú riadiť dopravné prostriedky, obsluhovať stroje, pracovať vo výškach ani vykonávať iné činnosti vyžadujúce pozornosť, rýchlu akcieschopnosť a motorickú koordináciu (Drug Agency, a. s.).

DISKUSIA

Pri hodnotení spotreby antidepresív v roku 2021 v SR sme zistili, že v prvej pätici najviac užívaných antidepresív sa umiestnili až štyria zástupcovia zo skupiny SSRI, ktorá podľa Chu a Wadhwa (2022) patrí medzi najviac predpisované antidepresíva, čo nám potvrdzujú aj naše výsledky. V SR bol najviac užívaný escitalopram, avšak podľa Marasine a kol. (2021), ktorí vykonávali štúdie v rôznych štátoch, bol dominantný sertralín, ktorý sa v našom rebríčku umiestnil na druhom mieste. Tento rozdiel nám môže reflektovať na iné preskripčné preferencie lekárov na Slovensku, ale aj na iné faktory, ktoré lekári pri predpisovaní liekov môžu zohľadňovať, ako napr. vlastné požiadavky pacienta, anamnézu alebo cenu lieku.

V piatich najčastejšie vydávaných liečivách v sledovanej lekárni sú zastúpení traja zástupcovia zo

skupiny SSRI a dvaja zástupcovia zo skupiny SNRI. Relatívnym prekvapením je duloxetín, ktorý v sledovanej lekárni obsadil už tretie miesto, pričom celoslovensky sa do prvej pätice najviac užívaných antidepresív nedostal. Toto liečivo je schválené nie len na liečbu depresie, ale aj na liečbu diabetickej perifernej neuropatickej bolesti, fibromyalgie a muskuloskeletálnej bolesti (Shelton, 2019). Z tohto dôvodu sa prikláňame k názoru, že jeho umiestnenie na treťom mieste môže súvisieť s vyšším výskytom pacientov v sledovanej lekárni, ktorí trpia depresiami a súčasne chronickými bolesťami, čo môže byť teoretickou príčinou jeho voľby psychiatrami v spolupráci s inými lekármi.

V poslednej časti tejto štúdie sme sa venovali LI, ktoré sú jedným zo závažných problémov, ktoré sa vyskytujú pri kombinovanej liečbe a môžu spôsobovať nežiaduce účinky alebo dokonca zlyhanie či neúspešnosť farmakoterapie. V niektorých prípadoch predpisujúci lekár nemusí mať dostatočný priestor hodnotiť riziko vzniku LI, najmä ak sú lieky predpisované rôznymi lekármi a pacient neuvedie správnu liekovú anamnézu. Navyše, pacienti častokrát užívajú aj rôzne lieky, ktorých výdaj nie je viazaný na lekársky predpis a fytofarmaká, o ktorých ošetrujúci lekár nemusí mať vedomosť. Práve preto je v tejto úlohe nezastupiteľný farmaceut, ktorý sa podieľa na výdaji liekov a má významnú úlohu pri kontrole vhodnosti užívania liečiv, fytofarmák, potravinových doplnkov a potravín, ktoré sú užívané súbežne. Zároveň v tomto smere považujeme za potrebné konštatovať nedostatočné využívanie služieb e-zdravia. V zmysle zákona č. 153/2013 Z. z. o Národnom zdravotnom informačnom systéme sú údaje tzv. pacientskeho sumára (zahŕňajúce aj údaje o vydaných a podaných liekov za posledných 12 mesiacov) dostupné lekárom a farmaceutom. Avšak, realizácia tohto zákonného ustanovenia v praxi zatiaľ neprebehla a farmaceut nemá k dispozícii prehľad o pacientom užívaných liekoch.

Najčastejším dôvodom LI boli aditívne až synergické anticholínergné účinky liečiv. Často sa vyskytovala kombinácia benzodiazepínov, antipsychotík a antihistaminík s antidepresívami. Všetky tieto uvedené skupiny liečiv sa vyznačujú anticholínergnými účinkami, ktoré môžu byť zastúpené v rôznej miere v závislosti od dávky. Vzhľadom na často sa vyskytujúcu polyfarmáciu u staršieho rizikového pacienta môžu mať tieto liečivá pri vzájomnom užívaní aditívny alebo synergický účinok. Tieto anticholínergné nežiaduce účinky sú zvlášť nebezpečné u starších pacientov, pretože sú častokrát nesprávne zaradené k prejavom starnutia alebo demencie a nevenuje sa im pozornosť. Starší pacienti si dokonca sami neuvedomia nežiaduce účinky a nepripisujú ich užívaniu liečiv, najmä ak sú prítomné poruchy kognitívnych funkcií (Mačugová a kol., 2011).

V úlohe hodnotenia LI je preto nezastupiteľný farmaceut, ktorý má možnosť upozorniť na výskyt LI a prekonzultovať ich s lekármi, odporučiť návrhy na vhodnejšie kombinácie liečiv a taktiež upozorniť pacienta na osobitné opatrenia, možný výskyt nežiaducich účinkov a skontrolovať správnosť užívania a dávkovania užívaných liekov. Všetky tieto možnosti sme uviedli pri prehľade eventuálnych intervencií farmaceuta pri pacientoch užívajúcich antidepresíva.

ZÁVER

Každý pacient vyžaduje individuálny prístup. Zvlášť citliví sú psychiatrickí pacienti. Nie každý lekár má dostatok priestoru venovať sa týmto pacientom, čo v nich môže podnecovať nedôveru k zvolenej liečbe. To môže vyústiť do zníženej adherencie a zhoršeniu príznakov ochorenia. Túto dôveru by mal obnoviť a udržiavať farmaceut.

V tejto štúdii sme poukázali na viaceré možnosti, ktoré má farmaceut k dispozícii, aby získal s pacientom otvorený a dôverný vzťah, a tak zlepšoval a kontroloval výsledky jeho liečby. Tieto intervencie sa ukázali ako účinné v zvyšovaní úspešnosti liečby.

Pri hodnotení najviac užívaných liečiv zo skupiny antidepresív sme určili, že v roku 2021 boli na Slovensku najviac užívané antidepresíva zo skupiny SSRI. V rámci Slovenska sme sa však stretli s určitými rozdielmi v najviac užívaných antidepresívach, čo môže mať viacero príčin, ako napr. rozdielne pre-

skripčné preferencie lekárov, ktorí môžu zohľadňovať aj vlastné požiadavky konkrétneho pacienta alebo cenu lieku.

Na záver sme sa venovali problematike liekových interakcií. Zistili sme, že pacienti užívajúci antidepresíva sa relatívne často stretnú s ich výskytom. Tieto liekové interakcie spôsobujú ďalšiu nedôveru k liečbe a možné nežiaduce účinky, pre ktoré pacienti nechcú tolerovať a nedodržiavajú liečbu. Z tohto hľadiska je dôležité, aby farmaceut dokázal identifikovať možné liekové interakcie a prispel k ich úspešnému vyriešeniu.

Na druhej strane, úloha farmaceuta na Slovensku je v porovnaní s inými štátmi stále málo uznávaná a mnohí lekári nie sú ochotní konzultovať výber farmakoterapie s farmaceutom. To je hlavná myšlienka, prečo si do budúcna želáme a navrhujeme, aby sa nezabúdalo na jedinečné vedomosti a schopnosti farmaceutov, a stali sa tak neoddeliteľnou súčasťou zdravotníckych tímov v starostlivosti nielen o psychiatrických, ale o všetkých pacientov.

ZOZNAM LITERATÚRY

Abubakar, A. R., Chedi, B., Mohammed, K. G., Haque, M.: Drug interaction and its implication in clinical practice and personalized medicine. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 2015, 5, 343 – 349. https://www.bibliomed.org/mnsfulltext/28/28-1432182685.pdf?1681331692. Accessed March 03, 2023.

Drug Agency, a. s.: *Databáza liekových interakcií* [Database of Drug Interactions]. https://berry.lekoveinterakce.cz. [cit. 02-02-2023].

Henssler, J., Alexander, D., Schwarzer, G., Bschor, T., Baethge, C.: Combining antidepressants vs antidepressant monotherapy for treatment of patients with acute depression. *JAMA Psychiatry*, 2022, 79, 300 – 312. https://jamanetwork.com/journals/jamapsychiatry/fullarticle/2789300. Accessed February 20, 2023.

Chu, A., Wadhwa, R.: *Selective serotonin reuptake inhibitors*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32119293. Accessed March 20, 2022.

Kamusheva, M., Ignatova, D., Golda, A., Skowron, A.: The potential role of the pharmacist in supporting patients with depression – a literature-based point of view. *Integrated Pharmacy Research and Practice*, 2020, 9, 49 – 63. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7049755. Accessed January 24, 2022.

Mačugová, A., Kuželová, M., Kostková, L., Drobná, V., Luha, J., Dukát, A., Murín, J., Stratený, K., Wawruch, M.: Anticholínergické účinky liečiv u starších pacientov [Anticholinergic effects of drugs in elderly patients]. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2011, 25, 126 – 130. https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2011/03/06.pdf. [cit. 2023-02-19].

Marasine, N. R., Sankhi, S.: Factors associated with antidepressant medication non-adherence. *Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 2021, 18, 242 – 249. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8100773. Accessed January 27, 2022.

Marasine, N. R., Sankhi, S., Lamichhane, R., Marasini, N. R., Dangi, N. B.: *Use of antidepressants among patients diagnosed with depression: a scoping review.* https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7984896. Accessed February 18, 2022.

Marek, J., Vrablík, M.: *Markova farmakoterapie vnitřních nemocí* [Mark's pharmacotherapy of internal diseases]. 5. vyd. Praha: Grada, 2019. 896 s.

Moraczewski, J., Aedma, K. K.: *Tricyclic Antidepressants*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557791. Accessed January 11, 2022.

Národné centrum zdravotníckych informácií [National health information centre]: *Spotreba humánnych liekov, zdravotníckych pomôcok a dietetických potravín*. https://www.nczisk.sk/Statisticke_vystupy/Tematicke_statisticke_vystupy/TOP-50-liekov/Pages/default.aspx. [cit. 02-02-2023].

Racková, S.: Využití mirtazapinu v klinické praxi [Mirtazapine in clinical practice]. *Psychiatrie pro praxi*, 2017, 18, 64 – 68. https://www.psychiatriepropraxi.cz/pdfs/psy/2017/02/04.pdf. [cit. 2022-03-28].

Shelton, R. C.: Serotonin and norepinephri-

ne reuptake inhibitors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2019, 250, 145 – 180. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30838456. Accessed March 23, 2022.

Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., Votava, M.: *Farmakologie* [Pharmacology]. Praha: Grada, 2018. 1008 s.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 3: 14 – 23, 2023

PHARMACOTHERAPY OF ARTERIAL HYPERTENSION IN PATIENTS WITH TYPE 2 *DIABETES MELLITUS*

Faixová, Zita[1]; Dutková, Miroslava[1]; Faixová, Dominika[2]; Gažová, Andrea[3]; Szabóová, Renáta[1]; Kyselovič, Ján[4,5]

[1]Department of Biology and Physiology
University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice
[2]Department of Pharmaceutical Technology,Pharmacognosy and Botany, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenkého 73, 041 81 Košice
[3]Institute of Pharmacology and Clinical Pharmacology
Comenius University Faculty of Medicine, Špitálska 24, 813 72 Bratislava
[4]Department of Pharmacology and Toxicology
University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice
[5]5th Department of Internal Medicine
Comenius University Faculty of Medicine and University Hospital in Bratislava, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava
The Slovak Republic

zita.faixova@uvlf.sk

ABSTRACT

The prevalence of arterial hypertension (AH) and type 2 *diabetes mellitus* (T2D) is increasing worldwide. The coexistence of these two diseases is associated with a six-fold increased risk of cardiovascular events compared to healthy individuals. The study aims to analyse therapy for both disorders, microvascular and macrovascular complications, and patient comorbidities. Of the patients with AH and T2D (N = 250), most were women (N = 154) (61.6 %) over 70 years old (37.2 %). Seventy percent of patients suffered from obesity (BMI more than 30.0) and dyslipidaemia (64.4 %). Liver diseases occurred in 26.8 % patients, varicose veins of the limbs in 20.4 % patients, hyperuricemia in 18.4 % patients and hypokalaemia in 10.4 % patients. The most frequently used drug groups for the treatment of hypertension were ß-blockers (70.8 %), diuretics (67.2 %) and calcium channel blockers (66.8 %). T2D was most frequently treated with biguanides (64.4 %), sulfonylurea derivatives (36 %), and insulin treatment was necessary for several patients (18 %). Dietary measures were sufficient in 11.2 % of patients. Diabetic nephropathy was reported in 9.6 % patients, diabetic neuropathy in 5.6 % patients and diabetic retinopathy in 1.6 % patients. Myocardial infarction was reported in 18.4 % patients and stroke by 12.8 % patients. In patients with AH and T2D,

it is essential to start with non-pharmacological treatment. Combined therapy in pharmacological treatment is advantageous, ideally in a fixed combination, which can significantly improve patient adherence.

Key words: arterial hypertension; comorbidities; pharmacotherapy; type 2 *diabetes mellitus*

INTRODUCTION

Hypertension is present in more than half of patients with *diabetes mellitus* and contributes to the development of microvascular and macrovascular diseases. Arterial hypertension (AH) is defined as a repeated increase in systolic blood pressure above 140 mmHg and diastolic blood pressure above 90 mmHg measured in at least two different visits to a doctor (Souček, 2011).

Hypertension has been classified into essential (primary) (90 – 95 %) and secondary hypertension (5 – 10 %). The cause of primary hypertension is a combination of genetic factors, diet, age and lifestyle. Secondary hypertension can arise from renal, endocrine, and vascular diseases (e. g. coarctation of the aorta), or drugs, toxins, etc., can also induce it. Other types of hypertension exist, e. g. resistant, isolated hypertension, etc. (Hecht, 2019).

In the pathogenesis of AH, factors of the external environment, hemodynamics, genetic factors (30 – 50 %) and deviations of endogenous regulatory mechanisms are applied (Hamrahian, 2017). Environmental and lifestyle factors also play a role in the development of hypertension, including high salt intake, excessive caloric intake, stress, excessive alcohol consumption, and lack of physical activity.

Diabetes mellitus type 2 (T2D) and AH coexist, affect each other's courses and often occur with other components of the metabolic syndrome (Pavlou et al., 2018; Przezak et al., 2022). T2D is a metabolic disorder characterised by hyperglycemia with impaired carbohydrate, fat, and protein metabolism due to defects in insulin secretion, insulin action, or both (Thompson and Kanamarlapudi, 2013).

The most common form of *diabetes mellitus* is type 2, it is estimated that 90 % of diabetic patients are diagnosed with this form, and the remaining 10 % have type I, but there are other rare types of diabetes (Reed et al., 2021). Risk factors of T2D include a combination of genetic, metabolic and environmental factors that interact and contribute to the prevalence of the disease. Although the individual predisposition to T2D has a solid genetic basis due to uncontrollable risk factors (ethnicity, family history, genetic predisposition), epidemiological studies indicate that many cases of T2D can be prevented by improving influenceable factors such as obesity, physical activity, consumption of unhealthy food, etc. (Galicia-Garcia et al., 2020).

T2D is a disease in which the loss of mutual relationship between insulin-secreting β-cells and glucagon-secreting α-cells leads to hyperglucagonemia and subsequent hyperglycemia (Muralitharan and Ian, 2017). A combination of peripheral insulin resistance and insufficient insulin secretion by pancreatic β-cells characterises T2D. Insulin resistance (IR) is associated with increased levels of free fatty acids and pro-inflammatory cytokines in the plasma, leading to reduced transport of glucose into muscle cells, increased glucose production in the liver and increased fat breakdown.

Dietary measures and physical activity are the bases of non-pharmacological treatment of patients with *diabetes mellitus*. Pharmacological treatment is required since lifestyle modifications fail to induce or maintain adequate glycemic control in most patients (Chan and Abrahamson, 2003). The selection of drugs in T2D should be guided by the patient's needs and treatment goals, drug concentration for optimal glycemic control, tolerability and side effect profile, and ease of administration (Nyenwe et al., 2011).

Hypertension and *DM* often co-occur (Przezak et al., 2022). Hypertension in *DM* is the result of the interaction of several factors, which include, in addition to genetic predispositions, IR and hyperinsulinemia, also vascular and endothelial dysfunction,

sodium retention, increased activity of the sympathetic nervous system and renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). In addition, hyperinsulinemia and IR contribute to an increase of intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells, leading to vasoconstriction (Mugo et al., 2007).

Many mechanisms are involved in the development of hypertension in diabetic patients. The role plays an increased retention of sodium in the body, which involves increased sodium-glucose cotransport in the proximal tubule of the kidneys, increased sympathetic activity, and hyperinsulinemia. Subsequently, there is an extravascular transfer of sodium and fluid into the interstitium. Hyperglycemia and increased sodium concentration increase the extracellular fluid volume (Mokáň et al., 2008).

AH and T2D are risk factors for cardiovascular diseases that cause increased mortality due to coronary artery disease, heart failure or stroke (Przezak et al., 2022). Reduction of blood pressure brings benefits for patients with T2D.

The goal of AH therapy is to reduce blood pressure to < 140/90 mmHg in all degrees of hypertension, thus slowing down the development of organ changes and the course of other complications of hypertension (Souček, 2011).

The work analyses the pharmacotherapy of arterial hypertension in patients with *diabetes mellitus* type 2, the occurrence of microvascular and macrovascular complications and patient comorbidities.

MATERIAL AND METHODS

We performed a retrospective analysis of the medical records of 250 patients diagnosed with arterial hypertension (I10 according to International Classification of Diseases -10; ICD-10) and *diabetes mellitus* type 2 (E11 according to ICD-10) treated in the in-house clinic from January 2022 to June 2022.

From the medical records, the following data were collected: age and gender, BMI value, pharmacotherapy of AH and T2D, microvascular and macrovascular complications, and patient comorbidities.

The Personal Data Protection Act depersonalised all data obtained. The obtained data were processed using MS Excel (2016).

RESULTS

Our study showed that out of 250 patients with AH and T2D, 61.6 % (154) were women, and 38.4 % (96) were men.

Our studied group were patients aged between 40 and 99 years (see Tab. 1). The data show that the incidence of AH and T2D increases with age of the population. Most patients diagnosed with both diseases were between the ages of 70 – 79 years old (37.2 %) and between the ages of 60 – 69 years old (36 %). The average age of all patients was 68.5 years. Most females with AH and T2D were between the ages of 70 – 79, while most males were aged 60 – 69 years old. The average age of females was 71 years, and the average age of males was 64.5 years.

The patients were classified on BMI. Out of 250 analysed patients, only 0.4 %, i. e. (1) had an average weight (BMI 18.5 – 24.9). In 29.6 % patients, i. e. (74), we found overweight (BMI 25 – 29.9), obesity class I and class II degree (BMI 30 – 39.9) was observed in the largest group of patients, in 62.8 % patients (157), and severe obesity (BMI higher than 40) occurred in 7.2 % (18) patients (see Tab. 2). Per the BMI definition, 64.9 % of females and 59.4 % of males were obese. BMI in women was 33.2, and in men 32.4.

Given that obesity is a risk factor for the development of AH, T2D and cardiovascular diseases, obesity in the analysed group of patients is alarming.

Several drugs were used to treat AH (see Tab. 3), and more were used in combined treatment or fixed therapy. Diabetic patients with hypertension were most often treated with ß-blockers (70. 8 %), followed by diuretics (67.2 %) and calcium channel blockers (66.8 %). Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) and angiotensin II receptor blockers (ARBs) were used to treat hypertension in approximately the same number of patients, i. e., 46.8 % and 46.4 %,

Tab. 1: The distribution of hypertensive patients with *diabetes mellitus* type 2 by age

Age group	All patients % (N)	Male % (N)	Female % (N)
40 – 49	3.6 (9)	9.4 (9)	0
50 – 59	12 (30)	20.8 (20)	6.5 (10)
60 – 69	36 (90)	37.5 (36)	35.1 (54)
70 – 79	37.2 (93)	28.1 (27)	42.9 (66)
80 – 89	9.6 (24)	4.2 (4)	13 (20)
90 – 99	1.6 (4)	0	2.6 (4)

Tab. 2: Classification of hypertensive patients with *diabetes mellitus* type 2 according to BMI

Classification	BMI ($kg.m^{-2}$)	All patients % (N)	Male % (N)	Female % (N)
Normal weight	18.5 – 24.9	0.4 (1)	1 (1)	0
Overweight	25.0 – 29.9	29.6 (74)	33.3 (32)	27.3 (42)
Obesity class I, II	30.0 – 39.9	62.8 (157)	59.4 (57)	64.9 (100)
Obesity class III	≥ 40	7.2 (18)	6.3 (6)	7.8 (12)

Tab. 3: Overview of drug groups in the pharmacotherapy of arterial hypertension in patients with *diabetes mellitus* type 2

Drug groups	All patients % (N)	Male % (N)	Female % (N)
ß-blockers	70.8 (177)	76 (73)	67.5 (104)
Diuretics	67.2 (168)	54.2 (52)	75.3 (116)
Calcium channel blockers	66. 8 (167)	63.5 (61)	68.8 (106)
ACEi	46.8 (117)	59.4 (57)	39 (60)
ARBs	46.4 (116)	53.2 (34)	53.2 (82)
Antagonists of α-receptors	37.6 (94)	34.4 (33)	39.6 (61)
Imidazoline receptor agonists	28 (70)	21.9 (21)	31.8 (48)

ACEi – Angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARBs – angiotensin II receptor blockers

respectively.

Drug groups such as α-adrenergic receptor antagonists (urapidil) were used by 37.6 % of patients, imidazoline receptor agonists such as moxonidine and rilmenidine were used by 28 % of patients.

Diuretics were women's most used group of drugs (75.3 %). This was followed by calcium channel blockers (68.8 %), ß-blockers (67.5%) and ARBs (53.2 %). In men, ß-blockers (76 %) were the most used in pharmacotherapy, followed by calcium channel blockers (63.5 %), ACE inhibitors (59.4 %) and diuretics (54.2 %).

We also evaluated drug groups for treating diabetes type 2 in arterial hypertensive patients (see Tab. 4). Patients were most often prescribed biguanides (up to 64.4 %), 36 % were treated with sulfonylurea derivatives, and 18 % required insulin treatment. The dietary measures themselves could have been more

Tab. 4: Overview of drug groups in the pharmacotherapy of *diabetes mellitus* type 2 in patients with arterial hypertension and T2D

Drug groups	All patients % (N)	Male % (N)	Female % (N)
Biguanides	64.4 (161)	69.8 (67)	61 (94)
Sulfonylurea derivatives	36 (90)	32.3 (31)	38.8 (59)
Insulin	18 (45)	16.7 (16)	18.8 (29)
Gliptins	9.6 (24)	12.3 (19)	5.2 (5)
Gliflozins	4.4 (11)	2.6 (4)	7.3 (7)
GLP-1 analogues	1.2 (3)	0.6 (1)	2.1 (2)
Dietary measures	11.2 (28)	11.5 (11)	11 (17)

GLP-1 analogues – glucagon-like peptide-1 analogues

Tab. 5: Occurrence of microvascular and macrovascular complications in arterial hypertensive patients with T2D

Microvascular complications	All patients % (N)	Male % (N)	Female % (N)
Diabetic nephropathy	9.6 (24)	6.3 (6)	11.7 (18)
Diabetic neuropathy	5.6 (14)	5.2 (5)	5 (9)
Diabetic retinopathy	1.6 (4)	0.6 (1)	3.1 (3)
Macrovascular complications			
Myocardial infarction	18.4 (46)	28.1 (27)	12.3 (19)
Stroke	12.8 (32)	10.4 (10)	14.3 (22)

Tab. 6: Occurrence of other comorbidities in patients with AH and T2D

Comorbidity	All patients % (N)	Male % (N)	Female % (N)
Obesity	70 (175)	63 (66.7)	73.4 (112)
Dyslipidemia	64.4 (161)	58 (60.4)	66.9 (103)
Liver diseases	26.8 (67)	44 (28.6)	24 (23)
Varicose veins	20.4 (51)	8 (8.3)	27.9 (43)
Hyperuricemia	18.4 (46)	20 (20.8)	16.9 (26)
Low potassium (Hypokalemia)	10.4 (26)	14 (14.6)	7.8 (12)
Cough after ACE inhibitors	7.6 (19)	3 (3.1)	10.4 (16)
Chronic vertebrogenic pain syndrome	7.2 (18)	11 (11.5)	4.5 (7)
Diabetic foot	2 (5)	3 (3.1)	1.3 (2)
Sleep apnea	0.8 (2)	1 (1)	0.6 (1)

effective, as they were sufficient for only 11.2 % of patients. Gliptins were used in treatment in 9.6 % of patients, gliflozins in 4.4 %, and glucagon-like peptide-one analogue in only 1.2 % of patients.

In women, biguanides were the most used drug group (61 %), followed by sulfonylurea derivatives (38.3 %); 18.8 % needed insulin treatment, and 12.3 % used gliptins.

Similar results were also observed in men; up to 69.8 % were treated with biguanides, followed by sulfonylurea derivatives (32.3 %), and insulin treatment was required by 16.7 % of men. Dietary measures were sufficient for 11 % of women and 11.5 % of men.

Out of the microvascular complications, the most common was diabetic nephropathy (9.6 %), diabetic neuropathy occurred in 5.6 % of patients and diabetic retinopathy in 1.6 % of patients. Diabetic nephropathy (11.7 %) and diabetic retinopathy (3.1 %) were more common in women than in men. On the contrary, we observed more cases of diabetic neuropathy in men (5.2 %) than in women (see Tab. 5).

Out of the macrovascular complications in our analysed group of patients, myocardial infarction occurred in 18.4 % of patients and stroke in 12.8 %. Stroke occurred more often in women (14.3 %), and, on the contrary, we detected a higher incidence of myocardial infarction in men (28.1 %).

In addition to macrovascular and microvascular complications, we observed other associated comorbidities in patients (see Tab. 6). The most common comorbidity was obesity, which occurred in up to 70 % of patients (175). Similarly, dyslipidemia was observed in 64.4 % of patients (161).

DISCUSSION

Two-thirds of patients with *diabetes mellitus* type 2 have arterial hypertension (Cheung and Li, 2012). Hypertension increases the incidence of microvascular and macrovascular complications in these patients, with the coexistence of these two major risk factors leading to a six-fold increased risk of cardiovascular disease compared to normotensive non-diabetic patients (Ninomiya et al., 2007).

The current prevalence of T2D and AH depends on age, BMI and ethnicity. Data from the National Health and Nutrition Examination Survey from 1999 – 2004 show that women with hypertension are more likely to use antihypertensive medications than men but often fall short of blood pressure (BP) targets (Pavlou et al., 2018). The INTERHEART study showed a higher risk of cardiovascular disease in hypertensive women than men, probably attributable to the higher prevalence of hypertension in older women.

Our group of 250 patients comprised of 61.6 % women and 38.4 % men. The results of our analysis show that men aged 60 – 69 years have a higher prevalence of hypertension (37.5 %) compared to women of this age (35.1 %) and *vice versa*; in the age group 70 – 79 years women have a higher prevalence of hypertension (42.9 %) compared to men (28.1 %). We found that the rate of AH and T2D increases with the increasing age of the population, and we recorded the highest incidence of both diseases in the age group of patients from 70 to 79 years. The obtained data are similar to the results of Kiňová et al. (2013), who report the highest prevalence of hypertension, up to 60 – 70 % in patients over 70 years of age. According to Dreisbach (2020), up to the age of 45, a higher percentage of men than women suffer from hypertension; between the ages of 45 and 64, the percentages are almost identical for both genders and a higher percentage of women than men suffer from hypertension over the age of 64.

Obesity is one of the main risk factors for hypertension. Excessive weight gain associated with increased visceral fat is a major risk factor for hypertension, accounting for 60 – 75 % of the risk of essential hypertension in humans. An increase in BMI leads to an increase in the risk of hypertension. A higher BMI is a risk factor for hypertension and dyslipidemia (Tang et al., 2022).

We found a higher incidence of obesity in women (64.9 %) than in men (59.4 %). Of our patients, only one patient (0.4 %) had average weight, and 29.6 % were overweight; we observed obesity class I and class II in up to 62.8 % and severe obesity (class III) in 7.2 % of patients. It should be essential for these patients to adhere to dietary measures and a significant weight reduction, as obesity significantly contributes to many complications and the development of cardiovascular diseases.

Treatment of T2D should be accompanied by ap-

propriate treatment of elevated BP and other cardiovascular risk factors to reduce the risk of micro- and macrovascular complications. According to recent systematic reviews, all classes of antihypertensive agents, including ACE inhibitors, angiotensin II receptor blockers (ARBs), diuretics, and calcium channel blockers, can treat hypertension in diabetic patients if they are effective and safe. Combining two or more drugs is necessary because many diabetic patients show resistant hypertension. These combinations have a synergistic effect in lowering BP and may lead to fewer side effects. Likewise, the use of two or more different drugs in one tablet contributes to better adherence and, consequently, to better BP control (Jašíčková et al., 2021; Simić and Takáč, 2022). Based on the SHIELD and STITCH studies, it was found that diabetic patients with mean blood pressure above 160/100 mmHg, who are initially treated with a combination of two antihypertensive drugs, can reach the target BP earlier compared to patients who are treated with monotherapy (Pavlou et al., 2018).

The results of our study showed that patients diagnosed with AH and T2D used β-blockers (70.8 %), diuretics (67.2 %) and calcium channel blockers (66.8 %). The exact representation had ACE inhibitors (46.8 %) and angiotensin II receptor blockers (ARBs) (46.4 %). All patients were treated with at least two combinations of drugs, which may contribute to better patient adherence and blood pressure control.

The American Diabetes Association 2020 clinical practice guidelines indicate that non-pharmacological measures such as weight loss, regular physical activity, and restriction of fat and total energy intake should always be part of any blood pressure-lowering treatment, as they are the mainstay of preventive therapy in patients with *DM* and hypertension. RAAS blockers can slow the progression of renal failure and cardiovascular disease and are, therefore, suitable for the initial treatment of hypertension in patients with *DM*. Other antihyperglycemic drugs, such as GLP-1 agonists and sodium-glucose cotransporter-2 (SGLT2) inhibitors, have been found to lower blood pressure and also improve glucose metabolism (Jia and Sowers, 2021).

T2D is a major global health problem with increasing prevalence. The balance of treatment is between optimal disease management and prevention of micro- and macrovascular events and severe hypoglycemia.

The results of the Look AHEAD study demonstrated that intensive lifestyle interventions, including dietary restrictions aimed at weight loss, were associated with better glycemic control in patients (Raveendran et al., 2018).

Our analysis of pharmacotherapy of patients with AH and T2D showed that the most frequently used group of drugs for the treatment of T2D were biguanides (64.4 %). This was followed by sulfonylurea derivatives (36 %); insulin treatment was necessary for 18 % of patients. Dietary measures were sufficient only in a very small group of patients (11.2 %); in others, pharmacotherapy was required.

A new review and meta-analysis, including 43 studies, evaluated the effect of SGLT2 inhibitors on blood pressure in patients with T2D. The investigated SGLT2 inhibitors (dapagliflozin, canagliflozin, ampagliflozin, ipragliflozin) were compared with placebo, metformin, sitagliptin, glimepiride and others. The authors concluded that SGLT2 inhibitors positively affected blood pressure alone as monotherapy or as additional therapy to existing therapy.

Gliflozins and GLP-1 analogues are rarely used in treating T2D. Only 4.4 % of patients from our group used gliflozins, and 1.2 % used GLP-1 analogues.

Diabetic complications have been classified into acute and chronic. We include diabetic ketoacidosis, non-ketotic hyperosmolar coma and hypoglycemia among the acute ones.

Chronic complications include injuries to the minor (microvascular complications) and large vessels (macrovascular complications). Microvascular complications are involved in diabetic neuropathy, nephropathy, and retinopathy. Macrovascular complications contribute to the pathogenesis of cardiovascular diseases such as coronary, cerebrovascular and peripheral arterial diseases. Several studies indicate that

strict glycemic control reduces the risk of occurrence and slows the progression of diabetic retinopathy and diabetic nephropathy in high-risk patients with T2D (Yamazaki et al., 2018).

We rarely observed microvascular complications in our group of analysed patients. Diabetic nephropathy (9.6 %), less frequently diabetic neuropathy (5.6 %) and rarely diabetic retinopathy (1.6 %) occurred most often.

Macrovascular complications are significantly associated with mortality in patients with T2D. The Framingham study found that patients with T2D have a 2 – 3 times higher incidence of coronary artery disease than non-diabetics. Other studies have shown that the cardiovascular risks of diabetes are determined by both diabetic factors, such as postprandial glucose level and classical cardiovascular factors, such as hypertension, dyslipidemia and obesity (Yamazaki et al., 2018).

The incidence of macrovascular complications was higher than microvascular complications in our analysed group of patients. We detected myocardial infarction in 18.4 % of patients and stroke in 12.8 % of patients.

Data from the Health Yearbook of the Slovak Republic from 2020 evaluated the development of the number of complications of *DM* and accompanying diseases diagnosed in the monitored year from 2011 – 2020. In 2020, the highest incidence was diseased with a lipid metabolism disorder and AH [National Center for Health Information (NCZI), 2021].

Approximately 40 % of diabetic patients have elevated triglyceride levels (> 2.28 $mmol.L^{-1}$), and 10 % have higher than 4.56 $mmol.L^{-1}$. The most substantial evidence of statins' beneficial cholesterol-lowering effect in diabetic patients comes from the Heart Protection Study (HPS) and the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS). Treatment with 40 mg of simvastatin reduced the risk of ischemic heart disease by 27 %. In the CARDS study, the average age of diabetic patients was 62 years. These were patients without cardiovascular disease with at least one risk factor, including hypertension, smoking or retinopathy. Treatment with atorvastatin resulted in a 36 % reduction in the incidence of acute cardiac events and a 48 % reduction in the incidence of stroke (Sirkanth and Deedwania, 2016).

Our study detected several complications in patients with AH and T2D simultaneously. Undoubtedly, the most frequently occurring comorbidities were obesity in up to 70.8 % of patients and dyslipidemia in 64.4 %. Hypokalemia occurred in 10.4 % of patients, which can also be attributed to a certain extent to the use of diuretics. 7.6 % of patients developed a dry, non-productive cough due to taking ACE inhibitors. 18.4 % of patients suffered from hyperuricemia, which the use of diuretics or improper lifestyle could cause.

CONCLUSIONS

The results of this retrospective study showed that AH and T2D coexist and increase with the population's age. It is important to start not only pharmacological therapy but also non-pharmacological treatment, which includes dietary measures and lifestyle changes with an emphasis on regular physical activity and can help to reach the target value of blood pressure more easily. It is advantageous to use combined treatment in pharmacological treatment, ideally in a fixed combination, which can significantly improve patient adherence.

According to the 2018 ESC/ESH recommendations, it is suggested to start hypertension treatment in diabetic patients if the blood pressure in the clinic is higher than 140/90 mmHg. In addition to lifestyle interventions, a combination of an ACE inhibitor or an ARB with a calcium channel blocker or a thiazide diuretic is recommended. This treatment strategy, including an ACE inhibitor or an ARB, has been proven to reduce albuminuria and the occurrence or progression of diabetic nephropathy more effectively than other groups of drugs (Williams et al., 2018).

In individuals with T2D and AH, microvascular and macrovascular complications are significantly more common than those without hypertension.

Among the microvascular complications, diabetic nephropathy and diabetic retinopathy occurred more often in women, while we recorded more cases of diabetic neuropathy in men. Among the macrovascular complications, stroke occurred more often in women, and a higher incidence of myocardial infarction was recorded in men.

Because in our study we found a high rate of obesity (70 %) to severe obesity (7.2 %) and dyslipidemia (64.4 %) in patients, it is also crucial to educate patients about changing lifestyles and eating habits that, in combination with pharmacological treatment, can help patients not only achieve an adequate blood pressure value but also ensure a better, healthier and longer life.

REFERENCES

Dreisbach, A. W.: *Epidemiology of Hypertension*. 2020. <https://emedicine.medscape.com/article/1928048-overview#a2>. Accessed February 26, 2022.

Galicia-Gracia, U., Benito-Vicente, A., Jebaris, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., Martin, C.: Pathophysiology of type 2 *diabetes mellitus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21 (17), 6275. <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/6275>. ISSN 1422-0067. Accessed May 14, 2022.

Hamrahian, S. M.: *Pathophysiology of hypertension*, 2017. <https://emedicine.medscape.com/article/1937383-overview#a1>. Accessed February 10, 2022.

Hecht, M.: Types and stages of hypertension. *Health line*, 2019. <https://www.healthline.com/health/types-and-stages-of-hypertension>. Accessed December 29, 2021.

Chan, J. L., Abrahamson, M. J.: Pharmacological management of type 2 *diabetes mellitus*: rationale for rational use of insulin. *Mayo Clinic Proceedings*, 2003, 78 (4). <https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196(11)62825-5/fulltext>. ISSN 0025-6196, 1942-5546. Accessed June 15, 2022.

Cheung, B. M., Li, C.: Diabetes and hypertension: Is there a common metabolic pathway? *Curr. Atheroscler. Res.*, 2012, 14, 160 – 166.

Jia, G., Sowers, J. R.: Hypertension in diabetes: an update of basic mechanisms and clinical disease. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 2021, 78 (5). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34601960/>. ISSN 1524-4563. Accessed October 30, 2022.

Jašíčková, A., Faixová, D., Faixová, Z., Gažová, A., Kyselovič, J.: Kompliancia a adherencia hypertenzných pacientov k terapii [Compliance and adherence of hypertensive patients to therapy]. *Folia Pharmaceutica Cassoviensia*, 2021, 3 (1), 14 – 21.

Kiňová, S., Hulín, I. et al.: *Interná medicína* [Internal Medicine]. 1. vyd. Bratislava: ProLitera, 2013. 1136 s.

Mokáň, M., Martinka, E., Galajda, P.: *Diabetes mellitus a vybrané metabolické ochorenia* [Diabetes Mellitus and the Selected Metabolic Disorders]. 1. vyd. Turany: P + M, 2008. 1003 s.

Mugo, M. N. et al.: *Hypertension*. Edinburgh, London, New York: Elsevier, 2007. <http://www.scopus.com/inward/record.url?scp=84882912327&partnerID=8YFLogxK>. Accessed April 2, 2022.

Muralitharan, N., Ian, P.: *Patofyziologie: pro zdravotnické obory* [Pathophysiology: for Medical Disciplines]. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a. s., 2017. 256 s.

NCZI [National Health Information Centre]. Zdravotnícka ročenka Slovenskej republiky 2020. Bratislava: Národné centrum zdravotníckych informácií, 2021. 256 s. https://www.nczisk.sk/Documents/rocenky/2020/Zdravotnicka_rocenka_Slovenskej_republiky_2020.pdf. Accessed October 31, 2022.

Ninomiya, T., Kubo, M., Doi, Y., Yonemoto, K., Tanizaki, Y., Rahman, M., Arima, H., Tsuryuya, K., Lida, M., Kiyohara, Y.: Impact of metabolic syndrome on the development of cardiovascular disease in a general Japanese population: The Hisayama study. *Stroke*, 2007, 38, 2063 – 2039.

Nyenwe, E. A., Jerkins, T. W., Umpierrez,

G. E., Kitabchi, A. E.: Management of type 2 diabetes: evolving strategies for the treatment of patients with type 2 diabetes. *Metabolism: clinical and experimental*, 2011, 60 (1), 1 – 23. < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3746516/>. Accessed January 9, 2022.

Pavlou, D. I., Paschou, S. A., Anagnostis, P., Spartalis, M., Spartalis, E., Vryonidou, A., Tentolouris, N., Siasos, G.: Hypertension in patients with type 2 *diabetes mellitus*: targets and management. *Maturitas*, 2018, 112, 71 – 77. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378512218301415>. Accessed October 31, 2022.

Przezak, A., Bielka, W., Pawlik, A.: Hypertension and type 2 diabetes – the novel treatment possibilities. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23, 6500. Doi: 10.3390/ijms23126500.

Raveendran, A. V., Chacko, E. C., Pappachan, J. M.: Non-pharmacological treatment options in the management of *diabetes mellitus*. *European Endocrinology*, 2018, 14 (2), 31 – 39. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6182920/>. Accessed May 4, 2022.

Reed, J., Bain, S., Kanamarlapudi, V.: A review of current trends with type 2 diabetes epidemiology, aetiology, pathogenesis, treatments and future perspectives. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 2021, 14, 3567 – 3602. https://www.dovepress.com/a-review-of-current-trends-with-type-2-diabetes-epidemiology-aetiology-peer-reviewed-fulltext-article-DMSO>. Accessed May 14, 2022.

Sirkanth, S., Deedwania, P.: Management of dyslipidemia in patients with hypertension, diabetes, and metabolic syndrome. *Current Hypertension Reports*, 2016. <Accessed October 31, 2022.

Simić, S., Takáč, P.: Fixné kombinácie liečiv vo farmakoterapii artériovej hypertenzie [Fixed-dose combinations in pharmacotherapy of arterial hypertension]. *Folia Pharmaceutica Cassoviensia*, 2022, 4 (2), 59 – 66.

Souček, M.: *Vnitřní lékařství* [Internal Medicine]. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2011. 805 s.

Tang, N., Ma, J., Tao, R., Chen, Z., Yang, Y., He, Q., Lv, Y., Lan, Z., Zhou, J.: The effects of the interaction between BMI and dyslipidemia on hypertension in adults. *Scientific Reports*, 2022, 12 (1), 927. <https://www.nature.com/articles/s41598-022-04968-8>. Accessed October 31, 2022.

Thompson, A., Kanamarlapudi, V.: Type 2 *diabetes mellitus* and glucagon like peptide-1 receptor signalling. *Journal of Clinical & Experimental Pharmacology*, 2013, 3 (4).

Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D. L., Coca, A., de Simone, G., Dominiczak, A., Kahan, T., Mahfoud, F., Redon, J., Ruilope, L., Zanchetti, A., Kerins, M., Kjeldsen, S. E., Kreutz, R., Laurent, S., Lip, G. Y .H., McManus, R., Narkiewicz, K., Ruschitzka, F., Schmieder, R. E., Shlyakhto, E., Tsioufis, C., Aboyans, V., Desormais, I.: 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *European Heart Journal*, 2018, 39, (33), 3021 – 3104.

Yamazaki, D., Hitomi, H., Nishyama, A.: Hypertension with *diabetes mellitus* complications. *Hypertension Research*, 2018, 41. https://www.nature.com/articles/s41440-017-0008-y. Accessed October 30, 2022.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 3: 24 – 34, 2023

SÚČASNÉ TERAPEUTICKÉ ALTERNATÍVY PREDSIEŇOVEJ FIBRILÁCIE

CURRENT THERAPEUTIC ALTERNATIVES OF ATRIAL FIBRILLATION

Rusnáková, Adriana; Maková, Zuzana

Katedra biológie a fyziológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Komenského 73, 040 81 Košice
Slovenská republika

zuzana.makova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Fibrilácia predsiení je najrozšírenejšou srdcovou arytmiou v modernej klinickej praxi. Je spojená so zvýšenou úmrtnosťou a výskytom cievnej mozgovej príhody. Incidencia predsieňovej fibrilácie stúpa a je za ňu zodpovedných niekoľko modifikovateľných a nemodifikovateľných rizikových faktorov. Presné mechanizmy a patogenéza sú stále málo známe, napriek tomu majú veľký význam pre manažment. Štúdia opisuje mechanizmus vzniku a priebehu arytmie, diagnostiku, možné vyvolávajúce príčiny a samotnú terapiu s prihliadnutím na vek, pohlavie a komorbidity. Desať klinických prípadov (päť žien, päť mužov) získaných v spolupráci s interným oddelením a kardiologickou ambulanciou v Rožňave poukazuje na konkrétny postup pri terapii tohto ochorenia. Fibrilácia predsiení sa všeobecne rozdeľuje na prvýkrát diagnostikovanú, paroxyzmálnu, perzistentnú a permanentnú. Elektrická, štrukturálna a autonómna remodelácia sú niektoré z rôznych patofyziologických mechanizmov, ktoré prispievajú k pretrvávaniu tohto ochorenia. Liečbou prvej voľby je často medikamentózna liečba buď s kontrolou frekvencie, alebo antiarytmikami na kontrolu rytmu, okrem antikoagulancií, ako je warfarín, na prevenciu cievnej mozgovej príhody u rizikových pacientov. Farmakologická terapia nie je však taká účinná ako kombinovaná terapia s elektrickou kardioverziou alebo katétrovou abláciou. Väčšina pozorovaných pacientov musela podstúpiť túto nefarmakologickú terapiu a niekedy aj viackrát. S pribúdajúcimi komorbiditami a vekom bolo náročnejšie dosiahnuť u pacientov návrat do sínusového rytmu. Ako alternatíva liečby sa objavila katétrová ablácia, ktorá zahŕňa lézie myokardiálneho tkaniva s cieľom narušiť základné spúšťače a substráty pre vznik predsieňovej fibrilácie.

Kľúčové slová: fibrilácia predsiení; katétrová ablácia; kardioverzia; sínusový rytmus

ABSTRACT

Atrial fibrillation is the most widespread cardiac arrhythmia in modern clinical practice. It is associated with increased mortality and incidence of stroke. The incidence of atrial fibrillation is increasing and several modifiable and non-modifiable risk factors are responsible for it. The exact mechanisms and pathogenesis are still poorly understood, yet they are of great importance for the management. The study describes the mechanism of the occurrence and course of arrhythmia, diagnosis, possible provoking causes and the therapy itself, taking into account age, gender and comorbidities. Ten clinical cases (five women, five men) obtained in cooperation with the internal department and the cardiology clinic in Rožňava point to a specific procedure in the therapy of this disease. Atrial fibrillation is generally divided into first diagnosed, paroxysmal, persistent and permanent. Electrical, structural, and autonomic remodeling are some of the various pathophysiological mechanisms that contribute to the persistence of this disease. First-line treatment is often medical therapy with either rate control or antiarrhythmics for rhythm control, in addition to anticoagulants such as warfarin for stroke prevention in at-risk patients. However, pharmacological therapy is not as effective as combined with electrical cardioversion or catheter ablation. Most of the observed patients had to undergo this non-pharmacological therapy and sometimes more than once. With increasing comorbidities and age, it became more difficult to achieve sinus rhythm version in patients. Catheter ablation has emerged as an alternative treatment, which involves lesions of the myocardial tissue with the aim of disrupting the basic triggers and substrates for the development of atrial fibrillation.

Key words: atrial fibrillation; catheter ablation; cardioversion; sinus rhythm

ÚVOD

Fibrilácia predsiení (FP) je najčastejšou arytmiou liečenou v klinickej praxi a je spojená so zvýšeným rizikom úmrtia, mozgovej príhody a periférnej embólie.

V súvislosti so starnutím populácie na celom svete a predlžovaním prežívania chronických ochorení stúpa výskyt a prevalencia fibrilácie predsiení, čo odôvodňuje označenie globálna epidémia. Táto multifaktoriálna arytmia sa prelína s bežnými sprievodnými kardiovaskulárnymi ochoreniami, ktoré majú spoločné klasické kardiovaskulárne rizikové faktory (Sagris a kol., 2021).

Informovanosť a lepšia detekcia fibrilácie predsiení sa za posledné desaťročie zlepšili, čo je dôležité, keďže približne jedna tretina celkovej populácie je asymptomatická. Preto je globálna záťaž určite podceňovaná. Na identifikáciu jedincov s vyšším rizikom fibrilácie predsiení a jej následkov, ako aj na implementáciu sú potrebné prístupy presnej medicíny (Kornej a kol., 2020).

Prognózy rozoberanej diagnózy sú naďalej deprimujúce a jasne poukazujú na potrebu nových prístupov, farmakologických aj nefarmakologických, na liečbu tejto bežnej arytmie.

Fibrilácia predsiení je arytmia charakterizovaná chaotickou elektrickou aktivitou v predsieni, ktorá spôsobuje asynchróniu excitácie a kontrakcie predsieňových vlákien. Takto sa organizovaná kontrakčná kapacita predsiení na plnenie komôr stráca, čo znižuje ejekciu komôr (Deb a kol., 2021).

Fibrilácia predsiení (FP) potrebuje na vznik substrát a spúšťač. Substrát predstavujú elektricky a štrukturálne zmenené predsiene (ischémia predsiení a zmena akčného potenciálu), ktoré sú potrebné na udržanie abnormálnej elektrickej aktivity a spúšťačom je väčšinou predsieňová extrasystola. K najčastejším príčinám remodelácie predsiení radíme ischemickú chorobu srdca, artériovú hypertenziu, chlopňové chyby,

dysbalanciu minerálov (hypokaliémia, hypomagneziémia), tyreotoxikózu, pľúcnu embóliu, perikarditídu, kardiomyopatiu a množstvo liekov. Remodeláciu pri FP možno rozdeliť do troch kategórií, ktoré zahŕňajú:

- elektrickú remodeláciu, ktorá zahŕňa moduláciu prúdu Ca^{2+} typu L, rôzne prúdy K^{+} a funkciu medzibunkového spojenia
- štrukturálnu remodeláciu, ktorá zahŕňa zmeny vlastností tkanív, veľkosti a ultraštruktúry
- autonómnu remodeláciu, vrátane zmenenej sympatovagálnej aktivity a hyperinervácie (Pellman a Sheikh 2015).

Niektorí ľudia si nie sú vedomí toho, že trpia fibriláciou predsení. Fibrilácia predsení sa môže zistiť pri auskultácii srdca stetoskopom počas fyzikálneho vyšetrenia z iných dôvodov. Lekár môže následne nariadiť niekoľko testov na diagnostikovanie ochorenia alebo vylúčenie iných ochorení, ktoré môžu spôsobovať podobné príznaky. Testy môžu zahŕňať:

- elektrokardiogram, ktorý je hlavným testom na diagnostiku fibrilácie predsení
- krvné testy pomáhajú lekárovi vylúčiť problémy so štítnou žľazou alebo odhaliť iné látky v krvi, ktoré môžu viesť k fibrilácii predsení
- Holterov monitor, ktorý zaznamenáva činnosť srdca nepretržite počas 24 hodín alebo dlhšie
- záznamník epizód. Toto zariadenie je podobné Holterovmu monitoru, ale zaznamenáva len v určitých časoch po dobu niekoľkých minút. Nosí sa dlhšie ako Holterov monitor, zvyčajne 30 dní. Zvyčajne sa stlačí tlačidlo, keď pacient pocíti príznaky
- echokardiogram je neinvazívny test, ktorý využíva zvukové vlny na vytvorenie obrazu veľkosti, štruktúry a pohybu srdca
- záťažový test zahŕňa vykonávanie testov na srdci počas cvičenia na bežiacom páse alebo stacionárnom bicykli
- röntgenové vyšetrenie hrudníka. Röntgenové snímky pomáhajú lekárovi zistiť stav pľúc a srdca (Mayo Clinic, 2021).

Fibrilácia predsení je veľmi heterogénna arytmia, a preto snaha o jej správnu klasifikáciu bola vždy veľkou výzvou, ale často viedla k nejednoznačným klasifikačným schémam (Hlivák a kol., 2022). V roku 2014 však nové usmernenia American College of Cardiology a American Heart Association zmenili klasifikáciu fibrilácie predsení z dvoch typov na štyri (Case-Lo, 2019):

- prvýkrát diagnostikovaná
- paroxyzmálna
- perzistujúca
- permanentná (chronická).

Prvýkrát diagnostikovaná FP je taká, ktorá doteraz nebola diagnostikovaná nezávisle od dĺžky trvania arytmie alebo prítomnosti symptómov.

Paroxyzmálna FP trvá menej ako 7 dní a ustúpi spontánne alebo po zásahu. Vo väčšine prípadov sa samovoľne ukončí do 48 hodín. Paroxyzmálnu FP možno ďalej rozdeliť na vagotonickú (25 % prípadov), adrenergnú (10 – 15 %) a napokon zmiešanú. Vagotonická FP sa vzťahuje na FP, ktorá je vyvolaná obdobiami alebo liekmi, ktoré vyvolávajú vysoký vagový tonus. Na druhej strane adrenergná FP je výsledkom období vysokého sympatického tonusu (Nayak a kol., 2020).

Perzistujúca FP bola definovaná ako FP, ktorá trvá viac ako 7 dní, vrátane epizód, ktoré sú ukončené kardioverziou, buď liekmi, alebo kardioverziou jednosmerným prúdom (Ogawa a kol., 2018). Pod perzistujúci typ radíme aj dlhodobo perzistujúcu FP a hovoríme o nej, ak sa fibrilácia nepretržite vyskytuje u pacienta dlhšie ako jeden rok (Mody a kol., 2017).

Permanentná (chronická) FP sa definuje v prípade spoločného rozhodnutia lekára a pacienta akceptovať prítomnosť FP a zastaviť ďalšie pokusy o obnovenie a/alebo udržanie sínusového rytmu. Keďže ide skôr o klinickú akceptáciu než o prirodzenú patofyziologickú vlastnosť FP, rozumie sa, že akceptácia FP sa môže meniť podľa vývoja symptómov, účinnosti intervencií a preferencií pacienta/lekára (Jones, 2018).

Tab. 1: Terapia predsieňovej fibrilácie

1. Antikoagulačná terapia	
2. Kontrola srdcovej frekvencie	
3. Kontrola srdcového rytmu:	a) elektrická kardioverzia (EKV)
3. Kontrola srdcového rytmu:	b) farmakologická kardioverzia (FKV): 4 triedy antiarytmík podľa ich spôsobu účinku (FKV): 1. blokátory sodíkových kanálov 2. β-blokátory 3. blokátory draslíkových kanálov 4. blokátory vápnikových kanálov
4. Katétrová ablácia	
5. TASK-1	

MATERIÁL A METÓDY

Štúdia bola vypracovaná pomocou domácej i zahraničnej odbornej literatúry vo forme kníh, časopisov a článkov elektronicky dostupných v internetových databázach. Pre vyhodnotenie desiatich klinických prípadov boli použité údaje získané zo zdravotnej dokumentácie pacientov na základe spolupráce s interným oddelením a kardiologickou ambulanciou v Rožňave. Všetky uvedené údaje boli spracované v súlade s platnou legislatívou Slovenskej republiky a s dodržaním etických noriem a ochrany osobných údajov.

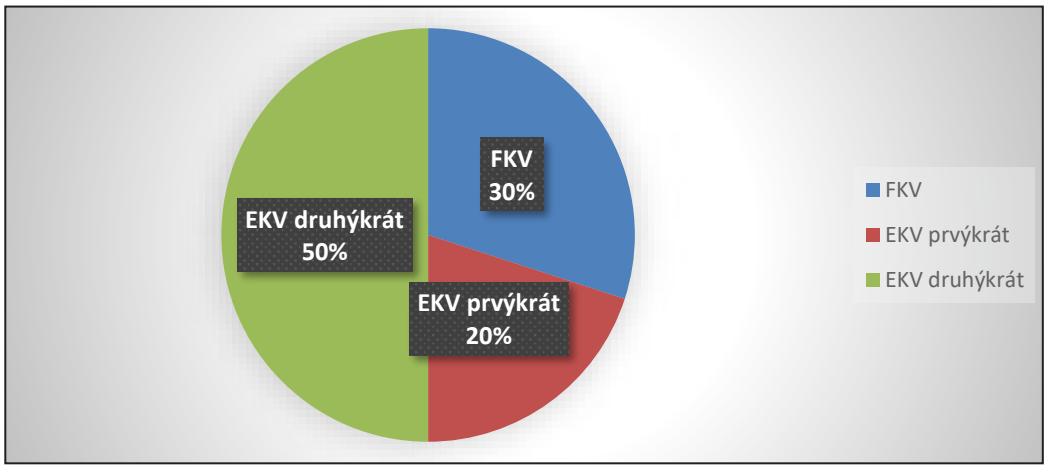
VÝSLEDKY A DISKUSIA

V terapii fibrilácie predsiení existujú dva hlavné postupy. Jedným z nich je kontrola srdcového rytmu, teda ukončenie arytmie a konverzia na sínusový rytmus. Alternatívnym postupom v terapii je kontrola srdcovej frekvencie, teda spomalenie srdcovej frekvencie. Spomalenie arytmie má za následok ústup alebo zmiernenie subjektívnych prejavov arytmie. Neoddeliteľnou súčasťou terapie je zhodnotenie rizika tromboembolizmu, predovšetkým cievnej mozgovej príhody (CMP). Najčastejšie vznikajú tromby v ušku ľavej predsiene. Preto väčšina pacientov musí byť na trvalej antikoagulačnej terapii (Mirossay a kol., 2021).

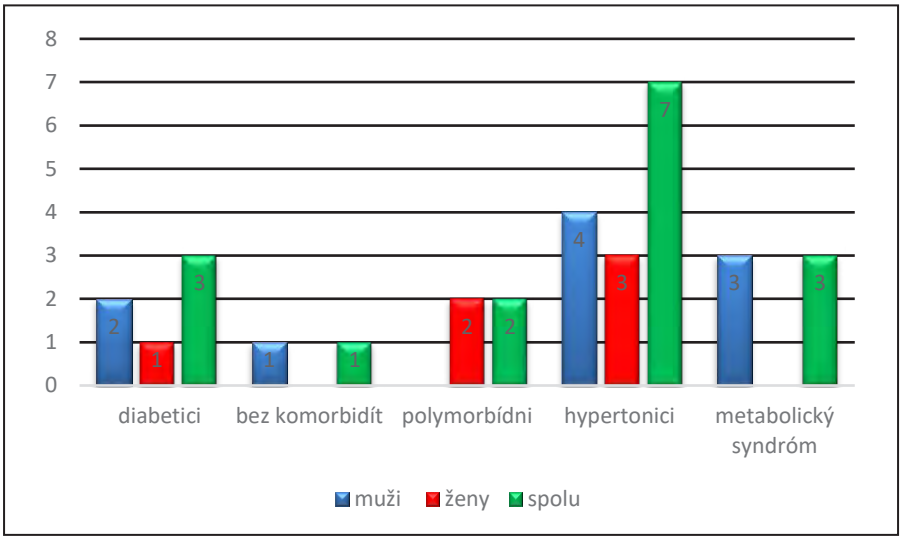
Za účelom zlepšiť efektivitu liečby a znížiť výskyt nežiaducich účinkov sa do centra pozornosti výskumu dostali základné príčiny FP, čo viedlo k rozpoznaniu tandemu P domén v slabom vnútorne rektifikujúcom K^+ kanáli (TWIK) – acidocitlivom K^+ kanáli 1 (TASK-1), ktorý je členom rodiny draslíkových kanálov s dvoma pórmi domén (K_{2p}) (Schmidt a kol., 2015). Predsieňový selektívny prúd TASK-1 hrá dôležitú úlohu v repolarizačnej fáze akčného potenciálu (Schmidt a Peyronnet, 2018). Zmeny v prúde TASK-1 vedú k zmene trvania akčného potenciálu, čo môže pomôcť udržať FP, a preto poukazujú na zapojenie TASK-1 do patofyziológie FP. Vzhľadom na jeho predsieňovo-selektívnu expresiu v ľudskom srdci, jeho up-reguláciu pri FP a jeho podiel na skrátení akčného potenciálu súvisiacom s fibriláciou predsiení predstavuje TASK-1 sľubný cieľ pre jej liečbu (Schmidt a kol., 2017). Prehľad terapie predsieňovej fibrilácie je zosumarizovaný v tabuľke 1.

Z desiatich v štúdii použitých klinických prípadov bolo päť žien a päť mužov (1. pacientka – 52-ročná hypertonička; 2. pacientka – 90-ročná, polymorbídna + tumor pľúc; 3. pacientka – 55-ročná hypertonička; 4. pacientka – 56-ročná hypertonička; 5. pacient – 51-ročný hypertonik; 6. pacient – 41-ročný hypertonik + alkokolizmus; 7. pacient – 26-ročný bez predchorobia; 8. pacient – 73-ročný hypertonik s komorbiditami; 9. pacientka – 88-ročná, polymorbídna; 10.

Graf 1: Percentuálne vyhodnotenie úspešnosti kardioverzie



Graf 2: Rozdelenie pacientov podľa najčastejších komorbidít



pacient – 58-ročný hypertonik + *diabetes mellitus* II. typu).

Graf 1 poukazuje na úspešnosť kardioverzie z predsieňovej fibrilácie na sínusový rytmus. U 30 % pacientov bola postačujúca farmakologická kardioverzia. Títo pacienti však boli diagnostikovaní novozistenou fibriláciou predsiení. Je pravdepodobné, že po čase u nich nastane recidíva dysrytmie bez účinnosti farmakologickej kardioverzie (FKV) a bude potrebné podstúpiť elektrickú kardioverziu (EKV). 20 % pacientov po neúspešnej FKV podstúpilo prvýkrát EKV, po ktorom sínusový rytmus pretrvával. 50 % pacientov podstúpilo EKV druhýkrát, pretože po prvej EKV sínusový rytmus pretrvával len určitú dobu s následnou recidívou dysrytmie.

Graf 2 znázorňuje rozdelenie pacientov z desiatich kazuistík podľa najčastejších príslušných komorbidít. Tieto ochorenia sú rizikovými faktormi pre vznik fib-

Tab. 2: Zhrnutie farmakologickej terapie vybraných pacientov

Liek	Liečivo	Počet pacientov	Komorbidity
Anopyrin 100 mg	kyselina acetylsalicylová	1	zlyhávanie srdca, benígna primárna artériová hypertenzia, aterosklerotická choroba srdca, trojcievne postihnutie, metabolický syndróm
Betaloc ZOK 25 mg	metoprolol	2	benígna primárna artériová hypertenzia, syndróm závislosti
Betaloc ZOK 50 mg	metoprolol	3	bez komorbidít, zlyhávanie srdca, benígna primárna artériová hypertenzia, aterosklerotická choroba srdca, trojcievne postihnutie, *DM* II. typu, CMP
Clexane 0,6 ml	enoxaparín	2	benígna primárna artériová hypertenzia, mitrálna insuficiencia
Cordarone 200 mg	amiodarón	1	benígna primárna artériová hypertenzia, mitrálna insuficiencia
Digoxín 0,125 mg	digoxín	2	tumor pľúc, arteriálna hypertenzia 1. stupňa, *DM* II. typu, metabolický syndróm
Eliquis 2,5 mg	apixaban	1	zlyhávanie srdca, benígna primárna artériová hypertenzia, aterosklerotická choroba srdca, trojcievne postihnutie
Fraxiparine 0,6 ml	nadroparín	3	benígna primárna artériová hypertenzia, *DM* II. typu, CMP
Furosemid 40 mg	furosemid	2	zlyhávanie srdca, benígna primárna artériová hypertenzia, aterosklerotická choroba srdca, trojcievne postihnutie, metabolický syndróm
Gopten 0,5 mg	trandolapril	1	benígna primárna artériová hypertenzia, syndróm závislosti
Kaldyum 600 mg	chlorid draselný	2	benígna primárna artériová hypertenzia, *DM* II. typu
Kalium chloratum 500 mg	chlorid draselný	1	benígna primárna artériová hypertenzia
Lusopress 20 mg	nitrendipín	1	zlyhávanie srdca, benígna primárna artériová hypertenzia, aterosklerotická choroba srdca, trojcievne postihnutie, metabolický syndróm
Metoprolol 100 mg	metoprolol	1	*DM* II. typu, metabolický syndróm
Metoprolol 50 mg	metoprolol	1	benígna primárna artériová hypertenzia, mitrálna insuficiencia
Prenessa 4 mg	perindopril	1	benígna primárna artériová hypertenzia
Prestilol 5 mg/5 mg	bisoprolol/perindopril	1	benígna primárna artériová hypertenzia
Rytmonorm SR 325 mg	propafenón	1	primárna artériová hypertenzia 2. stupňa
Tritace 5 mg	ramipril	1	zlyhávanie srdca, benígna primárna artériová hypertenzia, aterosklerotická choroba srdca, trojcievne postihnutie, metabolický syndróm
Verospiron 25 mg	spironolaktón	1	benígna primárna artériová hypertenzia, syndróm závislosti
Vidonorm 4 mg/5 mg	amlodipín/perindopril	1	primárna artériová hypertenzia 2. stupňa
Vidonorm 8 mg/10 mg	amlodipín/perindopril	1	*DM* II. typu, metabolický syndróm
Warfarin 10 mg	warfarín	1	*DM* II. typu, metabolický syndróm
Warfarin 3 mg	warfarín	1	primárna artériová hypertenzia 2. stupňa
Warfarin 5 mg	warfarín	2	benígna primárna artériová hypertenzia

rilácie predsení. To znamená, že mohli byť jej priamou vyvolávajúcou príčinou. 30 % pacientov boli diabetici, z toho 20 % mužov a 10 % žien; 10 % pacientov, a to mužov, nemalo žiadne iné ochorenie, 20 % boli polymorbidné ženy, 70 % pacientov boli hypertonici, z toho 40 % mužov a 30 % žien a metabolickým syndrómom trpelo 30 % pacientov (mužov).

Tabuľka 2 zobrazuje súhrn liečiv odporúčanej farmakologickej terapie naordinovanej interným oddelením v Rožňave. V tabuľke sa nachádza zoznam názvov liekov, ich účinných látok a počet pacientov s ich konkrétnymi komorbiditami, pri ktorých boli tieto liečivá nasadené.

Pacientka 1 je dlhodobo liečená na artériovú hypertenziu. Hypertenzia v priebehu dospelosti vedie k štrukturálnej a elektrickej remodelácii srdca, ktorá predurčuje vznik fibrilácie predsení (Ogunsua a kol., 2015). V roku 2014 bola hospitalizovaná pre bližšie neurčenú supraventrikulárnu tachykardiu, v roku 2020 sa vyvinula na novozistenú fibriláciu predsení. Pri vzniku fibrilácie predsení je mnohokrát prvým krokom liečby spomalenie frekvencie *i.v.* podaním metoprololu (Mirossay a kol., 2021). Tento postup bol realizovaný aj pri pacientke z prvého klinického prípadu, kde jej bol podaný Betaloc *i.v.* Následne pre navodenie sínusového rytmu bola zvolená elektrická kardioverzia po transezofágovej echokardiografii (TEE). Liečba fibrilácie predsení zahŕňa antikoagulačnú liečbu na minimalizáciu rizika embólie a cievnej mozgovej príhody počas elektrickej kardioverzie. Ak FP pretrváva dlhšie ako 48 hodín, odporúča sa antikoagulačná liečba počas 3 týždňov s udržiavaním medzinárodného normalizovaného pomeru (INR) > 2,0. V prípade, že sa nedosiahne aktivita predsení, liečba by sa mala predĺžiť na 4 týždne, a to aj po obnovení sínusového rytmu EKV. Kratšie trvajúca FP (< 48 hodín) sa môže alternatívne liečiť heparinizáciou a pred kardioverziou monitorovať pomocou TEE. Prípadné trombotické útvary v ušku ľavej predsiene sa dajú odhaliť pomocou TEE vyšetrenia (Sucu a kol., 2009). Keďže pacientke trvá fibrilácia predsení menej ako 48 hodín, pred EKV jej bol podaný len Fraxiparine a vykonané TEE vyšetrenie. Nevyžadovala sa dlhšia liečba antikoagulanciami pred EKV. Po prepustení bola pacientke odporúčaná liečba naďalej Fraxiparinom a Warfarinom, keďže jej CHA2DS2-VASc skóre bolo 2 (hodnotenie rizika vzniku tromboembolických komplikácií u pacientov s FP). U pacientov so skóre CHA2DS2-VASc 2 alebo vyšším sa odporúča používať warfarín alebo inhibítor faktora Xa, ako je rivaroxaban, dabigatran alebo apixaban. Ak je skóre CHA2DS2-VASc 1, antitrombotická liečba nemusí byť potrebná, ale lekár môže aj tak zvážiť použitie perorálneho antikoagulancia alebo aspirínu. Pacient so skóre CHA2DS2-VASc 0 nevyžaduje žiadnu antikoagulačnú liečbu (January a kol., 2014). Hoci antiarytmiká a ablačné terapie znižujú záťaž fibrilácie predsení a zlepšujú symptómy, neexistuje žiadny liek. To viedlo mnohých k hľadaniu „upstream" terapie (redukuje progresiu remodelácie predsení) alebo preventívnej terapie na oddialenie vzniku FP (Magnani a kol., 2011). Preto antihypertenzná liečba môže znížiť remodeláciu predsení a je sľubná ako upstream liečba FP (Ogunsua a kol., 2015). Štúdie naznačujú, že účinná liečba hypertenzie, najmä antagonistami renín-angiotenzín-aldosterónového systému (RAAS), môže znížiť pravdepodobnosť vzniku fibrilácie predsení (Manolis, 2012). Pacientka vzhľadom na tendenciu k recidívam ostáva naďalej na terapii betablokátorom (Betaloc ZOK) a na upstream liečbe perindoprilom (Prenessa). Podľa ADC databázy sa chlorid draselný používa na udržanie optimálnej koncentrácie draslíka v sére u pacientov s poruchami srdcového rytmu a zvýšenom krvnom tlaku. Z tohto dôvodu bola aj našej pacientke nasadená liečba Kaldyom.

90-ročná polymorbídna pacientka v druhom prípade trpí okrem FP hypertenziou a tumorom pľúc. Pacienti s rakovinou majú vyššie riziko fibrilácie predsení ako bežná populácia, pričom patofyziologické mechanizmy zahŕňajú prozápalový stav imunitného systému u týchto pacientov a zvýšenú zápalovú reakciu na liečbu rakoviny a operácie (Hajjar a kol., 2021). Tento jav môžeme pozorovať aj u našej pacientky, preto bola nasadená na empiricky podávanú ATB liečbu amoxicilínom (Amoksiklav). Kvôli vyso-

kému CHA2DS2-VASc skóre 4 ostáva pacientka na Fraxiparine. Liečba bola nasadená podľa prvej voľby, kontroly srdcovej frekvencie betablokátorom a digoxínom. Následne je stav pacientky uspokojujúci. Podľa ADC databázy sa chlorid draselný používa aj na doplnenie draslíka pri jeho nedostatku v organizme. Preto kvôli zistenej hypokaliémii pacientka pokračuje v liečbe Kaldyom.

V prípade pacientky 3 môžeme hovoriť o rovnakom postupe liečby, vývoji ochorenia a podmienkach ako je uvedené v prvom prípade. Pacientke bola následne nasadená antikoagulačná liečba CLEXANOM. Z dôvodu profylaxie dysrytmie a ako upstream liečba bol nasadený Prestilol. Na udržanie optimálnej koncentrácie draslíka užíva KALIUM CHLORATUM.

Pacientka 4 bola prijatá na oddelenie za účelom EKV, pretože po FKV amiodarónom sa sínusový rytmus neudržal. Pacientka trpí taktiež artériovou hypertenziou 3. stupňa. Z tohto dôvodu bol na FKV zvolený amiodarón, pretože je vhodný u pacientov s organickou chorobou srdca (Mirossay a kol., 2021). Amiodarón sa následne zvolil u pacientky aj ako dlhodobá antiarytmická liečba (Cordarone), ako bolo uvedené v jej liekovej anamnéze. Z paroxyzmálnej FP sa ochorenie počas obdobia 2 rokov vyvinulo na perzistentnú FP. Preto bola pacientka pred EKV nasadená na antikoagulačnú liečbu (CLEXANE, STADAPYRIN). Po EKV sínusový rytmus pretrváva. Pacientka naďalej ostáva na antiarytmickej liečbe Cordaronom, ako profylaxia recidívy dysrytmie bol nasadený aj metoprolol. Pacientka pokračuje v antikoagulačnej liečbe CLEXANOM do stabilizácie hodnôt INR a Warfarinom (CHA2DS2-VASc skóre 2).

Ďalším prípadom, kedy sa paroxyzmálna FP vyvinula na perzistentnú, je pacient 5, hypertonik. Pacient bol prijatý na oddelenie už druhýkrát za účelom EKV po TEE. Pacientovi bola pred zákrokom nasadená antikoagulačná liečba Warfarinom. Aj keď má pacient CHA2DS2-VASc skóre len 1 a podľa January a kol. (2014) je antikoagulačná liečba na zvážení lekára a nie je nutná, v tomto prípade ide o perzistentnú FP a antikoagulačná liečba pred a po EKV je nevyhnutná. Po EKV sínusový rytmus pretrvával a pacient ďalej pokračuje v antikoagulačnej (Warfarin) aj antiarytmickej liečbe (Rytmonorm SR). Ako upstream liečba bol nasadený Vidonorm.

Podľa článku „Alcohol consumption and the risk of incident atrial fibrillation among people with cardiovascular disease“ autorov Liang a kol. (2012) užívanie alkoholu, akútne aj chronické, sa podieľa na vzniku fibrilácie predsiení. V literatúre bol opísaný syndróm „prázdninového srdca“, ktorý sa vzťahuje na výskyt FP u pacientov po intenzívnom užívaní alkoholu. Riziko FP sa zvýšilo na 39 % u osôb, ktoré konzumovali viac ako 21 nápojov týždenne, a až na 45 % pri viac ako 35 nápojoch týždenne. Práve u pacienta 6 s hepatopatiou a hypertenziou mohol byť, okrem týchto komorbidít, vyvolávajúcou príčinou FP alkoholizmus. Bez predchádzajúcej antikoagulačnej terapie, keďže FP trvala menej ako 48 hodín, bola vykonaná EKV po TEE vyšetrení. V profylaxii recidívy dysrytmie bol nasadený Betaloc ZOK, upstream liečba sa zaviedla prostredníctvom Verospironu a Goptenu.

V článku „Atrial Fibrillation in the Young: A Neurologist's Nightmare“ autorov Aggarwal a kol. (2015) o mladých ľuďoch, pri ktorých sa objavila FP, sa opisuje klinický prípad, kedy sa u mladého 23-ročného chlapa po večernom popíjaní alkoholu objavila FP. Opakované EKG však ukázalo, že u pacienta nastala spontánna verzia na sínusový rytmus. Toto však nie je prípad nášho 26-ročného pacienta 7, ktorý mal rovnaké príznaky a laboratórne vyšetrenie preukázalo toxický účinok alkoholu. Vstupne mu bol podaný propafenón, no bez účinku. K spontánnej verzii došlo až po spomalení prevodu betablokátorom. Pri absencii akýchkoľvek štrukturálnych srdcových abnormalít a biochemických abnormalít a bez rodinnej anamnézy by bolo prijateľné považovať za spúšťač FP nadmernú konzumáciu alkoholu v deň dostavenia sa na pohotovosť. Toto tvrdenie môže platiť aj na nášho pacienta. V článku je ďalej spomínané, že antikoagulácia sa neodporúča, keďže príčina jeho FP je reverzibilná. Mal by sa zdržať veľkého množstva alkoholu, čo pravdepodobne zabráni ďalším záchvatom FP. Toto tvrdenie obhajuje aj postup terapie u nášho

pacienta, keďže antikoagulačná terapia nebola realizovaná aj kvôli CHA2DS2-VASc skóre 0. Pacient pokračuje len v terapii betablokátorom v profylaxii recidívy dysrytmie.

Fibrilácia predsiení a srdcové zlyhanie sú bežné stavy, ktoré sa často vyskytujú súčasne. Oba stavy majú spoločné rizikové faktory, sú spojené so zvýšenou chorobnosťou a úmrtnosťou a môžu zhoršovať ten druhý. Prítomnosť srdcového zlyhávania a príznakov s ním spojených môže ovplyvniť prístup k liečbe (t. j. kontrola frekvencie vs kontrola rytmu) aj možnosti liečby, ktoré sú k dispozícii pre pacientov s FP. Prítomnosť srdcového zlyhávania zvyšuje riziko mozgovej príhody pri FP a zníženie tromboembolického rizika je prvoradé. Niektorí pacienti so srdcovým zlyhávaním zle znášajú FP, a preto sa môže uprednostniť stratégia kontroly rytmu. Farmakologické možnosti kontroly komorovej reakcie na FP zahŕňajú β-blokátory, nedihydropyridínové blokátory kalciových kanálov a digoxín. Digoxín primárne spomaľuje komorovú frekvenciu zvýšením parasympatikového tonusu na atrioventrikulárny uzol (Darby, 2014).

Pacienti s *diabetes mellitus* majú o 34 % vyššie riziko vzniku fibrilácie predsiení a riziko sa zvyšuje o 3 % za každý ďalší rok od stanovenia diagnózy (Nayak a kol., 2020).

Jedným z pilierov liečby FP je antikoagulácia s cieľom minimalizovať tromboembolické komplikácie spojené s týmto ochorením. V nedávnej štúdii, v ktorej sa prehodnocovalo dávkovanie warfarínu u pacientov stratifikovaných podľa BMI, mali účastníci s vysokým BMI, najmä viac ako 40 kg/m^2, významne vyššie požiadavky na warfarín (Vyas a Lambiase, 2019).

U pacientov s vyššie uvedenými komorbiditami bola terapia FP náročnejšia. Týchto pacientov sa týkajú kazuistiky 8, 9 a 10. Pri týchto pacientoch bola antikoagulačná liečba nevyhnutná, CHA2DS2-VASc skóre mali oveľa vyššie ako ostatní pacienti. FKV bola vykonaná len na pacientke 9 metoprololom, po ktorom nastala verzia na sínusový rytmus. Pacientka v liečbe betablokátorom a antikoagulačnej liečbe pokračuje. V prípadoch 8 a 10 bolo EKV vykonané už viackrát, kvôli nálezu trombov alebo dysfunkčného predsieňového prívesku bola EKV odložená. Pacienti pokračujú v antikoagulačnej liečbe, liečbe kontroly frekvencie betablokátorom a upstream liečbe blokátormi RAAS a nitrendipínom.

ZÁVER

Terapia fibrilácie predsiení je veľmi náročná a rozmanitá. Závisí od mnohých faktorov a komorbidít. Po preskúmaní všetkých klinických prípadov sme dospeli k záveru, že terapia zvolená lekármi korešpondovala s odbornou literatúrou a štúdiami.

Fibrilácia predsiení je recidivujúce ochorenie. Nie je možné ho úplne vyliečiť, a preto mnoho pacientov podstupuje opakované terapie a ostávajú na dlhodobej antiarytmickej terapii. Samotná farmakologická terapia nie je taká účinná ako skombinovaná s elektrickou kardioverziou alebo katétrovou abláciou. Väčšina pozorovaných pacientov musela podstúpiť túto nefarmakologickú terapiu a niekedy aj viackrát. Pribúdajúcimi komorbiditami a vekom bolo náročnejšie dosiahnuť u pacientov verziu na sínusový rytmus. V terapii fibrilácie predsiení sú najpoužívanejšími liečivami betablokátory. Sú častokrát liekom prvej voľby, a taktiež sa používajú ako dlhodobá liečba v profylaxii recidívy dysrytmie.

ZOZNAM LITERATÚRY

Aggarwal, N., Selvendran, S., Raphael, C. E., Vassiliou. V.: Atrial fibrillation in the young: a neurologist's nightmare. *Neurol. Res. Int.*, 2015, 374 352. Doi: 10.1155/2015/374352.

Case-Lo, C.: A look at paroxysmal atrial fibrillation. *Healthline*, 2013. <https://www.healthline.com/health/living-with-atrial-fibrillation/paroxysmal>. Accessed March 10, 2023.

Darby, A. E.: Management of atrial fibrillation in patients with heart failure. *Journal of Atrial Fibrillation*, 2014, 7 (2), 1105. Doi: 10.4022/jafib.1105.

Deb, B., Ganesan, P., Feng, R., Narayan,

S. M.: Identifying atrial fibrillation mechanisms for personalized medicine. *J. Clin. Med.*, 2021, 10 (23), 5679.

Hajjar, L. A., Fonseca, S. M. R., Machado, T. I. V.: Atrial fibrillation and cancer. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2021. Doi: 10.3389/fcvm.2021.590768.

Hlivák, P., Hatala, R.: Klinická klasifikácia fibrilácie predsiení [Clinical classification of atrial fibrillation]. *Kardiol. Prax*, 2007, 5 (3), 140 – 145.

January, C. T., Wann, L. S., Alpert, J. S., Calkins, H., Cigarroa, J. E., Cleveland, J. C. Jr, Conti, J. B., Ellinor, P. T., Ezekowitz, M. D., Field, M. E., Murray, K. T., Sacco, R. L., Stevenson, W. G., Tchou, P. J., Tracy, C. M., Yancy, C. W: ACC/AHA Task Force Members. 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the Heart Rhythm Society. *Journal of the American College of Cardiology*, 2014, 64 (21), 60 − 76.

Jones, G., K.: Chapter 23 – Thrombosis in atrial fibrillation. In Topaz, O. (Ed.). *Cardiovascular Thrombus*. Academic Press, 2018. 337 – 354. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128126158000235>. Accessed March 8, 2023.

Kornej, J., Börschel, C., S., Benjamin, E., J., Schnabel, R., B.: Epidemiology of atrial fibrillation in the 21st Century: novel methods and new insights. *Circ. Res.*, 2020, 127 (1), 4 − 20. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316340.

Liang, Y., Mente, A., Yusuf, S., Gao, P., Sleight, P., Zhu, J., Fagard, R., Lonn, E., Teo, K., K.; ONTARGET and TRANSCEND Investigators: Alcohol consumption and the risk of incident atrial fibrillation among people with cardiovascular disease. *CMAJ Can. Med. Assoc. J.*, 2012, 184 (16), E857 – E866. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3494322/>. Accessed March 16, 2023.

Magnani, J. W., Rienstra, M., Lin, H., Sinner, M. F., Lubitz, S. A., McManus, D. D., Dupuis, J., Ellinor, P. T., Benjamin, E. J.: Atrial fibrillation: current knowledge and future directions in epidemiology and genomics. *Circulation*, 2011, 124 (18). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22042927/>. Accessed March 8, 2023.

Mahajan, R., Wong, C. X.: Obesity and metabolic syndrome in atrial fibrillation. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 2021, 13 (1), 77 – 86. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877918220301192>. Accessed December 12, 2022.

Manolis, A.: Hypertension and atrial fibrillation: diagnostic approach, prevention and treatment. Position paper of the Working Group "Hypertension Arrhythmias and Thrombosis" of the European Society of Hypertension. *Journal of hypertension*, 2012, 30, 2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22186358/>. Accessed March 11, 2023.

Mayo Clinic. Atrial fibrillation diagnosis and treatment, 2021. < https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/atrial-fibrillation/diagnosis-treatment/drc-20350630/>. Accessed March 16, 2023.

Mirossay, L., Mojžiš, J.: Základná farmakológia a farmakoterapia [Basic Pharmacology and Pharmacotherapy]. 2. vyd. Košice: EQUILIBRIA. s. r. o., 2021. 897 – 900.

Mody, B. P., Raza, A., Jacobson, J., Iwai, S., Frenkel, D., Rojas, R., Aronow, W. S.: Ablation of long-standing persistent atrial fibrillation. *Annals of Translational Medicine*, 2017, 5 (15), 305. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5555980/>. Accessed March 8, 2023.

Nayak, S., Natarajan, B., Pai, R. G.: Etiology, pathology, and classification of atrial fibrillation. *Int. J. Angiol.: Official Publication of the International College of Angiology, Inc.*, 2020, 2, 65 – 71. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7250635/>. Accessed March 2, 2023.

Ogawa, H., An, Y., Ikeda, S., Aono, Y., Doi, K., Ishii, M., Iguchi, M., Masunaga, N., Esato, M., Tsuji, H., Wada, H., Hasegawa, K., Abe, M., Lip, G. Y. H., Akao, M., Fushimi, A. F.: Registry investigators: progression from paroxysmal to sustained atrial fibrillation is associated with increased adver-

se events. *Stroke*, 2018, 49 (10), 2301 – 2308. Doi: 10.1161/STROKEAHA.118.021396.

Ogunsua, A. A., Shaikh, A. Y., Ahmed, M., McManus, D. D.: Atrial fibrillation and hypertension: mechanistic, epidemiologic, and treatment parallels. *Methodist DeBakey Cardiovasc J.*, 2015, 11 (4), 228 – 234. Doi: 10.14797/mdcj-11-4-228.

Pellman, J., Sheikh, F.: Atrial fibrillation: mechanisms, therapeutics, and future directions. *Comprehensive Physiology*, 2015, 5 (2), 649 – 665. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5240842/>. Accessed March 5, 2023.

Sagris, M., Vardas, E. P., Theofilis, P., Antonopoulos, A. S., Oikonomou, E., Tousoulis, D.: Atrial fibrillation: pathogenesis, predisposing factors, and genetics. *Int. J. Mol. Sci*., 2021, 23, 1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35008432/>. Accessed December 26, 2022.

Schmidt, C., Wiedmann, F., Zhou, X. B., Heijman, J., Voigt, N., Ratte, A., Lang, S., Kallenberger, S. M., Campana, C., Weymann, A., De Simone, R., Szabo, G., Ruhparwar, A., Kallenbach, K., Karck, M., Ehrlich, J. R., Baczkó, I., Borggrefe, M., Ravens, U., Dobrev, D., Katus, H. A., Thomas, D.: Upregulation of K(2P)3.1 K+ current causes action potential shortening in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*, 2015, 132 (2), 82 – 92.

Schmidt, C., Wiedmann, F., Zhou, X. B., Heijman, J., Voigt, N., Ratte, A., Lang, S., Kallenberger, S. M., Campana, C., Weymann, A., De Simone, R., Szabo, G., Ruhparwar, A., Kallenbach, K., Karck, M., Ehrlich, J. R., Baczkó, I., Borggrefe, M., Ravens, U., Dobrev, D., Katus, H. A., Thomas, D.: Inverse remodelling of K2P3.1 K+ channel expression and action potential duration in left ventricular dysfunction and atrial fibrillation: implications for patient-specific antiarrhythmic drug therapy. *Eur Heart J.*, 2017, 38 (22), 1764 − 1774.

Schmidt, C., Peyronnet, R.: *Voltage-gated and stretch-activated potassium channels in the human heart*, 2018. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00399-017-0541-z>. Accessed March 15, 2023.

Sucu, M., Davutoglu, V., Ozer, O.: Electrical cardioversion. *Annals of Saudi Medicine*, 2009, 29 (3), 201. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2813644/>. Accessed March 5, 2023.

Vyas, V., Lambiase, P.: Obesity and atrial fibrillation: epidemiology, pathophysiology and novel therapeutic opportunities. *Arrhythmia & Electrophysiology Review*, 2019, 8 (1), 28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6434511/>. March 20, 2023.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 3: 35 – 49, 2023

TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL FINGOLIMODU V PROTINÁDOROVEJ LIEČBE (PREHĽADOVÝ ČLÁNOK)

THERAPEUTIC POTENTIAL OF FINGOLIMOD IN ANTICANCER TREATMENT (REVIEW ARTICLE)

Macejová, Alexandra; Nosálová, Natália; Majirská, Monika; Bago Pilátová, Martina

Ústav farmakológie
Lekárska fakulta Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
Trieda SNP 1, 040 11 Košice
Slovenská republika

martina.pilatova@upjs.sk

ABSTRAKT

Fingolimod (FTY720) je klinicky schválené liečivo na imunomodulačnú terapiu sklerózy multiplex, ktoré zadržiava T-lymfocyty v lymfatických uzlinách pomocou funkčného antagonizmu receptora pre sfingozín-1-fosfát (S1P). S1P je biologicky aktívny sfingolipid, ktorý v cicavčích bunkách reguluje bunkový rast, prežitie a migráciu buniek intracelulárne alebo prostredníctvom receptorov. S1P je označovaný ako lipid podporujúci prežívanie, pretože v nádorových tkanivách podporuje transformáciu nádorových buniek, proliferáciu či neovaskularizáciu. Moduláciou sfingolipidového metabolizmu FTY720 ukazuje antiproliferatívnu aktivitu vo viacerých *in vitro* a *in vivo* modeloch nádorových ochorení. Potenciálnym mechanizmom je inhibícia sfingozínkinázy, ktorá je zodpovedná za tvorbu S1P, a modulácia receptorov pre S1P. Okrem účinkov na SK1 (sfingozínkináza 1) a S1PR (receptory S1P), FTY720 ovplyvňuje aj rôzne signálne dráhy zapojené v apoptóze, autofágii, či ferroptóze. Komplexný mechanizmus antiproliferatívneho pôsobenia FTY720 ešte nie je úplne objasnený a je nutné overiť ho v ďalších predklinických a klinických štúdiách.

Kľúčové slová: fingolimod; FTY720; proliferácia; sfingozín-1-fosfát

ABSTRACT

Fingolimod (FTY720) is clinically approved substance used for immunomodulatory therapy of sclerosis multiplex that sequesters T-lymphocytes to lymph nodes trought antagonism of sphingosine-1-phosphate receptor. Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a biologically active sphingolipid, which regulates growth, survival and migration throuht intracellular and receptor-mediated me-

chanism in mammalian cells. S1P is reffered to be as a survival promoting lipid because it promotes transformation of cancer cells, proliferation and neovascularisation. FTY720 also demonstrates antiproliferative activity in various *in vitro* and *in vivo* cancer models by modulation of sphingolipid metabolism. Potential mechanism is inhibiton of sphingosine kinase, enzyme responsible for generation of S1P, and modulation of S1P receptors. In addition to the effects on SK1 (sphingosine kinase 1) and S1PR (sphingosine-1-phosphate receptors), FTY720 also affects various signaling pathways involved in apoptosis, autophagy, or ferroptosis. The complex mechanism of the antiproliferative effect of FTY720 is not yet fully understood and it is necessary to verify it in further preclinical and clinical studies.

Key words: fingolimod; FTY720; proliferation; sphingosine-1-phosphate

ÚVOD

Sfingolipidy v eukaryotických bunkách zohrávajú dôležitú úlohu jednak ako štrukturálne komponenty bunkovej membrány, ale aj ako aktivátory/inhibítory receptorov, proteínkináz, fosfatáz či iónových transportérov. Tieto bioaktívne sfingolipidy sú kľúčovými regulátormi v bunkových procesoch ako je proliferácia, migrácia, apoptóza, autofágia či senescencia (Hannun a Obeid, 2008; Hannun a Obeid, 2018).

Najväčšia pozornosť je zameraná na dva sfingolipidy s odlišnými vlastnosťami, a to ceramid a sfingozín-1-fosfát (S1P). Ceramid je spájaný s antiproliferatívnou aktivitou – blokádou bunkového cyklu a apoptózou a je označovaný ako tumor supresorový lipid. Na druhej strane, S1P má prokancerogénne vlastnosti a podporuje proliferáciu a prežívanie buniek. Ich protichodná povaha a dynamická rovnováha môžu byť kľúčové pre stanovenie osudu bunky (Saddoughi a kol., 2008).

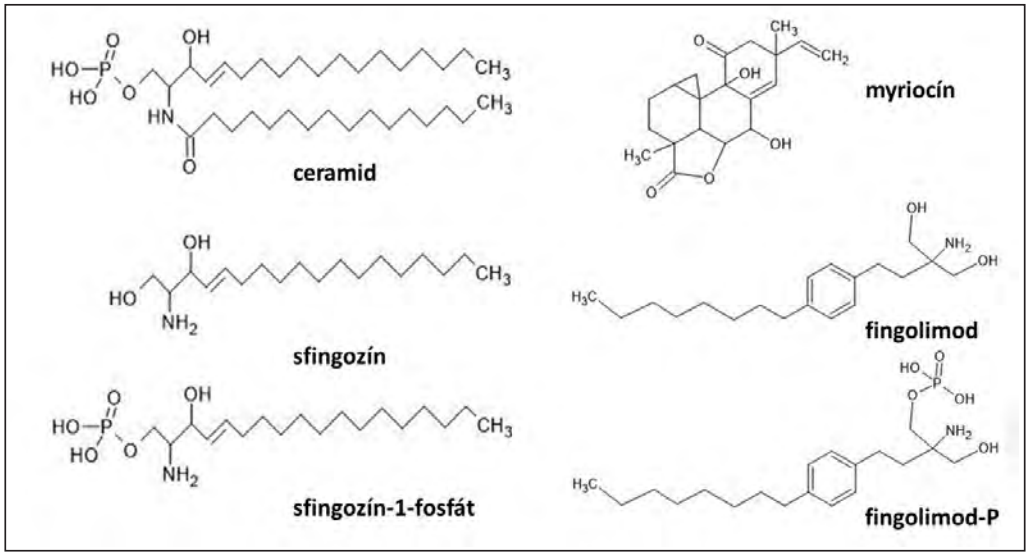
Sfingozín, štrukturálna podjednotka ceramidu, taktiež pôsobí ako negatívny regulátor proliferácie buniek a indukuje apoptózu. Jeho fosforyláciou vzniká S1P, čím sa znižuje jeho proapoptotická aktivita. Na druhej strane defosforyláciou S1P sa vytvára sfingozín (Cuvillier, 2002) (viď obr. 1). Sfingozín a ďalšie sfingoidné bázy pôsobia inhibične na proliferáciu buniek a majú cytotoxický účinok na mnohé nádorové línie (Sweeny a kol., 1996; Čonková a kol., 2019; Gonda a kol., 2019; Jacková a kol., 2020). Ich efektívnosť je však limitovaná fosforyláciou sfingozínkinázou (SK), ktorá pôsobí ako onkogén, pretože katalyzuje tvorbu S1P (Bergelin a kol., 2009). Ukázalo sa, že SK1 je vysoko exprimovaná v rôznych druhoch nádorov (Li a kol., 2009; Cai a kol., 2017; Wang a Wu, 2018; Li a kol., 2022) a klinické štúdie uvádzajú, že hladiny SK a S1P sú spojené s prežívaním pacientov a metastázovaním nádorového ochorenia (Kawakita a kol., 2017; Wang a kol., 2019; Li a kol., 2022). Práve preto je výskum zameraný na hľadanie nových molekúl alebo analógov sfingoidných báz, ktoré podporujú tvorbu ceramidov a inhibujú ich konverziu na S1P alebo jeho samotné pôsobenie. Fingolimod je štruktúrny analóg sfingozínu, ktorý je zavedený do klinickej praxe ako liečivo na terapiu sklerózy multiplex (Chun a Hartung, 2010). Okrem svojho imunosupresívneho účinku bol pozorovaný aj jeho vplyv na sfingolipidový metabolizmus v nádorových bunkách, a preto je predmetom ďalšieho záujmu v danej oblasti.

Tento prehľadový článok sumarizuje možné mechanizmy antiproliferatívneho účinku fingolimodu v *in vitro* a *in vivo* podmienkach.

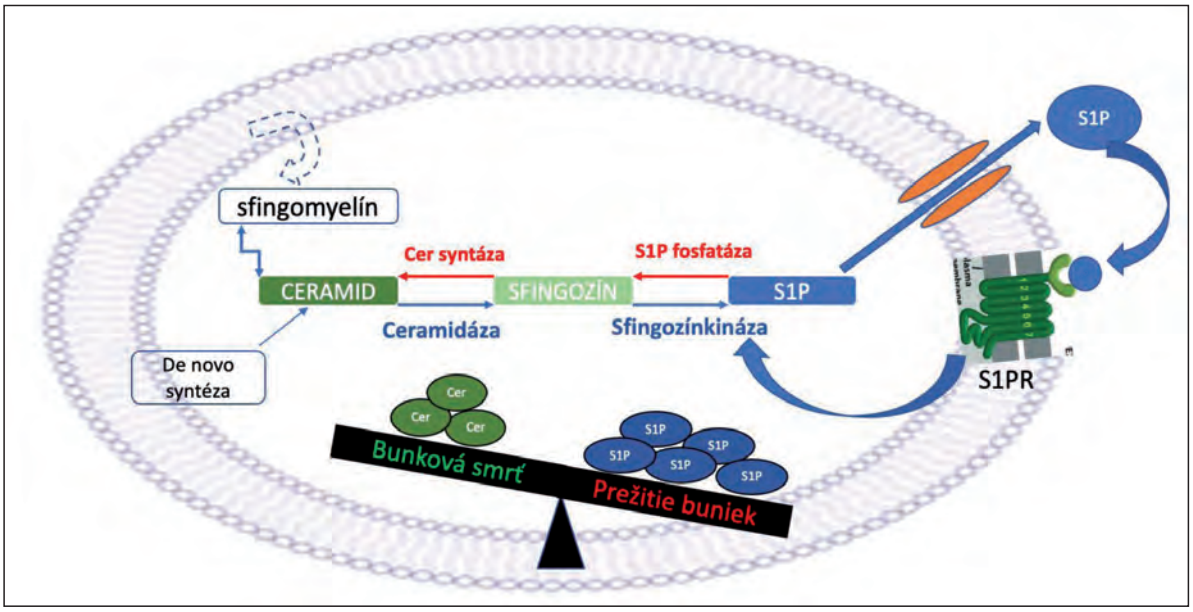
Metabolizmus sfingolipidov

V priebehu posledných desaťročí boli identifikované signálne metabolity a enzýmy sfingolipidového metabolizmu, ktorých zmenená expresia alebo aktivita zohráva kľúčovú úlohu v regulácii progresie nádorového ochorenia (Ogretmen, 2018). Za centrálnu molekulu sfingolipidového metabolizmu sa považuje ceramid, ktorý je súčasťou biosyntézy aj katabolizmu sfingolipidov (Hannun a Obeid, 2008).

Obr. 1: Chemická štruktúra ceramidu, sfingozínu, sfingozín-1-fosfátu (S1P), myriocínu, fingolimodu a fingolimodu-P



Obr. 2: Základný metabolizmus sfingolipidov/sfingolipidový reostat



Syntéza ceramidu prebieha prostredníctvom *de novo* syntézy alebo hydrolytickou cestou zo sfingomyelínu. Následne je metabolizovaná na proapoptotický sfingozín, ktorý môže byť konvertovaný na S1P s proliferatívnymi vlastnosťami. Rovnováha medzi metabolitmi určuje osud bunky a je označovaná ako „sfingolipidový reostat“.

Štiepením proapoptotickej centrálnej molekuly – ceramidu vzniká sfingozín s proapoptotickými vlastnosťami, ktorý je fosforylovaný sfingozínkinázami (SK) na antiapoptotický sfingozín-1-fosfát (S1P) (viď obr. 1) (Morad a Cabot, 2013). Dynamická rovnováha medzi signalizáciou ceramidu/sfingozínu a S1P je označovaná termínom „sfingolipidový reostat“, ktorý charakterizuje antagonistické úlohy sfingolipidov v rámci bunky a diktuje buď apoptotický osud alebo prežitie buniek (Cuvillier a kol., 1996). V zdravých

bunkách ceramid a sfingozín udržiavajú fyziologický apoptotický systém a diferenciáciu buniek. S1P signalizácia podporuje proliferáciu a migráciu buniek ako aj angiogenézu. Samotný sfingolipid S1P je signálna molekula slúžiaca ako ligand pre skupinu S1P receptorov (S1PR) na povrchu buniek. Vzhľadom na svoje viaceré biologické funkcie sa S1P podieľa na rôznych fyziologických, ale aj patologických stavoch, ako je zápal či nádorové ochorenia (Hait a Maiti, 2017; Wang a kol., 2019).

K ovplyvňovaniu procesov zápalu, tumorigenézy či neovaskularizácie dochádza na viacerých úrovniach, ktoré zahŕňajú nielen S1P receptory, ale aj sfingozínkinázy, S1P fosfatázy a S1P lyázu. Intracelulárne hladiny ceramidov a S1P sa menia vzhľadom na pôsobenie extracelulárnych stimulov, ktoré môžu ovplyvňovať aktivitu enzýmov zapojených do metabolizmu sfingolipidov (Luberto a Hannun, 1999; Pyne a Pyne, 2010) (viď obr. 2). Zvýšenie aktivity jedného enzýmu môže viesť k akumulácii ceramidu a sfingozínu alebo naopak k produkcii S1P. Poznatok, že sfingolipidový reostat koordinuje hladiny týchto sfingolipidových metabolitov a kontroluje tak osud bunky, vyplynul z inhibície SK (enzým katalyzujúci syntézu S1P). Inhibícia tohto enzýmu viedla k zníženému množstvu S1P, k zvýšenej hladine ceramidu a následnej bunkovej smrti. V dôsledku toho je pravdepodobné, že SK predstavuje kľúčový cieľový proteín, keďže znižuje koncentráciu ceramidov a sfingozínu v bunke (Newton a kol., 2015).

Za syntézu S1P u ľudí sú zodpovedné dve príbuzné sfingozínkinázy: SK1 a SK2, ktoré vykazujú rôznu lokalizáciu a katalytickú aktivitu, z čoho vyplývajú aj ich odlišné fyziologické úlohy. SK1 je cytozolový proteín, ktorý môže byť súčasťou endocytovej transmembránovej siete (Lima a kol., 2017). SK2 sa nachádza hlavne v jadre a sčasti v mitochondriách mnohých buniek (Strub a kol., 2011). Ďalšia charakterizácia bunkových účinkov SK odhalila, že izoformy SK1 a SK2 odlišne regulujú bunkový osud. Zatiaľ čo aktivita SK1 je spojená s mitogénnymi a antiapoptotickými účinkami a je označovaná ako onkogén, ktorý je upregulovaný pri mnohých nádorových ochoreniach, zvýšená hladina SK2 podporuje bunkovú smrť (Min a kol., 2007). Intracelulárny S1P môže byť exportovaný niekoľkými transportérmi, ako sú ATP-viažuce kazetové transportéry ABCA1, ABCC1, ABCG2 a Spinster 2 (Spns2). *ABCC1* a *ABCG2* transportéry boli pôvodne identifikované ako multirezistentné gény a korelujú s horšou prognózou pri nádoroch prsníka (Huang a kol., 2013). Bunkovo-špecifická expresia rôznych S1PR určuje široký rozsah biologických funkcií sprostredkovaných S1P. Zvýšená akumulácia extracelulárneho S1P vedie k spusteniu signálnych kaskád, ktoré sprostredkúvajú prežívanie buniek hlavne väzbou S1P na S1P receptory 1-5 (S1PR), ovplyvňované parakrínne a autokrínne (Ponnusamy a kol., 2010). S1PR1-5 sú receptory spriahnuté s G proteínom, regulujúce viaceré signálne dráhy ako Akt/mTOR (Igarashi a kol., 2001); NF-κB (Siehler a kol., 2001) a MAPK (Zondag a kol., 1998); spojené s prežívaním bunky. V mnohých štúdiách bolo potvrdené, že signálne dráhy SK/S1P v rôznych nádorových tkanivách podporujú ich proliferáciu a tvorbu metastáz. Nadmerná syntéza SK/S1P je spájaná s rezistenciou na chemoterapiu, rádioterapiu alebo hormonálnu terapiu v nádorových bunkách prsníka, prostaty, mnohopočetného myelómu či pankreasu (Pyne a Pyne, 2010; Nagahashi a kol., 2016). Na základe týchto zistení je signalizácia SK/S1P považovaná za potenciálny cieľ v ďalších stratégiách liečby nádorových ochorení. V nádorových bunkách nerovnováha signálnych sfingolipidov vedie k zvýšenej S1P signalizácii a následnej indukcii transformácie a rastu nádorových buniek, alebo úniku pred ceramidom indukovanou apoptózou (Spiegel a Milstien, 2003). Tieto sfingolipidy s protichodnými úlohami môžu byť v rámci bunky navzájom konvertované, čo naznačuje, že rovnováha medzi nimi je dôležitým ukazovateľom jej osudu (Furuya a kol., 2011).

Mechanizmus imunomodulačného účinku

Fingolimod (2-amino-2-[2-(4-octylfenyl) etyl]propán diolhydrochlorid); FTY720) je neselektívny modulátor receptora sfingozín 1-fosfátu (S1PR) schválený FDA (2010) a EMA (2011), ktorý bol uvedený

do klinickej praxe ako prvé perorálne imunomodulačné liečivo modifikujúce ochorenie (DMD – disease modifying drug) schválené na liečbu primárne a sekundárne progresívnej a relabujúcej-remitujúcej roztrúsenej sklerózy (Lubin a kol., 2014; Chiba, 2020). Ide o štrukturálny analóg sfingozínu vyvinutý z fungálneho metabolitu myriocínu (Fujita a kol., 1994); ktorý je pomocou sfingozínkinázy 2 (SK2, sphingosine kinase 2) a s menšou mierou sfingozínkinázy 1 (SK1, sphingosine kinase 1) fosforylovaný na fingolimod-P (viď obr. 1). Fingolimod-P sa viaže s vysokou afinitou na receptorové podtypy S1PR1, S1PR3, S1PR4 a S1PR5 a má vyššiu účinnosť ako S1P (Pournajaf a kol., 2022). Po väzbe fingolimodu-P alebo S1P na S1PR sú tieto receptory internalizované, disociované v endozómoch a potom recyklované späť do bunkovej membrány, okrem S1PR1. Fingolimod-P má vysokú afinitu k receptoru S1PR1. S1PR1 je ireverzibilne downregulovaný fingolimodom-P (lyáza S1P katabolizuje S1P, ale nie fingolimod-P) s následnou trvalou desenzibilizáciou na sérový S1P, čo na bunkovej úrovni vedie k funkčnému antagonizmu. Imunomodulácia prostredníctvom funkčného antagonizmu receptora S1PR1 vedie k sekvestrácii lymfocytov v sekundárnych lymfatických orgánoch, čím sa znižuje ich infiltrácia do mozgu a spomaľuje sa tak progresia ochorenia (Chun a Hartung, 2010; Estrada-Bernal a kol., 2012; Tintore a kol., 2019; Pournajaf a kol., 2022). Uvádza sa, že prítomnosť fenylénovej skupiny v bočnom reťazci FTY720 je zodpovedná za imunosupresívnu aktivitu (Chiba a kol., 1998).

Okrem jeho priaznivého účinku v liečbe sklerózy multiplex sa tento imunomodulátor používa v kombinovanej liečbe s inými imunosupresívami na profylaxiu akútnej rejekcie po transplantácii solídneho orgánu a rovnako bol popísaný jeho potenciál v liečbe nádorových ochorení (www.ema.europa.eu).

Mechanizmy antiproliferatívneho pôsobenia fingolimodu

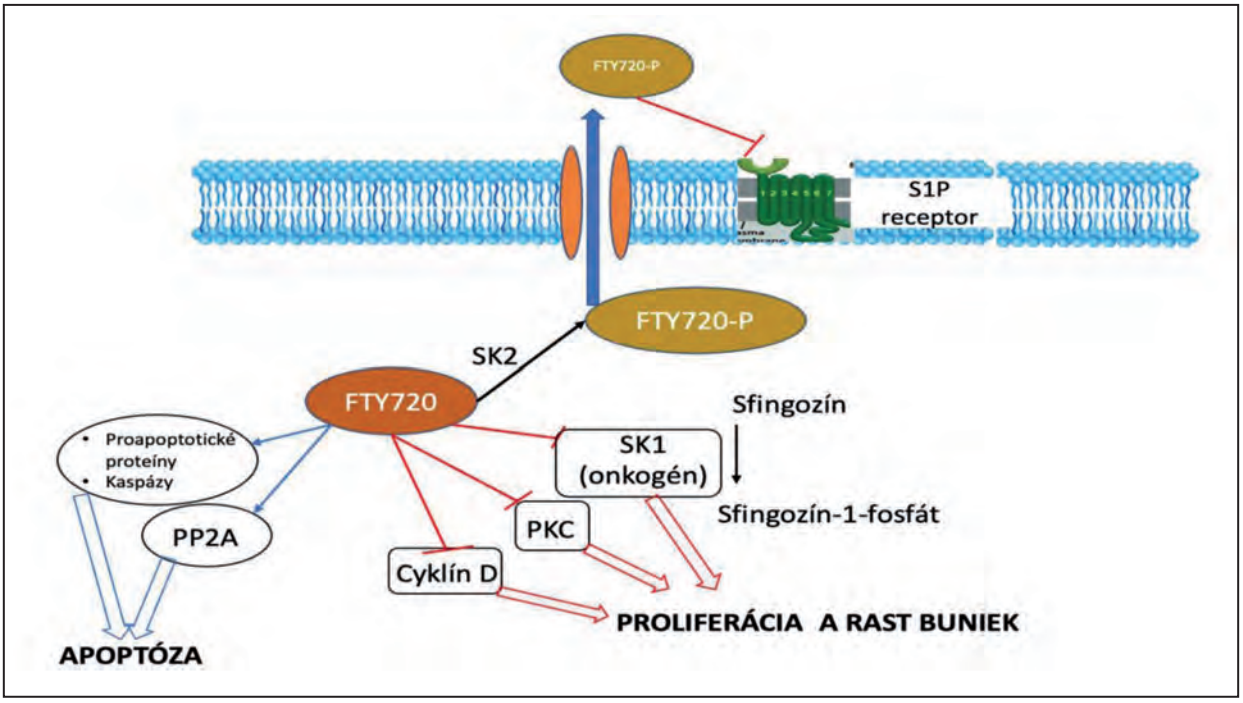
V súčasnosti už existuje množstvo dôkazov o aberantnej signalizácii sfingozín 1-fosfátu (S1P) v mnohých typoch nádorových ochorení. Funkcia S1P a SK pri nádorových ochoreniach je komplexná a je ovplyvnená typom bunky, expresiou receptora, subcelulárnou lokalizáciou a nádorovým mikrosprostredím (Pyne a Pyne, 2010). Nádorové bunky sa môžu prispôsobiť tak intracelulárnemu pôsobeniu sfingolipidu S1P, ako aj „inside-out“ S1P signalizácii, aby podporili ich prežitie a metastázy. S1P môže pôsobiť na intracelulárne ciele, ako sú HDAC a NF-KB, aby podporil progresiu nádorov. Zistilo sa, že S1P interaguje s telomerázovou reverznou transkriptázou (hTERT), stabilizuje telomerázy a podporuje tak progresiu a rast nádorov (Panneer a kol., 2015). Zvýšená hladina S1P bola pozorovaná aj v plazme obéznych ľudí (Kowalski a kol., 2013); čo viedlo k štúdii zameranej na sledovanie zapojenia S1P signalizácie s možným využitím fingolimodu v karcinóme prsníka spojenom s obezitou. Liečba fingolimodom potlačila infiltráciu prozápalových cytokínov (interleukín 6, tumor nekrotizujúci faktor α) a aktiváciu signálnych dráh modulovaných S1P, čím sa zabránilo tvorbe metastatických ložísk v pľúcach. Z toho vyplýva, že FTY720 znižuje rozvoj zápalu, ktorý je spojený s obezitou, S1P/S1PR signalizáciu a následnú kolonizáciu buniek, ktoré sú zodpovedné za tvorbu metastáz (Nagahashi a kol., 2018). V predklinických štúdiách fingolimod preukázal účinnosť na viacerých *in vitro* a *in vivo* modeloch kolorektálneho karcinómu (Rosa a kol., 2013); hepatocelulárneho karcinómu (Ho a kol., 2005) a karcinómu prostaty (Pchejetski a kol., 2010); čo by mohlo taktiež naznačovať potenciálnu terapeutickú úlohu fingolimodu v liečbe nádorových ochorení. Vysoká expresia SK1 bola preukázaná pri niekoľkých ľudských nádoroch vrátane mozgu, prsníka, hrubého čreva, pľúc, vaječníkov, žalúdka, maternice, obličiek, konečníka a tenkého čreva. Zvýšená expresia SK1 v niekoľkých štúdiách korelovala so zvýšeným stupňom nádoru a čo je dôležité, so zníženým prežitím pacienta. Medzi ďalšie intenzívne študované účinky FTY720 patrí nielen priama inhibícia SK1, či jej downregulácia, ktorá nie je závislá od fosforylácie fingolimodu, ale aj jej degradácia pomocou ubikvitín-proteazómovej cesty. Tento účinok by mohol byť sprostredkovaný akumuláciou ceramidu a

následnou aktiváciou proteazómu vyvolanou ceramidom (White a kol., 2016). Antiproliferatívny účinok FTY720 bol pozorovaný závisle, ako aj nezávisle od S1P/SK signalizácie (viď obr. 3). Ukázalo sa, že heterogenita odpovedí na fingolimod zahŕňa zvýšenú bunkovú smrť, zníženú bunkovú proliferáciu, angiogenézu, migráciu, inváziu, metastázy a zápal (White a kol., 2016). Okrem účinkov na SK1 a S1PR, FTY720 indukuje mitochondriálnu dráhu apoptózy prostredníctvom permeabilizácie membrány, aktivácie kaspáz a regulácie proteínov spojených s apoptózou (Nagahara a kol., 2000).

Bunkový cyklus a apoptóza

Schopnosť fingolimodu indukovať vnútornú (kaspázovo a mitochondriálne závislú) ako aj vonkajšiu apoptózu, je sprostredkovaná viacerými signálnymi dráhami bunkovej smrti. V *in vitro* a *in vivo* štúdiách FTY720 indukoval apoptózu a zastavenie bunkového cyklu (BC) v nádorových bunkách prostaty (Pchejetski a kol., 2010); prsníka (Lim a kol., 2011); pľúc (Lucas da Silva a kol., 2008); pečene (Ng a kol., 2007); obličky (Ubai a kol., 2007); žalúdka (Zheng a kol., 2010); pankreasu (Shen a kol., 2007) a vaječníkov (Zhang a kol., 2010). V *in vitro* experimentoch sa ukázalo, že inhibícia SK1 pomocou FTY720 vedie k apoptóze nádorových buniek prostaty a zníženiu expresie androgénneho receptora (Hla a Brinkmann, 2011). V bunkách mnohopočetného myelómu FTY720 podporuje aktiváciu kaspázy 3, 8, 9, štiepenie Bax (proaptotický proteín) a uvoľnenie cytochrómu c a Smac/DIABLO z mitochondrií do cytozólu (Yasui a kol., 2005). Apoptóza indukovaná fingolimodom bola inhibovaná nadmernou expresiou Bcl-2 proteínov v bunkovej línii Jurkat, ale to nezabránilo zablokovaniu bunkového cyklu (BC). To naznačuje, že FTY720 pôsobí nezávislými mechanizmami na apoptózu a BC (Nagahara a kol., 2001). FTY720 významne indukoval G0/G1 blokádu BC a apoptózu v bunkových líniach Jurkat (bunky lymfoblastovej akútnej leukémie) a HL-60 (bunky promyelocytovej leukémie) prostredníctvom ovplyvnenia permeability mitochondriálnej membrány a uvoľňovania cytochrómu c (Nagahara a kol., 2001; Liu a kol., 2008). V nádorových bunkách prostaty vystavených pôsobeniu FTY720 bola indukovaná zástava v G1 fáze BC prostredníctvom inhibície cyklín dependentných kináz 2/4 a zvýšenej hladiny p21, s následnou bunkovou smrťou mitochondriálnou cestou (Permpongkosol a kol., 2002). Liu Q. a kol. (2010) pozorovali po inkubácii bunkových línií ako aj primárnych buniek lymfómu z plášťovej zóny (MCL) s fingolimodom akumuláciu buniek v G0/G1 a G2/M fáze BC so súčasným poklesom vstupu buniek do S fázy, spojeným s časovo závislou down-reguláciou cyklínu D, modulácoiu p--Akt a indukciou fosforylácie Erk1/2. Taktiež pozorovali schopnosť fingolimodu indukovať apoptózu nezávisle od kaspáz, sprostredkovanú produkciou ROS (reactive oxygen species, reaktívnych foriem kyslika), ktorá viedla k upregulácii proapoptotického Bax. FTY720 v nefosforylovanej forme pôsobí ako reaktivátor proteín fosfotázy 2A (PP2A) (Roberts a kol., 2010); ktorá je považovaná za tumor supresorový proteín aktivovaný ceramidom a jeho hladina je znížená v mnohých typoch nádorových tkanív (Perrotti a Neviani, 2013). Pravdepodobne vplyvom fingolimodu dochádza k narušeniu interakcie PP2A so SET (endogénny inhibítor PP2A). Väzba fingolimodu indukuje chemické zmeny na N-terminálnych zvyškoch SET, čím sa SET stáva nedostupným pre dimerizáciu alebo oligomerizáciu. Väzba fingolimodu nakoniec oddeľuje SET od PP2A, čo vedie k aktivácii PP2A (De Palma a kol., 2019). Fingolimod tiež znižuje inhibíciu PP2A akumuláciou SET v jadre, čo umožňuje PP2A obnoviť svoju aktivitu v cytoplazme (Pippa a kol., 2014). FTY20-sprostredkovaná reaktivácia PP2A indukuje od kaspáz závislú apoptózu, moduluje Akt a ERK1/2 signalizáciu, čím zhoršuje proliferáciu a klonogénny potenciál buniek kolorektálneho karcinómu (Cristóbal a kol., 2014). Liu Q. a kol. (2010) pozorovali po inkubácii bunkových línií ako aj primárnych buniek lymfómu z plášťovej zóny (MCL) s fingolimodom jeho schopnosť indukovať apoptózu nezávisle od kaspáz sprostredkovanú produkciou ROS (reaktívnych foriem kyslika), ktorá viedla k upregulácii proapototického Bax.

Obr. 3: Mechanizmus pôsobenia FTY720



FTY720 je fosforylovaný sfingozínkinázou 2 (SK2) a vo fosforylovanej forme moduluje receptory pre S1P. FTY720 intracelulárne inhibuje sfingozínkinázu 1 (SK1), ktorá je zodpovedná za tvorbu S1P; proteínkinázu C (PKC) a cyklín D, ktoré sú zapojené v proliferácii a raste buniek. Na druhej strane indukuje mitochondriálnu cestu apoptózy prostredníctvom reaktivácie proteínovej fosfatázy 2A a aktivácie proapoptotických proteínov a kaspáz.

Autofágia

Autofágia môže pôsobiť buď ako proces vedúci k bunkovej smrti alebo k prežitiu a je špecifická pre tkanivo aj mikroprostredie. Touto jej duálnou úlohou pri regulácii bunkovej smrti sa vysvetľuje prežívanie nádorových buniek po chemoterapeutickej liečbe (Shen a kol., 2012). Ide o viacstupňový katabolický proces zahŕňajúci iniciáciu autofagozómu (fagofor), nukleáciu a predlžovanie vezikúl, fúziu vezikúl s lyzozómami, tvorbu autofagolyzozómu a degradáciu cytoplazmatického materiálu (Sentelle a kol., 2012). Práce zaoberajúce sa úlohou FTY720 v autofágii vo vzťahu k nádorovým ochoreniam sú kontroverzné. Fingolimod v bunkách mnohopočetného myelómu U266 indukoval programovanú bunkovú smrť apoptózou a autofágiou spojenú s reaktívnymi druhmi kyslíka (ROS), ktoré regulujú oba tieto procesy (Li a kol., 2013). Avšak indukcia autofágie nie je vždy prospešná, pretože napríklad v bunkových nádorových líniách vaječníkov citlivých verzus rezistentných na cisplatinu bola indukcia autofágie pomocou FTY720 antagonistická voči apoptóze sprostredkovanej cisplatinou (Zhang a kol., 2013). Li J. a kol. (2016) popísali, že u buniek kolorektálneho karcinómu vystavených pôsobeniu fingolimodu sa objavili autofágické znaky, ako je tvorba autofagozómov a akumulácia ľahkého reťazca 3 (LC3)-II, čo naznačuje účasť autofágie na cytotoxicite FTY720, ako aj možnú ochrannú úlohu autofágie proti vlastnému cytotoxickému účinku liečiva. Ochranná autofágia bola inhibovaná nádorovým inhibítorom PP2A (CIP2A), endogénnym inhibítorom PP2A, ktorý úzko súvisí so zlou prognózou a rezistenciou voči liečivám. Na stanovenie miery autofágickej degradácie sa v experimentálnych podmienkach využíva meranie autofágického toku, pri ktorom sa hodnotí rýchlosť vzniku autofagozómového markera LC3-II. V štúdii zaoberajúcej sa vplyvom kombinácie FTY720 a γ-žiarenia

na bunky mammárneho karcinómu bola pozorovaná akumulácia autofagozómov pravdepodobne v dôsledku blokovania autofágického toku. Analýza konverzie LC3-I na LC3-II, ktorý je markerom degradácie autofagozómov ukázala zvýšenú konverziu z LC3--I na LC3-II po kombinovanej liečbe s ožarovaním. Toto zistenie naznačuje, že kombinovaná liečba s FTY720 a ožarovaním pravdepodobne blokuje autofágické procesy prepínajúce programovanú bunkovú smrť smerom k apoptóze (Marvasco a kol., 2014).

Ferroptóza

Ferroptóza je typ bunkovej smrti závislý od peroxidácie lipidov, ktorý sa líši od klasickej programovanej bunkovej smrti z hľadiska morfológie, fyziológie a biochémie. Môže byť pozorovaná pri rádioterapii, chemoterapii a nádorovej imunoterapii. Jej dysregulácia je pozorovaná pri nádorových ochoreniach a uvádza sa, že aktivácia ferroptózy môže byť potenciálnou stratégiou na prekonanie mechanizmu liekovej rezistencie pri tradičnej liečbe týchto ochorení (Zhao a kol., 2022). Pre feroptózu je nevyhnutná akumulácia peroxidácie lipidov regulovaná rôznymi redoxnými systémami v bunkách. Najrozšírenejším bunkovým antioxidantom je glutatión, ktorý je zložený z troch aminokyselín – cysteínu, glutamátu a glycínu. Cysteín, ktorý je označovaný za rýchlosť určujúci prekurzor syntézy glutatiónu, vzniká redukčnou reakciou z cystínu, ktorý je z extracelulárneho priestoru importovaný do bunky pomocou transportného systému aniónových aminokyselín SLC7A11, pričom ten je vysoko špecifický pre cysteín a glutamát. Inhibícia SLC7A11 vedie k inaktivácii onkogénnej dráhy, zahŕňajúc potlačenie bunkovej proliferácie, rastu a invázie, zatiaľ čo nadmerná expresia SLC7A11 môže spôsobiť opačné bunkové účinky (Koppula a kol., 2021; Lan a kol., 2022). Tento proteínový transportér aminokyselín je často nadmerne exprimovaný pri ľudských malignitách (He a kol., 2022). Dornier a kol. (2017) vo svojej štúdii popisujú, že export glutamátu sprostredkovaný SLC7A11 bol spojený so zvýšenou invazívnosťou buniek karcinómu prsníka. Zhong a kol. (2020) v experimentoch na vzorkách ľudského mnohopočetného myelómu, ako aj na bunkových líniách pozorovali fingolimodom indukovanú ferroptózu spojenú s inhibíciou kritických regulátorov GPX4 (glutathione peroxidase 4) a SLC7A11 (solute carrier family 7 member 11).

Fingolimod a protinádorová terapia

Zacielením na viaceré onkogénne a kompenzačné signálne dráhy zapojené do liekovej rezistencie, fingolimod inhibuje dráhu prenosu signálu v nádorových bunkách a nádoroch a zvyšuje senzitivitu protinádorovej terapie. Kombinovaná liečba buniek kolorektálneho karcinómu vykazuje aditívny účinok fingolimodu s oxaliplatinou a 5-fluórouracilom (Cristóbal a kol., 2014). Bola popísaná aj jeho schopnosť podporovať resenzibilizáciu na cetuximab *in vivo* a *in vitro*, čo viedlo k inhibícii rastu nádoru, indukcii apoptózy ako aj predĺženiu života u myšacích modelov (Rosa a kol., 2013). V bunkách melanómu rezistentných na cisplatinu FTY720 indukoval degradáciu SK1 s následnou inhibíciou signálnej dráhy PI3K/Akt/mTOR, súvisiacou s chemorezistenciou a únikom z apoptózy (Ishitsuka a kol., 2014). Vo svojej predklinickej štúdii Rupp a kol. (2021) označili FTY720 ako potenciálne liečivo v terapii vysoko agresívneho triple negatívneho karcinómu prsníka (TNBC). Po liečbe FTY720 bola zaznamenaná redukcia rastu nádorového tkaniva prostredníctvom apoptózy s minimálnym efektom na zdravé bunky. V porovnaní s cisplatinou, FTY720 v monoterapii vykazoval porovnateľný terapeutický efekt, avšak bez toxicity spojenej s chemoterapeutickou liečbou. Taktiež bol študovaný účinok FTY720 na tvorbu metastáz v syngénnom modeli TNBC a po prvýkrát v modeli xenograftu. FTY720 nemal vplyv na tvorbu pľúcnych metastáz, na druhej strane potlačal tvorbu vzdialenejších metastáz pečene a sleziny (Rupp a kol., 2021). Metastázy pečene predstavujú častú lokalizáciu nádorového ochorenia prsníka a sú spájané so slabým prežívaním a vyšším rizikom úmrtia oproti metastázam pľúc (Chen a kol., 2018). Práve preto poskytuje FTY720 výhodu v liečbe karcinómu prsníka a s ním spojených metastáz. V bunkových líniách karcinómu prostaty ako aj v *in vivo* nádoroch u

myší FTY720 zvyšoval citlivosť na rádioterapiu prostredníctvom inhibície SK1 a vyčerpania signálnych molekúl prežitia ako Akt a S1P (Pchejetski a kol., 2010). Liu Q. a kol. (2010) v *in vivo* experimentoch na MCL xenograftovom modeli u myší síce pozorovali, že fingolimod zvyšoval medián prežitia, ale v monoterapii neviedol k úplnej eliminácii ochorenia.

Súčasťou mechanizmu je aj modulácia nádorového prostredia prostredníctvom inhibície angiogenézy, ktorá je hnacím mechnizmom progresie nádorového tkaniva (LaMontagne a kol., 2006). V solídnych nádoroch je SK1 potrebná pri onkogénnej signalizácii vaskulárneho endotelového rastového faktora VEGF, epidermálneho rastového faktora (EGF) a Ras (Huang a kol., 2013). Perorálne podaná kombinácia FTY720 a sunitinibu malátu (inhibítor tyrozínkinázy) spôsobila výraznú redukciu nádorového tkaniva v syngénnom modeli karcinómu prsníka. Histologická analýza odhalila normalizáciu vaskulatúry tumoru (Mousseau a kol., 2012); ktorá sa javí ako kľúčový problém pri zvyšovaní efektivity ďalších chemoterapeutík či rádioterapie (Huang a Chen, 2010). Spolu so zlepšením výsledku liečby, potkany liečené dvojkombináciou liečiv zaznamenali menší úbytok hmotnosti oproti monoterapii, čo naznačuje redukciu toxicity sunitinib malátu. Je pravdepodobné, že použitie FTY720 v kombinácii s inými antiangiogénnymi liečivami môže znížiť ich dávku, ako aj rozsah nežiaducich účinkov (Mousseau a kol., 2012). V dôsledku imunosupresívneho pôsobenia fingolimodu sa pri dlhodobej terapii vyskytujú nežiaduce účinky ako infekcie horných a dolných dýchacích ciest, močových ciest, herpesvírusové infekcie, ale bol pozorovaný aj výskyt nádorových ochorení vo forme bazaliómov, melanómov, B-bunkových a T-bunkových lymfómov, glioblastómov (Tran a kol., 2018; Wills a kol., 2019; Behrangi a kol., 2019; Alping a kol., 2020; London a kol., 2020; Kawai a kol., 2020). V súčasnosti existujú možnosti na minimalizáciu imunosupresívneho účinku fingolimodu, ako napr. aplikácia LP-FTY720 (lipozomálny nosič FTY720), blokáda FTY720 fosforylácie, blokádou imunitných inhibičných dráh použitím anti-CTLA-4 mAb, anti-CTLA-4 mAb, resp. inhibítora IDO (indolamín-pyrol 2,3-dioxigenáza) (Mao a kol., 2014; White a kol., 2016; Redelman-Sidi a kol., 2018).

ZÁVER

Fingolimod (FTY720) je v súčasnosti liečivom prvej línie v terapii sklerózy multiplex. Terapeutický prínos FTY720 sa vo veľkej miere pripisuje modulácii S1PR receptorov a S1P metabolizmu. Okrem imunosupresívneho pôsobenia boli pozorované aj jeho antiproliferatívne účinky. Okrem SIP signalizácie, FTY720 inhibuje aj transdukčné dráhy spojené s prežívaním nádorových buniek, pravdepodobne pre svoju štrukturálnu podobnosť so sfingozínom a vykazuje účinky potenciálneho protinádorového liečiva *in vitro* a *in vivo*. Avšak pre potvrdenie účinku a bezpečnosti je potrebné vykonať predovšetkým klinické štúdie, ktoré by mohli zaradiť FTY720 medzi chemoterapeutické liečivá.

POĎAKOVANIE

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt Otvorená vedecká komunita pre moderný interdisciplinárny výskum v medicíne (OPENMED), kód ITMS2014+: 313011V455, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a vďaka Slovenskej grantovej agentúre VEGA 1/0653/19, VEGA 1/0539/21.

ZOZNAM LITERATÚRY

Alping, P., Askling, J., Burman, J., Fink, K., Fogdell-Hahn, A., Gunnarsson, M., Hillert, J., Langer-Gould, A., Lycke, J., Nilsson, P., Salzer, J., Svenningsson, A., Vrethem, M., Olsson, T., Piehl, F., Frisell, T.: Cancer risk for fingolimod, natalizumab, and rituximab in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*., 2020, 87 (5), 688 – 699.

Azuma, H., Takahara, S., Ichimaru, N., Wang, J. D., Itoh, Y., Otsuki, Y., Morimoto, J., Fukui,

R., Hoshiga, M., Ishihara, T., Nonomura, N., Suzuki, S., Okuyama, A., Katsuoka, Y.: Marked prevention of tumor growth and metastasis by a novel immunosuppressive agent, FTY720, in mouse breast cancer models. *Cancer research*, 2002, 62 (5), 1410 – 1419.

Behrangi, N., Fischbach, F., Kipp, M.: Mechanism of siponimod: anti-inflammatory and neuroprotective mode of action. *Cells*, 2019, 8 (1), 24.

Bergelin, N., Blom, T., Heikkilä, J., Löf, C., Alam, C., Balthasar, S., Slotte, J. P., Hinkkanen, A., Törnquist, K.: Sphingosine kinase as an oncogene: autocrine sphingosine 1-phosphate modulates ML-1 thyroid carcinoma cell migration by a mechanism dependent on protein kinase C-alpha and ERK1/2. *Endocrinology*, 2009, 150 (5), 2055 – 2063.

Cai, H., Xie, X., Ji, L., Ruan, X., Zheng, Z.: Sphingosine kinase 1: a novel independent prognosis biomarker in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*., 2017, 13 (4), 2316 – 2322.

Cristóbal, I., Manso, R., Rincón, R., Caramés, C., Senin, C., Borrero, A., Martínez-Useros, J., Rodriguez, M., Zazo, S., Aguilera, O., Madoz-Gúrpide, J., Rojo, F., García-Foncillas, J.: PP2A inhibition is a common event in colorectal cancer and its restoration using FTY720 shows promising therapeutic potential. *Molecular cancer therapeutics*, 2014, 13 (4), 938 – 947.

Cuvillier, O.: Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochimica et biophysica acta*, 2002, 1585 (2 – 3), 153 – 162.

Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S., Spiegel, S.: Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 1996, 381 (6585), 800 – 803.

Čonková, M., Martinková, M., Gonda, J., Jacková, D., Pilátová, M. B., Kupka, D., Jáger, D.: Stereoselective synthesis and antiproliferative activity of the isomeric sphinganine analogues. *Carbohydr. Res.*, 2019, 472, 76 – 85.

De Palma, R. M., Parnham, S. R., Li, Y., Oaks, J. J., Peterson, Y. K., Szulc, Z. M., Roth, B. M., Xing, Y., Ogretmen, B.: The NMR-based characterization of the FTY720-SET complex reveals an alternative mechanism for the attenuation of the inhibitory SET-Pp2a interaction. *FASEB J.*, 33 (6), 7647 – 7666.

Dornier, E., Rabas, N., Mitchell, L., Novo, D., Dhayade, S., Marco, S., Mackay, G., Sumpton, D., Pallares, M., Nixon, C., Blyth, K., Macpherson, I. R., Rainero, E., Norman, J. C.: Glutaminolysis drives membrane trafficking to promote invasiveness of breast cancer cells. *Nature communications*, 2017, 8 (1), 2255.

Egom, E. E., Ke, Y., Musa, H., Mohamed, T. M., Wang, T., Cartwright, E., Solaro, R. J., Lei, M.: FTY720 prevents ischemia/reperfusion injury- associated arrhythmias in an *ex vivo* rat heart model via activation of Pak1/Akt signaling. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2010, 48 (2), 406 – 414.

Estrada-Bernal, A., Palanichamy, K., Ray Chaudhury, A., Van Brocklyn, J. R.: Induction of brain tumor stem cell apoptosis by FTY720: a potential therapeutic agent for glioblastoma. *Neuro-oncology*, 2012, 14 (4), 405 – 415.

Fujita, T., Inoue, K., Yamamoto, S., Ikumoto, T., Sasaki, S., Toyama, R., Chiba, K., Hoshino, Y., Okumoto, T.: Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *The Journal of antibiotics*, 1994, 47 (2), 208 – 215.

Furuya, H., Shimizu, Y., Kawamori, T.: Sphingolipids in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2011, 30 (3 – 4), 567 – 576.

Gonda, J., Fazekašová, S., Martinková, M., Mitríková, T., Roman, D., Pilátová, M. B.: Synthesis and biological activity of sphingosines with integrated azobenzene switches. *Org. Biomol. Chem.*, 2019, 17 (13), 3361 – 3373.

Hait, N. C., Maiti, A.: The role of sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate in inflammation and cancer. *Mediators Inflamm*., 2017, 2017, 4 806 541.

Hannun, Y. A., Obeid, L. M.: Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2008, 9 (2), 139 – 150.

He, J., Wang, X., Chen, K., Zhang, M., Wang, J.: The amino acid transporter SLC7A11--mediated crosstalk implicated in cancer therapy and the tumor microenvironment. *Biochem. Pharmacol.*, 2022, 205, 115 241.

Hla, T., Brinkmann, V.: Sphingosine 1-phosphate (S1P): physiology and the effects of S1P receptor modulation. *Neurology*, 2011, 76 (8, Suppl. 3), 3 – 8.

Ho, J. W., Man, K., Sun, C. K., Lee, T. K., Poon, R. T., Fan, S. T.: Effects of a novel immunomodulating agent, FTY720, on tumor growth and angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Molecular cancer therapeutics*, 2005, 4 (9), 1430 – 1438.

Huang, W. C., Nagahashi, M., Terracina, K. P., Takabe, K.: Emerging role of sphingosine-1-phosphate in inflammation, cancer, and lymphangiogenesis. *Biomolecules*, 2013, 3 (3), 408 – 434.

Huang, G., Chen, L.: Recombinant human endostatin improves anti-tumor efficacy of paclitaxel by normalizing tumor vasculature in Lewis lung carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 2010, 136 (8), 1201 – 1211.

Chen, W., Hoffmann, A. D., Liu, H., Liu, X.: Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. 2018, *NPJ precision oncology*, 2 (1), 4.

Chiba, K., Yanagawa, Y., Masubuchi, Y., Kataoka, H., Kawaguchi, T., Ohtsuki, M. Hoshino, Y.: FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *Journal of immunology*, 1998, 160 (10), 5037 – 5044.

Chiba, K.: Discovery of fingolimod based on the chemical modification of a natural product from the fungus, *Isaria sinclairii*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 73 (10), 666 – 678.

Chun, J., Hartung, H. P.: Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clinical neuropharmacology*, 2010, 33 (2), 91 – 101.

Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S., Nakamura, S.: Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 2003, 278 (47), 46 832 – 46 839.

Ishitsuka, A., Fujine, E., Mizutani, Y., Tawada, C., Kanoh, H., Banno, Y., Seishima, M.: FTY720 and cisplatin synergistically induce the death of cisplatin-resistant melanoma cells through the downregulation of the PI3K pathway and the decrease in epidermal growth factor receptor expression. *International journal of molecular medicine*, 2014, 34 (4), 1169 – 1174.

Jacková, D., Brunderová, M., Fábian, M., Martinková, M., Gonda, J., Pilátová, M. B.: Synthesis and anticancer profile of novel sphingoid base-like compounds with a quaternary stereocentre. *Carbohydr. Res.*, 2020, 487, 107 862.

Kawai, H., Matsushita, H., Akashi, H., Furuya, D., Kawakami, S., Suzuki, R., Moriuchi, M., Ogawa, Y., Kawada, H., Nakamura, N., Ando, K.: Peripheral T-cell lymphomas as fingolimod-associated lymphoproliferative disorder for patients with multiple sclerosis-case report with literature review. *Leuk. Lymphoma*, 2020, 61 (4), 959 – 962.

Kawakita, Y., Motoyama, S., Sato, Y., Koyota, S., Wakita, A., Liu, J., Saito, H., Minamiya, Y.: Sphingosine-1-phosphate/sphingosine kinase 1-dependent lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Surg. Today*, 2017, 47 (11), 1312 – 1320.

Koppula, P., Zhuang, L., Gan, B.: Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. *Protein Cell.*, 2021, 12 (8), 599 – 620.

Kowalski, G. M., Carey, A. L., Selathurai, A., Kingwell, B. A., Bruce, C. R.: Plasma sphingosine-1-phosphate is elevated in obesity. *PloS One*, 2013, 8 (9).

LaMontagne, K., Littlewood-Evans, A., Schnell, C., O'Reilly, T., Wyder, L., Sanchez, T., Probst, B., Butler, J., Wood, A., Liau, G., Billy, E., Theuer, A., Hla, T., Wood, J.: Antagonism of sphin-

gosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer research*, 2006, 66 (1), 221 – 231.

Lan, H., Gao, Y., Zhao, Z., Mei, Z., Wang, F.: Ferroptosis: redox imbalance and hematological tumorigenesis. *Front Oncol.*, 2022, 12, 834 681.

Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R., Spiegel, S., Hla, T.: Sphingosine 1-phosphate signalling through the G- protein-coupled receptor Edg-1. *The Biochemical journal*, 1998, 605 – 609.

Li, R. Z., Wang, X. R., Wang, J., Xie, C., Wang, X. X., Pan, H. D., Meng, W. Y., Liang, T. L., Li, J. X., Yan, P. Y., Wu, Q. B., Liu, L., Yao, X. J., Leung, E. L.-H.: The key role of sphingolipid metabolism in cancer: New therapeutic targets, diagnostic and prognostic values, and anti-tumor immunotherapy resistance. *Front Oncol.*, 2022, 12, 941 643.

Li, J., Wang, S. W., Zhang, D. S., Sun, Y., Zhu, C. Y., Fei, Q., Hu, J., Zhang, C., Sun, Y. M.: FTY720-induced enhancement of autophagy protects cells from FTY720 cytotoxicity in colorectal cancer. *Oncol Rep.*, 2016, 35 (5), 2833 – 2842.

Li, W., Yu, C. P., Xia, J. T., Zhang, L., Weng, G. X., Zheng, H. Q., Kong, Q. L., Hu, L. J., Zeng, M. S., Zeng, Y. X., Li, M., Li, J., Song, L. B.: Sphingosine kinase 1 is associated with gastric cancer progression and poor survival of patients. *Clin Cancer Res.*, 2009, 15 (4),1393 – 1399.

Li, Y. C., Liu, Z. G., Yao, K., Wang, H. H., Hu, R., Yang, W. Liao, A. J.: Mechanisms of ROS in U266 cell death induced by FTY720. *Chinese Association of Pathophysiology*, 2013, 21 (3), 643 – 646.

Lim, K. G., Tonelli, F., Li, Z., Lu, X., Bittman, R., Pyne, S., Pyne, N. J.: FTY720 analogues as sphingosine kinase 1 inhibitors: enzyme inhibition kinetics, allosterism, proteasomal degradation, and actin rearrangement in MCF-7 breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 2011, 286 (21), 18 633 – 18 640.

Lima, S., Milstien, S., Spiegel, S.: Sphingosine and sphingosine kinase 1 involvement in endocytic membrane trafficking. *The Journal of biological chemistry*, 2017, 292 (8), 3074 –3088.

Liu, Q., Alinari, L., Chen, C. S., Yan, F., Dalton, J. T., Lapalombella, R., Zhang, X., Mani, R., Lin, T., Byrd, J. C., Baiocchi, R. A., Muthusamy, N.: FTY720 shows promising *in vitro* and *in vivo* preclinical activity by downmodulating Cyclin D1 and phospho-Akt in mantle cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.*, 2010, 16 (12), 3182 – 3192.

Liu, Q., Zhao, X., Frissora, F., Ma, Y., Santhanam, R., Jarjoura, D., Lehman, A., Perrotti, D., Chen, C. S., Dalton, J. T., Muthusamy, N., Byrd, J. C.: FTY720 demonstrates promising pre-clinical activity for chronic lymphocytic leukemia and lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Blood*, 2008, 111, 275 – 284.

London, F., Cambron, B., Jacobs, S., Delrée, P., Gustin, T.: Glioblastoma in a fingolimod-treated multiple sclerosis patient: Causal or coincidental association? *Mult Scler Relat Disord.*, 2020, 41, 102 012.

Luberto, C., Hannun, Y. A.: Sphingolipid metabolism in the regulation of bioactive molecules. *Lipids*, 1999, 34, S5 – S11.

Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Sørensen, P. S., Thompson, A. J., Wolinsky, J. S., Balcer, L. J., Banwell, B., Barkhof, F., Bebo, B. Jr., Calabresi, P. A., Clanet, M., Comi, G., Fox, R. J., Freedman, M. S., Goodman, A. D., Inglese, M., Kappos, L., Kieseier, B. C., Lincoln, J. A., Lubetzki, C., Miller, A. E., Montalban, X., O'Connor, P. W., Petkau, J., Pozzilli, C., Rudick, R. A., Sormani, M. P., Stüve, O., Waubant, E., Polman, C. H.: Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*, 2014, 83 (3), 278 – 286.

Lucas da Silva, L. B., Ribeiro, D. A., Cury, P. M., Cordeiro, J. A., Bueno, V.: FTY720 treatment in experimentally urethane-induced lung tumors. *Journal of experimental therapeutics & oncology*, 2008, 7 (1), 9 – 15.

Mao, Y., Wang, J., Zhao, Y., Wu, Y., Kwak, K. J., Chen, C. S., Byrd, J. C., Lee, R. J., Phelps, M. A., Lee, L. J., Muthusamy, N.: A novel liposomal formulation of FTY720 (fingolimod) for promising enhanced targeted delivery. *Nanomedicine*, 2014, 10

(2), 393 – 400.

Marvaso, G., Barone, A., Amodio, N., Raimondi, L., Agosti, V., Altomare, E., Scotti, V., Lombardi, A., Bianco, R., Bianco, C., Caraglia, M., Tassone, P., Tagliaferri, P.: Sphingosine analog fingolimod (FTY720) increases radiation sensitivity of human breast cancer cells *in vitro*. *Cancer Biol. Ther*., 2014, 15 (6), 797 – 805.

Min, J., Mesika, A., Sivaguru, M., Veldhoven, P., Alexander, H., Futerman, A. H., Alexander, S.: (Dihydro)ceramide synthase 1 regulated sensitivity to cisplatin is associated with the activation of p38 mitogen-activated protein kinase and is abrogated by sphingosine kinase 1. *Molecular cancer research: MCR*, 2007, 5 (8), 801 – 812.

Morad, S. A., Cabot, M. C.: Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13 (1), 51 – 65.

Mousseau, Y., Mollard, S., Faucher-Durand, K., Richard, L., Nizou, A., Cook-Moreau, J., Baaj, Y., Qiu, H., Plainard, X., Fourcade, L., Funalot, B., Sturtz, F. G.: Fingolimod potentiates the effects of sunitinib malate in a rat breast cancer model. *Breast cancer research and treatment*, 2012, 134 (1), 31 – 40.

Nagahara, Y., Ikekita, M., Shinomiya, T.: Immunosuppressant FTY720 induces apoptosis by direct induction of permeability transition and release of cytochrome c from mitochondria. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2000, 165 (6), 3250 – 3259.

Nagahara, Y., Matsuoka, Y., Saito, K., Ikekita, M., Higuchi, S., Shinomiya, T.: Coordinate involvement of cell cycle arrest and apoptosis strengthen the effect of FTY720. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2001, 92, 680 – 687.

Nagahashi, M., Tsuchida, J., Moro, K., Hasegawa, M., Tatsuda, K., Woelfel, I. A., Takabe, K., Wakai, T.: High levels of sphingolipids in human breast cancer. *The Journal of Surgical Research*, 2016, 204 (2), 435 – 444.

Nagahashi, M., Yamada, A., Katsuta, E., Aoyagi, T., Huang, W. C., Terracina, K. P., Hait, N. C., Allegood, J. C., Tsuchida, J., Yuza, K., Nakajima, M., Abe, M., Sakimura, K., Milstien, S., Wakai, T., Spiegel, S., Takabe, K.: Targeting the SphK1/S1P/S1PR1 axis that links obesity, chronic inflammation, and breast cancer metastasis. *Cancer research*, 2018, 78 (7), 1713 – 1725.

Newton, J., Lima, S., Maceyka, M., Spiegel, S.: Revisiting the sphingolipid rheostat: Evolving concepts in cancer therapy. *Experimental cell research*, 2015, 333 (2), 195 – 200.

Ng, K. T., Man, K., Ho, J. W., Sun, C. K., Lee, T. K., Zhao, Y., Lo, C. M., Poon, R. T., Fan, S. T.: Marked suppression of tumor growth by FTY720 in a rat liver tumor model: the significance of down-regulation of cell survival Akt pathway. *International journal of oncology*, 2007, 30 (2), 375 – 380.

Ogretmen, B.: Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nature reviews. Cancer*, 2018, 18 (1), 33 – 50.

Panneer Selvam, S., De Palma, R. M., Oaks, J. J., Oleinik, N., Peterson, Y. K., Stahelin, R. V., Skordalakes, E., Ponnusamy, S., Garrett-Mayer, E., Smith, C. D., Ogretmen, B.: Binding of the sphingolipid S1P to hTERT stabilizes telomerase at the nuclear periphery by allosterically mimicking protein phosphorylation. *Sci. Signal.*, 2015, 8 (381).

Perrotti, D., Neviani, P.: Protein phosphatase 2A: a target for anticancer therapy. *The Lancet. Oncology*, 2013, 14 (6), e229 – e238.

Pchejetski, D., Bohler, T., Brizuela, L., Sauer, L., Doumerc, N., Golzio, M., Salunkhe, V., Teissié, J., Malavaud, B., Waxman, J., Cuvillier, O.: FTY720 (fingolimod) sensitizes prostate cancer cells to radiotherapy by inhibition of sphingosine kinase-1. *Cancer research*, 2010, 70 (21), 8651 – 8661.

Pippa, R., Dominguez, A., Christensen, D. J., Moreno-Miralles, I., Blanco-Prieto, M. J., Vitek, M. P., Odero, M. D.: Effect of FTY720 on the SET-Pp2a complex in acute myeloid leukemia; SET binding drugs have antagonistic activity. *Leukemia*, 2014, 28 (9), 1915 – 1918.

Pitman, M. R., Woodcock, J. M., Lopez, A. F., Pitson, S. M.: Molecular targets of FTY720 (fingolimod). *Current molecular medicine*, 2012, 12 (10),

1207 – 1219.

Pournajaf, S., Dargahi, L., Javan, M., Pourgholami, M. H.: Molecular pharmacology and novel potential therapeutic applications of fingolimod. *Front Pharmacol*., 2022, 13, 807 639.

Pyne, N. J., Pyne, S.: Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nature Reviews Cancer*, , 2010, 10 (7), 489 – 503.

Rosa, R., Marciano, R., Malapelle, U., Formisano, L., Nappi, L., D'Amato, C., D'Amato, V., Damiano, V., Marfè, G., Del Vecchio, S., Zannetti, A., Greco, A., De Stefano, A., Carlomagno, C., Veneziani, B. M., Troncone, G., De Placido, S., Bianco, R.: Sphingosine kinase 1 overexpression contributes to cetuximab resistance in human colorectal cancer models. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2013, 19 (1), 138 – 147.

Rupp, T., Pelouin, O., Genest, L., Legrand, C., Froget, G., Castagné, V.: Therapeutic potential of Fingolimod in triple negative breast cancer preclinical models. *Translational oncology*, 2021, 14 (1), 100 926.

Saddoughi, S. A., Song, P., Ogretmen, B.: Roles of bioactive sphingolipids in cancer biology and therapeutics. *Sub-cellular biochemistry*, 2008, 49, 413 – 440.

Sentelle, R. D., Senkal, C. E., Jiang, W., Ponnusamy, S., Gencer, S., Selvam, S. P., Ramshesh, V. K., Peterson, Y. K., Lemasters, J. J., Szulc, Z. M., Bielawski, J., Ogretmen, B.: Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat. Chem. Biol*., 2012, 8 (10), 831 – 838.

Redelman-Sidi, G., Michielin, O., Cervera, C., Ribi, C., Aguado, J. M., Fernández-Ruiz, M., Manuel, O.: ESCMID Study Group for Infections in Compromised Hosts (ESGICH) Consensus Document on the safety of targeted and biological therapies: an infectious diseases perspective (Immune checkpoint inhibitors, cell adhesion inhibitors, sphingosine--1-phosphate receptor modulators and proteasome inhibitors). *Clin. Microbiol. Infect.*, 2018, 24 (2), 95 – 107.

Shen, S., Kepp, O., Kroemer, G.: The end of autophagic cell death? *Autophagy*, 2012, 8, 1 – 3.

Siehler, S., Wang, Y., Fan, X., Windh, R. T., Manning, D. R.: Sphingosine 1-phosphate activates nuclear factor-kappa B through Edg receptors. Activation through Edg-3 and Edg-5, but not Edg-1, in human embryonic kidney 293 cells. *The Journal of biological chemistry*, 2001, 276 (52), 48 733 – 48 739.

Skerjanec, A., Tedesco, H., Neumayer, H. H., Cole, E., Budde, K., Hsu, C. H., Schmouder, R.: FTY720, a novel immunomodulator in de novo kidney transplant patients: pharmacokinetics and exposure-response relationship. *Journal of clinical pharmacology*, 2005, 45 (11), 1268 – 1278.

Spiegel, S., Milstien, S.: Sphingosine--1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2003, 4 (5), 397 – 407.

Strub, G. M., Paillard, M., Liang, J., Gomez, L., Allegood, J. C., Hait, N. C., Maceyka, M., Price, M. M., Chen, Q., Simpson, D. C., Kordula, T., Milstien, S., Lesnefsky, E. J., Spiegel, S.: Sphingosine--1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2011, 25 (2), 600 – 612.

Sweeney, E. A., Sakakura, C., Shirahama, T., Masamune, A., Ohta, H., Hakomori, S., Igarashi, Y.: Sphingosine and its methylated derivative N,N-dimethylsphingosine (DMS) induce apoptosis in a variety of human cancer cell lines. *International journal of cancer*, 1996, 66 (3), 358 – 366.

Tintore, M., Vidal-Jordana, A., Sastre-Garriga, J.: Treatment of multiple sclerosis – success from bench to bedside. *Nature reviews. Neurology*, 2019, 15 (1), 53 – 58.

Tran, J. Q., Hartung, J. P., Tompkins, C. A., Frohna, P. A.: Effects of high- and low-fat meals on the pharmacokinetics of ozanimod, a novel sphingosine-1-phosphate receptor modulator. *Clin. Pharma-*

col. Drug Dev., 2018, 7 (6),634 – 640.

Ubai, T., Azuma, H., Kotake, Y., Inamoto, T., Takahara, K., Ito, Y., Kiyama, S., Sakamoto, T., Horie, S., Muto, S., Takahara, S., Otsuki, Y., Katsuoka, Y.: FTY720 induced Bcl-associated and Fas-independent apoptosis in human renal cancer cells *in vitro* and significantly reduced *in vivo* tumor growth in mouse xenograft. *Anticancer research*, 2007, 27 (1A), 75 – 88.

Wang, F., Wu, Z.: Sphingosine kinase 1 overexpression is associated with poor prognosis and oxaliplatin resistance in hepatocellular carcinoma. *Exp. Ther. Med.*, 2018, 15 (6), 5371 – 5376.

Wang, P., Yuan, Y., Lin, W., Zhong, H., Xu, K., Qi, X.: Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in cancer. *Cancer Cell Int.*, 2019, 19, 295.

Wang, Y., Shen, Y., Sun, X., Hong, T. L., Huang, L. S., Zhong, M.: Prognostic roles of the expression of sphingosine-1-phosphate metabolism enzymes in non-small cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 2019, 8 (5), 674.

White, C., Alshaker, H., Cooper, C., Winkler, M., Pchejetski, D.: The emerging role of FTY720 (Fingolimod) in cancer treatment. *Oncotarget*, 2016, 7 (17), 23 106 – 23 127.

Wills, A., Fan, G., Kim, E., Okada, C. Y., White, K. P., Hopkins, R. S.: Primary cutaneous Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) in a patient taking fingolimod. *Dermatol. Online J.*, 2019, 25 (9), 13030/qt2g62q2fq.

Zhang, N., Dai, L., Qi, Y., Di, W., Xia, P.: Combination of FTY720 with cisplatin exhibits antagonistic effects in ovarian cancer cells: role of autophagy. *International journal of oncology*, 2013, 42 (6), 2053 – 2059.

Zhang, N., Qi, Y., Wadham, C., Wang, L., Warren, A., Di, W., Xia, P.: FTY720 induces necrotic cell death and autophagy in ovarian cancer cells: a protective role of autophagy. *Autophagy*, 2010, 6 (8), 1157 – 1167.

Zhao, L., Zhou, X., Xie, F., Zhang, L., Yan, H., Huang, J., Zhang, C., Zhou, F., Chen, J., Zhang, L.: Ferroptosis in cancer and cancer immunotherapy. *Cancer Commun (Lond).*, 2022, 42 (2), 88 –

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 3: 50 – 58, 2023

INTERAKCIE INTESTINÁLNYCH BAKTÉRIÍ S BAKTERIOCÍNMI

INTERACTIONS OF INTESTINAL BACTERIA WITH BACTERIOCINS

Focková, Valentína; Lauková, Andrea

Centrum biovied SAV, v. v. i.
Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Šoltésovej 4 – 6, 040 01 Košice
Slovenská republika

fockova@saske.sk

ABSTRAKT

V súčasnosti narastá v mnohých oblastiach záujem o prospešné baktérie s cieľom ich využitia na prevenciu a udržanie dobrého zdravotného stavu ľudskej populácie i zvierat. Tieto baktérie vďaka svojím vlastnostiam, medzi ktoré patrí aj antimikrobiálny účinok nimi produkovaných substancií – bakteriocínov, predstavujú doplnok ku v súčasnosti nadmieru užívaným a stále častejšie menej účinným antibiotikám a chemoterapeutikám. Cieľom tejto štúdie bolo testovať inhibičný účinok vybraných bakteriocínov na intestinálne baktérie, ale aj na baktérie izolované z potravinových produktov a takisto ku klinickým a zbierkovým bakteriálnym druhom. Z celkového počtu 128 testovaných kmeňov bolo najviac kmeňov citlivých ku Enterocínu (Ent) A/P (52,3 %); najmenej kmeňov (22,6 %) bolo citlivých ku Mundticín-like substancii EM 41/3. Najvyššiu inhibičnú aktivitu dosahoval Ent A/P a Ent M, pričom ich najvyššia inhibičná aktivita (25 600, resp. 51 200 AU.ml^{-1}) bola zaznamenaná pri inhibícii kmeňa *Enterococcus faecium* B16 (potravinový kmeň) a kmeňa *E. durans* ED 26E/7 (ovčie mlieko). Najcitlivejšie ku použitým bakteriocínom boli potravinové indikátorové kmene. Inhibičný účinok enterocínov sa prejavil aj pri interakčných testoch vybraných kmeňov s enterocínmi pri klasickej kultivácii, a taktiež pri kultivácii v laboratórnom bioreaktore BioSAN. Dosiahnuté výsledky majú význam z hľadiska poznania antimikrobiálneho spektra použitých bakteriocínov. Sú tiež prínosom pre štúdium bakteriocínov z prospešných baktérií s cieľom ich ďalšieho využitia aj vo farmaceutickom priemysle so zameraním na veterinárnu a humánnu medicínu.

Kľúčové slová: bakteriocín; inhibícia; interakcia; mikrobiota

ABSTRACT

Nowadays, a great interest in beneficial bacteria has been grown in many areas with the aim to prevent and maintain good health in human and also in animals. These bacteria with antimicrobial effect due to their bacteriocins (antimicrobial substances) represent an alternative to the currently overused and increasingly less effective antibiotics and chemotherapeutics. The goal of this study was testing antibacterial effect of selected bacteriocins against intestinal bacteria but also against bacteria isolated from food products, as well as against clinical strains and strains from bacterial species collection. Out of the total number of 128 tested strains, the most strains were sensitive to Ent A/P (52.3 %), the least strains (22.6 %) were sensitive to Mundticin-like substance EM 41/3. The highest inhibitory activity was achieved due to Ent A/P and Ent M with the values of 25 600 and 51 200 AU.ml^{-1} respectively, when inhibiting *Enterococcus faecium* B16 strain isolated from salami and the strain *E. durans* ED 26E/7 from ewes milk. Food-derived indicator strains such as enterococci from milk and fermented meat products were the most sensitive to the bacteriocins used. Inhibitory effect of enterocins was also shown in competitive studies of selected strains with enterocins using standard cultivation as well as cultivation in laboratory fermentor BioSAN. The results achieved in this study present a contribution regarding the bacteriocins antimicrobial spectrum studies. They also contribute to bacteriocins studies with the aim of their further use in pharmacy and as products for human and veterinary medicine.

Key words: bacteriocin; inhibition; interaction; microbiota

ÚVOD

Prospešné baktérie prispievajú ku optimalizácii a zachovaniu zdravotného statusu ľudí i zvierat; majú teda využitie vo veterinárnej či v humánnej medicíne, vo farmaceutickom, kozmetickom priemysle, ako aj v priemysle potravinárskom (Dolenčić Špehar a kol., 2020). Jednou z prospešných vlastností niektorých baktérií je produkcia substancií s antimikrobiálnym účinkom – bakteriocínov, teda inhibícia rastu a množenia iných baktérií. Bakteriocíny sú vlastne bakteriálne ribozomálne syntetizované bielkoviny, ktoré vykazujú inhibičnú aktivitu proti viac či menej príbuzným bakteriálnym druhom (Lauková a kol. 1993, 2020; Nes a kol., 2014; Maryam a kol., 2017; Meade a kol., 2020). V rámci bakteriocínov sa klasifikovala skupina enterocínov, čo sú antimikrobiálne substancie produkované väčšinou zástupcami bakteriálneho rodu *Enterococcus* (Lauková a kol., 2017). Samotné enterokoky sú ponímané ako kontroverzné baktérie, pretože na jednej strane mnohé kmene majú prospešné vlastnosti, napr. produkujú substancie s antimikrobiálnym účinkom, no na druhej strane klinické kmene môžu spôsobovať ochorenia. Avšak, niektorí zástupcovia rodu *Enterococcus* vykazujú také vlastnosti, ktoré ich priamo predurčujú na využitie v podobe prospešných baktérií (Lauková a kol., 1993). Možnosť využitia takýchto kmeňov enterokokov v chovoch zvierat je dlhodobo študovaná vedeckým tímom v Laboratóriu živočíšnej mikrobiológie Centra biovied SAV v. v. i., na Ústave fyziológie hospodárskych zvierat v Košiciach. Tomuto pracovisku patrí prvenstvo v oblasti aplikácie bakteriocínov, resp. enterocínov, najmä v chove potravinových zvierat, s priaznivými výsledkami publikovanými v mnohých vedeckých časopisoch (Mareková a kol., 2007; Lauková a kol., 2008, 2012; 2015; 2017; Szabóová a kol., 2011; Pogány Simonová a kol., 2013; 2020). Prospešné baktérie, teda aj niektoré enterokoky, a/alebo ich substancie možno považovať za perspektívne antimikrobiálne látky novej generácie. Takéto látky sú v súčasnosti označované aj termínom postbiotiká. Majú potenciál využitia ako doplnok alebo čiastočná alternatíva k antibiotikám a chemoterapeutikám. Predstavujú možnosť prevencie a *post*-terapie niektorých, najmä bakteriálnych ochorení (Yang a kol., 2014; Maryam a kol., 2017; Meade a kol., 2020;

Darbandi a kol., 2021). Prezentovaná práca bola zameraná na *in vitro* testovanie inhibičného účinku vybraných bakteriocínov (izolovaných a charakterizovaných na CBv SAV, v. v. i. ÚFHZ v Košiciach) na skupinu indikátorových kmeňov (klinické, zbierkové, intestinálne/fekálne), ale aj kmene potravinárske. Rovnako boli sledované kompetitívne (interakčné) účinky bakteriocínov na vybrané indikátorové kmene aj s použitím biofermentora BioSAN.

MATERIÁL A METÓDY

Citlivosť indikátorových bakteriálnych kmeňov k bakteriocínom

In vitro inhibičná aktivita bakteriocínov bola testovaná kvantitatívnou metódou, tzv. agar spot testom (De Vuyst a kol., 1996). Indikátorové kmene kultivované podľa príslušnosti, resp. charakteru kmeňa boli aplikované v množstve 200 µl do 4 ml 0,7 % príslušného agaru. Týmto obsahom boli preliate jednotlivé agarové platne (1,5 %; v/v). Na agar boli následne aplikované jednotlivé čiastočne purifikované enterocíny (10 µl). Platne boli inkubované opäť podľa príslušnosti kmeňov a následne boli vyhodnotené zóny inhibície. Výsledná inhibičná aktivita čiastočne purifikovaného enterocínu bola odčítaná ako ostro-ohraničená jasná zóna z najvyššieho riedenia daného bakteriocínu, ktoré spôsobí inhibíciu indikátorového kmeňa. Inhibičná aktivita bola vyjadrená v arbitrárnych jednotkách na mililiter ($AU.ml^{-1}$), čo predstavuje najvyššie riedenie daného bakteriocínu, ktoré spôsobí inhibíciu indikátorového kmeňa.

Použité boli bakteriocíny (enterocíny), resp. čiastočne purifikované substancie (precipitáty) produkované kmeňmi enterokokov rôzneho pôvodu: Enterocín M, Enterocín A/P, Enterocín 2019, a Mundticín-like (MLS) EM 41/3. Precipitáty boli pripravené ako je uvedené v predchádzajúcich prácach (Mareková a kol., 2003, 2007; Pogány Simonová a kol., 2020; Focková a kol., 2022). Kultúry produkčných kmeňov v MRS bujóne (Merck, Darmstadt, Nemecko) po nočnej kultivácii pri 37 ˚C boli centrifugované 30 min (10 000 x g; Jouan MR 18 12, Francúzsko). Po úprave pH supernatantu (pH 5,0 – 6,0); teplotnom ošetrení (10 min, 80 °C) a ošetrení chelatonom = EDTA III boli supernatanty precipitované síranom amónnym (40 % saturácia) v trvaní 4 – 18 hodín (podľa charakteru enterocínu) pri laboratórnej teplote alebo pri teplote 4 °C. Precipitované supernatanty boli centrifugované (10 000 x 30 min) a resuspendované v minimálnom objeme fosfátového pufru (10 mM, pH 6,5). Ich aktivita bola otestovaná proti hlavnému (citlivému) indikátorovému kmeňu *Enterococcus avium* EA5 (izolát pracoviska), v prípade MLS EM 41/3 *Listeria monocytogenes* LMP 7223 (Veterinárny ústav Olomouc) a dosiahla 51 200 – 102 400 $AU.ml^{-1}$. Použité boli Gram-pozitívne i Gram-negatívne indikátorové kmene (5 zbierkových kmeňov, 37 klinických kmeňov, 54 fekálnych kmeňov a 32 kmeňov z potravinových zdrojov), spolu 128 kmeňov. Z Gram-negatívnych baktérií boli použité 2 klinické kmene *Salmonella* Enteritidis (Dr. Šišák, Brno). Ostatné použité Gram-negatívne kmene boli izolované v našom laboratóriu: 5 kmeňov *Escherichia coli* (trus koní), 3 kmene *Pseudomonas teatrolens* a 1 kmeň *Pseudomonas fragii* K7/od/1 (trus koní), kmene *Acinetobacter lwofii* K8/od/2, *Acinetobacter johnsonii* K8/21d/a/1 a *Acinetobacter tandoii* K5 PL/2 (trus koní). Použité boli tiež 2 kmene *Citrobacter freundii* a jeden kmeň *Citrobacter braakii* K3/1 (z trusu koňa), 2 kmene *Buttiauxella agrestis* a kmeň *Buttiauxella ferraggutiae* 1/1/2 (trus srny/jeleňa). Indikátorové kmene zástupcov Gram-pozitívnych rodov *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Rothia*, *Kocuria* a *Arthrobacter* taktiež izolované v LŽM CBv SAV v. v. i. ÚFHZ (okrem kmeňov *Str. pyogenes* a *Str. pneumoniae* dodané z Univerzity Komenského v Bratislave) boli nasledovné: 22 kmeňov *Enterococcus faecium*, 8 kmeňov *E. durans* (potravinové zdroje), 5 kmeňov *E. moraviensis* (zbierkové kmene), 4 kmene *E. faecalis* (trus králika), 3 kmene *E. casseliflavus* (trus koňa), 17 kmeňov *Staphylococcus aureus*, kmeň *S. capitis* R19/2, 4 kmene *S. pasteuri* (klinické kmene, potravinové zdroje, črevný obsah rýb), kmeň *Streptococcus dysgalactiae* 6/-2/bH (trus koní); z otidíd u detí bolo 7 kmeňov (5 %) *Str. pyogenes* a 11 kmeňov *Str. pneu-*

moniae; kmeň *Str. salivarius* 46Iv (klinické kmene), 14 kmeňov *Str. gallolyticus* (trus bobra), *Aerococcus viridans* 2/0/a/H, 2 kmene *Arthrobacter arilaitensis* (trus koní), 5 kmeňov *Rothia amarae* a kmene *Kocuria kristinae* (klinické kmene). Kmene *Kocuria kristinae* boli poskytnuté MVDr. Evou Stykovou z Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

Interaktívne/kompetitívne testovanie vybraných indikátorových kmeňov s bakteriocínmi

Na testovanie kompetitívnej aktivity (interakcie) boli vybrané indikátorové kmene, ktoré boli najcitlivejšie ku daným bakteriocínom podľa *in vitro* agar spot testu. Pre kultiváciu indikátorových kmeňov boli použité kultivačné médiá Brain heart infusion (BHI) alebo Trypticase soy broth (TSB, Becton a Dickinson, USA). Objem 50 µl nočnej bujónovej kultúry bol inokulovaný do 100 ml bujónu, a to dvakrát – pre kontrolnú a pokusnú vzorku. Ku pokusnej vzorke bol aplikovaný na začiatku kultivácie bakteriocín (50 µl). Kontrolná a pokusná vzorka boli kultivované vo vodnom kúpeli pretrepávaním pri 37 °C po dobu 24 hodín. Každú hodinu, resp. dve hodiny sa odoberali vzorky (1,5 ml); vrátane vzorky na začiatku kultivácie (tzv. nultá vzorka). Ich absorbancia (A_{600}) bola meraná spektrofotometricky (Spekol 11, Carl Zeiss, Jena, Nemecko), a sledované boli tiež počty bakteriálnych buniek (riedené štandardnou mikrobiologickou metódou – ISO). Jednotlivé riedenia boli vysievané na BH agar alebo TSY agar. Počty prežívajúcich buniek boli vyjadrené v kolónie tvoriacich jednotkách na mililiter (KTJ.ml^{-1}). Sledovaná bola aj kompetitívna kinetika rastu indikátorových kmeňov s bakteriocínom v závislosti od času s použitím bioreaktora BioSAN (Laboserv, Brno, Česká republika). Každý kmeň bol kultivovaný v príslušnom bujóne (25 ml) pri 37 °C, po dobu 24 hodín, pričom bola zaznamenávaná absorbancia každých 30 minút. Pri kultivácii baktérií sa rozlišujú jednotlivé fázy rastu; lag fáza (baktérie sa ešte nemnožia tak rýchlo, pripravujú sa na rast v novom prostredí), exponenciálna/logaritmická fáza (prebieha intenzívne množenie a populácia dosahuje exponenciálny rast), stacionárna fáza (postupne sa spomaľuje rýchlosť množenia buniek, až do štádia rovnováhy), fáza odumierania (počet odumretých buniek prevyšuje počet novovzniknutých buniek).

VÝSLEDKY

MLS EM 41/3 inhibovala rast 8 fekálnych kmeňov z celkového počtu 54 (14,8 %; viď tab. 1); 7 zástupcov z rodu *Enterococcus* a Gram-negatívny kmeň *Buttiauxella agrestis* 4/112/2. Z 36 Gram-pozitívnych baktérií bolo ku MLS EM 41/3 citlivých 7 kmeňov (19,4 %); z 18 Gram-negatívnych druhov bol inhibovaný 1 kmeň. Enterocín (Ent) M inhiboval rast 13 Gram-pozitívnych fekálnych kmeňov (36,1 %); 7 enterokokov, 5 streptokokov, *Aerococcus viridans* 2/0/a/H, a Gram-negatívny kmeň *Buttiauxella agrestis* 4/112/2. Ent M tak inhiboval sumárne 14 fekálnych kmeňov (25,9 %). Ku Ent A/P bolo citlivých 7 fekálnych zástupcov z rodu *Enterococcus*, 12 zástupcov z rodu *Streptococcus* (z 15 testovaných), *Aerococcus viridans* 2/0/a/H, kmeň *E. coli* K8 PL/1 a kmeň *Buttiauxella agrestis* 4/112/2. Inhibovaných bolo 20 Gram-pozitívnych, a 2 Gram-negatívne kmene (40,7 %). Ku Ent 2019 bolo citlivých 18 Gram-pozitívnych kmeňov a 2 Gram-negatívne kmene (37 %). Po ošetrení Ent 2019 bolo teda inhibovaných 20 z 54 fekálnych kmeňov; 7 enterokokov, 10 streptokokov, kmeň *Aerococcus viridans* 2/0/a/H, kmeň *E. coli* K8 PL/1 a kmeň *Buttiauxella agrestis* 4/112/2 (viď tab. 1).

Z celkového počtu 32 potravinových kmeňov bolo ku MLS EM 41/3 citlivých 15 kmeňov (46,8 %; viď tab. 1). Inhibovaných bolo 15 z 28 enterokokov. Ku Ent M bolo citlivých 27 z 32 potravinových enterokokov. Rast ostatných indikátorov nebol inhibovaný. Percentuálna úspešnosť inhibičnej aktivity Ent M proti potravinovým kmeňom bola 84,3 %. Ent A/P inhiboval 28 z 32 potravinových kmeňov enterokokov (87,5 %) izolovaných z tradičných fermentovaných mäsových produktov a mlieka. Ku Ent 2019 bolo citlivých 14 kmeňov z rodu *Enterococcus*. Ostatné kmene z potravín neboli citlivé ku Ent 2019; teda inhiboval 43,7 % kmeňov (viď tab. 1).

Tab. 1: Citlivosť fekálnych/intestinálnych, potravinových a klinických kmeňov ku enterocínom

	Počet inhibovaných kmeňov			
	MLS EM 41/3	**Ent M**	**Ent A/P**	**Ent 2019**
Fekálne kmene (n = 54)	8/54 (14,8 %)	14/54 (25,9 %)	22/54 (40,7 %)	20/54 (37 %)
Potravinové kmene (n = 32)	15/32 (46,8 %)	27/32 (84,3 %)	28/32 (87,5 %)	14/32 (43,7 %)
Klinické kmene (n = 42)	6/42 (14,2 %)	14/42 (33,3 %)	17/42 (40,4 %)	14/42 (33,3 %)

n – počet, EM – E. mundtii, MLS – Mundticín-like substancia; počet inhibovaných/počet testovaných

Ku MLS EM 41/3 bolo citlivých 6 Gram-pozitívnych klinických kmeňov, kmeň *Rothia amarae* 6Er a 5 kmeňov z 19 zástupcov rodu *Streptococcus*. Ent M inhiboval 33,3 % klinických kmeňov, medzi ktoré patrili Gram-pozitívne kmene enterokokov (inhibovaných bolo 5 zo 7 kmeňov) a streptokokov (inhibovaných bolo 9 z 19). Ent A/P inhiboval taktiež iba Gram-pozitívne klinické kmene (17), z čoho bolo 7 zástupcov z rodu *Enterococcus* a 10 kmeňov z rodu *Streptococcus* (viď tab. 1). Ku Ent 2019 boli citlivé 3 kmene z rodu *Enterococcus* a 11 kmeňov streptokokov. Gram-negatívne klinické kmene *Salmonella* Enteritidis neboli inhibované Ent 2019 (viď tab. 1).

Pri kompetitívnej interakcii bakteriocínov s Gram-pozitívnym indikátorom *E. faecalis* EE22a bola jeho inhibícia zaznamenaná pri štandardnej kultivácii až v neskorej logaritmickej fáze rastu a pri kultivácii v laboratórnom bioreaktore BioSAN s výnimkou Ent A/P a Ent 2019 to bolo v skorej logaritmickej fáze. Kmeň *E. durans* ED 20E1 bol inhibovaný precipitátmi v skorej logaritmickej fáze rastu; inhibícia kmeňa *E. faecium* B16 nastala v neskorej logaritmickej fáze. *Str. pneumoniae* 41 bol inhibovaný Ent A/P a Ent 2019 v logaritmickej fáze rastu a inhibícia pretrvala až 24 hodín. Inhibícia kmeňa *E. moraviensis* CCM466 po ošetrení Ent A/P začala v logaritmickej fáze rastu, a pretrvala až po dobu 24 hodín.

Gram-negatívny kmeň *E. coli* K8PL1 kultivovaný s MLS EM 41/3, Ent M a Ent 2019 bol inhibovaný v neskorej logaritmickej fáze. V prípade Ent A/P došlo ku inhibícii kmeňa *E. coli* K8PL1 už v skorej logaritmickej fáze s pretrvaním do neskorej logaritmickej fázy rastu. Inhibícia kmeňa *Buttiauxella agrestis* 4/112/2 s MLS EM 41/3 a Ent A/P začala v skorej logaritmickej fáze rastu a pretrvala po dobu 24 hodín. Rovnaká bola inhibícia aj pri kultivácii kmeňa *Buttiauxella agrestis* 4/112/2 s Ent 2019 a Ent M.

DISKUSIA

Z celkového počtu 128 indikátorových kmeňov, Gram-pozitívnych i Gram-negatívnych druhov (54 fekálnych, 32 potravinových kmeňov, 5 zbierkových kmeňov, 37 klinických kmeňov) bolo ku MLS EM 41/3 citlivých 29 kmeňov (22,6 %). Ku Ent M bolo citlivých 56 kmeňov (43,8 %); ku Ent A/P bolo citlivých 67 kmeňov (52,4 %) a ku Ent 2019 bolo citlivých 48 kmeňov (37,5 %). Najcitlivejšie boli Gram-pozitívne baktérie. Zo 128 kmeňov bolo aspoň jedným enterocínom inhibovaných 69 kmeňov (63,8 %); pričom všetky indikátorové enterokoky boli citlivé (100 %). Zo streptokokov bolo citlivých 24 z 34 testovaných (70,5 %); pričom kmene boli z rôznych zdrojov (trus králika, koní, bobra, z mlieka, fermentovanej salámy, ale aj zo zubných chráničov a streptokokov získaných pri *otitis media* detí). Lauková a kol. (1993) či Pogány Simonová a kol. (2020) popísali inhibíciu ruminálnych alebo fekálnych baktérií enterocínmi. Inhibičný účinok bakteriocínov na druhy streptokokov – pôvodcov *otitis media* bol publikovaný aj Laukovou a kol.

(2021). Biofilm-tvoriace streptokoky boli citlivé ku galidermínu, čo je lantibiotický bakteriocín produkovaný kmeňom *Staphylococcus gallinarum* TU 392 (Bierbaum a kol., 1996).

Ku použitým bakteriocínom boli citlivé fekálne kmene druhov *E. faecalis* (trus králika), *E. casseliflavus* (trus koní), *Buttiauxella agrestis* (trus srny), *E. faecium* (saláma), *E. durans* (ovčie mlieko), *Str. pneumoniae* (*otitis media*). Avšak 57 kmeňov nebolo citlivých ani k jednému bakteriocínu. Testované stafylokoky boli rezistentné ku enterocínom. Za *in vitro* podmienok stafylokoky často nevykazujú citlivosť k enterocínom, ale pri aplikácii enterocínov *in vivo* v chove brojlerových králikov dochádzalo k signifikantnej redukcii stafylokokov ($P < 0,001$; Lauková a kol., 2012). Je možné sa domnievať, že k uvedenej redukcii mohli prispieť i iné faktory, napr. pôsobenie kyseliny mliečnej niektorými druhmi prítomných baktérií. V rámci enterokokov boli kmene inhibované minimálne jedným bakteriocínom. Často platí, že najcitlivejšie k daným bakteriocínom sú práve baktérie rovnakého alebo blízkeho druhu, akými sú producenti týchto antibakteriálnych substancií (Franz a kol., 2007). Z Gram-negatívnych baktérií (20) boli aspoň jedným bakteriocínom inhibované 2 kmene; *E. coli* K8PL1 z trusu koňa a kmeň *Buttiauxella agrestis* 4/112/2 z trusu srny (10 %).

Najviac kmeňov prejavilo citlivosť ku Ent A/P (52,3 %); Gram-pozitívne aj Gram-negatívne baktérie. Zároveň pri Ent A/P bola zaznamenaná aj najvyššia inhibičná aktivita; pri indikátorových kmeňoch *E. faecium* B16 zo salámy a *E. durans* ED 26E/7 z mlieka (25 600 – 51 200 AU.ml^{1}). Najmenej (22,6 %) kmeňov bolo citlivých ku MLS EM 41/3 (bez rozdielu, či to boli Gram-pozitívne alebo Gram-negatívne kmene). Ent A/P, ktorého producentom je kmeň *E. faecium* EK13=CCM7419, bol aplikovaný v chove viacerých druhov zvierat s prospešnými účinkami, ako sú stimulácia fagocytárnej aktivity či inhibícia koliformných baktérií (Lauková a kol., 2003; 2006). Rovnako tak *in vitro* testovania potvrdili širokospektrálnu inhibičnú aktivitu Ent A/P (Mareková a kol., 2003). Ent A/P vykazuje výrazný antimikrobiálny účinok voči viacerým bakteriálnym druhom rôzneho pôvodu ako sú enterokoky, streptokoky, laktobacily, stafylokoky či listérie (Mareková a kol., 2003). Anti-listeriálny účinok Ent A/P bol potvrdený aj *in situ* pri jeho experimentálnych aplikáciách v potravinách (Lauková a Mareková, 2002).

K mundticínovej substancii (MLS EM 41/3), ktorá je produkovaná kmeňom izolovaným z trusu koňa plemena Norik muránsky boli najcitlivejšie práve baktérie izolované z konského trusu. Tento účinok je možné vysvetliť tým, že ide o bakteriocínovú substanciu produkovanú autochtónnym kmeňom (Focková a kol., 2022). Ku MLS EM 41/3, ale aj ku ostatným enterocínom boli citlivé však aj kmene enterokokov izolované zo salámy a mlieka, a kmene *Str. pneumoniae* izolované v prípadoch *otitis media* u detí. Je potrebné pripomenúť, že mundticíny z kmeňov izolovaných z trusu koní popísané doposiaľ neboli. Preto zistenie inhibičného spektra MLS EM 41/3 je úplne novým poznatkom.

Výraznou inhibičnou aktivitou sa vyznačuje aj Ent M. Jeho inhibičné účinky na rôzne bakteriálne druhy boli potvrdené ako *in vitro*, tak aj *in vivo* štúdiami. Napr. pri aplikácii Ent M, ale i jeho produkčného kmeňa *E. faecium* AL41 (CCM8558) v chovoch králikov, hydiny, pštrosov či v chove koní, bol zaznamenaný pokles koliformných baktérií, pseudomonád, stafylokokov, kampylobakterov a klostrídií. Rovnako prospešne možno hodnotiť aj vplyv Ent M na imunitný systém testovaných zvierat (Lauková a kol., 2012; 2015; 2018; 2020). Produkčný kmeň Ent M, *E. faecium* AL41 (CCM8558) preukázal aj dostatočnú adherenciu na humánnu mukózu (Lauková a kol., 2004). Kmeň produkujúci Ent 2019, teda *E. faecium* EF 2019 (CCM7420) je kmeň izolovaný z trusu králikov. Ent 2019 produkovaný autochtónnym kmeňom potvrdil svoje antimikrobiálne vlastnosti v chove brojlerových králikov, ale aj v *in vitro* testoch (Simonová a Lauková, 2007; Pogány Simonová a kol., 2009, 2020). Po podávaní kmeňa a aj Ent F2019 boli inhibovaní zástupcovia rodov *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* (Simonová a Lauková, 2007; Pogány Simonová a kol.,

2020).

Použité bakteriocíny majú široké spektrum účinku, ako to v prácach s využitím niektorých z uvádzaných bakteriocínov referujú Lauková a kol. (1993), Szabóová a kol. (2011), Pogány Simonová a kol. (2015; 2020). Vo všeobecnosti, enterocíny zväčša predstavujú bakteriocíny so širokým inhibičným spektrom účinku (Franz a kol., 2007; Nes a kol. 2014).

Keďže v tejto štúdii použité enterocíny inhibovali ako Gram-pozitívne, tak i Gram-negatívne baktérie, môžeme ich považovať za širokospektrálne bakteriocíny. Inhibičné účinky však môžu byť ovplyvnené rôznymi faktormi, medzi ktorými je najvýznamnejším faktorom štádium/fáza citlivosti indikátorového kmeňa, čiže v ktorej fáze rastu je testovaný kmeň najcitlivejší ku bakteriocínu (Franz a kol. 2007; Nes a kol. 2014), ako to napokon vyplýva aj z interakčných testov vybraných kmeňov s enterocínmi pri klasickej kultivácii, a taktiež pri kultivácii v laboratórnom bioreaktore BioSAN.

ZÁVERY

V súčasnosti narastá v mnohých oblastiach života záujem o prospešné baktérie a ich metabolity s cieľom ich využitia na prevenciu a udržanie zdravého chovu potravinových ako aj spoločenských zvierat, ale aj v ľudskej populácii. V tejto štúdii bol jednoznačne preukázaný inhibičný *in vitro* účinok bakteriocínov hlavne na Gram-pozitívnu intestinálnu mikrobiotu, ale aj na mikrobiotu z iného zdroja, a to aj pri interakčných testoch počas klasickej kultivácie indikátorového kmeňa s bakteriocínom, ako aj pri kultivácii v laboratórnom fermentore. Bakteriocíny enterocínového typu majú zväčša široké spektrum účinku, čo naznačujú aj výsledky dosiahnuté v tejto práci. Významným výsledkom je citlivosť kmeňov ku MLS EM 41/3, čo je nový typ enterocínu (produkovaný kmeňom *E. mundtii* z trusu koňa). Prezentované výsledky majú význam z hľadiska štúdia rozsahu spektra a interakčných účinkov bakteriocínov. Prispievajú do oblasti základného výskumu, ale sú tiež prínosom pre aplikačné využitie bakteriocínov so zámerom ich perspektívneho využitia vo farmaceutickom priemysle pre veterinársku alebo poľnohospodársku prax.

POĎAKOVANIE

Prezentované výsledky sú časťou a skrátenou formou rigoróznej práce R (173/22) s názvom „Interakcia intestinálnych baktérií s bakteriocínmi“, ktorú predložila a úspešne obhájila PharmDr. Valentína Focková pod vedením MVDr. Andrei Laukovej, CSc. (CBV SAV, v. v. i. ÚFHZ, Košice). Problematika riešená v rigoróznej práci vznikla v rámci riešenia tematiky v projektoch VEGA/2/000/17 (Bioaktívne substancie, ich význam a využitie pre zdravie zvierat) a v slovensko-poľskom projekte SK-PL (2019-2022): Benefits of bacteriocins application in horse diet (Prospešnosť bakteriocínov v diéte koní).

ZOZNAM LITERATÚRY

Bierbaum, G., Gotz, F., Peschel, A., Kupke, T., Van de Kamp, M., Sahl, H. G.: The biosynthesis of the lantibiotic epidermin, gallidermin, Pep5 and epilancin K7. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1996, 69 (2), 119 – 127.

Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M.: Bacteriocins: properties and potential use as antimicrobials. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2022, 36 (1).

De Vuyst, L., Callewaert, R., Pot, B.: Characterization of the antagonistic activity of *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 and large scale isolation of its bacteriocin Amylovorin L471. *Syst. Appl. Microbiol.*, 1996, 19 (1), 9 – 20.

Dolenčić Špehar, I., Bendelja Ljoljić, D., Petanjek, Z., Zamberlin, Š., Tudor Kalit, M., Samaržija, D.: Antimicrobial activity of bacteriocins of Lactic Acid Bacteria on *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* and *Clostridium tyrobutyricum* in cheese production. *Mljekarstvo*, 2020, 70 (3), 135 – 149.

Focková, V., Styková, E., Pogány Simonová, M., Maďar, M., Kačírová, J., Lauková, A.: Horses as a source of bioactive fecal strains *Enterococcus*

mundtii. *Vet. Res. Com.*, 2022, 46, 739 – 747.

Franz, Ch. M. A. P., Belkum, M. J. V., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., Gálvez, A.: Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2007, 31 (3), 293 – 310.

Lauková, A., Mareková, M., Javorský, P.: Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM4231. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1993, 16 (5), 257 – 260.

Lauková, A., Mareková, M.: A bacteriocin-mediated antagonism by *Enterococcus faecium* EK13 against *Listeria innocua* in tofu. *Archiv Lebensmittelhyg.*, 2002, 53, 28 – 30.

Lauková, A., Guba, P., Nemcová, R., Vasilková, Z.: Reduction of *Salmonella* in gnotobiotic Japanese quails caused by the Enterocin A-producing EK13 strain of *Enterococcus faecium*. *Vet. Res. Com.*, 2003, 27 (4), 275 – 280.

Lauková, A., Strompfová, V., Skřivanová, V., Volek, Z., Jindřichová, E., Marounek, M.: Bacteriocin-producing strain of *Enterococcus faecium* EK 13 with probiotic character and its application in the digestive tract of rabbits. *Biológia*, 2006, 61 (6), 779 – 782.

Lauková, A., Simonová, M., Strompfová, V., Štyriak, I., Ouwehand, A. C., Várady, M.: Potential of enterococci isolated from horses. *Anaerobe*, 2008, 14 (4), 234 – 236.

Lauková, A., Chrastinová, Ľ., Pogány Simonová, M., Strompfová, V., Plachá, I., Čobanová, K., Formelová, Z., Chrenková, M., Ondruška, Ľ.: *Enterococcus faecium* AL 41: its enterocin M and their beneficial use in rabbits husbandry. *Prob. Antimicrob. Prot.*, 2012, 4 (4), 243 – 249.

Lauková, A., Chrastinová, Ľ., Kandričáková, A., Ščerbová, J., Plachá, I., Pogány Simonová, M., Čobanová, K., Formelová, Z., Ondruška, Ľ., Strompfová, V.: Bakteriocínová substancia duracín-like ED26E/7 a jej experimentálne využitie v chove brojlerových králikov [Bacteriocin substance durancin-like ED26E/7 and its experimental use in broiler rabbits husbandry]. MASO-*Mäso*, 2015, 5, 56 – 59.

Lauková, A., Kandričáková, A., Buňková, L., Pleva, P., Ščerbová, J.: Sensitivity to enterocins of biogenic amine-producing faecal enterococci from ostriches and pheasants. *Prob. Antimicrob. Prot.*, 2017, 9, 483 – 491.

Lauková, A., Styková, E., Kubašová, I., Gancarčíková, S., Plachá, I., Mudroňová, D., Kandričáková, A., Miltko, R., Belzecki, G., Valocký, I., Strompfová, V.: Enterocin M and its beneficial effects in horses – a pilot experiment. *Prob Antimicrob. Prot.*, 2018, 10 (3), 420 – 426.

Lauková, A., Styková, E., Kubašová, I., Strompfová, V., Gancarčíková, S., Plachá, I., Miltko, R., Belzecki, G., Valocký, I., Pogány Simonová, M.: Enterocin M-producing *Enterococcus faecium* CCM 8558 demonstrating probiotic properties in horses. *Prob. Antimicrob. Prot.*, 2020, 12 (4), 1555 – 1561.

Lauková, A., Kandričáková, A., Bino, E.: Biofilm formation ability in *Streptococci* causing acute *otitis media* in children and their treatment with lantibiotic Gallidermin. *J. Med. Public Health*, 2021, 2, 29 – 33.

Mareková, M., Lauková, A., De Vuyst, L., Skaugen, M., Nes, I. F.: Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, 94 (3), 523 – 530.

Mareková, M., Lauková, A., Skaugen, M., Nes, I. F.: Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed Enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 34 (8), 533 – 537.

Maryam, H., Maqsood, S., Farooq, U.: Bacteriocins: a novel weapon against emerging resistance. *Saudi J. Pathol. Microbiol.*, 2017, 2 (7), 220 – 227.

Meade, E., Slattery, M. A., Garvey, M.: Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: resistance is futile? *Antibiotics*, 2020, 9 (1), 32.

Nes, I. F., Diep, D. B., Ike, Y.: Enterococcal

bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection.* Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

Pogány Simonová, M., Lauková, A., Plachá, I., Čobanová, K., Strompfová, V., Szabóová, R., Chrastinová, Ľ.: Can enterocins affect phagocytosis and glutathione peroxidase in rabbits? *Cent. Eur. J. Biol*., 2013, 8 (8), 730 – 734.

Pogány Simonová, M., Chrastinová, Ľ., Lauková, A.: Autochtonous strain *Enterococcus faecium* EF2019 (CCM7420), its bacteriocin and their beneficial effects in broiler rabbits – a review. *Animals*, 2020, 10 (7), 1188.

Simonová, M., Lauková, A.: Bacteriocin activity of enterococci from rabbits. *Vet. Res. Com.*, 2007, 31 (2), 143 – 152.

Szabóová, R., Lauková, A., Chrastinová, Ľ., Pogány Simonová, M., Strompfová, V., Plachá, I., Čobanová, K., Vasilková, Z., Chrenková, M.: Enterocin 4231 produced by *Enterococcus faecium* CCM 4231 and its use in rabbits. *Acta Vet. Beograd*, 2011, 61 (5 – 6), 523 – 529.

Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., Fang, J. Y.: Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Front. Microbiol*., 2014, 5, 241.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 3: 59 – 65, 2023

OVPLYVNENIE ANTICYTOTOXICKÝCH VLASTNOSTÍ EXTRAKTU REPÍKA LEKÁRSKEHO EXTRAKČNÝM ČINIDLOM

EFFECT OF EXTRACTION REAGENT ON BIOLOGICAL PROPERTIES OF SELECTED EXTRACTS OF AGRIMONY

Snaková, Marianna[1]; Marcinčáková, Dana[1]; Kolesárová, Mária[1]; Miłek, Michał [2]; Legáth, Jaroslav[1]

[1]Katedra farmakológie a toxikológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika
[2]Department of Chemistry and Food Toxicology
Institute of Food Technology and Nutrition University of Rzeszów, Ćwiklinskiej 1a, 35-601 Rzeszow
Poland

dana.marcincakova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo hodnotenie vplyvu extrakčného činidla (etanol v 30, 50 a 70 % koncentrácii) na biologické vlastnosti extraktov repíka lekárskeho (*Agrimonia eupatoria* L.). Monitorovaním modelového organizmu VERO buniek v reálnom čase pomocou xCELLigence systému (Real-Time Cell Analyser RTCA) počas 48 hodín sme sledovali adherenciu a proliferáciu buniek, ktorá prejavila signifikantný pokles so zvyšujúcou sa koncentráciou všetkých sledovaných extraktov (P < 0,001). Ako druhý bol použitý MTT test metabolickej aktivity buniek. Nižšie koncentrácie 125 a 250 µg.ml^{-1} spôsobili zvýšenie metabolickej aktivity ošetrovaných buniek (P < 0,001); zatiaľ čo najnižšia metabolická aktivita bola detegovaná pri najvyššej použitej koncentrácii 1000 µg.ml^{-1} etanolového extraktu. Koncentrácia extrakčného činidla ovplyvnila vlastnosti pripravených extraktov. Nižšie koncentrácie spôsobili nárast proliferácie a metabolickej aktivity, zatiaľ čo so stúpajúcou koncentráciou bol zaznamenaný výraznejší pokles proliferácie aj metabolickej aktivity buniek. Zaznamenali sme teda proliferatívne účinky repíka lekárskeho v nižších koncentráciách a cytotoxickú aktivitu so zvyšujúcou sa koncentráciou extraktu.

Kľúčové slová: biologická aktivita; proliferácia; repík lekársky; viabilita

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of extraction reagent (ethanol at a concentration of 30, 50 and 70 %) on the biological properties of

the extracts of agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.). By monitoring the model organism VERO cells in real time using xCELLigence system (Real-Time Cell Analyser RTCA) for 48 hours, we observed cell adherence and proliferation, which showed a significant decrease with increasing concentration of all extracts monitored (P < 0.001). MTT metabolic activity assay was used as a second one. Lower concentrations of 125 and 250 µg.ml^{-1} caused an increase in the metabolic activity of the treated cells (P < 0.001), while the lowest metabolic activity was detected at the highest concentration of 1000 µg.ml^{-1}. The concentration of the extractant influenced the properties of the prepared extracts. Lower concentrations caused an increase in proliferation and metabolic activity, while with increasing concentration, a more pronounced decrease in both proliferation and metabolic activity of the cells was noted. Thus, we recorded proliferative effects of agrimony at lower concentrations and cytotoxic activity with increasing concentration of the extract.

Key words: biological activity; proliferation; agrimony; viability

ÚVOD

Liečivé rastliny sa pokladajú za bohatý zdroj zložiek využiteľných pri terapeutických postupoch a vývoji syntézy liekov. Nakoľko väčšina z nich nebola doteraz súčasťou klinických skúšaní, majú potenciálne využitie v budúcich liečebných postupoch.

Repík lekársky (*Agrimonia eupatoria*) je rastlina patriaca do čeľade *Rosaceae* a rodu *Agrimonia* pôvodom z mierneho podnebného pásma, najmä zo severnej a strednej Európy, Ázie a Severnej Ameriky. Je trvácou rastlinou charakteristickou drobnými žltými kvetmi, krátkym podzemkom a stonkou s trichómami (Malheiros a kol., 2022). Patrí medzi rastliny so širokým využitím. Doterajšie vykonané štúdie potvrdzujú jeho antioxidačné, protizápalové, antibakteriálne, hepatoprotektívne, antidiabetické účinky inhibovaním α-glukozidázy a absorpciu glukózy, rovnako aj jeho pozitívny vplyv na rýchlosť hojenia rán. Imunoprotektívny vplyv dosahuje znižovaním prozápalových cytokínov a zvyšovaním cytokínov protizápalových. Vychytáva voľné radikály a interferuje s reguláciou NO a stimuluje expresiu antioxidačných enzýmov. Antiproliferatívne pôsobí na bunky karcinogénne bez ovplyvnenia zdravej bunkovej línie (Paluch a kol., 2020). Je pestrým zdrojom polyfenolov a bioaktívnych zlúčenín s potenciálom na terapeutické využitie, preto je zaujímavým subjektom na výskum a hodnotenie biologických vlastností v podmienkach *in vitro*.

Príprava liečivých rastlín na experimentálne účely je kľúčová k dosiahnutiu kvalitného výsledku výskumu. Spočíva v extrakcii a stanovení kvality a množstva bioaktívnych zložiek. Medzi rozpúšťadlá bežne používané pri extrakcii liečivých rastlín sa radia polárne rozpúšťadlá (napr. voda, alkoholy), stredné polárne (napr. acetón, dichlórmetán) a nepolárne rozpúšťadlá (napr. n-hexán, éter, chloroform) (Abubakar a Haque, 2020).

Správne zvolený typ rozpúšťadla v extrakčnom postupe je záruka úspešného stanovenia bioaktívnej zlúčeniny z rastlinnej vzorky. Nízka toxicita, ľahké odparovanie pri nízkej teplote, podpora rýchlej fyziologickej absorpcie extraktu, konzervačné pôsobenie a neschopnosť spôsobiť komplex alebo disociáciu extraktu sú vlastnosti dobrého rozpúšťadla. Keďže konečný produkt pri extrakcii bude obsahovať stopy zvyškového rozpúšťadla, rozpúšťadlo by malo byť netoxické a nemalo by interferovať s biologickým testom. Správne zvolené rozpúšťadlo závisí aj od látok, ktoré sa budú extrahovať (Gurjar a kol., 2012).

Cieľom štúdie je porovnanie biologických účinkov etanolových extraktov repíka lekárskeho, ktoré boli pripravené pomocou odlišných koncentrácií extrakčného činidla etanolu (30, 50, 70 %) a stanoviť vplyv týchto extraktov na proliferáciu a viabilitu modelového organizmu bunkovej kultúry VERO (epitelové bunky obličiek opice).

MATERIÁL A METODIKA

Extrakty rastliny repíka lekárskeho boli pripravené pomocou extrakčného činidla etanolu v rozličnej koncentrácii 30 %, 50 % a 70 % a následne boli lyofilizované a uchovávané do dňa experimentu. Pre testovanie boli extrakty nariedené sterilnou deionizovanou vodou tak, aby výsledné koncentrácie pôsobiace na bunky boli 125, 250, 500 a 1000 µg.ml^{-1}. Na hodnotenie biologickej aktivity bol použitý modelový organizmus buniek obličkového epitelu opice (VERO – CCL-81™, ATCC – American Type Culture Collection, USA).

Vplyv na proliferáciu buniek (xCELLigence system)

Schopnosť adhézie a proliferácie buniek bola analyzovaná xCELLigence systémom (Acea Bioscience, USA). Odlišná adherencia buniek na dno jamiek E-platne obsahujúcich zlaté elektródy vedie k zmenám impedancie, ktoré boli vyjadrené ako bunkový index (CI), ktorý je výsledným údajom zaznamenávajúcim sa do grafickej podoby pomocou xCELLigence softvéru. Experiment bol vykonaný podľa práce Miłek a kol. (2022).

Vplyv na viabilitu buniek (MTS test)

Na štúdium viability bol použitý test merania metabolickej aktivity buniek MTS test, počas ktorého bola sledovaná zmena sfarbenia žltej tetrazóliovej soli na fialový formazán, ktorého redukcia prebieha v mitochondriách životaschopných buniek (Miłek a kol., 2022). Z nameranej hodnoty absorbancie pomocou kontrolných buniek (metabolická aktivita 100 %) bolo vypočítané % metabolickej aktivity. Rovnako bolo pre lepšie porovnanie dosiahnutých výsledkov vypočítané aj % zmeny adherencie buniek pomocou kontrolných buniek, ktorých % adherencie bolo považované za 100 %.

Štatistické spracovanie výsledkov

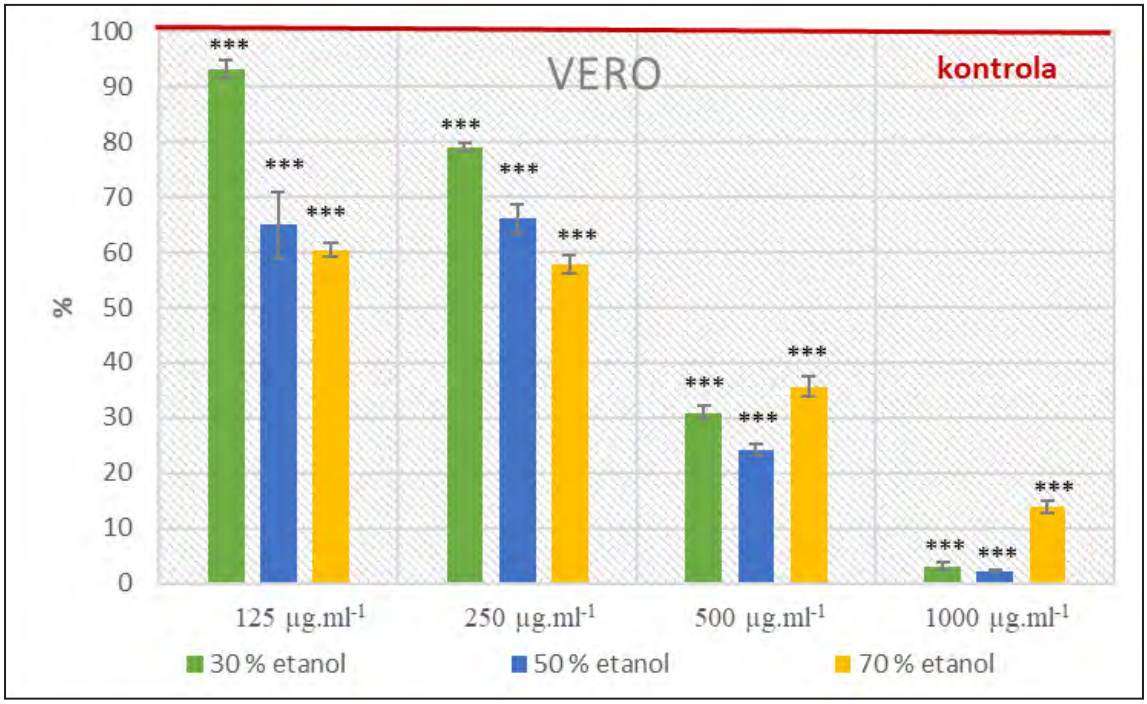
Výsledky boli spracované pomocou programu Microsoft Excell (2016) a štatistického programu Graph Pad Prism 8.3.1 (USA), jednocestným Anova testom, konkrétne Dunettovým porovnávacím testom. Hodnota $P < 0,05$ bola považovaná za štatisticky významný rozdiel oproti kontrolným bunkám bez vystavenia účinkom extraktov. Všetky merania boli vykonané v triplikátoch.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hodnotenie biologických vlastností vybraných extraktov z repíka v podmienkach *in vitro* bolo vykonané pomocou modelového organizmu VERO buniek z obličkového epitelu opice. Systémom xCELLigence sme analyzovali adherenciu buniek, ktoré boli ošetrené rôznymi etanolovými extraktami repíka lekárskeho každú hodinu počas 48 hodín trvania experimentu. Tento systém analyzuje len bunky adherované na dno platničky, kde sa nachádzajú zlaté mikroelektródy. V závislosti od adhezivity, jej sily a bunkovej morfológie sa mení interakcia buniek s mikroelektródami, ktorá je zaznačená ako zmena impedancie a jej miera vyjadrená ako bunkový index. VERO bunky boli ošetrované 30, 50 a 70 % etanolovými extraktami so štyrmi rôznymi koncentráciami 125, 250, 500 a 1000 µg.ml^{-1}. U všetkých sledovaných extraktov sme zaznamenali signifikantný pokles adherencie buniek oproti kontrole, ktorá predstavovala 100 % adherencie buniek bez ošetrenia repíkovými extraktami (viď graf 1). Adherencia mala klesajúci charakter v závislosti od koncentrácie použitých extraktov. Najnižšia adherencia bola pozorovaná u buniek vystavených účinku najvyššej sledovanej koncentrácie 1000 µg.ml^{-1}, a to vo všetkých etanolových extraktoch.

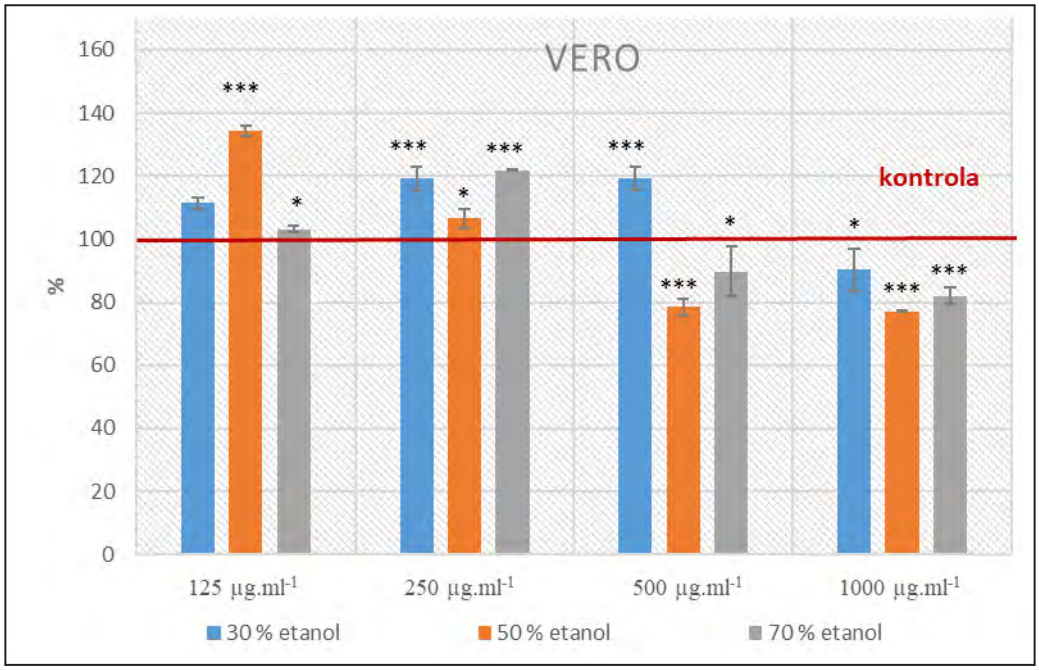
Antiproliferatívny účinok repíka, ktorý je závislý na koncentrácii extraktu zhodne v porovnaní s našimi výsledkami zistili Al-Bederi a Al-Sammarrae (2013), ktorí skúmali inhibičný účinok 8 rôznych koncentrácií vodného a metanolového extraktu repíka nie len na rast modelového organizmu ľudských buniek rabdomyosarkómu RD, ale aj na karcinogénnych bukových líniách HeLa metódou *in vitro*. Antiproliferatívny účinok bol selektívny len na bunky rakovinové a zároveň bol výsledný účinok závislý na koncentrácii

Graf 1: Porovnanie adherencie buniek VERO v 48. hodine pôsobenia extraktov



*** – P < 0,001 – štatisticky významná zmena oproti kontrole

Graf 2: Metabolická aktivita buniek po 48 hodinách pôsobenia extraktov repíka



* – P < 0,05; *** – P < 0,001 – štatisticky významná zmena oproti kontrole

Tab. 1: Porovnanie percentuálnych hodnôt adherencie a metabolickej aktivity buniek VERO 48 hodín po expozícii testovaným extraktom

koncentrácia µg.ml^{-1}		% adherencie	± sd	% metabolickej aktivity	± sd
etanol 30 %	125	93,13	± 0,06***	111,41	± 1,86***
	250	78,98	± 6,50***	119,34	± 3,52***
	500	30,88	± 1,36***	119,37	± 3,76***
	1000	2,99	± 0,67***	90,34	± 6,78*
etanol 50 %	125	64,91	± 5,34***	134,41	± 1,67***
	250	66,06	± 1,27***	106,48	± 2,98*
	500	24,22	± 0,49***	78,52	± 2,6***
	1000	2,24	± 0,19***	77,1	± 0,17***
etanol 70 %	125	60,38	± 2,02***	103,06	± 1,01*
	250	57,73	± 1,87***	121,87	± 0,33***
	500	35,58	± 2,04***	89,76	± 7,98*
	1000	13,82	± 0,23***	82,03	± 2,54***

* – P < 0,05 a *** – P < 0,001 – štatisticky významná zmena oproti kontrole

a dobe inkubácie, pretože extrakty s tromi najnižšími koncentráciami 1,0; 2,0; 3,0 µg.ml^{-1} nevykazovali nijakú účinnú inhibíciu rastu, naopak extrakt s najvyššou koncentráciou 96,0 vykazoval najvyššie percento inhibície rastu počas troch časových úsekov analýzy. Antiproliferatívne účinky sa pripisujú obsahovým zložkám repíka, najmä flavonoidom a polyfenolom.

Vplyv extraktu repíka lekárskeho na modelový organizmus metódou *in vitro* bol popísaný aj v štúdii Marcinčáková a kol. (2022), v ktorej bol potvrdený vplyv etanolového extraktu repíka proti enviromentálnemu účinku bisfenolu A (BPA) využitím črevných epitelových buniek prasaťa IPEC-1. Najnižšie hodnoty bunkového indexu boli zaznamenané pri najvyšších koncentráciách 100 a 200 µg.ml^{-1} extraktu repíka v porovnaní s kontrolou bez ošetrenia.

V ďalšej časti experimentu sme stanovovali životaschopnosť buniek meraním ich metabolickej aktivity MTT testom. Výsledky sú uvedené v grafe 2. Metabolická aktivita bola vyhodnotená po 48 hodinách od exponovania modelového organizmu testovaným extraktom. Vitalita buniek pre jednotlivé koncentrácie extraktov repíka bola vyhodnotená ako percento metabolickej aktivity vzhľadom na kontrolné bunky bez ošetrenia extraktami. Po 48 hodinách bol zaznamenaný signifikantný nárast metabolickej aktivity buniek ošetrených najnižšími koncentráciami (125 a 250 µg.ml^{-1}) extraktov. So zvyšujúcou sa koncentráciou bol zaznamenaný výrazný pokles životaschopnosti buniek. V prípade buniek, ktoré boli exponované extraktom v koncentrácii 500 a 1000 µg.ml^{-1} (50 a 70 % etanolu) bol detegovaný výrazný pokles metabolizmu v porovnaní s bunkami neošetrenými pripravenými extraktami repíka. Koncentrácia použitého extrakčného činidla mala mierny vplyv na bunkovú odpoveď, metabolická aktivita stúpla najvýraznejšie pri nižších koncentráciách extraktu repíka pripraveného pomocou 30 % etanolu, zatiaľ čo najvýznamnejší pokles metabolickej aktivity aj adherencie spôsobil extrakt pripravený pomocou 70 % etanolu.

Odlišnosť výsledkov analýz experimentu je pochopiteľná z dôvodu rôznych princípov použitých výskumných metód a iných faktorov. A preto bunky, ktoré majú vyhodnotený pokles adherencie, môžu stále vykazovať zvýšenú metabolickú aktivitu, a naopak. Prehľad a porovnanie hodnotených zmien sú sumarizované v tabuľke 1.

Získané výsledky je možné porovnať s japonskou

štúdiou, v ktorej Cojocaru-Toma (2020) vykonával štúdium cytotoxického potenciálu stanovovaných extraktov z repíka lekárskeho na metabolizmus pečeňových buniek pomocou MTT testu. Zhodne zistil, že najvyššia analyzovaná koncentrácia 1000 µg.ml^{-1} spôsobila najnižšiu životaschopnosť testovaných buniek 49,9 % a metabolická aktivita klesala so zvyšujúcou sa koncentráciou extraktu repíka.

V najnovšej štúdii Tsirigotis-Maniecka a kol. (2023) analyzovali cytotoxicitu extraktov repíka lekárskeho v koncentráciách v rozmedzí od 1,9 do 1000 µg.ml^{-1} na dvoch typoch bunkových línií, a to zdravých a rakovinových bunkách, konkrétne meraním rastu bunkovej línie ľudského adenokarcinómu pľúc (A549) a myšacích fibroblastových buniek (L929). Z výsledkov stanovili netoxické pôsobenie extraktu až do koncentrácie 500 µg.ml^{-1}. Toxické pôsobenie bolo zachytené pri koncentrácii 1000 µg.ml^{-1}, čo sa prejavilo premenou morfológie buniek, prítomnosťou granúl v cytoplazme s nastávajúcou smrťou buniek.

Na druhej strane, zistený proliferatívny účinok repíka lekárskeho v nižších koncentráciách má potenciálne využitie v terapii hojenia rán. Vasilenko a kol. (2022) v nedávnej slovenskej štúdii vyhodnocovali bunkovú proliferáciu sledovaním reepitelizácie a tvorby granulačného tkaniva *in vivo* a farbením antigénu Ki67 *in vitro*. Zistili pozitívny nárast počtu fibroblastov v mieste rany a rýchlejšiu epidermálnu regeneráciu po ošetrení repíkom. Expresia Ki67 bola závislá od koncentrácie. Najvýraznejší poliferatívny účinok mal extrakt repíka s najnižšou koncentráciou. Všetky testované koncentrácie pôsobili proliferatívne, okrem najvyššej, ktorá inhibovala rast buniek, teda preukázala antiproliferatívny účinok.

ZÁVER

Biologické vlastnosti extraktov repíka boli hodnotené u etanolových extraktov pripravených pomocou 30, 50 a 70 % etanolu pomocou modelového organizmu buniek VERO, ktoré pochádzajú z epitelu obličiek opice.

Systémom xCELLigence (Real-Time Cell Analyser RTCA) sme monitorovali bunkovú odpoveď v reálnom čase (počas 48 hodín), respektíve adherenciu buniek exponovaných etanolovým extraktom repíka. Vo všetkých testovaných koncentráciách sme zaznamenali signifikantné zníženie adherencie buniek oproti kontrolným bunkám bez exponovania pripraveným extraktom. Najvýraznejší pokles adherencie buniek bol detegovaný pri najvyššej použitej koncentrácii 1000 µg.ml^{-1} etanolového extraktu, pričom adherencia klesala so zvyšujúcou sa koncentráciou extraktov.

Kolorimetrickým testom MTT sme hodnotili zmeny metabolickej aktivity testovaných buniek, ktoré boli rovnako ošetrované etanolovými extraktami repíka testovanej koncentrácie. Bunky vystavené najnižším koncentráciám (120 a 250 µg.ml^{-1}) sledovaných extraktov a koncentrácii 500 µg.ml^{-1} (30 % etanolový extrakt) vykazovali signifikantný nárast metabolickej aktivity ($P < 0,05$). So zvyšujúcou sa koncentráciou extraktov repíka sme sledovali výrazný pokles metabolizmu modelových buniek ($P < 0,001$).

Na základe zistených výsledkov môžeme potvrdiť proliferatívne účinky repíka lekárskeho v nižších koncentráciách a antiproliferatívnu aktivitu so zvyšujúcou sa koncentráciou extraktu. Potenciál repíka vo využívaní pri terapii ochorení, či v podpornej liečbe bol potvrdený aj v našej práci, nevyhnutná je však správna voľba extrakčného činidla a aj výber vhodných koncentrácií extraktov vzhľadom na požadovaný farmakoterapeutický zámer.

POĎAKOVANIE

Štúdia vznikla vďaka podpore Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0039 a Národného referenčného laboratória pre pesticídy Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

ZOZNAM LITERATÚRY

Abubakar, A., Haque, M.: Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of*

Pharmacy And Bioallied Sciences, 2020, 12 (1), 1 – 10. <http://dx.doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19>. Accessed December 14, 2022.

Cojocaru-Toma, M.: *Agrimonia eupatoria* L. as a source of biologically active compounds. *Perspectives of world science and education*. Osaka: CPN Publishing Group, 2020. 18 – 27.

Gurjar, M. S., Ali, S., Akhtar, M., Singh, K. S.: Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences*, 2012, 3 (3), 425 – 433. <http://dx.doi.org/10.4236/as.2012.33050>. Accessed December 14, 2022.

Maltheiros, J, Simões, D. M., Antunes, P. E., Figueirinha, A., Dulce Cotrim, M., Fonseca1, D. A.: Vascular effects of polyphenols from *Agrimonia eupatoria* L. and role of isoquercitrin in its vasorelaxant potential in human arteries. *Pharmaceuticals*, 2022, 15 (5), 638. <https://doi.org/10.3390/ph15050638>. Accessed December 11, 2022.

Marcinčáková, D., Kolesárová, M., Falis, M., Horn, Ch., Miłek, M., Legáth, J.: Potential role of *Agrimonia eupatoria* L. extract in cell proliferation against toxicity induced by bisphenol A. *Folia Veterinaria*, 2022, 66 (1), 33 – 41. <https://doi.org/10.2478/fv-2022-0004>. Accessed January 12, 2023.

Miłek, M., Marcinčáková, D., Kolesárová, M., Legáthová, D., Dzugan, M.: The effect of adding spices to green walnut tinctures on their polyphenolic profile, antioxidant capacity and action on renal cells. *Applied Sciences*, 2022, 12 (7), 1 – 13. <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/7/3669>. Accessed December 11, 2022.

Paluch, Z., Biriczová, L., Pallag, G., Marques, E. C., Vargová, N., Kmoníčková, E.: The therapeutic effects of *Agrimonia eupatoria* L. *Physiological Research*, 2020, 69 (Suppl. 4), S555 – S571. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934641>. Accessed December 1, 2022.

Tsirigotis-Maniecka, M., Zaczyńska, E., Czarny, A., Jadczyk, P., Umińska-Wasiluk, B., Gancarz, R., Pawlaczyk-Graja, I.: Antioxidant and protective effects of the polyphenolic glycoconjugate from *Agrimonia eupatoria L.* herb in the prevention of inflammation in human cells. *Journal of Functional Biomaterials*, 2023, 14 (4), 182. <https://doi.org/10.3390/jfb14040182>. Accessed December 17, 2022.

Vasilenko, T., Kováč, I., Slezák, M., Ďurkáč, J., Peržeľová, V., Čoma, M., Kaňuchová, M., Urban, L., Szabo, P., Dvořánková, B., Vrzgula, A., Zajíček, R., Smetana, K. Jr., Gál, P.: *Agrimonia eupatoria L.* aqueous extract improves skin wound healing: an *in vitro* study in fibroblasts and keratinocytes and *in vivo* study in rats. *In vivo*, 2022, 36 (3), 1236 – 1244. < https://doi.org/10.21873/invivo.12822>. Accessed December 5, 2022.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 3: 66 – 75, 2023

ŠTÚDIUM ÚČINKU *VALERIANA OFFICINALIS* NA *ARTEMIA FRANCISCANA*

A STUDY OF THE EFFECT OF *VALERIANA OFFICINALIS* ON *ARTEMIA FRANCISCANA*

Hudáková, Nikola[1]; Gregušová, Jana[2]; Beňová, Katarína[2]; Čížková, Daša[1]

[1]Centrum experimentálnej a klinickej regeneračnej medicíny
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
[2]Katedra biológie a fyziológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

nikola.hudakova@student.uvlf.sk

ABSTRAKT

V experimente sme zisťovali toxicitu rastliny valeriána lekárska (*Valeriana officinalis* L.) z čeľade *Caprifoliaceae* Juss. na *Artemia franciscana* Kellogg. Pripravili sme tri rôzne vodné výluhy (macerát, zápar a odvar) v dvoch rôznych koncentráciách. V priebehu 96 hodín sme každých 24 hodín sledovali a zaznamenávali letalitu *Artemia franciscana* Kellogg vo všetkých skupinách. Po vyhodnotení a štatistickom spracovaní výsledkov sme toxicitu *Valeriana officinalis* L. na *Artemia franciscana* Kellogg potvrdili. Všetky tri vodné výluhy (macerát, zápar a odvar) vykázali toxicitu voči *Artemia franciscana* Kellogg. Na základe výsledkov experimentu sme zistili, že zo všetkých vodných výluhov bol najviac toxický macerát, ktorý bol pripravený 24-hodinovým lúhovaním pri laboratórnej teplote zo sušenej homogenizovanej drogy *Valerianae radix*.

Kľúčové slová: *Artemia franciscana*; toxicita; *Valeriana officinalis*

ABSTRACT

In the experiment, we investigated the toxicity of the valerian plant (*Valeriana officinalis* L.) from the family *Caprifoliaceae* Juss. on *Artemia franciscana* Kellogg. We prepared three different water extracts (macerate, infusion and decoction) in two different concentrations. *Artemia franciscana* Kellogg lethality in all groups was monitored and recorded every 24 hours during the period of 96 hours. After the evaluation and statistical processing of the results, we confirmed the toxicity of *Va-*

***leriana officinalis* L. on *Artemia franciscana* Kellogg. All three aqueous extracts (macerate, brew and decoction) showed toxicity to *Artemia franciscana* Kellogg. Based on the results of the experiment, we found that the most toxic of all aqueous extracts was the macerate, which was prepared by infusing for 24-hours at laboratory temperature from the dried homogenized drug *Valerianae radix*.**

Key words: *Artemia franciscana*; toxicity; *Valeriana officinalis*

ÚVOD

Valeriána lekárska (*Valeriana officinalis* L.) je trváca bylina z čeľade *Caprifoliaceae* Juss. (viď tab. 1). Na Slovensku má mnohé ľudové názvy ako baldrián, paldran, odolen alebo v češtine kozlík lékařský (Tůmová, 2008; Martin a Martinová, 2014).

Tab. 1: Taxonomické zaradenie valeriány lekárskej

Ríša	*Plantae* Haeckel
Kmeň	*Tracheophyta* Sinnott ex Caval.-Sm.
Trieda	*Spermatopsida*
Rad	*Dipsacales* Juss. ex Bercht. & J. Presl
Čeľaď	*Caprifoliaceae* Juss.
Rod	*Valeriana* L.
Druh	*Valeriana officinalis* Linnaeus

Zdroj: WFO, 2023

Medzi najdôležitejšie obsahové látky tejto rastliny patria: silice (0,3 – 2,1 %); seskviterpénové kyseliny, valepotriáty (0,1 – 2 %); lignány (0,2 %); stopy alkaloidov, voľné aminokyseliny, škrob, rôzne sacharidy (glukóza, fruktóza, sacharóza, rafinóza), fenolové kyseliny a voľné mastné kyseliny (Kubelka, 2011; Lunz a Stappen, 2021). Aj napriek intenzívnemu výskumu nie sú účinky rastliny úplne objasnené (Shinjyo a kol., 2020; Jenabi a kol., 2023). Presný mechanizmus sedatívneho účinku tiež nie je úplne známy. Zistilo sa, že extrakty z valeriány inhibujú aktivitu GABA transaminázy, čím zvyšujú koncentráciu samotnej GABA v synaptických štrbinách mozgu (Murphy a kol., 2010). GABA-ergný mechanizmus je najčastejšie pripisovaný kyseline valerénovej a jej aldehydu – valerenalu (Adel Pilerood a Prakash, 2014; Rafiee a kol., 2018). Niektoré obsahové látky zároveň interagujú s GABA-ergným systémom a mechanizmus je preto podobný benzodiazepínom (Fernández a kol., 2004; Shinjyo a kol., 2020; Lunz a Stappen, 2021).

Valeriána sa obvykle užíva perorálne na liečbu insomnie, dyssomnie, nepokoja, úzkosti a depresie. Medzi ďalšie aplikácie patria napríklad žalúdočné ťažkosti, liečba kŕčov hladkých svalov, miernych tremorov, syndrómu chronického vyčerpania, bolesti svalov a kĺbov, liečba psychických stresových stavov ako sú hysterické stavy, excitabilita, hypochondria, bolesti hlavy a migréna (Msomi a kol., 2018; Jenabi a kol., 2023). Medzi účinky, ktoré sú podporované klinickými dátami, patrí len použitie ako mierne sedatívum a spánok navodzujúca a podporujúca látka. Droga sa často používa ako miernejšia alternatíva alebo možná substitúcia silnejších syntetických sedatív, ako sú benzodiazepíny, pri liečbe stavov nervového napätia a úzkostných porúch spánku (World Health Organization, 1999; Shinjyo a kol.; 2020, Madari a kol., 2021). Éterický olej a extrakt sa tiež využívajú ako dochucovadlá potravín a nápojov (Adel Pilerood a Prakash, 2014; Lunz a Stappen, 2021).

Korene valeriány sú používané na výrobu kapsúl, tabliet, tekutých extraktov a čajov (Barrett, 2005). Apretácia, teda príprava rastliny pred sušením štandardne pozostáva zo zberu, umytia, sušenia a rezania (Eftimová a Habán, 2012). Vysušený materiál je následne extrahovaný vodou a/alebo alkoholom (Isetts, 2007). Tiež bolo opísané použitie superkritického oxidu uhličitého (CO_2) na prípravu extraktu valeriány (Zizovic a kol., 2007). Taktiež bola popísaná kompletná syntéza kyseliny valerénovej (Wong a kol., 2018).

V experimente sme sledovali a ohodnotili účinok *Valeriana officinalis* L. na *Artemia franciscana* Kellogg. Cieľom experimentu bolo sledovanie vplyvu výluhov tejto rastliny na letality žiabronôžok v rôz-

Tab. 2: Spôsob prípravy jednotlivých vodných extraktov

Skupina	Koncentrácia	Spôsob prípravy
P1 – macerát	12 $g.l^{-1}$	sušený, rozdrvený koreň sme 24 hodín lúhovali pri laboratórnej teplote
P2 – macerát	48 $g.l^{-1}$	sušený, rozdrvený koreň sme 24 hodín lúhovali pri laboratórnej teplote
P3 – zápar	12 $g.l^{-1}$	sušený, rozdrvený koreň sme zaliali vriacou vodou a 15 minút lúhovali v prikrytej nádobe
P4 – zápar	8 $g.l^{-1}$	sušený, rozdrvený koreň sme zaliali vriacou vodou a 15 minút lúhovali v prikrytej nádobe
P5 – odvar	6 $g.l^{-1}$	sušený, rozdrvený koreň sme 15 minút varili v prikrytej nádobe
P6 – odvar	24 $g.l^{-1}$	sušený, rozdrvený koreň sme 15 minút varili v prikrytej nádobe

nych časových intervaloch a následné spracovanie výsledkov, ich analýza a stanovenie toxicity *Valeriana officinalis* L.

MATERIÁL A METÓDY

Naupliá *Artemia franciscana* Kellogg

Na experimenty sme použili naupliá *Artemia franciscana* Kellogg, čerstvo vyliahnuté vývinové štádia žiabronôžky. Naupliá sme získali po vložení cýst do morskej vody s presne definovaným zložením. Morská voda slúžila ako médium potrebné na liahnutie na prípravu vodných výluhov z rastliny. Vibračný membránový kompresor bol využitý na zaistenie vhodných podmienok liahnutia v premývacej fľaši (vyhovujúce množstvo kyslíka a neustála cirkulácia cýst). Aby sme zabezpečili vyliahnutie dostatočného počtu jedincov do 24 hodín, teplotu morskej vody sme udržiavali pomocou termostatu (25 °C).

Test akútnej toxicity

Experiment prebiehal 96 hodín. Žiabronôžky neboli kŕmené, preto sme predpokladali, že po 120 hodinách došlo k ich úhynu, ktorý bol spôsobený nedostatkom potravy a vyhladovaním jedincov. Keďže je dokázané, že uhynuté žiabronôžky nemajú nepriaznivý vplyv na výsledok testu, zo vzoriek sme ich neodstraňovali. Za uhynuté boli považované len tie jedince, ktoré počas minimálne 10 sekúnd stáleho pozorovania nevykazovali žiaden pohyb v médiu v miske a zároveň nevykazovali ani minimálny pohyb ktorejkoľvek časti tela, a to ani po stimulácii vyvolanej pohybom misky a rozvírením hladiny. Test je platný vtedy, keď letalita *Artemia franciscana* Kellogg v kontrolnej skupine neprekročí hranicu 10 %. Spolu sme testovali 6 rôznych výluhov z drogy. Každá zo 6 experimentálnych skupín pozostávala z 50 jedincov, ktorí boli rozdelení do 5 samostatných misiek tak, aby každá miska obsahovala presne 10 jedincov a 10 ml konkrétneho vodného výluhu z valeriány lekárskej. Kontrolná skupina obsahovala 5 misiek, pričom v každej miske sa nachádzala len morská voda o objeme 10 ml a 10 čerstvo vyliahnutých jedincov. Pomocou plastovej Pasteurovej pipety sme do pripravených Petriho misiek s morskou vodou alebo výluhom vložili 10 kusov práve vyliahnutých žiabronôžok a vzorku sme prikryli viečkom. Test prebiehal v tmavom prostredí, v termostate nastavenom na teplotu 21 ± 1°C . Počas 4 dní sme každých 24 hodín (po 24, 48, 72 a 96 hodinách) počítali živé žiabronôžky a zaznamenávali ich letalitu v jednotlivých experimentálnych aj kontrolných vzorkách (viď tab. 2). Jedince sme počítali voľným okom alebo pomocou lupy. Kvôli lepšej viditeľnosti a uľahčeniu počítania boli misky umiestnené na čiernej podložke a osvetlené bočným svetlom.

Tab. 2: Spôsob prípravy jednotlivých vodných extraktov

Skupina	Koncentrácia	Spôsob prípravy
P1 – macerát	12 $g.l^{-1}$	sušený, rozdrvený koreň sme 24 hodín lúhovali pri laboratórnej teplote
P2 – macerát	48 $g.l^{-1}$	sušený, rozdrvený koreň sme 24 hodín lúhovali pri laboratórnej teplote
P3 – zápar	12 $g.l^{-1}$	sušený, rozdrvený koreň sme zaliali vriacou vodou a 15 minút lúhovali v prikrytej nádobe
P4 – zápar	8 $g.l^{-1}$	sušený, rozdrvený koreň sme zaliali vriacou vodou a 15 minút lúhovali v prikrytej nádobe
P5 – odvar	6 $g.l^{-1}$	sušený, rozdrvený koreň sme 15 minút varili v prikrytej nádobe
P6 – odvar	24 $g.l^{-1}$	sušený, rozdrvený koreň sme 15 minút varili v prikrytej nádobe

Tab. 3: Signifikantné rozdiely preukázateľnosti pre 50 jedincov

skupina s minimálnym efektom	0	4	10	20	30	40	50	60	70	80	90
skupina s maximálnym efektom	12	16	26	38	50	60	70	80	88	94	–

Zdroj: Hayes a Laws, 1991

Príprava vzoriek

Na prípravu vodných extraktov bol použitý prípravok od firmy Juvamed (Juvamed s. r. o., Slovensko) – sušený, sypaný koreň valeriány lekárskej, ktorý sme rozdrvili pomocou mažiara.

Štatistické spracovanie výsledkov

Kvalitatívne znaky, ktoré sme sledovali, boli úhyn alebo prežívanie. V každej skupine sme testovali 50 homogénnych jedincov, ktorých sme rozdelili do piatich samostatných skupín – misiek presne po 10 jedincov. Vo všetkých skupinách bola zachovaná rovnorodosť podmienok. Počet skupín sme v tabuľkách označili pomocou písmena n. Príčinami variability, ktorá vznikla medzi jednotlivými skupinami, môže byť intravitálna rôznorodosť prežívania naupliových vývinových štádií žiabronôžok alebo náhodné vplyvy. Veľkosť daných vplyvov sa dá s určitou pravdepodobnosťou odhadnúť len metódami matematickej štatistiky. Ako stredná hodnota úhynu v jednotlivých skupinách bol vypočítaný aritmetický priemer (x) z piatich testovaných misiek, ktoré patrili do jednej experimentálnej skupiny. Ako miera variácie bola stanovená smerodajná odchýlka jedného merania „s“, ktorá sa vypočíta podľa vzorca určeného pre rozsah súboru menší než 8: s = R . kn, kde R predstavuje variačné rozpätie a vypočíta sa ako rozdiel maximálneho a minimálneho úhynu pre každú, jednotlivú zo skupín samostatne ($R = x_{max} – x_{min}$). A kde kn je koeficient, ktorého hodnota pre 5 misiek je 0,430.

Rozdiely medzi priemermi jednotlivých pokusov sme následne otestovali za pomoci signifikantných rozdielov preukázateľnosti (Hayes a Laws, 1991); ktoré sú uvedené v tabuľke 3. Výsledky sme štatisticky spracovali (viď tab. 4) pomocou programu Excel a zobrazili vo forme grafov.

Tab. 4: Letalita (%) *Artemia francisana* po vystavení pôsobeniu macerátu, záparu a odvaru zo sušeného, rozdrveného koreňa valeriány lekárskej s rôznymi koncentráciami

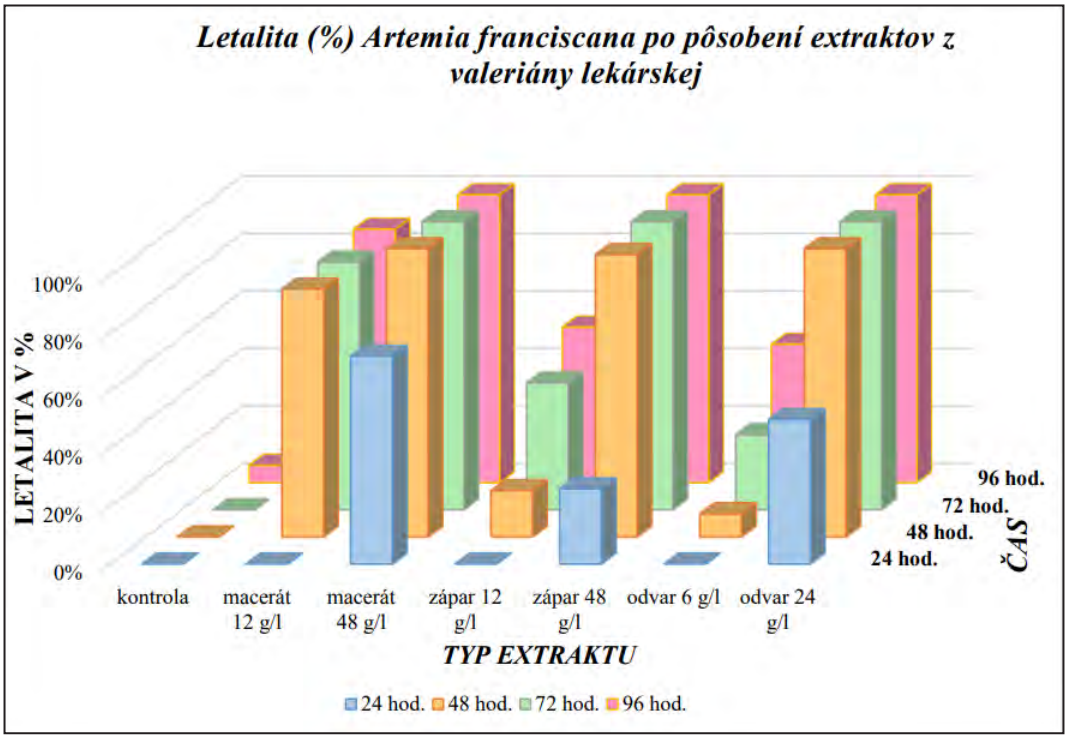
čas		**24 hod**			**48 hod**			**72 hod**			**96 hod**	
skupina experimentu	x	n	S	x	n	S	x	n	S	x	n	S
K – kontrola	**0**	5	0	**0**	5	0	**0**	5	0	**6**	5	4,3
P1 – macerát s konc. 12 $g.l^{-1}$	**0**	5	0	**86***	5	12,9	**86***	5	12,9	**88***	5	12,9
P2 – macerát s konc. 48 $g.l^{-1}$	**72***	5	12,9	**100***	5	0	**100***	5	0	**100***	5	0
P3 – zápar s konc. 12 $g.l^{-1}$	**0**	5	0	**16***	5	4,3	**44***	5	12,9	**54***	5	12,9
P4 – zápar s konc. 48 $g.l^{-1}$	**26***	5	12,9	**98***	5	4,3	**100***	5	0	**100***	5	0
P5 – odvar s konc. 6 $g.l^{-1}$	**0**	5	4,3	**8**	5	4,3	**26**	5	12,9	**48**	5	12,9
P6 – odvar s konc. 24 $g.l^{-1}$	**50***	5	12,9	**100***	5	0	**100***	5	0	**100***	5	0

X – priemerná letalita v %
N – počet testovaných skupín
S – smerodajná odchýlka
* – štatisticky zvýšená letalita v testovanej skupine v porovnaní s kontrolnou skupinou

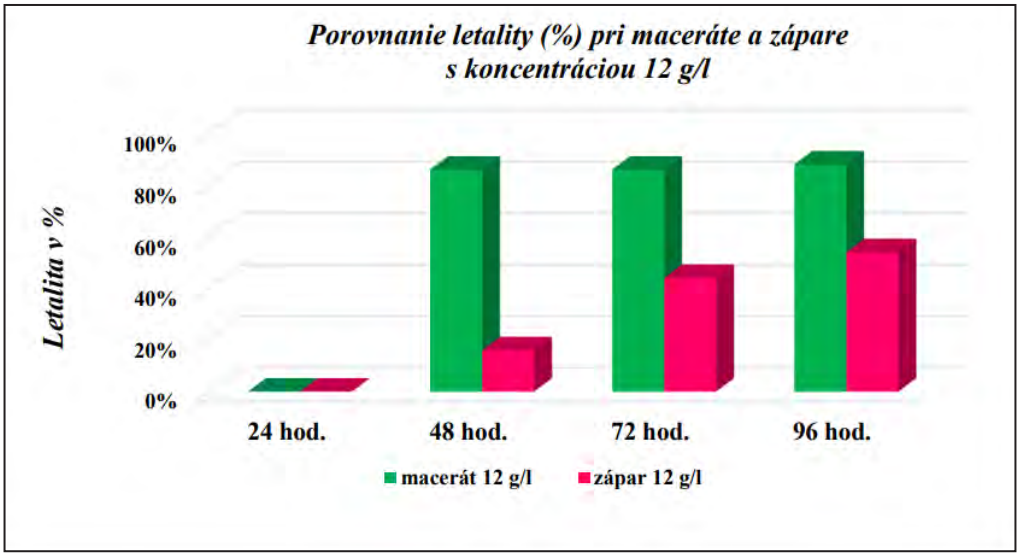
VÝSLEDKY

V kontrolne skupine sme pozorovali letalitu *Artemia franciscana* Kellogg na úrovni 0 % po 24, 48 aj 72 hodinách (viď obr. 1). Po 96 hodinách už bola letalita v kontrolnej skupine na úrovni 6 %. Po 24 hodinách sme zaznamenali štatisticky významne zvýšenú letalitu artémií v experimentálnej skupine macerátu s vyššou koncentráciou (48 $g.l^{-1}$) aj záparu s vyššou koncentráciou (48 $g.l^{-1}$) a v skupine odvaru s vyššou koncentráciou (24 $g.l^{-1}$) oproti kontrolnej skupine. V 24. hodine sme zaznamenali štatisticky významne zvýšenú letalitu artémií v experimentálnej skupine macerátu s vyššou koncentráciou (48 $g.l^{-1}$) oproti skupine macerátu s nižšou koncentráciou (12 $g.l^{-1}$) (viď obr. 2). V 24. hodine sme zaznamenali aj štatisticky významne zvýšenú letalitu artémií v experimentálnej skupine macerátu s vyššou koncentráciou (48 $g.l^{-1}$) oproti skupine záparu s vyššou koncentráciou (48 $g.l^{-1}$) (viď obr. 3). Po 48 hodinách sme zaznamenali štatisticky významne zvýšenú letalitu artémií vo všetkých skupinách okrem skupiny odvaru s nižšou koncentráciou (6 $g.l^{-1}$) oproti kontrolnej skupine. Po 48 hodinách sme v skupine macerátu s nižšou koncentráciou (12 $g.l^{-1}$) začali pozorovať výrazne spomalený pohyb jedincov oproti ostatným skupinám. Jedince sa nepohybovali v celom médiu, ale vykazovali mihotavý pohyb na mieste. Po 72 a 96 hodinách sme už zaznamenali štatisticky významne zvýšenú letalitu artémií vo všetkých skupinách oproti kontrolnej skupine. Po 72 hodinách sme v skupine záparu s nižšou koncentráciou (12 $g.l^{-1}$) a po 96 hodinách v skupine

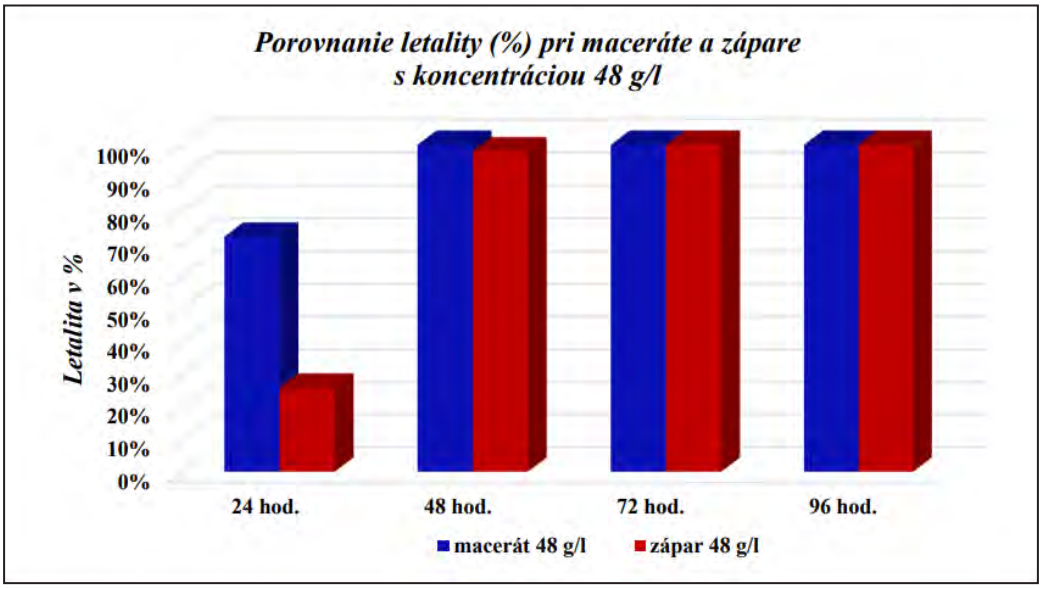
Obr. 1: Porovnanie letality (%) *Artemia francisana* po vystavení pôsobeniu macerátu, záparu a odvaru zo sušeného, rozdrveného koreňa valeriány lekárskej s rôznymi koncentráciami



Obr. 2: Porovnanie letality (%) *Artemia francisana* po vystavení pôsobeniu macerátu a záparu zo sušeného, rozdrveného koreňa valeriány lekárskej s rovnakou koncentráciou 12 g.l^{-1}



Obr. 3: Porovnanie letality (%) *Artemia francisana* po vystavení pôsobeniu macerátu a záparu zo sušeného, rozdrveného koreňa valeriány lekárskej s rovnakou koncentráciou 48 g.l^{-1}



odvaru s nižšou koncentráciou (6 g.l^{-1}) spozorovali pomalý, mihotavý pohyb jedincov na mieste. V skupine záparu s vyššou koncentráciou (48 g.l^{-1}) sme zaznamenali štatisticky významne zvýšenú letalitu artémií oproti skupine záparu s nižšou koncentráciou (12 g.l^{-1}) po 24, 48, 72 aj 96 hodinách. Takisto v prípade skupiny odvaru s vyššou koncentráciou (24 g.l^{-1}) sme zaznamenali štatisticky významne zvýšenú letalitu artémií oproti skupine odvaru s nižšou koncentráciou (6 g.l^{-1}) po 24, 48, 72 aj 96 hodinách. V skupine macerátu s nižšou koncentráciou (12 g.l^{-1}) sme zaznamenali štatisticky významne zvýšenú letalitu artémií oproti skupine záparu s nižšou koncentráciou (12 g.l^{-1}) po 48, 72 aj 96 hodinách.

DISKUSIA

Na základe obrázkov a tabuliek sme dospeli k záveru, že macerát, zápar aj odvar, ktorý sme pripravili zo sušeného, homogenizovaného koreňa valeriány lekárskej (*Valerianae radix*), vykazujú toxický účinok na *Artemia franciscana* Kellogg. So zvyšujúcou sa koncentráciou jednotlivých extraktov (macerátu, záparu, odvaru) sa zvyšovala aj letalita artémií. Najvyššiu letalitu *Artemia franciscana* Kellogg sme zaznamenali pri maceráte s koncentráciou 48 g.l^{-1}, ktorý bol pripravený pri izbovej teplote – už po 24 hodinách bola letalita 72 % a po 48, 72 a 96 hodinách bola letalita až 100 %. Macerát, ktorý bol pripravený za studena, bol najúčinnejší pravdepodobne kvôli dlhšej dobe vylúhovania (24 hodín), pretože vylúhovadlo malo dostatočne dlhú možnosť preniknúť do hrubo homogenizovaného koreňa valeriány a účinné látky boli do extraktu uvoľnené vo väčšom množstve. Dôležitú úlohu mala aj teplota vylúhovania. Určité obsahové látky *Valerianae radix* sú termolabilné (valepotriáty a seskviterpénové kyseliny – kyseliny valerénová a acetoxyvalerénová) a pri zvýšenej teplote dochádza k ich degradácii, tak aj strate akéhokoľvek účinku (Wu a kol., 2023). Keďže macerát bol pripravený pri izbovej teplote, tak k tepelnému rozkladu týchto látok nedošlo a ich aktivita zostala zachovaná. Pri zápare s koncentráciou 48 g.l^{-1} sme po 24 hodinách zaznamenali len 26 % letalitu artémií, po 48 hodinách 86 % letalitu a po 72 a 96 hodinách už bola letalita 100 %. Pri zápare s nižšou koncentráciou (12 g.l^{-1}) sme vo

všetkých časových úsekoch tiež zaznamenali značne nižšiu úmrtnosť artémií v porovnaní s macerátom s nižšou koncentráciou (12 $g.l^{-1}$). V pokusnej skupine so záparom sme teda celkovo zaznamenali štatisticky nižšiu letalitu artémií oproti skupine s macerátom, preto sme dospeli k záveru, že zápary sú pre artémie menej toxické. Nižšia toxicita záparov môže byť spôsobená kratšou dobou vylúhovania (15 minút) a aj rozkladom aktívnych látok v dôsledku prípravy pri zvýšenej teplote. Aj odvary z *Valeriana officinalis* L. v našom teste vykázali pomerne vysokú toxicitu voči *Artemia franciscana* Kellogg, ktorá sa prejavila vysokou letalitou žiabronôžok hlavne pri odvare s vyššou koncentráciou (24 $g.l^{-1}$). Pri tomto odvare bola letalita po 24 hodinách 50 % a po 48, 72 a 96 hodinách už bola 100 %. Pri odvare s nižšou koncentráciou (6 $g.l^{-1}$) bola letalita nižšia v porovnaní so všetkými ostatnými experimentálnymi skupinami (okrem kontrolnej skupiny). Odvary sme pripravili pomocou 15-minútového varu, pri ktorom s najväčšou pravdepodobnosťou došlo k rozkladu všetkých termolabilných látok, ktoré sa spolupodieľajú na terapeutickom i toxickom efekte rastliny. Napriek tomu by sme vysokú toxicitu odvarov z valeriány lekárskej mohli vysvetliť tým, že zvýšená teplota podporuje extrakčný proces tak, že zvyšuje difúzny koeficient a aj rozpustnosť všetkých extrahovateľných látok (Wu a kol., 2023). K obsahovým účinným látkam valeriány lekárskej patria silice, ktoré sú prchavé, len veľmi ťažko rozpustné vo vode a získavajú sa destiláciou vodnou parou (Tomko a kol., 1999). Preto pri príprave varením po dobu 15 minút mohlo dôjsť k ich aspoň čiastočnému uvoľneniu. Napriek vyššej toxicite všetkých vodných výluhov (pripravených pri rôznych teplotách) na *Artemia franciscana* Kellogg, by jej užívanie u ľudí nemalo vyvolávať obavy. Pre extrakty z valeriány, ale aj jednotlivé izolované látky (s výnimkou valepotriátov a ich degradačných produktov) bola v rôznych experimentoch zistená nízka toxicita (EMA, 2021). O tom, ktoré obsahové látky sú zodpovedné za sedatívny, anxiolytický a spazmolytický účinok drogy, sa stále vedú spory. Účinok pravdepodobne spočíva v súhre všetkých obsahových látok (silice, seskviterpénové kyseliny, valepotriáty, flavonoidy) (Martin a Martinová, 2014; Madari a kol., 2021). Výhodou použitia valeriány je jej nízka toxicita a malá pravdepodobnosť výskytu vedľajších účinkov (Cass, 2004). Nežiaduce účinky, uvádzané pri vodných extraktoch boli: závraty, výrazne zvýšená ranná ospalosť pri vyššej dávke (900 mg oproti 450 mg) a nauzea. Aplikácia prípravkov s valeriánou pri predávkovaní nevedie k závažným klinickým príznakom, môže prispievať k únave, závratom a somnolencii (EMA, 2021). Predávkovanie je možné až pri podaní viac ako 18 gramov koreňa, čo je približne desaťnásobok obvyklej dávky. Aj dávky, ktoré predstavovali 20-násobok terapeutickej dávky, vyvolali len mierne symptómy, ktoré odzneli do 24 hodín (Willey a kol., 1995; Cass, 2004; Freitas a kol., 2021). Veľké množstvo ľudí s insomniou si neželá užívať hypnotiká kvôli ich vedľajším účinkom. Väčšina klinických štúdií poukazuje na fakt, že valeriána má pri opakovanom podávaní mierny, spánok navodzujúci efekt a nevyvoláva zmeny spánkovej architektúry alebo signifikantné vedľajšie účinky (Tůmová, 2008). Droga sa často používa ako miernejšia alternatíva alebo možná substitúcia silnejších syntetických sedatív, ako sú benzodiazepíny, pri liečbe stavov nervového napätia a úzkostných porúch spánku (World Health Organization, 1999).

ZÁVER

V experimente sme sledovali vplyv *Valeriana officinalis* L. z čeľade *Caprifoliaceae* Juss. na *Artemia franciscana* Kellogg. Experimentami sme potvrdili toxický vplyv valeriány lekárskej na *Artemia franciscana* Kellogg. Toxicita všetkých vodných výluhov (macerát, zápar, odvar) s vyššou koncentráciou sa prejavila už po 24 hodinách. U extraktov s nižšou koncentráciou sa toxicita prejavila až po 48 hodinách. Na základe výsledkov experimentu bol zo všetkých vodných výluhov najviac toxický macerát, ktorý bol pripravený 24-hodinovým lúhovaním pri laboratórnej teplote zo sušeného, rozdrveného koreňa valeriány lekárskej (*Valerianae radix*).

ZOZNAM LITERATÚRY

Adel Pilerood, S., Prakash, J.: Evaluation of nutritional composition and antioxidant activity of Borage (*Echium amoenum*) and Valerian (*Valerian officinalis*). *J. Food Sci. Technol.*, 2014, 51 (5), 845 – 854.

Barrett, M.: The Handbook of Clinically Tested Herbal Remedies. *Choice Reviews Online*, 2005, 1508 p. Accessed June 7, 2023.

Cass, H.: Herbs for the nervous system: Ginkgo, kava, valerian, passionflower. *Seminars in Integrative Medicine*, 2004, 2, 82 – 88.

Eftimová, J., Habán, M.: *Produkcia liečivých rastlín* [Production of Medicinal Plants]. 1. vyd. Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, 2012, 90 s.

EMA: Valerianae radix. European Medicines Agency 2021. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/valerianae-radix. Accessed June 7, 2023.

Fernández, S., Wasowski, C., Paladini, A. C., Marder, M.: Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from Valeriana officinalis. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2004, 77 (2), 399 – 404.

Freitas, C., Khanal, S., Landsberg, D., Kaul, V.: An alternative cause of encephalopathy: valerian root overdose. *Cureus*, 2021, 13, e17759.

Hayes, W. J. H., Laws, E. R.: *Handbook of Pesticide Toxicology: General principles*. New Delhi: Academic Press. 1991, 1576 p.

Isetts, B. J.: Valerian. In Tracy, T. S., Kingston, R. L. (Eds.): *Herbal Products: Toxicology and Clinical Pharmacology*. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press, 2007, 55 – 70.

Jenabi, E., Khazaei, S., Aghababaei, S., Moradkhani, S.: Effect of fennel-valerian extract on hot flashes and sleep disorders in postmenopausal women: a randomized trial. *J. Menopausal Med.*, 2023, 29 (1), 21 – 28.

Kubelka, W.: Teedrogen und Phytopharmaka. *Sci. Pharm.*, 2011, 79 (3), 703.

Lunz, K., Stappen, I.: Back to the roots – an overview of the chemical composition and bioactivity of selected root-essential oils. *Molecules*, 2021, 26 (11), p. 3155.

Madari, S., Golebiowski, R., Mansukhani, M. P., Kolla, B. P.: Pharmacological management of insomnia. *Neurotherapeutics*, 2021, 18 (1), 44 – 52.

Martin, J., Martinová, D.: Léčivé rostliny s hypnotickým a sedativním účinkem [Medicinal plants with a hypnotic and sedative effect]. *Farmacie pro praxi*, 2014, 10 (6), 226 – 229.

Msomi, N. Z., Simelane, M. B. C.: Herbal Medicine. In : *Herbal Medicine*. IntechOpen, 2018, 314 p. Doi: 10.5772/intechopen.72816.

Murphy, K., Kubin, Z. J., Shepherd, J. N., Ettinger, R. H.: *Valeriana officinalis* root extracts have potent anxiolytic effects in laboratory rats. *Phytomedicine*, 2010, 17 (8 – 9), 674 – 678.

Rafiee, M., Kiani, Z., Moezi, S. A., Rad, G. H. M.: The effects of lavender, valerian, and oxazepam on anxiety among hospitalized patients with coronary artery disease. *Mod. Care J.*, 2018, 15. Doi: 10.5812/modernc.68390.

Shinjyo, N., Waddell, G., Green, J.: Valerian root in treating sleep problems and associated disorders – a systematic review and meta-analysis. *J. Evid. Based Integr. Med.*, 2020, 25. 2515690X20967323.

Tomko, J. a kol.: *Farmakognózia* [Pharmacognosy]. Martin: Osveta, 1999, 424 s.

Tůmová, L.: *Valerianae radix* – možné interakce s ostatními léky [*Valerianae radix* – possible drug interactions]. *Farmacie pro praxi*, 2008, 4 (1), 24 – 25.

WFO: World Flora Online, 2023. http://www.worldfloraonline.or. Accessed June 7, 2023.

Willey, L. B., Mady, S. P., Cobaugh, D. J., Wax, P. M.: Valerian overdose: a case report. *Veterinary and Human Toxicology*, 1995, 37 (4), 364 – 365.

Wong, J., d'Espaux, L., Dev, I., van der Horst, C., Keasling, J.: *De novo* synthesis of the sedative valerenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.*, 2018, 47, 94 – 101.

World Health Organization, editor: *WHO*

monographs on selected medicinal plants. Geneva: World Health Organization, 1999, 284 p.

Wu, C. R., Lee, S. Y., Chen, C. H., Lin, S. D.: Bioactive compounds of underground valerian extracts and their effect on inhibiting metabolic syndrome-related enzymes activities. *Foods*, 2023, 12, 636 p.

Zizovic, I., Stamenić, M., Ivanović, J., Orlović, A., Ristić, M., Djordjević, S., Petrović, S. D., Skala, D.: Supercritical carbon dioxide extraction of sesquiterpenes from valerian root. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2007, 43 (2), 249 – 258.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 3: 76 – 86, 2023

POLYFENOLY V ZELENOM ČAJI

POLYPHENOLS IN GREEN TEA

Hudák, Alexander[1]; Hudáková, Terézia[2]; Čaráková, Natália[1]

[1]Katedra chémie, biochémie a biofyziky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
[2]Ústav lekárskej biológie
Lekárska fakulta Univerzita P. J. Šafárika v Košiciach, Tr. SNP 1, 040 11 Košice
Slovenská republika

alexander.hudak@uvlf.sk

ABSTRAKT

Množstvo rôznych rastlín je zdrojom širokého spektra biologicky účinných látok. Takýmito látkami sú aj polyfenoly, ktoré predstavujú širokú, veľmi rôznorodú skupinu jednoduchých fenolových zlúčenín aj zložitejších polymérov. Ich priaznivé účinky na ľudské zdravie sú predmetom neustáleho vedeckého záujmu. Pôsobia antioxidačne, spomaľujú zrážanlivosť krvi, predchádzajú tvorbe rakoviny, potláčajú mikroorganizmy, podporujú imunitný systém, regulujú krvný tlak, ako aj hladinu krvného cukru. Ich významným a ľahko dostupným zdrojom je aj zelený čaj. Štúdia je preto zameraná na stanovenie obsahu celkových polyfenolových látok v rôznych druhoch zeleného čaju, ktoré sú bežne dostupné v lekárňach a v obchodnej sieti. Na extrakciu polyfenolov bola použitá horúca voda a etanol. Obsah celkových polyfenolov bol stanovený spektrofotometrickou metódou s použitím činidla Folin-Ciocalteu. Na základe výsledkov stanovenia bolo zistené, že etanolové extrakty vykazovali vyšší obsah polyfenolov ako extrakty získané použitím horúcej vody.

Kľúčové slová: činidlo Folin-Ciocalteu; polyfenoly; spektrofotometria; zelený čaj

ABSTRACT

A number of different plants are the source of a wide spectrum of biologically active substances. Such substances are also polyphenols, which represent a wide, very diverse group of simple phenolic compounds and more complex polymers. Their beneficial effects on human health are the subject of constant scientific interest. They act as antioxidants, slow down blood clotting, prevent the formation of cancer, suppress microorganisms,

support the immune system, regulate blood pressure and blood sugar levels. Green tea is also an important and easily available source of them. The paper is therefore focused on determining the content of total polyphenolic substances in various types of green tea, which are commonly available in pharmacies and retail outlets. Hot water and ethanol were used to extract polyphenols. The content of total polyphenols was determined by the spectrophotometric method using the Folin-Ciocalteu reagent. Based on the results of the determination, it was found that the ethanol extracts showed a higher content of polyphenols than the hot water extracts.

Key words: Folin-Ciocalteu reagent; green tea; polyphenols; spectrophotometry

ÚVOD

Čaj je po vode druhým najrozšírenejším nápojom na svete. Je to kultúrny nápoj pôvodom z Číny, ktorý sa postupne rozšíril do mnohých kútov sveta. Všetky druhy čajov sa pripravujú z listov rastliny *Camellia sinensis*, ktorá pochádza z Ázie. Najlepšie sa jej darí vo vysokých nadmorských výškach, vo voľnej a hlbokej pôde a v subtropickom podnebí. Spracovanie čajovníka sa uskutočňuje viacerými spôsobmi, výsledkom čoho sú rôzne druhy čajov (Sivasubramaniam, 2020). Na základe stupňa fermentácie môžeme čaj rozdeliť na čaj nefermentovaný (zelený čaj), fermentovaný (čierny čaj) a olofermentovaný čaj (oolong alebo pouchong). Vyrábajú sa aj tzv. ochutené čaje, ktoré sú zmesou pravého čaju s rôznymi rastlinami. Čierny čaj sa konzumuje hlavne v Severnej Amerike, Európe a južnej Ázii, zatiaľ čo zelené čaje a čaje oolong sa konzumujú najmä v krajinách východnej Ázie.

Pitie zeleného čaju je už od staroveku považované za zdraviu prospešný zvyk, ktorý pochádza z Číny, odkiaľ ho budhistickí mnísi rozšírili do Japonska. Pripisovali mu mnoho prospešných účinkov a nazývali ho aj ako čaj bohov, alebo čaj večného života, ktorý dokáže vyliečiť telo aj myseľ. V 13. storočí bol najväčším zástancom liečivých účinkov zeleného čaju mních menom Eisai, ktorý v roku 1211 napísal knihu „Maintaining Health by Drinking Tea“ o blahodarnom vplyve zeleného čaju na ľudské zdravie (O-Cha.com, 2023). V tomto diele uvádza: „*Čaj predstavuje zázračný prostriedok na udržanie pevného zdravia. Čaj má neuveriteľnú moc predlžovať život. V časoch dávnych, ako aj dnes čaj predstavuje elixír života, ktorý prináša so sebou nesmrteľnosť horských obyvdlí.*“ Od čias, kedy boli napísané uvedené myšlienky, výskum v oblasti významu zeleného čaju pre ľudský organizmus pokročil natoľko, že je možné vedecky potvrdiť pravdivosť dnes už legendárneho názoru mnícha Eisai. V súčasnosti sa už nedá vôbec pochybovať o význame zeleného čaju v prevencii celej škály ochorení. Zelený čaj odbúrava cholesterol v krvi, znižuje krvný tlak, hladinu cukru v krvi, spomaľuje starnutie organizmu, dodáva telu novú energiu, pomáha organizmu vysporiadať sa s otravami potravinami. Vďaka vysokému obsahu fluóru znižuje riziko výskytu zubného kazu. Zvyšuje odolnosť organizmu voči vírusovým ochoreniam, dodáva telu dôležité vitamíny (napr. vitamíny A a C), karotén, minerály a látky pôsobiace ako antioxidanty. Obsahuje zlúčeniny patriace do skupiny polyfenolov, ktoré sa v zelenom čaji nachádzajú vo vysokých koncentráciách. Tieto látky prispievajú k horkastej chuti čaju. Polyfenoly sa delia na rôzne skupiny v závislosti od počtu aromatických kruhov, ktoré sa nachádzajú v ich molekule a spôsobu, akým sa tieto kruhy spájajú (Parkányiová a kol., 2003).

Z polyfenolov sú v zelenom čaji najviac zastúpené katechíny a flavonoidy. Katechíny sa vyznačujú silnými antioxidačnými účinkami. Epigalokatechín galát (EGCG) predstavuje približne 10 – 50 % z celkového obsahu katechínov v zelenom čaji a je považovaný za katechín s najsilnejšími antioxidačnými účinkami. Jedinou šálkou zeleného čaju môžeme telu dodať približne 10 – 40 mg polyfenolov (Khan a Mukhtar, 2007; Afzal a kol., 2015). Na blahodarných účinkoch zeleného čaju sa podieľajú aj taníny.

Celkový obsah polyfenolov v zelených a čiernych čajoch je podobný. V dôsledku stupňa oxidácie počas

Tab. 1: Vzorky zeleného čaju

	Názov	Výrobca	Zloženie	Doba vylúhovania
1.	**Green Tea Ginger Lemon**	Teekanne	zelený čaj (85 %), aróma citrónu, citrónová kôra, zázvor	3 – 5 minút
2.	**Gunpowder zelený čaj**	Juvamed	100 % čistý zelený čaj	2 – 5 minút
3.	**Gunpowder pravý zelený čaj**	Grešík Valdemar	100 % čistý zelený čaj	3 minúty
4.	**Green Tea**	Sir Winston Tea	100 % čistý zelený čaj	2 – 3 minúty
5.	**Popradský zelený čaj čučoriedka a brusinka**	Popradský	zelený čaj (95,25 %); aróma čučoriedka (1,75%), aróma brusnica (1 %), čučoriedková vláknina (1%)	3 – 5 minút
6.	**Fresh Green Tea**	Hyson	100 % čistý zelený čaj	2 – 3 minúty
7.	**English Tea Shop Organic**	Vivantis	zelený rooibos (64 %), ibištek (19 %), granátové jablko (6 %), kvet mučenky (5,5 %), prírodné arómy (5 %), čučoriedka (0,5 %)	4 – 5 minút
8.	**Old England green tea**	Milford	100 % čistý zelený čaj	3 – 4 minúty
9.	**Green Tea ginger lemon**	Teekanne	zelený čaj (85 %), aróma citrónu (10 %), prírodná aróma zázvoru s ďalšími prírodnými aromatami, citrónová kôra, zázvor (1 %)	2 – 3 minúty
10.	**Zen Chai Green Tea Speciality**	Teekanne	zelený čaj, citrónová aróma, aróma manga	3 – 5 minút
11.	**Ginko and Guarana**	Vitto Tea	zelený čaj (83,8 %); lístky ginko (6,3 %); kôra pomaranča, semienka guarany, kvet slezu, kvet pomaranča, aróma	2 – 4 minúty
12.	**Amore Mio Green Tea**	Amorae Mio	zelený čaj, china sencha, damicena, muira puama, kvet pivoňky, aróma	2 – 3 minúty
13.	**Green Tea**	Mistral	100 % zelený čaj	2 – 4 minúty
14.	**Zelený čaj Fresh Exclusive**	Fresh	100 % zelený čaj	2 – 5 minút
15.	**Green Tea Moroccan Mint**	Dilmah	zelený čaj (80 %), prírodné listy mäty priepornej (10 %) a mäty kučeravej (10 %)	3 – 5 minút

spracovania čaju vznikajú rozdiely v typoch prítomných flavonoidov (Khan a Mukhtar, 2007).

Najznámejšou zložkou čaju je povzbudivo pôsobiaci kofeín, ktorý poskytuje čaju prirodzenú energetickú podporu, schopnosť koncentrovať sa, ale len málo prispieva k chuti, farbe a aróme. Esenciálne oleje, podobne ako aj niektoré aminokyseliny a cukry, poskytujú čaju lahodnú vôňu a chuť (Dudík, 2017; O-Cha.com, 2023).

Čajovník je jedinou rastlinou, ktorá obsahuje aminokyselinu theanín, ktorá uvoľňuje myseľ, zlepšuje pamäť a urýchľuje reakcie človeka. Chutí sladko a spolu s trieslovinami, ktoré majú trpkú chuť, vytvárajú vyváženú chuť čaju.

Polyfenolové zlúčeniny a ich metabolity pozitívne pôsobia na ľudské zdravie. Vďaka svojmu potenciálu sa využívajú hlavne v prevencii a doplnkovej terapii civilizačných ochorení. Sú známe ako antioxidanty (Queen, 2010); potláčajú produkciu karcinogénov v tele (Kamaraj a kol., 2007; Sharma a Rao, 2009); majú antidiabetické (Oyenihi, 2016; Sun a kol., 2020); kardioprotektívne (García-Lafuente, 2009; Pandey a Rizvi, 2017) a neuro-protektívne účinky (Süli a kol., 2014; Pandey a Rizvi, 2017).

Štúdia je zameraná na porovnanie obsahu celkových polyfenolov vo vodnom a v etanolovom extrakte z viacerých vzoriek zeleného čaju, bežne dostupného v obchodnej sieti. Získané výsledky poskytnú informáciu o druhoch zeleného čaju, ktoré sú najlepším zdrojom polyfenolových zlúčenín.

MATERIÁL A METÓDY

Vzorky zeleného čaju boli zakúpené v obchodnej sieti a vo viacerých lekárňach. Ich zoznam, zloženie a určená doba vylúhovania je uvedená v tabuľke 1.

Vodný extrakt bol pripravený zaliatím 0,5 g homogenizovaného čaju 50 ml horúcej destilovanej vody v kadičkách, ktoré sa prikryli hodinovým sklíčkom. Čaj bol vylúhovaný po dobu určenú na balení čaju. Vodný extrakt sa následne prefiltroval do 100 ml odmernej banky, nechal sa ochladiť na laboratórnu teplotu a doplnil sa destilovanou vodou po značku.

Etanolový extrakt bol pripravený zmiešaním 0,1 g homogenizovaných vzoriek čaju s 10 ml etanolu (96 % hm., mikroChem s. r. o., SR) v 25 ml odmerných bankách. Zmes bola na 48 hodín uložená na tmavom mieste. Po uplynutí stanovenej doby bola zmes prefiltrovaná cez membránový diskový filter (Q-max PVDF 0,22 µm) a filtrát bol analyzovaný.

Celkové polyfenoly boli stanovené metódou Folin-Ciocalteau (Naczk a Shahidi, 2014) a ich hmotnosť bola vyjadrená ako ekvivalent kyseliny galovej (GAE) v mg GAE na 1 g suchej vzorky. Závislosť absorbancie od koncentrácie roztokov bola zistená na základe merania kalibračných roztokov pripravených riedením roztoku kyseliny galovej (5 $mg.cm^{-3}$) v koncentračnom rozsahu 0 až 1,25 $mg.cm^{-3}$. Pred meraním absorbancie bolo v sklenenej skúmavke zmiešaných 1,6 ml destilovanej vody a 20 l roztoku štandardu alebo vzorky. K roztoku sa pridalo 100 µl Folin-Ciocalteau činidla. Zmes sa dôkladne premiešala, pridalo sa k nej 300 µl roztoku uhličitanu sodného (0,1 $g.cm^{-3}$) a nechala sa v tme inkubovať po dobu 2 hodín pri laboratórnej teplote. Analyzované extrakty z čaju boli pred prípravou zmesi prefiltrované cez diskový filter Q-max PVDF 0,22 µm. Po uplynutí doby inkubácie bola odmeraná absorbancia roztokov pri vlnovej dĺžke 765 nm oproti slepej vzorke. Každý roztok štandardu kyseliny galovej aj vzorky bol pripravený a zmeraný trikrát. Absorbancia roztokov bola meraná na spektrofotometri UV-VIS Spectrophotometer Shimadzu UV-1280 v sklenených kyvetách.

Na základe hodnôt absorbancie roztokov kyseliny galovej (viď tab. 2) bola pomocou lineárnej regresnej analýzy zostrojená kalibračná závislosť absorbancie od koncentrácie kyseliny galovej. Regresná rovnica kyseliny galovej bola vypočítaná v tvare $y = 0{,}8176.x - 0{,}0051$. Koeficient korelácie $R = 0{,}9993$.

Na základe nameraných hodnôt absorbancie roztokov jednotlivých vzoriek a rovnice kalibračnej závislosti bola vypočítaná koncentrácia celkových polyfenolov v extraktoch vzoriek v $mg.cm^{-3}$. Hmotnosť celkových polyfenolov bola vyjadrená ako ekvivalent kyseliny galovej (GAE) v mg GAE na 1 g suchej vzorky. Výsledky stanovenia polyfenolov vo

Tab. 2: Absorbancia roztokov štandardov kyseliny galovej

Koncentr. [mg.cm^{-3}]	0,0	0,05	0,15	0,25	0,5	0,75	1,0	1,25
Absorbancia	0,0	0,035	0,110	0,194	0,400	0,622	0,826	1,001

Tab. 3: Obsah polyfenolov vo vodnom extrakte

	Názov čaju	Polyfenoly [mg.cm^{-3}]	Polyfenoly [mg GAE.g^{-1}]
1.	Green Tea Ginger Lemon	0,2912 ± 0,0269	58,25 ± 5,40
2.	Gunpowder zelený čaj	0,2174 ± 0,0068	43,49 ± 1,35
3.	Gunpowder pravý zelený čaj	0,2362 ± 0,0080	47,23 ± 1,60
4.	Sir Winston Tea Green Tea	0,2582 ± 0,0185	51,64 ± 3,70
5.	Popradský zelený čaj čučoriedka a brusinka	0,3691 ± 0,0154	73,81 ± 3,08
6.	Fresh Green Tea	0,3418 ± 0,0148	68,35 ± 2,95
7.	English Tea Shop Organic	0,1896 ± 0,0196	37,91 ± 3,92
8.	Old England Green Tea	0,2565 ± 0,0104	51,31 ± 2,08
9.	Green Tea Ginger Lemon	0,3773 ± 0,0035	75,45 ± 0,70
10.	Zen Chai Green Tea Speciality	0,4180 ± 0,0190	83,60 ± 3,80
11.	Ginko and Guarana Tea	0,2778 ± 0,0160	55,55 ± 3,21
12.	Amore Mio Green Tea	0,2227 ± 0,0245	44,54 ± 4,91
13.	Mistral Green Tea	0,4465 ± 0,0265	89,30 ± 5,29
14.	Zelený čaj Fresh Exclusive	0,1946 ± 0,0124	38,92 ± 2,47
15.	Green Tea Moroccan Mint	0,3895 ± 0,0327	77,90 ± 6,55

Tab. 4: Obsah polyfenolov v etanolovom extrakte

	Názov čaju	Polyfenoly [mg.cm^{-3}]	Polyfenoly [mg GAE.g^{-1}]
1.	Green Tea Ginger Lemon	0,7437 ± 0,0065	74,37 ± 0,65
2.	Gunpowder zelený čaj	0,7752 ± 0,0114	77,52 ± 1,14
3.	Gunpowder pravý zelený čaj	0,8200 ± 0,0308	82,00 ± 3,08
4.	Sir Winston Tea Green Tea	0,8033 ± 0,0229	79,88 ± 2,30
5.	Popradský zelený čaj čučoriedka a brusinka	0,9692 ± 0,0180	96,92 ± 1,80
6.	Fresh Green Tea	0,6696 ± 0,0259	66,95 ± 2,59
7.	English Tea Shop Organic	0,5473 ± 0,0422	54,73 ± 4,22
8.	Old England Green Tea	0,8155 ± 0,0178	81,50 ± 1,78
9.	Green Tea Ginger Lemon	0,6777 ± 0,0398	67,77 ± 3,99
10.	Zen Chai Green Tea Speciality	0,6790 ± 0,0117	67,90 ± 1,17
11.	Ginko and Guarana Tea	0,6769 ± 0,0159	67,69 ± 1,59
12.	Amore Mio Green Tea	0,4050 ± 0,0088	40,50 ± 0,89
13.	Mistral Green Tea	0,6149 ± 0,0441	61,49 ± 4,41
14.	Zelený čaj Fresh Exclusive	0,6764 ± 0,0388	67,64 ± 3,88
15.	Green Tea Moroccan Mint	0,5733 ± 0,0268	57,33 ± 2,66

Tab. 5: Celkový obsah polyfenolov v rôznych druhoch čaju

Extrakčné činidlo	Zelený čaj [mg GAE.g^{-1}]	Čierny čaj [mg GAE. g^{-1}]	Čaj oolong [mg GAE.g^{-1}]
Etanol (50 % v/v)	231,23 ± 4,81	124,34 ± 1,36	189,08 ± 7,03
Methanol (50 % v/v)	209,76 ± 4,53	124,28 ± 1,17	176,78 ± 3,33
Voda	136,51 ± 0,41	52,42 ± 0,85	66,89 ± 1,53

Zdroj: Nadiah a kol., 2015

vodných a etanolových extraktoch sú uvedené v tabuľkách 3 a 4.

Na základe nameraných hodnôt absorbancie roztokov jednotlivých vzoriek a rovnice kalibračnej závislosti bola vypočítaná koncentrácia celkových polyfenolov v extraktoch vzoriek v mg.cm^{-3}. Hmotnosť celkových polyfenolov bola vyjadrená ako ekvivalent kyseliny galovej (GAE) v mg GAE na 1 g suchej vzorky. Výsledky stanovenia polyfenolov vo vodných a etanolových extraktoch sú uvedené v tabuľkách 3 a 4.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Postup pri príprave zeleného čaju je rôzny a pri jednotlivých druhoch čaju sa líši. Pri príprave zeleného čaju je potrebné dbať na teplotu vody, ktorá by nemala presahovať 90 °C. Čaj určený na pitie sa pripraví zaliatím jednej čajovej lyžičky (2 g) 200 ml horúcej vody. Zmes sa nechá lúhovať 1,5 – 2 minúty a po precedení sa môže piť (O-Cha.com, 2023). V 15-tich nami analyzovaných vzorkách výrobcovia uvádzali rôzne časy lúhovania, od 2 – 3 min (Green Tea – Sir Winston Tea) až po 3 – 5 min (Zen Chai Green Tea – Teekane). U všetkých čajov bola najdlhšia doba lúhovania 5 minút. Z 15 analyzovaných čajov bolo sedem 100 % zelených čajov. V ostatných vzorkách tvoril základ zelený čaj (od 95,25 % do 64 % hm.) s prídavkom rôznych prírodných ingrediencií ako je citrónová kôra, pomarančová kôra, zázvor, čučoriedka, granátové jablko, ginko a iné.

Pri analýze vodných extraktov čaju bol najväčší obsah polyfenolov zistený vo vzorke 13 (Mistral Green Tea); 89,30 ± 5,29 mg GAE.g^{-1}, za ktorým nasledovala vzorka 10 (Zen Chai Green Tea Speciality); 83,60 ± 3,80 mg GAE.g^{-1}. Najnižší obsah 37,91 ± 3,92 mg GAE.g^{-1} bol stanovený vo vzorke 7 (English Tea Shop Organic). Najnižšie množstvo polyfenolov vo vzorke 7 zrejme ovplyvnil aj najnižší percentuálny obsah zeleného čaju (64 % hm.).

V etanolových extraktoch sa najmenšie množstvo polyfenolov stanovilo vo vzorke 12 (Amore Mio Green Tea); 40,50 ± 0,89 mg GAE.g^{-1} a najvyšší obsah bol zistený vo vzorke 5 (Popradský zelený čaj čučoriedka a brusinka); 96,92 ± 1,80 mg GAE.g^{-1}. K tomuto výsledku zrejme prispeli aj ďalšie zložky tohto čaju.

Stanoveniu polyfenolov v zelenom čaji bolo venovaných viacero odborných štúdií. Anesini a kol. (2008) analyzovali dvanásť vzoriek ôsmich značiek čaju, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (*Theaceae*), ktorý sa pestuje v severovýchodnej Argentíne. Zelený čaj vykazoval vyšší obsah polyfenolov ako čierny čaj. Zistilo sa, že celková koncentrácia polyfenolov v zelenom čaji kolíše od 21,02 ± 1,54 do 14,32 ± 0,45 % GAE, zatiaľ čo v čiernom čaji sa obsah polyfenolov pohyboval od 17,62 ± 0,42 do 8,42 ± 0,55 % GAE. Výsledky práce potvrdili dobrú kvalitu argentínskeho čaju.

Štúdia Fukushima a kol. (2009) bola zameraná na zistenie množstva celkových polyfenolov (CP) z nápojov, ktoré spotrebujú Japonci v oblasti Tokia a Osaky. Celkový obsah polyfenolov bol stanovený v káve, zelenom čaji, čiernom čaji, čaji oolong, jačmennom čaji, ovocnej šťave, paradajkovej/zeleninovej šťave a kakaových nápojoch modifikovanou Folin-Ciocalteuovou metódou. Koncentrácia CP v zelenom čaji predstavovala 115 mg/100 ml čaju.

Manian a kol. (2008) zistili, že priemerný obsah celkových polyfenolov v zelenom čaji bol 7,72 mg GAE.g^{-1} suchého čaju. Obsah CP v zelenom čaji sa pohyboval od 1,17 do 18,59 mg GAE.g^{-1}.

Nadiah a kol. (2015) stanovili obsah polyfenolov v troch druhoch čaju, v čiernom, zelenom a oolong čaji (viď tab. 5). Na extrakciu použili vodu, 50 % (obj.) vodný roztok metanolu a 50 % (obj.) vodný roztok etanolu. Výsledky ukázali, že v obsahu polyfenolov sú rozdiely v závislosti od druhov čaju a druhov použitých extrakčných roztokov.

Ako vyplýva z tabuľky, z troch druhov analyzovaného čaju najviac polyfenolov obsahoval zelený čaj. Výsledky naznačujú, že extrahovateľnosť polyfenolov je ovplyvnená polaritou a viskozitou použitých rozpúšťadiel. Rozpustnosť polyfenolov sa zvyšuje s polaritou rozpúšťadla a najmenej polárne rozpúšťadlá sú vhodné na extrakciu lipofilných fenolov.

Tadesse a kol. (2015) zistili, že celkový obsah polyfenolov v zelenom čaji Wushwush (WGT) je 19,98 ± 1,15 mg GAE na 100 g hmotnosti suchých listov, čo bol najvyšší obsah spomedzi testovaných vzoriek. Celkový obsah polyfenolov v čiernych čajoch Wushwush (WBT), Gumero (GBT) a čiernom čaji východnej Afriky (EABT) bol stanovený na 16,24 ± 0,9; 17,90 ± 0,93 a 16,17 ± 0,33 mg GAE na 100 g hmotnosti suchých listov.

Štúdia Raksha a kol. (2017) bola zameraná na extrakciu maximálneho množstva polyfenolov a optimalizáciu extrakčného času a teploty. Vodná extrakcia polyfenolov zo zeleného čaju sa uskutočnila pri troch rôznych teplotách 40 °C, 50 °C a 60 °C a v troch časových intervaloch: 15, 30 a 60 minút. Maximálny obsah celkových polyfenolov bol získaný pri teplote 40 °C počas 30-minútovej extrakcie, a to 124,6 µg v 100 ml extraktu.

Nibir a kol. (2017) stanovili celkový obsah polyfenolov vo vodných extraktoch štyroch odrôd čajovníka čínskeho (*Camellia sinensis*, pomarančový pekoe: BOP, kvetnatý pomarančový pekoe: FBOP, červený prach a zelený čaj). Zelený čaj obsahoval výrazne vyššie množstvo celkových fenolových a flavonoidových zlúčenín v porovnaní s inými odrodami čaju: BOP : 8,84 ± 0,50 ; FBOP: 6,78 ± 0,55; červený prach: 8,20 ± 0,49 a zelený čaj: 26,33 ± 1,73 mg GAE.g^{-1}.

Eruygur a kol. (2018) vo svojej štúdii uvádzajú, že pomer tuhá látka/kvapalina je najefektívnejším parametrom pri extrakcii polyfenolových zlúčenín bez ohľadu na typ čaju. Najvyšší obsah polyfenolov 411,762 mg GAE.ml^{-1} zistili v zelenom čaji; 387,714 mg GAE.ml^{-1} v čiernom čaji a najnižší obsah 325,452 mg GAE.ml^{-1} v bielom čaji.

Na porovnanie celkového obsahu polyfenolov, flavonoidov, antioxidačnej aktivity a obsahu kofeínu v čiernom, zelenom, bielom, harmančekovom a ibištekovom čaji bola zameraná štúdia Shannon a kol. (2018). Najvyšší obsah CP bol zistený v zelenom čaji (557,58 µg GAE.g^{-1}) a čiernom čaji (499,19 µg GAE.g^{-1}).

Korkmaz a kol. (2019) zistili, že metanolový extrakt zo zeleného čaju obsahoval v porovnaní s čajom čiernym a bielym najviac CP, a to 46,9 ± 4,096 mg GAE.g^{-1}.

Koláčková a kol. (2020) pri analýze zeleného čaju Matcha z Japonska zistili v metanolovom extrakte 169 – 273 mg GAE.g^{-1} suchej hmotnosti polyfenolových látok.

Pacheco-Coello a kol. (2020) stanovili obsah celkových polyfenolov v zelenom čaji z Číny predávanom v meste Maracay vo Venezuele a v čaji značky Lipton a McCormick. V jednom grame jednotlivých vzoriek čaju stanovili 201,34 ± 3,98; 178,32 ± 2.22 a 220,10 ± 2,20 mg GAE.

Štúdia Paiva a kol. (2021) porovnáva antioxidačné vlastnosti, celkové polyfenoly, celkové flavonoidy, profily katechínov a obsah kofeínu v zelenom čaji [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze] z Azorských ostrovov, zbieranom v rôznych ročných obdobiach počas dvoch rôznych rokov. Obsah CP sa pohyboval medzi 291,14 a 326,93 mg ekvivalentov kyseliny galovej (GAE).g^{-1} sušeného extraktu v roku 2019 a medzi 300,25 a 320,58 mg GAE.g^{-1} v roku 2020.

Cieľom štúdie Trinovani a kol. (2022) bolo určiť celkové množstvo polyfenolov a antioxidantov v prášku zeleného čaju z miestnych čajových odrôd

(GMB 7 a GMB 9). Výsledky ukázali, že celkový obsah polyfenolov v prášku zo zeleného čaju bol v odrode GMB 27,61 % a v odrode GMB 927,31 %.

Obsah polyfenolov v zelenom čaji sa pohybuje v širokom intervale hodnôt. Závisí od mnohých faktorov, ako je druh čaju, geografické, pôdne a klimatické podmienky, spôsob pestovania, zberu a spracovania čaju. Výsledky jednotlivých stanovení do značnej miery ovplyvňuje aj spôsob a čas extrakcie, extrakčné činidlo, teplota a metóda stanovenia. V tejto štúdii sme zvolili postup prípravy zeleného čaju, teda vodný výluh tak, ako to odporúča predajca čaju, aby sme zistili množstvo polyfenolov, ktoré vieme získať z jedného gramu suchej hmotnosti čaju. Pre porovnanie sa uskutočnila aj extrakcia pomocou etanolu. Nami získané výsledky sú radovo porovnateľné s výsledkami uvedenými napr. v prácach Nibir a kol. 2017; Pacheco-Coello a kol., 2020; Koláčková a kol., 2020.

Zdraviu prospešné účinky polyfenolov závisia tak od ich príjmu, ako aj od ich biologickej dostupnosti. Nepoznáme žiadny vzťah medzi množstvom polyfenolov v potravinách a ich biologickou dostupnosťou v ľudskom tele. Väčšina polyfenolov sa v potravinách nachádza vo forme esterov, glykozidov alebo polymérov. V tejto forme sa však nemôžu absorbovať a musia prejsť premenou, na ktorej sa zúčastňujú črevné enzýmy alebo mikroflóra. Preto formy polyfenolov, ktoré sa v konečnom dôsledku dostávajú do krvi a tkanív, sa líšia od foriem prítomných v potravinách (D'Archivio, 2007).

Zelený čaj, vďaka svojim pozitívnym účinkom, je neustále predmetom viacerých výskumov. Odporúča sa pri prevencii civilizačných ochorení, pomáha udržiavať pozornosť, môže pomôcť zlepšiť funkciu mozgu. Hlavnou zložkou čaju s týmto účinkom je významný stimulant kofeín. Činnosť mozgu posilňuje aj aminokyselina L-theanín. Pitie zeleného čaju s obsahom kombinácie L-theanínu a malého množstva kofeínu môže dodať oveľa viac energie a vyššiu produktivitu v porovnaní s kávou (Gunnars, 2020).

Niektoré štúdie naznačujú, že zelený čaj môže zvyšovať citlivosť na inzulín a znížiť hladinu cukru v krvi po jedle (Baier, 2020). Výskumy naznačujú, že u konzumentov zeleného čaju je menšie riziko vzniku nádorových ochorení, ale na potvrdenie týchto účinkov je potrebných viacero ďalších štúdií. Pozitívny antioxidačný účinok zeleného čaju sa môže využiť v prevencii nádorových ochorení. Zelený čaj môže zlepšiť niektoré z hlavných rizikových faktorov kardiovaskulárnych ochorení. Redukuje zlý cholesterol (LDL) v krvi, zlepšuje pomer dobrého cholesterolu (HDL) a tak pomáha udržiavať srdce zdravé. Pravidelné pitie zeleného čaju má dobrý vplyv aj na krvný tlak (Khan a Mukhtar, 2019).

Zelený čaj je prísadou mnohých kozmetických produktov (denné a nočné krémy, masky na tvár, čistiace vody) vhodných pre všetky typy pleti. Tým, že pôsobí antioxidačne, zabraňuje pôsobeniu voľných radikálov, vylepšuje pružnosť pokožky a spomaľuje proces starnutia. Upokojuje, osviežuje a zjemňuje pleť, eliminuje pigmentové škvrny, zmierňuje vrásky, účinne bojuje proti akné a redukuje jazvy. Nie nadarmo ho v Číne označujú za „elixír mladosti" a „nápoj dlhovekosti".

ZÁVER

Zelený čaj neprechádza procesom oxidácie a preto si zachováva všetky svoje prírodné polyfenoly, ktoré významne prispievajú k prevencii závažných ochorení u ľudí. Za väčšinu pozitívnych účinkov zeleného čaju je v najväčšej miere zodpovedný polyfenol zo skupiny katechínov, a to epigalokatechín-3-galát (EGCG).

V tejto štúdii bol Folin-Ciocalteau spektrofotometrickou metódou stanovený obsah celkových polyfenolov vo vodnom a etanolovom extrakte z 15 vzoriek zeleného čaju. Sedem z týchto čajov boli čisto zelené čaje, v ostatných sa nachádzali ďalšie prísady. Cieľom bolo zistiť, ktoré druhy zeleného čaju predávaného v obchodnej sieti sú najväčším zdrojom celkových polyfenolov. Boli analyzované vodné extrakty, teda čaje pripravené podľa pokynov výrobcu a pre porovnanie tiež etanolové extrakty z čajovej sušiny. Najvyšší obsah polyfenolov bol zistený vo vodnom

extrakte z čajov Mistral Green Tea a Zen Chai Green Tea Speciality, a najnižší v čajoch English Tea Shop Organic a Zelený čaj Fresh Exclusiv. Z etanolových extraktov obsahoval najväčšie množstvo polyfenolov extrakt z čaju Popradský zelený čaj čučoriedka a brusinka a najnižší obsah extrakt z Amore Mio Green Tea. Z analýzy vzoriek čaju vyplynulo, že stanovenie obsahu polyfenolov v čaji závisí od spôsobu prípravy extraktov a použitého extrakčného činidla. Vodné extrakty potvrdili, že predávané druhy zeleného čaju sú solídnym zdrojom celkových polyfenolov.

Zelený čaj má veľmi silné fyziologické účinky a osviežujúci vplyv na organizmus, ktorý je vystavovaný vysokému pracovnému výkonu alebo dlhodobej psychickej záťaži. Odporúča sa pri práci v nočných hodinách, v letných horúčavách, zabraňuje poteniu a potláča pocit smädu. Zdravotné účinky pitia zeleného i čierneho čaju sú porovnateľné, oba dopomáhajú k zdraviu a dobrej kondícii organizmu. Viac benefitov má však rozhodne zelený čaj. Rozhodnutie, ktorý z týchto čajov piť, je jednoducho iba záležitosťou chuti.

ZOZNAM LITERATÚRY

Afzal, M., Safer, A. M., Menon, M.: Green tea polyphenols and their potential role in health and disease. *Inflammopharmacology*, 2015, 23, (4), 151 – 161. Doi: 10.1007/s10787-015-0236-1.

Anesini, C., Ferraro, G. E., Filip, R.: Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, (19), 9225 – 9229. Doi: 10.1021/jf8022782.

Baier, L.: 10 výhod zeleného čaju. Prečo by ste ho mali piť každý deň [10 advantages of green tea. Why should it be drunk every day]. *Health and Wellness*, 2020.<https://www-asweetpeachef-com.translate.goog/benefits-of-green-tea/?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=sk&_x_tr_hl=sk&_x_tr_pto=nui,sc>. Accessed April 11, 2022.

D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedettom, R., Garguiulo, R., Giovannini, C., Masella, R.: Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanita*, 2007, 43 (4), 348 – 361. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18209268/>. Accessed March 18, 2023.

Dudík, B.: Zelený čaj: Ako často ho piť? Má nežiadúce účinky [Green tea: how often to drink it? Has it adverse effects?]. *Bratislava: Slovenský pacient*, 2017. https://slovenskypacient.sk/zeleny-caj-ako-casto-pit-kofein-neziaduce-ucinky/. [cit.14-2-2023].

Eruygur, N., Dincel, N. G. K., Kutuk, N.: Modeling of total phenolic contents in various tea samples by experimental design methods Open Chemistry. *Open Chemistry*, 2018 16 (1), 738 – 744. https://doi.org/10.1515/chem-2018-0082. Accessed February 15, 2023.

Fukushima, Y., Ohie, T., Yonekawa, Y., Yonemoto, K., Aizawa, H., Mori, Y., Watanabe, M., Takeuchi, M., Hasegawa, M., Taguchi, Ch., Kondo, K.: Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57 (4), 1253 – 1259. Doi: 10.1021/jf802418j.

García-Lafuente, A., Guillamon, E., Villares, A., Rostango, M. A., Martiníz, J. A.: Flavonoids as antiinflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Research*, 2009, 58 (9), 537 – 552. Doi: 10.1007/s00011-009-0037-3.

Gunnars, K.: 10 Evidence-based benefits of green tea. *Healthine*, 2020. <https://www-healthline-com.translate.goog/nutrition/top-10-evidence-based-health-benefits-of-green tea?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=sk&_x_tr_hl=sk&_x_tr_pto=nui,s. Accessed February 15, 2023.

Kamaraj, S., Vinodhkumar, R., Anandakumar, P., Jagan, S., Ramakrishnan, G., Devaki, T.: The effects of quercetin on antioxidant status and tumor markers in the lung and serum of mice treated with benzo(a)pyrene. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30 (12), 2268 – 2273. Doi: 10.1248/bpb.30.2268.

Khan, N., Mukhtar, H.: Tea polyphenols for health promotion. *Life Science*, 2007, 81 (7), 519 –

533. Doi: 10.1016/j.lfs.2007.06.011.

Khan, N., Mukhtar, H.: Tea polyphenols in promotion of human health. *Nutrients*, 2019, 11 (1), 39. Doi:10.3390/nu11010039.

Koláčková, T., Kolofiková, K., Sytařová, I., Snopek, S., Sumczynski, D., Orsavová, J.: Matcha tea: analysis of nutritional composition, phenolics and antioxidant activity. *Plant Foods Hum. Nutr*., 2020, 75 (1), 48 – 53. Doi: 10.1007/s11130-019-00777-z.

Korkmaz, N., Sener, S. O., Akkaya, S., Badem, M., Aliyazicioglu, R., Abudayyak, M., Oztas, E., Ozgen, U.: Investigation of antioxidant, cytotoxic, tyrosinase inhibitory activities, and phenolic profiles of green, white, and black teas. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2019, 44 (3), 278 – 288. Doi: 10.1515/tjb-2017-0345.

Manian, R., Anusuya, N., Siddhuraju, P., Manian, S.: The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chem*., 2008, 107, 1000 – 1007. Doi: 10.1016/j.foodchem.2007.09.008.

Naczk, M., Shahidi, F.: Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1054 (1 – 2), 95 – 111. Doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.059.

Nadiah, N. I., Cheng, L. H., Azhar, M. E., Karim, A. A., Uthumporn, U., Ruri, A. S.: Determination of phenolics and antioxidant properties in tea and effect of polyphenols on alpha-amylase activity. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2015, 14 (11), 808 – 817. Doi: 10.3923/pjn.2015.808.817.

Nibir, Y. M., Sumit, A. F., Akhand, A. A., Ahsan, N., Hossain, M. S.: Comparative assessment of total polyphenols, antioxidant and antimicrobial activity of different tea varieties of Bangladesh. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2017, 7 (4), 352 – 357. Doi: 10.1016/j.apjtb.2017.01.005.

O-Cha.com. O-Cha.com's Guide to Japanese Green Tea. http://www.o-cha.com. Accessed April 20, 2023.

Pacheco-Coello, F.: Determination of total phenolic compounds and evaluation of the antioxidant activity of commercial and artisanal green tea traded in Maracay, Venezuela. *Revista Boliviana de Química*, 2020, 37 (1), 12 – 20. Doi: 10.34098/2078-3949.37.1.4.

Paiva, L., Lima, E., Motta, M., Marcone, M., Baptista, J.: Influence of seasonal and yearly variation on phenolic profiles, caffeine, and antioxidant activities of green tea [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze] from Azores. *Appl. Sci*., 2021, 11, 7439. Doi: 10.3390/app11167439.

Pandey, K. B., Rizvi, S. I.: Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2009, 2 (5), 270 – 278. Doi: 10.4161/oxim.2.5.9498.

Parkányiová, J., Parkányiová, L., Pokorný, J.: Rostliny jako zdroje přírodních antioxidantů. *Vitamins 2003* – Přírodní antioxidanty a volné radikály [Natural Antioxidants and Free Radicals]. Vyd. Univerzita Pardubice, 2003, 199 – 204.

Queen, B. L., Tollefsbol, T. O.: Polyphenols and aging. *HHS Public Access*, 2010, 3, (1), 34 – 42. Doi: 10.2174/1874609811003010034.

Oyenihi, O. R., Oyenihi, A. B., Adeyanju, A. A., Oguntibeju, O. O.: Antidiabetic effects of resveratrol: the way forward in its clinical utility. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 14 p. Doi: 10.1155/2016/9737483.

Raksha, K., Roshini, T. J., Chandra Prabha, D., Dhinek, A.: Optimization of the extraction of polyphenols from green tea (*Camellia sinensis*). *International Journal of Life Sciences Research*, 2017, 5 (1), 37 – 43.

Shannon, E., Jaiswal, A. K., Abu-Ghannam, N.: Polyphenolic content and antioxidant capacity of white, green, black, and herbal teas: a kinetic study. *Food Research*, 2018, 2 (1), 1 – 11. DOI: https://doi.org/10.26656/fr.2017.2(1).117.

Sharma, V., Rao, L. J.: A thought on the biological activities of black tea. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 2009, 49 (5), 379 – 404. Doi: 10.1080/10408390802068066.

Sivasubramaniam, S.: Tea beverage. In *Encyclopedia Britannica*. Edinburgh: Britannica, 2022.

<https://www.britannica.com/topic/tea-beverage>. Accessed June 14, 2023.

Sun, Ch., Zhao, Ch., Guven, E. C., Paoli, P., Simal-Gandara, J., Ramkumar, K. M., Wang, S., Buleu, F., Pah, A., Turi, V., Damian, G., Dragan, S., Tomas, M., Khan, W., Wang, M., Delmas, D., Puy Portillo, M., Dar, P., Chen, L., Xiao, J.: Dietary polyphenols as antidiabetic agents: Advances and opportunities. *Food Frontiers*, 2020, 1 (1), 18 – 44. Doi: 10.1002/fft2.15.

Süli, J., Homzová, K., Sobeková, A., Bujdošová, Z.: Fyziologické účinky polyfenolov a ich metabolitov v strave [Physiological effects of polyphenols and their metabolites in diet]. *Československá fyziologie*, 2014, 63 (2), 92 – 96.

Trinovani, E., Prawira-Atmaja, M. I., Kusmiyati, M., Harianto, S., Shabri, H., Maulana, H.: Total polyphenols and antioxidant activities of green tea powder from GMB 7 and GMB 9 tea clones. *The 2nd International Conference on Sustainable Plantation IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 2022, 974 012113 Indonesia, Bogor, September 2 – 3, 2021. Doi:10.1088/1755-1315/974/1/012113.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 3: 87 – 95, 2023

FARMAKOTERAPEUTICKÝ EFEKT CINAKALCETU U PACIENTOV S PRIMÁRNOU HYPERPARATYREÓZOU

PHARMACOTHERAPY EFFECT OF CINACALCET IN PATIENTS WITH PRIMARY HYPERPARATHYROISIS

Szabóová, Renáta[1]; Herich, Róbert[2]; Krivjančinová, Sidónia[1]

[1]Katedra biológie a fyziológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach Komenského 73, 041 81 Košice
[2]Katedra morfologických disciplín
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

renata.szaboova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Primárna hyperparatyreóza je endokrinologické ochorenie spôsobené zvýšenou aktivitou prištítneho telieska, ktoré produkuje nadmerné množstvo parathormónu. Cieľom štúdie bolo sledovať farmakoterapeutický efekt účinnej látky cinakalcet na hladiny vápnika, ionizovaného vápnika a parathormónu v krvnom sére vo zvolenom rovnakom časovom intervale u pacientok (n = 10) v seniorskom veku s diagnózou primárna hyperparatyreóza. Počas sledovaného obdobia pacientok sme zaznamenali signifikantné zníženie (P < 0,001) priemernej hladiny vápnika ako aj ionizovaného vápnika v krvi celej skupiny pacientok počas liečby cinakalcetom v porovnaní s obdobím pred terapiou ochorenia. Taktiež sa efekt cinakalcetu prejavil aj pri sledovaní priemernej hladiny parathormónu v celej skupine pacientok, pričom pred terapiou bola zaznamenaná zvýšená produkcia parathormónu (primárnou príčinou bola hyperkalciémia). Po terapii cinakalcetom bola sledovaná znížená produkcia PTH u 70 % pacientok (n = 7) v porovnaní s obdobím pred terapiou primárnej hyperparaytreózy.

Kľúčové slová: parathormón; primárna hyperparatyreóza; symptóm; terapia

ABSTRACT

Primary hyperparathyroidism is an endocrine disease caused by increased activity of parathyroid gland, that produces excessive amounts of parathyroid hormone. The aim of the study was to monitor the pharmacotherapeutic effect of the active substance cinacalcet on the calcium, ionized calcium and parathormone level in the blood se-

rum in the same selected time interval in patients – women (n = 10) in senior age with a diagnosis of primary hyperparathyroidism. During the monitored period, patients showed a significant decrease (P < 0.001) in the average level of calcium as well as ionized calcium in the blood of patients group during treatment with cinacalcet compared to the period before the disease therapy. The effect of cinacalcet was also manifested by monitoring the average level of parathyroid hormone in the group of patients, while increase of parathyroid hormone production was noted before therapy (the primary cause was hypercalcemia). After cinacalcet therapy, the decrease of parathyroid hormone production was observed in 70 % of patients (n = 7) compared to the period before therapy of primary hyperparathyroidism.

Key words: parathyroid hormone; primary hyperparathyroidism; symptom; therapy

ÚVOD

Zvýšená aktivita prištítnych žliaz – hyperparatyreóza vzniká v dôsledku vnútorných zmien týkajúcich sa vylučovania parathormónu alebo vonkajších zmien súvisiacich s porušením homeostázy vápnika. Rozoznávame tri základne typy hyperparatyreózy, a to primárnu, sekundárnu a terciárnu hyperparatyreózu (Fraser, 2009). Primárna hyperparatyreóza (PH) patrí v súčasnosti medzi rozšírené endokrinologické ochorenia a je charakterizovaná nadmernou produkciou parathormónu (PTH) z jedného alebo viacerých prištítnych teliesok. Dôležitosť parathormónu spočíva hlavne v regulácii homeostázy vápnika a fosforu v organizme. Hyperkalciémia je hlavným ukazovateľom daného ochorenia, kedy sa vápnik nadmerne uvoľňuje z kostného tkaniva a prestupuje do krvného obehu. Priebeh ochorenia sa môže vyskytovať asymptomaticky – bez príznakov alebo symptomaticky – prostredníctvom rôznych symptómov v kostiach, obličkách, gastrointestinálnom a kardiovaskulárnom aparáte (viď tab. 1). Hlavnými príčinami vzniku je zvyčajne prítomnosť adenómov a karcinómov v prištítnych telieskach alebo genetické či metabolické poruchy (MacKenzie-Feder a kol., 2011).

V posledných piatich desaťročiach sa klinický obraz PH zmenil v rôznych regiónoch sveta. Porovnanie výskytu a klinických aspektov choroby medzi krajinami je veľmi komplikované z dôvodu rôznej dostupnosti zdrojov informácií, diagnostiky alebo liečby (Bilezikian a kol., 2018). Prevalencia PH sa líši v závislosti od krajiny a rasy, pričom primárna hyperparatyreóza prevláda hlavne u žien, ktoré sú v období postmenopauzy, a to v pomere 4 : 1 (ženy : muži). V severnej Amerike a v Európe sa PH vyskytuje predovšetkým ako ochorenie asymptomatické. Databázy v USA poukazujú na vyšší výskyt ochorenia u ľudí s tmavšou farbou pleti v porovnaní s osobami so svetlou farbou pleti. V latinskej Amerike má toto ochorenie symptomatický priebeh u polovice obyvateľov. V ázijských krajinách ako sú Čína a India sa PH javí skôr symptomaticky, a to hyperkalciémiou a poruchami orgánov (Bilezikian a kol., 2018).

Primárna hyperparatyreóza patrí medzi tretiu najviac sa vyskytujúcu endokrinologickú chorobu, a to po ochorení *diabetes mellitus* a ochorení funkcie štítnej žľazy, s prevalenciou v intervale 0,1 – 1,0 %. Incidencia PH je najvyššia u ľudí vo veku 50 – 60 rokov, pričom celosvetovo postihuje 2 % ľudí vo veku nad 55 rokov (Madkhali a kol., 2016).

Sekrécia parathormónu je za fyziologických podmienok stimulovaná poklesom hladiny extracelulárneho vápnika. Vedomosť mechanizmu fungovania homeostázy vápnika sa objavila receptorom pre vápnik. Ak sa extracelulárny vápnik viaže na vápnikový receptor v bunke prištítneho telieska, vylučovanie PTH a rast prištítnych buniek sú spomalené (Khan a kol., 2016).

Pacienti s PH sa nevyznačujú typickými špecifickými symptómami, avšak sú prítomné nešpecifické komplikácie akými sú depresia, strata pamäti, nespavosť, únava, bolesti svalov alebo kostí (Madkhali a kol., 2016). Klinický obraz (viď tab. 1) závisí hlavne od dĺžky trvania nadprodukcie PTH (Kršek, 2011).

Hyperkalciémia spôsobená nadmernou sekréciou

Tab. 1: Klinické príznaky primárnej hyperparatyreózy

Neurologické	bolesti hlavy, somnolencia, kóma, EEG abnormality, hyporeflexia
Mentálne	iritabilita, sťažená koncentrácia, únava, apatia, psychóza
Kardiovaskulárne	hypertenzia, skrátený interval QT, kalcifikácia chlopní
Neuromuskulárne	svalová slabosť, myalgia, svalová hypotónia, ataxia
Kožné	Svrbenie
Kĺbové	artralgia, dna, pseudodna
Gastrointestinálne	pankreatitída, anorexia, nauzea, zvracanie, zápcha, strata hmotnosti, vredy, cholecystolitiáza
Kostné	bolesti kostí, kostné cysty, demineralizácia, zlomeniny
Renálne	polyúria, hematúria, dysúria, nefrolitiáza, polydipsia, znížená glomerulárna filtrácia
Očné	ukladanie vápnika do spojiviek

Zdroj: Marek a kol., 2017

PTH z jedného alebo viacerých prištítnych teliesok je základným biochemickým znakom PH. Diferenciálna diagnostika hyperkalciémie zahŕňa malignitu, užívanie lítia a tiazidových diuretík, nadbytok vitamínov D a A, ako aj ochorenia akými sú sarkoidóza, mnohopočetný myelóm, hypertyreóza a tzv. milk-alkali syndróm. U pacientov s PH sa často pozoruje znížené množstvo aktívnej formy vitamínu D (kalcitriolu), čo však predstavuje dôsledok, nie príčinu nadbytku PTH. Pri závažných formách PH sú zvyčajne v sére diagnostikované tiež nízke hladiny fosfátu (Bilezikian a kol., 2018).

Cieľom tejto štúdie je zhodnotenie výsledkov hladiny sledovaných parametrov (Ca, ionizovaný Ca, PTH) v krvnom sére a porovnanie ich hodnôt pred a po liečbe pomocou cinakalcetu u pacientok v seniorskom veku s diagnózou PH počas určitého časového obdobia s následným indikovaným chirurgickým zákrokom.

MATERIÁL A METÓDY

Súčasťou tejto práce je spracovanie kazuistík žien (n = 10) vo veku 60 – 80 rokov poskytnuté z lekárskych výpisov endokrinologickej ambulancie, pričom boli dodržané zásady GDPR. Každej pacientke bola diagnostikovaná primárna hyperparatyreóza na základe laboratórnych biochemických vyšetrení a zobrazovacích metód. V krvnom sére pozorovaných pacientok boli vyšetrované nasledovné parametre – hladina vápnika (Ca; vyjadrená v $mmol.l^{-1}$), ionizovaného vápnika (iCa; vyjadrená v $mmol.l^{-1}$) a parathormónu (PTH; vyjadrená v $ng.l^{-1}$). Stanovené hodnoty týchto parametrov boli porovnané a vyhodnotené s fyziologickou normou/referenčnou hodnotou (viď tab. 2) v troch mesačných intervaloch označených ako 1., 2. a 3. kontrola, a to počas jedného roka pred a následne po terapii liečivom cinakalcet obsiahnutom v lieku Cinacalcet Mylan 30 mg (Mylan Laboratories SAS, Francúzsko), prípadne Mimpara 30 mg (Amgen Europe B. V., Holandsko). Hladina ionizovaného vápnika sa stanovovala výpočtom z koncentrácie biochemických parametrov: celkové bielkoviny ($g.l^{-1}$) a vápnik v krvnom sére pacientok (viď schéma 1). Zo zobrazovacích metód podstúpili pacientky dvojfázové scintigrafické vyšetrenie a ultrasonografiu, na základe ktorých bolo lokalizované miesto výskytu adenómu, prípadne adenómov prištít-

Tab. 2: Fyziologické normy biochemických parametrov v krvnom sére u žien

Sledované parametre	Fyziologické normy u dospelých	Jednotka
Ca	2,20 – 2,65	$mmol.l^{-1}$
Ionizovaný Ca	0,90 – 1,30	$mmol.l^{-1}$
PTH	12,00 – 72,00	$ng.l^{-1}$

Zdroj: Oddelenie laboratórnej medicíny – klinická biochémia (Nemocnica Snina s. r. o., Snina, Slovenská republika)

Schéma 1: Vzorec na výpočet hladiny ionizovaného vápnika v krvnom sére

Vzorec:

$iCa = 97,2 \times A/B + 116,7$

iCa – ionizovaný vápnik [$mmol.l^{-1}$]; A – vápnik v sére [$mmol.l^{-1}$];

B – celkové bielkoviny v plazme [$g.l^{-1}$]

Zdroj: http://www.nspka.cz/okbh-lab-prirucka/HVEZDAAAGB.htm

nych teliesok. Primárne bol pacientkam indikovaný chirurgický zákrok, ktorý väčšina z nich v súčasnosti neabsolvovala z dôvodu polymorbidity, veku alebo nepriaznivej epidemiologickej situácie v rámci koronavírusového ochorenia (Covid 19, Corona virus disease 19).

Priemerné hodnoty sledovaných parametrov so smerodajnou odchýlkou (SD), štatistická analýza výsledkov ako aj štatistická významnosť rozdielov bola určená a porovnaná pomocou jednocestnej Anovy a potvrdená Tukey-post testom (MiniTab, Česká republika). Hladina štatistickej významnosti 0,001 bola vyjadrená hodnotou P ($P < 0,001$).

VÝSLEDKY

Prehľad priemerných hodnôt (získaných z troch vyšetrení v mesačných intervaloch) sledovaných biochemických parametrov (Ca, iCa, PTH) pred a po terapii cinakalcetom, ako aj miesto výskytu adenómu každej pacientky zobrazuje tabuľka 3. Porovnanie priemerných hladín Ca, iCa a PTH pred terapiou a po terapii je graficky znázornené v stĺpcových grafoch 1, 2 a 3.

Počas sledovaného obdobia sme zaznamenali signifikantné zníženie ($P < 0,001$) priemernej hladiny vápnika ako aj ionizovaného vápnika v krvi v celkovom priemere, a to po terapii cinakalcetom celej skupiny pacientok v porovnaní pred terapiou ochorenia (viď tab. 4).

Vplyv cinakalcetu pri liečbe primárnej hyperparatyreózy sa prejavil u pacientok aj pri sledovaní priemernej hladiny parathormónu (viď tab. 4) v celej skupine, pričom pred terapiou sme u pacientok zaznamenali inhibíciu produkcie PTH. Po terapii PH pomocou cinakalcetu bola zaznamenaná normokalciémia, t. j. produkcia PTH bola počas liečby stimulovaná v porovnaní s produkciou PTH pred terapiou primárnej hyperparaytreózy.

DISKUSIA

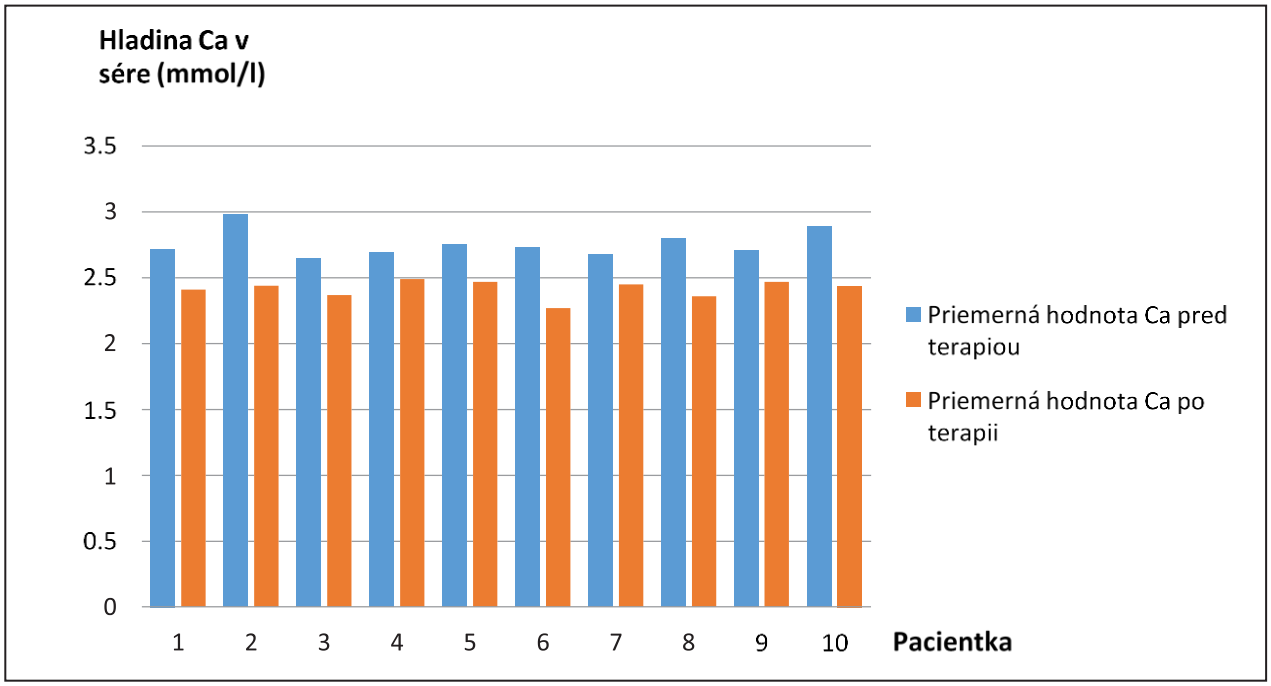
Primárna hyperparatyreóza je najčastejšia príčina hyperkalciémie a má incidenciu 25 prípadov na 100

Tab. 3: Priemerné hodnoty sledovaných parametrov pred a po terapii cinakalcetom, miesto výskytu adenómu u pacientok s PH

P.	Pohlavie/vek	Priemerná hodnota pred terapiou			Priemerná hodnota po terapii			Miesto výskytu adenómu PT
		Ca (mmol.l^{-1})	iCa (mmol.l^{-1})	PTH (ng.l^{-1})	Ca (mmol.l^{-1})	iCa (mmol.l^{-1})	PTH (ng.l^{-1})	
1	žena/75	2,72	1,42	78,33	2,41	1,28	78,33	dolné ľavé PT
2	žena/80	2,98	1,53	317,67	2,44	1,27	303,33	1 dolné ľavé a 1 pravé PT
3	žena/79	2,65	1,36	125,67	2,37	1,23	122,33	1 dolné ľavé PT
4	žena/63	2,69	1,38	119,33	2,49	1,31	121,37	1 dolné pravé PT
5	žena/67	2,75	1,41	209,8	2,47	1,28	217,2	1 dolné ľavé PT
6	žena/75	2,73	1,40	154,27	2,27	1,19	116,00	1 dolné pravé PT
7	žena/65	2,68	1,38	84,6	2,45	1,28	72,1	1 dolné pravé PT
8	žena/66	2,80	1,38	130,00	2,36	1,20	105,67	1 dolné pravé PT
9	žena/78	2,71	1,37	119,67	2,47	1,24	97,50	1 horné ľavé PT
10	žena/73	2,89	1,43	192,67	2,44	1,25	178,33	1 dolné a 1 horné ľavé PT

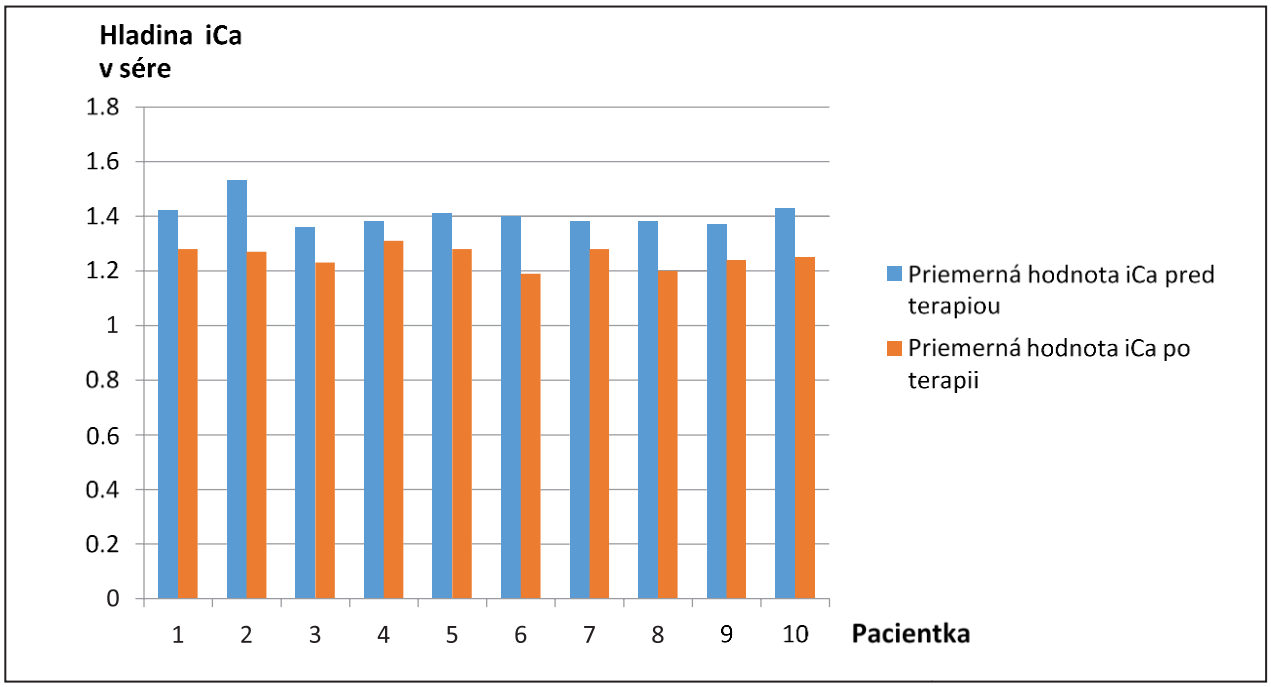
P. – pacientka, Ca – vápnik, iCa – ionizovaný vápnik, PTH – parathormón, PT – prištítne telieska; referenčný interval fyziologickej normy: Ca (mmol.l^{-1}): 2,20 – 2,65; iCa (mmol.l^{-1}): 0,90 – 1,30; PTH (ng.l^{-1}): 12 – 72

Graf 1: Hladiny Ca v sére pacientok – porovnanie priemerných hodnôt pred terapiou a po terapii



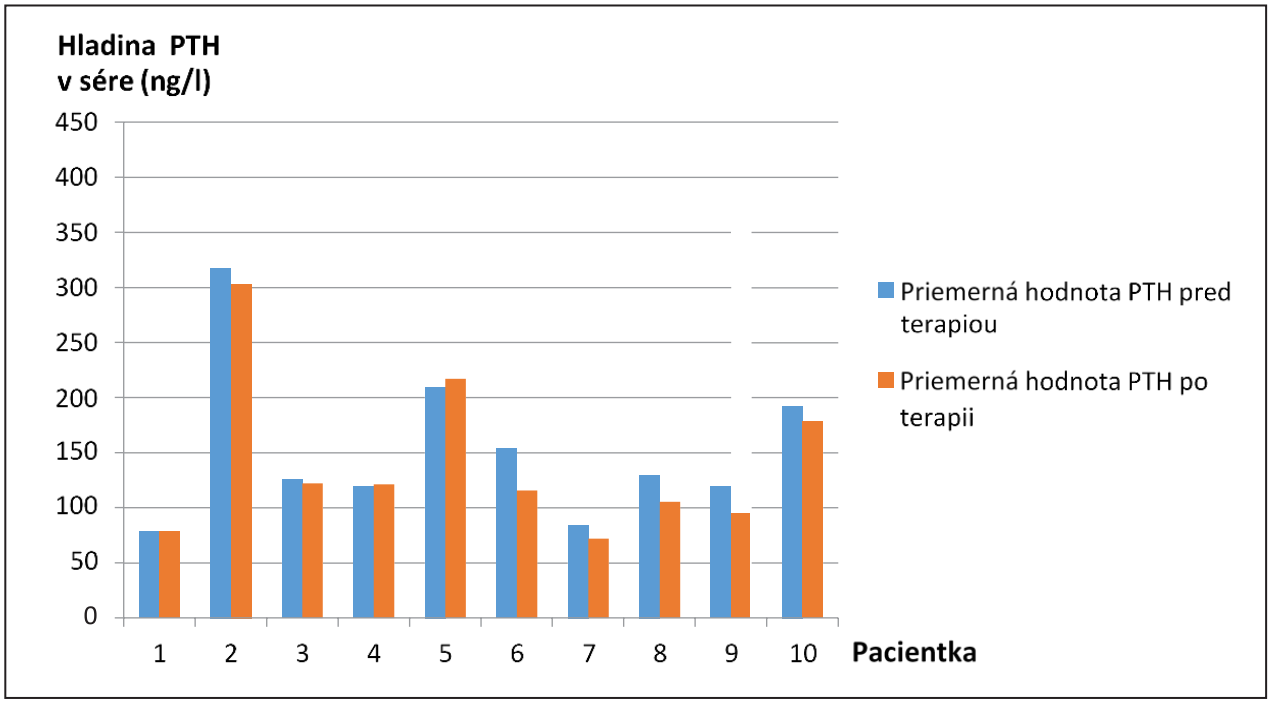
Ca – vápnik; referenčný interval fyziologickej normy: Ca (mmol.l^{-1}): 2,20 – 2,65

Graf 2: Hladiny iCa v sére pacientok – porovnanie priemerných hodnôt pred terapiou a po terapii



iCa – ionizovaný vápnik; referenčný interval fyziologickej normy: iCa (mmol.l^{-1}): 0,90 – 1,30

Graf 3: Hladiny PTH v sére pacientok – porovnanie priemerných hodnôt pred terapiou a po terapii



PTH – parathormón; referenčný interval fyziologickej normy: PTH (ng.l^{-1}): 12 – 72

Tab. 4: Priemerná koncentrácia Ca, iCa a PTH pred a po terapii v rámci pacientok (n = 10) s primárnou hyperparatyreózou

Pacientky (n = 10)		Pred terapiou	Po terapii
Ca (mmol.l^{-1})	Priemer	2,76^{a}	2,41^{b}
	SD	0,12	0,13
iCa (mmol.l^{-1})	Priemer	1,41^{a}	1,25^{b}
	SD	0,06	0,07
PTH (ng.l^{-1})	Priemer	153,20	141,21
	SD	75,37	90,82

Ca – vápnik, iCa – ionizovaný vápnik, PTH – parathormón; SD – štandardná odchýlka; štatistická významnosť je vyjadrená hodnotou P, pričom rozdielne písmená (^{ab}) vyjadrujú štatistickú významnosť P < 0,001

000 osôb celej populácie, pričom výskyt s pribúdajúcim vekom stúpa, pričom sa 4-krát častejšie objavuje u žien ako u mužov (Suliburk a Perrier, 2007). Diagnostika tohto ochorenia je náročná z dôvodu zvýšenej incidencie asymptomatických pacientov. Taktiež veľký podiel na stanovení diagnózy primárna hyperparatyreóza majú lekári – špecialisti, ako internista (stanovia 90 % prípadov), urológ (50 %), neurológ (30 %), ortopéd (20 %) a stomatológ (3 %) (Hnízdil a kol., 2013). Hyperkalciémia sa najčastejšie diagnostikuje pri rutinnom odbere krvi, ako to bolo aj u sledovaných pacientok. Za miernu hyperkalciémiu sa považuje hodnota 2,63 – 3,00 mmol.l^{-1}, vyššie hodnoty ako 3,50 mmol.l^{-1} sa môžu podieľať na vzniku patologických procesov (Carroll a Schade, 2003). Typické klinické príznaky primárnej hyperparatyreózy súvisia s renálnym, kostným, gastrointestinálnym, kardiovaskulárnym či neurologickým poškodením (Bobčák, 2017). Madkhali a kol. (2016) uvádzajú, že u 80 – 85 % pacientov s primárnou hyperparatyreózou je hlavnou príčinou vzniku daného ochorenia prítomnosť adenómu prištítneho telieska (prítomný u pacientok 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) alebo viac ako jedného adenómu na prištítnych telieskach ako je to u pacientok 2 a 10, ojedinelý je výskyt karcinómu PT.

Vzhľadom na vysoké percento nádorových zmien tkaniva prištítnych teliesok je chirurgický zákrok, t. j. odstránenie adenómu, hlavným liečebným postupom PH. Broulík a kol. (2007) zdôrazňujú, že u pacientov s vysokou hladinou PTH v dôsledku prítomnosti veľkých adenómov v prištítnych telieskach môže nastať paratyroidálna kríza, ktorá sa prejavuje najmä srdcovou arytmiou, hyperkalciémiou a dehydratáciou. Komplikovanejšie to je u pacientov, ktorým nie je indikovaný chirurgický výkon na prištítnych telieskach z rôznych dôvodov: 1. polymorbidita a vek (pacientka 1, 6, 7, 9); 2. odmietanie operácie (pacientka 2); 3. pozastavenie operácie (pacientka 3 a 5). Najvhodnejšou medikamentóznou liečbou s cieľom znížiť hladiny vápnika v krvi je podávanie kalcimimetík – cinakalcetu alebo bisfosfonátov. V postmenopauzálnom období žien sa môžu podávať aj estrogény (Broulík a kol., 2007).

Diagnostika PH u pacientok bola dôležitým cieľom praktickej časti štúdie zameranej na laboratórne biochemické vyšetrenia – hladiny Ca, iCa a PTH v krvnom sére ako aj využitie diagnostických zobrazovacích metód. U všetkých pacientok bola stanovená hodnota sledovaných biochemických parametrov vyššia v porovnaní s intervalom fyziologickej normy.

Opakovanou zvýšenou hladinou vápnika v krvi, t. j. minimálne 3-krát, sa stanovila hyperkalciémia, ktorá patrí medzi primárne príčiny PH. Zobrazenie tkaniva prištítnych teliesok je podľa Khan a kol. (2016)

štandardným predoperačným postupom na zistenie presnej lokalizácie abnormálne vyvinutého tkaniva prištítnych teliesok, pričom u všetkých pacientok bolo vykonané scintigrafické vyšetrenie (najčastejšie s údajmi – 99mTc MIBI) s následným nálezom adenómu lokalizovaného v prištítnych telieskach. Medikamentózna liečba cinakalcetom bola použitá až po vykonaní daného zobrazovacieho vyšetrenia.

Hlavným cieľom štúdie bolo zistiť účinnosť medikamentóznej liečby s účinnou látkou cinakalcet, v ktorej sa ako liek užíval Cinacalcet Mylan 30 mg, pričom v jednom prípade (pacientka 10) sa použil originálny liek Mimpara 30 mg. Zo štúdií vyplýva, že farmakoterapia účinnou látkou cinakalcet počas určitého časového obdobia má za následok zníženie koncentrácie vápnika v krvnom sére (Marcocci a kol., 2009); čo sa taktiež potvrdilo u všetkých našich pacientok. Marcocci a kol. (2009) uvádzajú, že hladina vápnika v sére sa zníži viac ako o 0,25 $mmol.l^{-1}$ u viac ako 60 % pacientov s rakovinou prištítnych teliesok. Avšak cinakalcet nedokáže upraviť hodnoty PTH na optimálnu hladinu, a to kvôli fyziologickým vlastnostiam PTH alebo prítomnosti adenómu lokalizovaného v prištítnych telieskach. Z týchto dôvodov sa cinakalcet používa hlavne na zníženie hyperkalciémie počas čakacej doby na operáciu. Z nežiaducich účinkov sa najčastejšie vyskytujú nauzea, zvracanie a zriedkavo hypokalciémia (Ng a kol., 2020), ktorá u našich pacientok nebola pozorovaná.

Počas troch mesiacov užívania účinnej látky cinakalcet hladina vápnika ako aj ionizovaného vápnika v krvnom sére varírovala v intervaloch referenčných hodnôt, t. j. bol zaznamenaný pokles hladín Ca na fyziologické hodnoty, a to u 100 % sledovaných pacientok, čo zobrazuje graf 1. Taktiež bolo pozorované signifikantné zníženie ($P < 0,001$) priemernej hladiny vápnika ako aj ionizovaného vápnika v krvi v celkovom priemere skupiny, a to po terapii cinakalcetom v porovnaní s obdobím pred terapiou ochorenia. Hladina PTH bola nestabilná nielen pred terapiou, ale aj po liečbe cinakalcetom (viď graf 3); a to u 70 % pacientok (2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) sa znížila hladina PTH, u 20 % pacientok (4, 5) sa zvýšila hladina PTH, u pacientky 1 ostala hladina PTH nemenná. Po diagnostike PH bol pacientkam indikovaný chirurgický zákrok, ktorý je podľa Broulík a kol. (2007) primárnym liečebným postupom, kde po odstránení adenómu dochádza k vzniku pooperačnej hypokalciémie. Za úspešný chirurgický zákrok na prištítnych telieskach sa považuje pokles PTH v krvnom sére o viac než 50 % už niekoľko minút po operácii (Broulík a kol., 2007).

Štúdie uvádzajú, že u pacientov liečených chirurgicky je recidíva obličkových kameňov (nefrolitiáza) 0 % (prítomná u pacientky 8), nakoľko môžu absentovať aj iné sprievodné klinické príznaky ako sú: riziko vzniku zlomenín (prítomné u pacientok 4, 5, 6, 8); kardiovaskulárne problémy (prítomné u pacientky 3), neurologické prejavy (Madkhali a kol., 2016). Paratyreoidektómiu doposiaľ podstúpili pacientky 4, 8 a 10, po ktorej pretrvávala normokalciémia alebo prechodná hypokalciémia.

Pravidelné sledovanie hladín vápnika a PTH sú dôležitou súčasťou terapie a kontrolných vyšetrení každého pacienta s potvrdenou PH. Dôležité je regulovať príjem vápnika a vitamínu D. Obmedzenie príjmu vápnika a nedostatok vitamínu D by mohlo spôsobiť zvýšenú produkciu PTH z poškodeného prištítneho telieska (Bilezikian a kol., 2018).

ZÁVER

Primárna hyperparatyreóza patrila v minulosti medzi zriedkavé endokrinologické ochorenia. Za posledných 40 rokov sa klinický obraz ochorenia výrazne zmenil. Rutinné stanovenie vápnika v krvnom sére prispelo k lepšej identifikácii asymptomatických pacientov s PH, ktorých výskyt je v súčasnosti vyšší v porovnaní so symptomatickými pacientami.

Klinické príznaky PH sú často rôzne, no nie sú typické iba pre tento typ ochorenia. Okrem primárneho typu hyperparatyreózy sa diagnostikujú aj iné typy: sekundárna a terciárna hyperparatyreóza. Hlavnou príčinou primárnej hyperparatyreózy je vrátane genetických porúch aj prítomnosť adenómu a hyperplázia prištítnych teliesok, zriedkavo dochádza v parenchýme prištítnych teliesok k tvorbe karcinómu.

Extirpácia adenómu prištítneho telieska sa považuje za primárnu liečbu ochorenia. Pre úspešnosť celkovej liečby je dôležitá spolupráca viacerých lekárov – špecialistov, akými sú endokrinológ, chirurg, urológ a genetik. Dôležité je najmä včas zachytiť a rozpoznať symptómy ochorenia pomocou skríningu a pravidelnej kontroly u lekára, aby sa znížila úmrtnosť pacientov na dané ochorenie.

ZOZNAM LITERATÚRY

Bilezikian, J. P.: Primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2018, 103 (11), 3993 – 4004.

Bobčák, P.: Primárna hyperparatyreóza – kazuistika [Primary hyperparathyroidism]. *Via practica*, 2017, 14 (4), 198 – 200.

Broulík, P., Adámek, S., Libánský, P., Tvrdoň, J.: Diagnostika a léčba primární hyperparatyreózy [Diagnosis and treatment of primary hyperparathyroidism]. *Interní medicína pro praxi*, 2007, 3, 130 –132.

Carroli, M. F., Schade, D. S.: A practical approach to hypercalcemia, *American Family Physician*, 2003, 67 (9), 1959 – 1966.

Fraser, D. W.: Hyperparathyroidism, *The Lancet*, 2009, 374 (9684), 145 – 158.

Hnízdil, L., Procházková, I., Jedlička, V., Žák, J., Kalač, J., Wechsler, J., Čapov, I.: Adenom příštítného tělíska [Adenoma of parathyroid gland]. *Onkologie*, 2013, 7 (5), 252 – 255.

http://www.nspka.cz/okbh-lab-prirucka/HVEZDAAAGB.htm. [cit. 2023- 02-22].

Khan, A. A., Hanley, D. A., Rizzoli, R., Bollerslev, J., Young, J. E. M., Rejnmark, L., Thakker, R., D' amour, P., Paul, T., Uum, S. V., Shrayyef, M. Z., Goltzman, D., Kaiser, S., Cusano, N. E:, Rouillon, R., Mosekilde, L., Kung, A. W., Rao, S. D., Bhadada, S. K., Clarke, B. L., Liu, J., Duh, Q., Lewiecki, E. M., Bandeira, F., Eastell, R., Marcocci, C., Silverberg, S. J., Udelsman, R., Davison, K. S:, Potts, J. T., Brandi, M. L., Bilezikian, J. P.: Primary hyperparathyroidism: review and recommendations on evaluation, diagnosis and management. A Canadian and international consensus, *Osteoporosis International*, 2016, 28, 1 – 19.

Kršek, M.: Endokrinologie [Endocrinology]. 1. vyd. Praha: Galén, 2011. 97 s.

Mackenzie-Feder, J., Sirrs, S., Anderson, D., Sharif, J., Khan, A.: Primary hyperparathyroidism: an Overview. *International Journal of Endocrinology*, 2011, 2011, 251 410.

Madkhali, T., Alhefdhi, A., Chen, H., Elfenbein, D.: Primary hyperparathyroidism. *Turkish Journal of Surgery*, 2016, 32 (1), 58 – 66.

Marcocci, C., Chanson, P., Shoback, D., Bilezikian, J., Fernandez-Cruz, L., Orgiazzi, J., Henzen, Ch., Cheng, S., Sterling, L. R., Lu, J., Peacock, M.: Cinacalcet reduces serum calcium concentrations in patients with intractable primary hyperparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2009, 94 (8), 276 – 2772.

Marek, J.: Endokrinologie [Endocrinology]. 1. vyd. Praha: Galén, 2017. 692 s.

Ng, H. Ch., Chin, Y. H., Tan, M. H. Q., Ng, J. X., Yang, S. P., Kiew, J. J., Khoo, C. M.: Cinacalcet and primary hyperparathyroidism: systematic review and meta regression, *Endocrine connections*, 2020, 9 (7), 724 – 735.

Suliburk, J. W., Perrier, N. D.: Primary hyperparathyroidism. *The Oncologist*, 2007, 12, 644 – 653.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 3: 96 – 108, 2023

ABÚZUS NESTEROIDNÝCH ANTIFLOGISTÍK AKO JEDEN Z FAKTOROV VZNIKU GASTRODUODENÁLNEJ VREDOVEJ CHOROBY

ABUSUS OF NONSTEROIDAL ANTI-IFLAMMATORY DRUGS AS ONE OF THE FACTORS IN THE DEVELOPMENT OF GASTRODUODENAL ULCER DISEASE

Juhászová, Andrea; Galajda, Richard

Katedra biológie a fyziológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Slovenská republika

richard.galajda@uvlf.sk

ABSTRAKT

Nesteroidné antiflogistiká (NSA) sú považované za jedny z najviac využívaných liečiv, určených na terapiu zápalu, bolesti, horúčky, u niektorých je významný aj antiagregačný efekt. Štúdia vychádza z opisu základných vlastností, mechanizmu účinku, účinnosti, kontraindikácií a liekových interakcií NSA a zhodnotenia zdravotných rizík vyplývajúcich z ich nadmerného užívania. Hlavným cieľom bolo zhrnutie informácií o zneužívaní NSA v súvislosti s výskytom nežiaducich účinkov, najmä z pohľadu gastrotoxicity. V práci sme vychádzali z výsledkov observačnej štúdie realizovanej formou dotazníkov prístupných v troch verejných lekárňach, v dvoch ambulanciách všeobecného lekára, v dvoch gastroenterologických ambulanciách a v jednom dennom stacionári nachádzajúcich sa v rámci Košického kraja počas troch mesiacov od decembra 2022 do februára 2023. Otázky pre respondentov boli zamerané na zistenie spotreby NSA a hľadanie súvislostí medzi pohlavím, vekom užívateľov, indikáciami, frekvenciou užívania, prítomnosťou rizikových faktorov a výskytom gastroduodenálneho vredu. V ďalšej časti sme analyzovali informácie z verejne prístupných zdrojov – Národného ústavu zdravotníckych informácii (NCZI) o spotrebe vybraných najčastejšie používaných liekov zo skupiny NSA v Slovenskej republike za obdobie rokov 2015 – 2022 s cieľom potvrdiť trend zvyšujúceho sa užívania nesteroidných antiflogistík. Výsledky štúdie v súlade so závermi dostupných vedeckých pozorovaní potvrdili vyššie riziko vzniku gastroduodenálnych vredov predovšetkým u starších pacientov s pravidelným užívaním NSA a prítomnosťou ďalších rizikových faktorov. Prínos práce spočíva tiež v zhrnutí a poukázaní na rôzne možnosti gastropro-

tekcie a dôvodov nedostatočnej informovanosti užívateľov NSA.

Kľúčové slová: abúzus; gastroduodenálny vred; nesteroidné antiflogistiká (NSA)

ABSTRACT

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are considered to be one of the most widely used drugs, they are used to treat inflammation, pain, fever, and some have a significant anti-aggregation effect. The study is based on the description of the basic properties, mechanism of action, effectiveness, contraindications and drug interactions of non-steroidal antiphlogistics and evaluation of the health risks resulting from their excessive use. The main objective was to collect information on the abuse of NSAIDs in relation to the occurrence of adverse effects, especially from the point of view of gastrotoxicity. The work was based on the results of an observational study carried out in the form of questionnaires accessible in three public pharmacies, in two general practitioner clinics, in two gastroenterology clinics and in one day hospital located within the Košice region during three months from December 2022 to February 2023. The questions for the respondents were aimed at determining the consumption of NSAs and looking for connections between gender, age of users, indications, frequency of use, presence of risk factors and occurrence of gastroduodenal ulcer. In the next part, we analyzed information from publicly accessible sources – National Centre of Health Information (NCZI) about the consumption of selected most commonly used drugs from the NSA group in Slovakia for the period 2015 – 2022 with the aim of confirming the trend of increasing use of nonsteroidal antiphlogistics. The results of the study, in accordance with the conclusions of available scientific observations, confirmed a higher risk of developing gastroduodenal ulcers, especially in older patients with regular use of NSAIDs and the presence of other risk factors. The contribution of the work also consists in summarizing and pointing out the various possibilities of gastroprotection and the reasons for the lack of information among NSAIDs users.

Key words: abuse; gastroduodenal ulcer; non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)

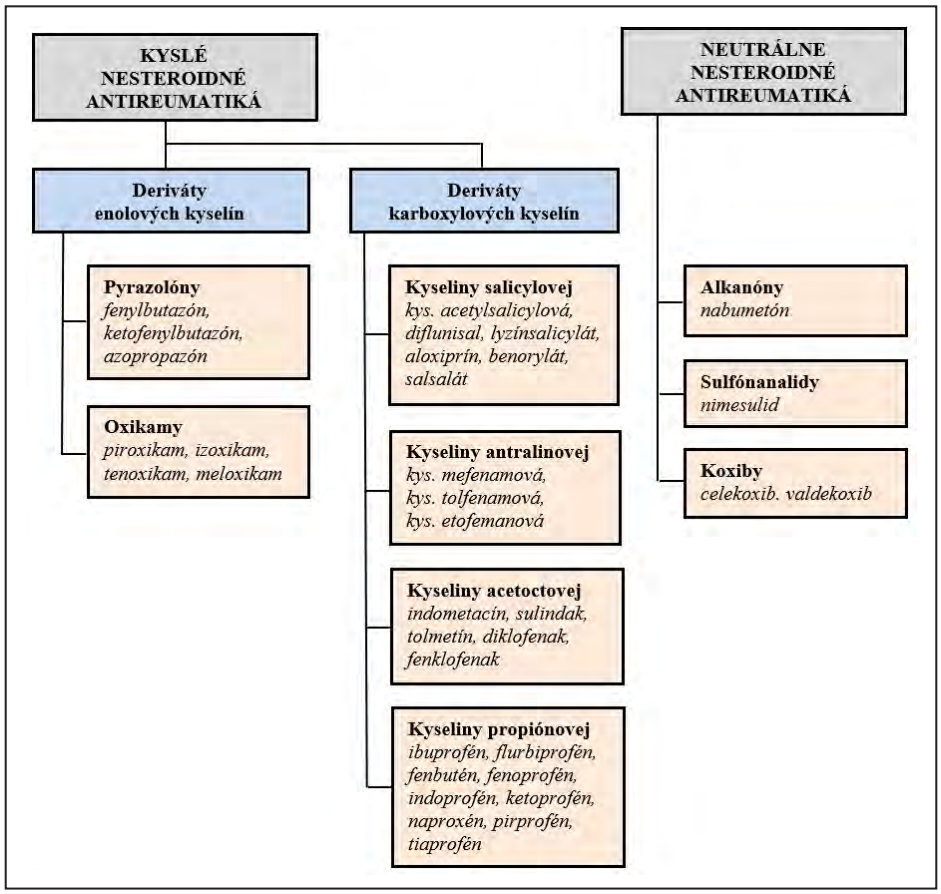
ÚVOD

Nesteroidné antiflogistiká (NSA) sú využívané modernou medicínou už viac ako sto rokov. Sú to osvedčené liečivá vďaka ich silnému antiflogistickému, analgetickému a antipyretickému účinku. U prípravkov s obsahom kyseliny acetylsalicylovej (KAS) je významný ich antiagregačný potenciál, ktorý má široké uplatnenie v internej medicíne a v kardiológii. Ich široký terapeutický rozsah prispel k vzniku rôznych liekových foriem, čo sa pozitívne prejavilo aj na ich obľúbenosti medzi pacientmi, k dispozícii je veľké množstvo generických verzií týchto liečiv. K ľahkej dostupnosti pre pacienta prispieva aj ich priaznivá cena a tiež to, že mnohé z nich je možné kúpiť v lekárňach aj bez lekárskeho predpisu (Shmerling, 2018). V súčasnosti sa táto farmakologická skupina liečiv rozšírila až na viac ako 200 účinných látok, ktoré sú rozdelené približne do 20 chemicky odlišných skupín. Rozdelenie podľa chemickej štruktúry je znázornené na obrázku 1 (Mirossay a Mojžiš, 2006).

Mechanizmus účinku NSA

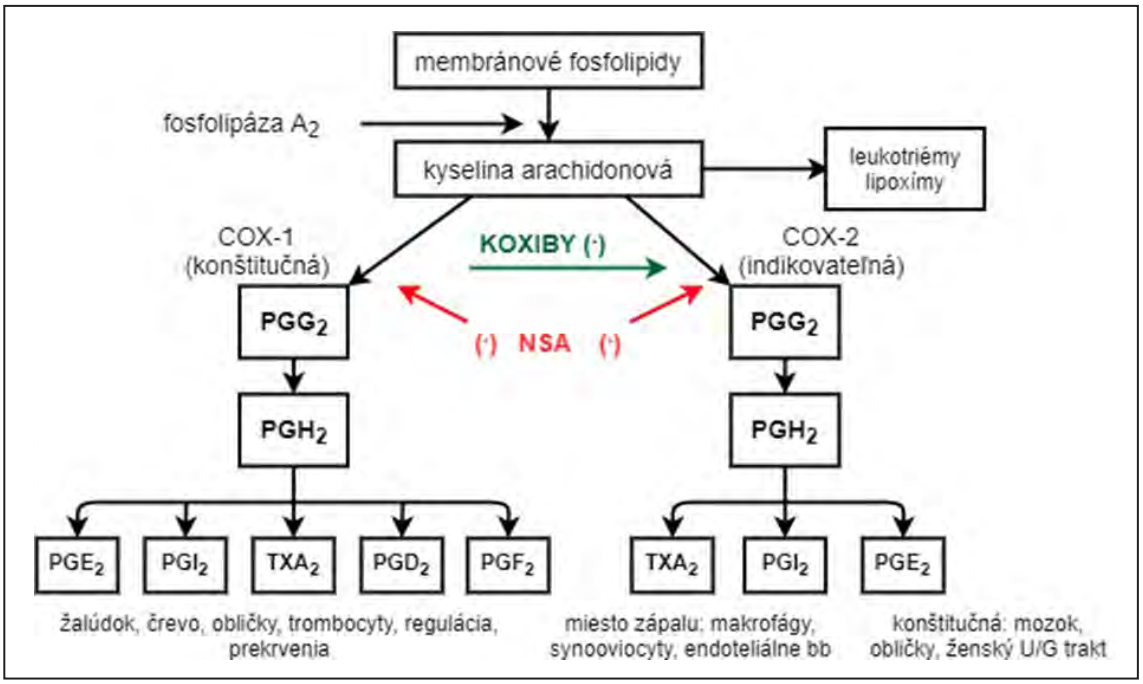
Podstatou mechanizmu účinku NSA je inhibícia enzýmu cyklooxygenáza (COX), ktorý existuje v dvoch izoformách, a to v konštitučnej (COX-1) a indukovateľnej (COX-2). Obe izoformy enzýmu COX katabolizujú tvorbu prostaglandínov (PG) a tromboxánov (TXA2) z kyseliny arachidonovej, ktoré zapríčiňujú zápalové procesy, bolesť a horúčku (Choi a kol., 2009). Rozdielne účinky jednotlivých foriem COX na orgánové sústavy a mechanizmus účinku NSA je znázornený na obrázku 2 (Lukáč, 2005).

Obr. 1: Rozdelenie NSA podľa chemickej štruktúry



Zdroj: Mirossay a Mojžiš, 2006

Obr. 2: Mechanizmus účinku NSA



Zdroj: Lukáč a kol., 2005

Gastrotoxicita NSA

Vysoký terapeutický efekt NSA je do určitej miery zatienený ich súčasným gastrotoxickým pôsobením, ktorý tvorí až 50 % všetkých nežiaducich účinkov (NU) a môže mať za následok závažné zdravotné komplikácie, v niektorých prípadoch až s fatálnym koncom. Za fyziologických podmienok je sliznica žalúdka chránená obrannými mechanizmami, kde prostaglandíny (hlavne prostaglandín E2 – PGE2) zohrávajú dôležitú úlohu v udržiavaní integrity žalúdoènej sliznice. Ich protektívny úèinok je sprostredkovaný nasledujúcimi procesmi: inhibícia sekrécie žalúdoènej kyseliny, stimulácia sekrécie mucusu a bikarbonátu, stimulácia sekrécie vody a elektrolytov do jejuna, zvýšenie slizniènèho prekrvenia a vazodilataèné úèinky. K narušeniu protektívnych procesov NSA dochádza dvoma mechanizmami gastrotoxického pôsobenia, **priamym toxickým** a **systémovým**.

Priamy toxický efekt pri NSA nastáva po kontakte liečiva so žalúdočnou sliznicou, pretože liečivo prejavuje leptavé vlastnosti z dôvodu obsahu kyslých skupín. Tým, že dôjde k adhézii liečiva na stenu žalúdka, dochádza ku kumulácii liečiva na jednom mieste žalúdočnej sliznice. NSA ako slabé kyseliny sa po perorálnej aplikácii dostávajú do kontaktu s kyslým prostredím žalúdka a strácajú schopnosť disociovať. V elektroneutrálnom stave ľahko prestupujú sliznicou žalúdka, dôsledkom čoho je priame poškodenie hlienovej a bikarbonátovej slizničnej bariéry a rozvoj gastropatií v rôznych podobách (erózie, perforácie, ulcerácie) (Lukáč a kol., 2005; Vostinaru, 2017). Opísanému mechanizmu priameho poškodzovania sliznice gastrointestinálneho traktu (GIT) sa však v súčasnosti pripisuje menšia váha po preskúmaní prostaglandínovej teórie popisujúcej systémový účinok NSA (Bjarnason a kol., 2018).

Systémový účinok NSA nastáva po vstrebaní liečiva a spočíva v blokácii COX-1, čo má za následok inhibíciu syntézy PG, ktoré sa podieľajú na cytoprotektívnych procesoch na sliznici žalúdka a duodena. Tieto ochranné mechanizmy sa podieľajú na udržiavaní integrity sliznice žalúdka, sekrécii žalúdočného hlienu a bikarbonátov, prietoku krvi sliznicou a proliferácii buniek epitelu (Killinger a kol., 2004). Deplécia ochranných PG má za následok zvýšenú sekréciu kyseliny chlorovodíkovej (HCl) a naopak zníženú sekréciu hlienu, hydrogén uhličitanu (HCO_3) a zníženú proliferáciu epitelových buniek zodpovedných za regeneračné vlastnosti sliznice. Nedostatočná tvorba cytoprotektívnych prostaglandínov vedie ku zníženiu obranyschopnosti sliznice GIT a k následnej prevahe agresívnych zložiek, ktorými sú HCL, pepsín, prítomnos *Helicobacter pylori* v žalúdku, žlč a komenzálne baktérie v tenkom čreve (Bjarnason a kol., 2018). Najčastejšie je postihnutá oblasť žalúdka a duodena, ale toxicita NSA sa prejavuje aj v iných častiach tenkého a hrubého čreva.

Gastrotoxickými účinkami NSA sa začali vo väčšej miere zaoberať odborníci v 80. rokoch minulého storočia. Z početného množstva publikácií, prehľadových prác a kazuistík vznikli štatistické závery, ktoré uvádzajú, že až 50 % pacientov užívajúcich NSA majú GIT ťažkosti prejavujúce sa dyspepsiou. Gastroduodenálne vredy potvrdené endoskopicky vznikajú približne u 10 – 20 % pacientov pri liečbe NSA (Lukáč a kol., 2005). Vážne komplikácie gastroduodenálnych vredov (obštrukcie, perforácie, krvácanie) postihuje 1 – 2 % jedincov, pričom úmrtnosť na spomínané komplikácie môže dosahovať hodnotu až 11 % (Fries, 1999). Terapia NSA by mala byť iniciovaná po zhodnotení klinického stavu pacienta a zvážením pomeru prínosov a možných gastrotoxických a kardiotoxických rizík najmä u starších polymorbídnych pacientov (Kriška a kol., 2002).

MATERIÁL A METÓDY

Výsledky štúdie vychádzali z nasledovných dvoch analýz:

1. Prvá analýza bola založená na vyhodnotení dotazníkov, ktoré boli vypracované na základe odborných poznatkov o vplyve nadmerného užívania NSA ako jedného z faktorov vzniku gastroduodenálnej vredovej choroby. Dotazníky boli prístupné v troch verejných lekárňach, v dvoch ambulanciách všeobecného lekára,

v dvoch gastroenterologických ambulanciách a v jednom dennom stacionári počas obdobia troch mesiacov od decembra 2022 do februára 2023, nachádzajúcich sa v rámci Košického kraja (Vranov nad Topľou, Moldava nad Bodvou, Turňa nad Bodvou). Dotazníky boli anonymné, aby sa u respondentov zachovala ochrana osobných údajov a aby sa pri ich vypĺňaní dosiahla maximálna úprimnosť. Pre ľahšiu zrozumiteľnosť boli v dotazníkoch uvedené komerčné názvy liekov.

2. Druhá analýza zachytáva spotrebu dvoch druhov liekov zo skupiny NSA na Slovensku počas osemročného obdobia v intervale od 2015 do 2022 na základe datasetov zverejnených Národným centrom zdravotníckych informácií (NCZI). V rámci našej analýzy sme sa sústredili na NSA, ktoré boli v dotazníkoch označené respondentmi ako najčastejšie používané, t. j. z voľnopredajných liekov Ibalgin, s účinnou látkou ibuprofén (údaje boli zhrnuté o produktoch Ibalgin 400 tbl flm 24 x 400 mg, Ibalgin 400 tbl flm 48 x 400 mg, Ibalgin Rapidcaps 400 mg cps mol 20 x 400 mg a Ibalgin Rapidcaps 400 mg cps mol 30 x 400 mg a následne prepočítané na 24-kusové balenia) a z liekov vydávaných na základe lekárskeho predpisu Flector, s účinnou látkou sodná soľ diklofenaku (v prípravkoch Flector EP Rapid 50 mg gra 20 x 50 mg). Získané údaje z obidvoch analýz sme štatisticky spracovali v programe Microsoft Excel vo forme tabuliek a grafov.

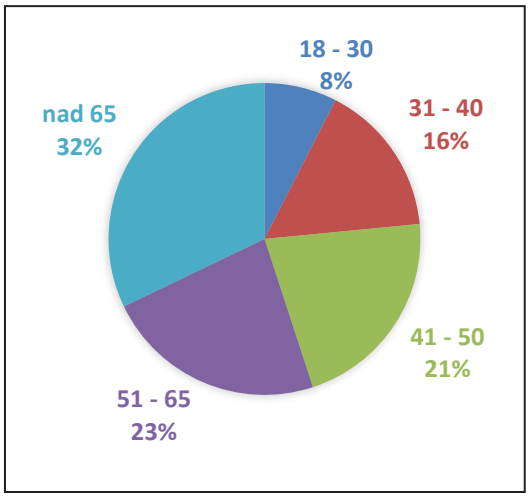
VÝSLEDKY

Vyhodnotenie dotazníkov

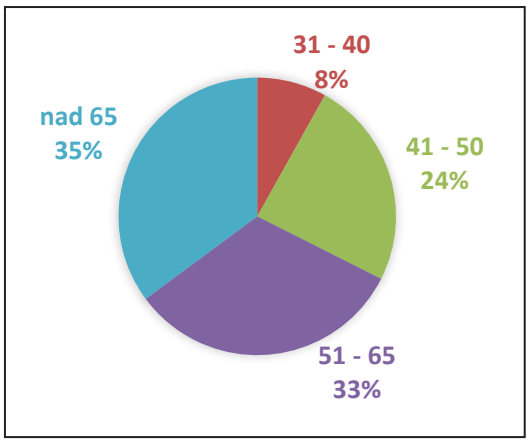
Vyplnenia dotazníkov sa zúčastnilo celkovo 358 respondentov, z ktorých 37 (10 %) označilo, že počas ich života mali diagnostikovaný žalúdočný alebo dvanástnikový vred. Respondenti odpovedali na okruhy otázok nasledovne:

- štruktúra respondentov podľa pohlavia – dotazníky vyplnilo 222 žien, čo prestavuje 62 % z celkového počtu zúčastnených a 136 mužov, čo predstavuje 38 % respondentov. Z podsúboru respondentov s potvrdeným gastroduodenálnym vredom (GDV) sa po vyhodnotení dotazníkov títo rozdelili na ženy v počte 20 (54 %) a mužov v počte 17 (46 %).
- veková štruktúra respondentov – z možných piatich vekových kategórií boli dotazníky vyplnené respondentmi vo veku 18 – 30 rokov v počte 27 (8 %), vo veku 31 – 40 rokov 57 respondentov (16 %), vo veku 41 – 50 rokov 77 respondentov (21 %), vo veku 51 – 65 rokov 82 respondentov (23 %). Najviac respondentov

Graf 1: Veková štruktúra všetkých respondentov



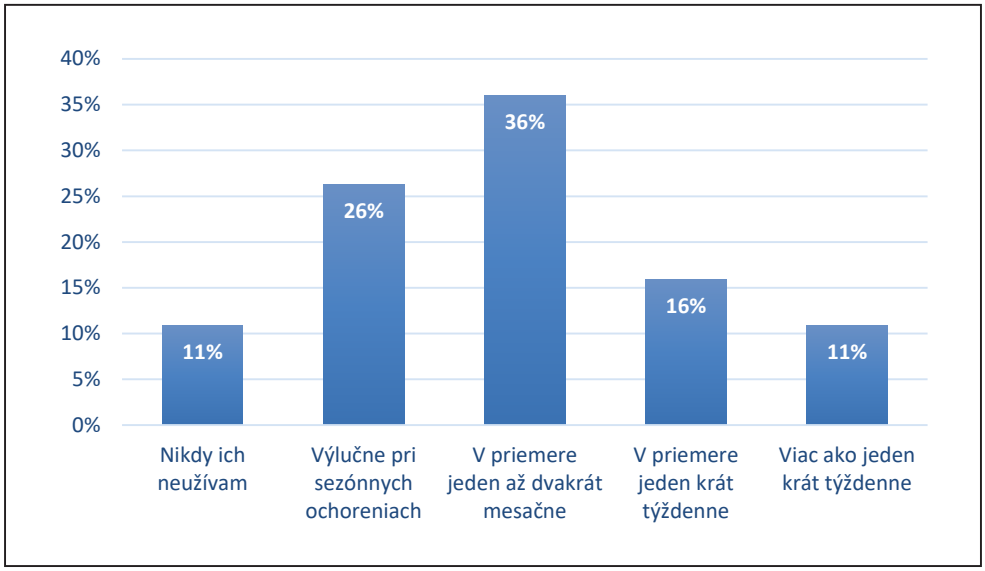
Graf 2: Veková štruktúra respondentov s potvrdenou diagnózou ochorenia



Tab. 1: Porovnanie štruktúry užívania voľnopredajných NSA

Účinná látka vybraných OTC	Počet respondentov s potvrdeným gastroduodenálnym vredom užívajúcich vybrané OTC	Podiel z počtu respondentov s potvrdeným gastroduodenálnym vredom (v %)	Celkový počet respondentov užívajúcich vybrané OTC	Podiel z celkového počtu respondentov (v %)
Kyselina acetylsalicylová	8	12 %	54	15 %
Diklofenak	11	30 %	116	32 %
Ibuprofén	24	65 %	215	60 %
Naproxén	4	11 %	45	13 %
Žiadne z uvedených	4	11 %	49	14 %

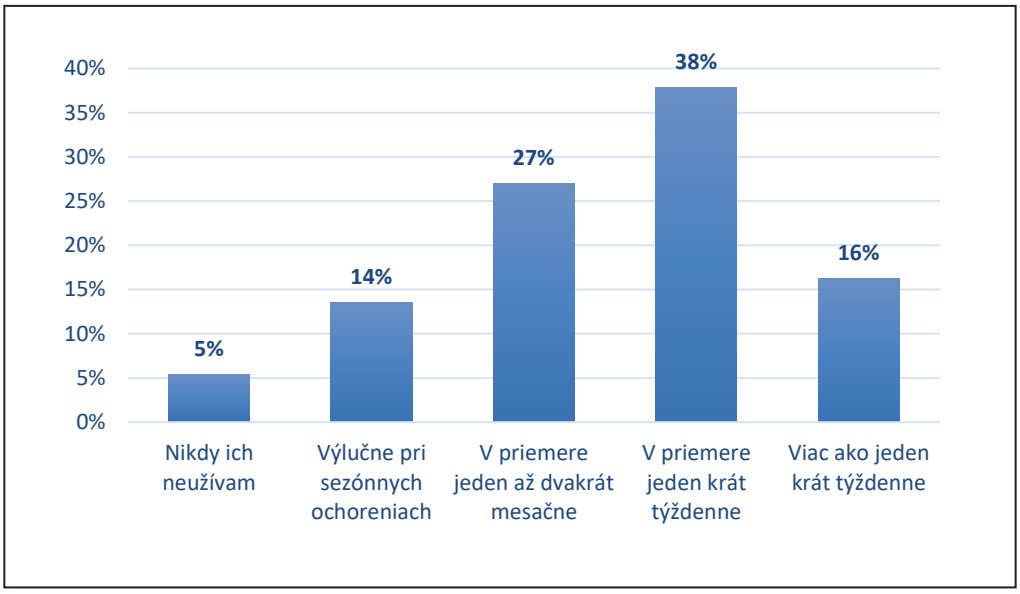
Graf 3: Štruktúra frekvencie užívania vybraných voľnopredajných NSA všetkými respondentmi



bolo vo vekovej kategórie nad 65 rokov, ktorých počet bol 155, čo predstavuje 32 % z celkového počtu respondentov (viď graf 1).

- Porovnateľný bol aj výsledok analýzy vekových kategórií respondentov, ktorí označili, že bol u nich diagnostikovaný GDV [nad 65 rokov (13 respondentov), 51 – 65 rokov (12 respondentov)], na druhej strane vo vekovom rozmedzí 18 – 30 rokov nebolo toto ochorenie potvrdené ani u jedného z respondentov (viď graf 2).
- štruktúra užívania vybraných voľnopredajných NSA – respondentmi boli najčastejšie užívané lieky s účinnými látkami ibuprofén (užívalo ho 60 % z celkového počtu respondentov a 65 % z respondentov s GDV) a diklofenak (viď tab. 1).
- štruktúra frekvencie užívania voľnopredajných NSA – najväčší počet respondentov (129) v zastúpení 36 % užívalo NSA „v priemere jeden až dvakrát mesačne“ (viď graf 3), pričom u respondentov s potvrdeným GDV užívalo niektoré voľnopredajné NSA v priemere jeden krát týždenne až 54 % z nich a ďalšia značná časť respondentov (27 %) jeden až dvakrát mesačne (viď graf 4).

Graf 4: Štruktúra frekvencie užívania vybraných voľnopredajných NSA respondentmi s potvrdenou diagnózou ochorenia



Tab. 2: Porovnanie frekvencie užívania vybraných voľnopredajných NSA respondentmi

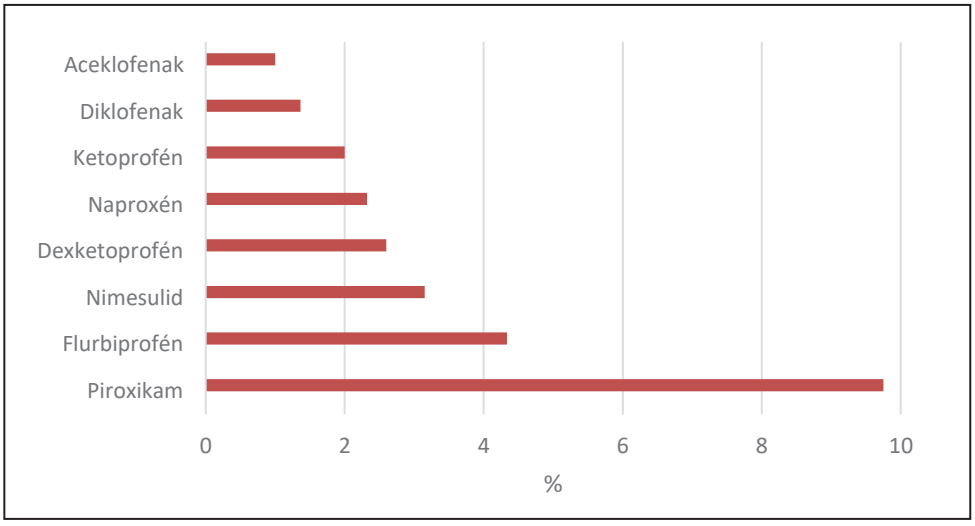
Frekvencia užívania vybraných voľnopredajných liekov	Počet respondentov s potvrdeným gastroduodenálnym vredom	Podiel z počtu respondentov s potvrdeným gastroduodenálnym vredom (v %)	Celkový počet respondentov	Podiel z celkového počtu respondentov (v %)	Podiel respondentov s potvrdeným gastroduodenálnym vredom na celkovom počte respondentov (v %)
1. Nikdy	2	5 %	39	11 %	5 %
2. Výlučne pri sezónnych ochoreniach	5	14 %	94	26 %	5 %
3. V priemere jeden až dvakrát mesačne	10	27 %	129	36 %	8 %
Menej časté užívanie (r. 1 + 2 + 3)	***17***	***46 %***	***262***	***73 %***	***6 %***
4. V priemere jeden krát týždenne	14	38 %	57	16 %	25 %
5. Viac ako jeden krát týždenne	6	16 %	39	11 %	15 %
Časté užívanie (r. 4 + 5)	***20***	***54 %***	***96***	***27 %***	***21 %***
Celkom	**37**	**100 %**	**358**	**100 %**	

- štruktúra indikácií užívania voľnopredajných NSA – približne rovnaký počet respondentov užíva označené NSA pri „bolestiach chrbtice, krížov a pohybového aparátu“ (53 %) a „pri bolestiach hlavy“ (51 %). Významnejšie zastúpenie mala taktiež možnosť s označením „chrípka a nachladenie“, kto-

Tab. 3: Porovnanie štruktúry užívania NSA viazaných na lekársky predpis

Účinná látka vybraných Rx	Počet respondentov s potvrdeným gastroduodenálnym vredom užívajúcich vybrané Rx	Podiel z počtu respondentov s potvrdeným gastroduodenálnym vredom (v %)	Celkový počet respondentov užívajúcich vybrané Rx	Podiel z celkového počtu respondentov (v %)	Podiel respondentov s potvrdeným gastroduodenálnym vredom na celkovom počte respondentov užívajúcich vybrané Rx (v %)
Piroxikam	3	8 %	4	1 %	75 %
Flurbiprofén	1	3 %	3	1 %	33 %
Nimesulid	8	22 %	33	9 %	24 %
Dexketoprofén	1	3 %	5	1 %	20 %
Naproxén	5	14 %	28	8 %	18 %
Ketoprofén	4	11 %	26	7 %	15 %
Diklofenak	20	54 %	181	51 %	11 %
Aceklofenak	1	3 %	13	4 %	8 %
Žiadne z uvedených	8	22 %	133	37 %	6 %

Graf 5: Relatívne riziko vzniku gastroduodenálneho vredu u jednotlivých NSA



rá bola označená respondentmi v zastúpení 32. Ostatné typy bolestí boli označené v oveľa menšom počte (viď tab. 2).

- štruktúra užívania vybraných NSA viazaných na lekársky predpis – aspoň jeden z uvedených liekov užívalo 63 % zo všetkých respondentov, u tých s potvrdeným GDV bol ten podiel ešte väčší (78 %). V tejto skupine boli najviac zastúpené lieky s účinnou látkou diklofenak (viď tab. 3). V súvislosti s touto otázkou sme skúmali aj relatívne riziko vzni-

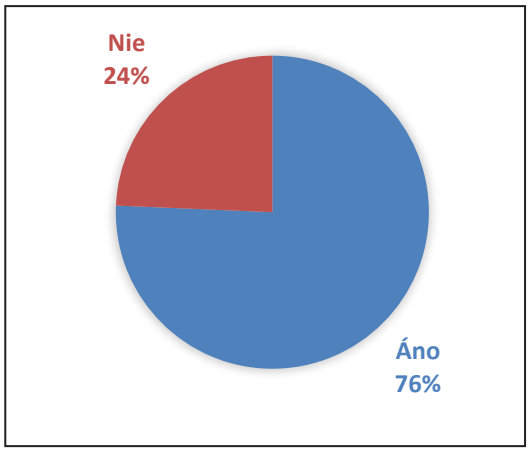
Tab. 4: Porovnanie štruktúry prítomnosti rizikových faktorov u respondentov

Vystavenie rizikovým faktorom	Počet respondentov s potvrdeným gastroduodenálnym vredom	Podiel z počtu respondentov s potvrdeným gastroduodenálnym vredom (v %)	Celkový počet respondentov	Podiel z celkového počtu respondentov (v %)
Fajčenie (pravidelné)	8	22 %	73	20 %
Chronický stres	12	32 %	92	26 %
Potvrdená infekcia H. pylori	12	32 %	29	8 %
Pravidelná konzumácia alkoholu	3	8 %	7	2 %
Žiadne z uvedených	8	22 %	189	53 %

ku GDV u jednotlivých NSA viazaných na preskripciu (viď graf 5).

- štruktúra výskytu pravidelných tráviacich ťažkostí – z celkového počtu respondentov 45 % označilo možnosť, že ich pravidelne trápia tráviace ťažkosti, ktoré sa môžu manifestovať ako nechutenstvo, pocit sýtosti, pálenie záhy, nadúvanie, časté grganie, zvracanie alebo bolesť žalúdka. U respondentov s potvrdeným GDV bol pomer výskytu tráviacich ťažkostí zreteľnejší, pretože až 76 % z nich označilo v tejto otázke kladnú odpoveď (viď graf 6).
- štruktúra prítomnosti rizikových faktorov – približne polovica respondentov (47 %) označila, že je vystavená aspoň jednému z rizikových faktorov, ktoré môžu viesť ku vzniku gastropatií rôzneho typu. Štruktúra respondentov s potvrdeným ochorením sa pri tejto otázke líšila vo veľkej miere, pretože až 78 % respondentov potvrdilo, že sú vystavení aspoň jednému z uvedených rizikových faktorov v nasledujúcom pomere: potvrdená infekcia *Helicobacter pylori* 32 %, chronický stres 32 %, fajčenie 22 %, pravidelná konzumácia alkoholu 8 % (viď tab. 4).

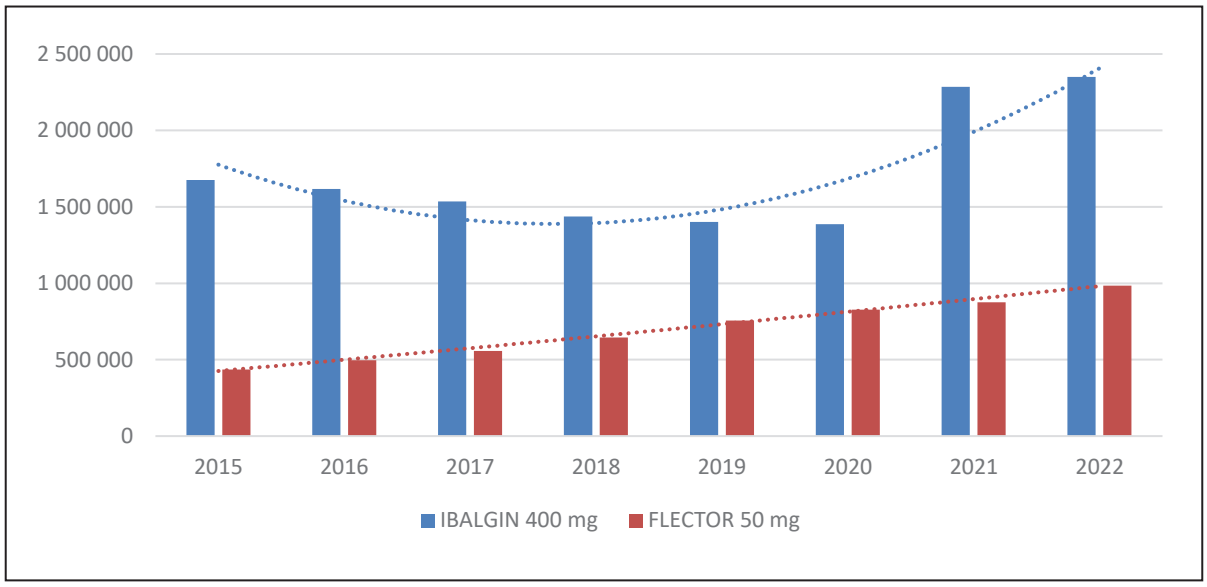
Graf 6: Štruktúra výskytu pravidelných tráviacich ťažkostí u respondentov s potvrdenou diagnózou ochorenia



Analýza spotreby vybraných NSA na Slovensku za obdobie 2015 – 2022

V spotrebe voľnopredajného lieku Ibalgin 400 mg sme zaznamenali mierne klesajúci trend počas obdobia od 2015 do 2020, kedy spotreba uvedeného lieku prepočítaná na 24 ks balenia klesla z ročnej spotreby na úrovni cca. 1,7 miliónov balení v roku 2015 na cca 1,4 miliónov balení v roku 2020. Tento jav mohol byť spôsobený aj negatívnou reklamou datovanou práve z tohto obdobia na tzv. „ružové tablety“, o ktorej svedčia aj početné internetové články. Z uvedeného dôvodu mnohí pacienti siahali po liekoch s účinnými látkami z iných farmakologických skupín. Ako ďalšiu príčinu môžeme uviesť aj existenciu alternatívnych, cenovo často dostupnejších prípravkov s účinnou látkou ibuprofén. Rapídny nárast spotreby analyzovaného lieku v rokoch 2021 a 2022 na úroveň cca 2,3 miliónov balení bol veľmi pravdepodobne vyvolaný nástupom pandémie ochorenia COVID-19 a následným početným výskytom postcovidových syndrómov. Spotreba lieku Flector 50 mg (sodná soľ diklofenaku), ktorý je viazaný na lekársky predpis,

Graf 7: Spotreba vybraných NSA počas obdobia 2015 – 2022 v počtoch balení



vykazovala rastúci trend počas celého skúmaného obdobia s priemerným medziročným tempom rastu na úrovni 12 % (viď graf 7).

Pre vytvorenie komplexnej predstavy o faktoroch spôsobujúcich abúzus NSA sme sa venovali aj analýze písomných informácií lieku pre užívateľa (PIL), ako povinných súčastí každého balenia lieku. Hlavným cieľom rozboru jednotlivých PIL bolo zhodnotiť, či obsahujú v dostatočnej miere informácie týkajúce sa možných GIT komplikácií pri užívaní NSA. Zistili sme, že PIL týchto liekov upozorňujú „rizikových pacientov“ (t. j. už s existujúcim gastrointestinálnym ochorením) na možné komplikácie v dostatočnej miere. Ako hlavné kontraindikácie sa uvádzajú žalúdočno-črevné ťažkosti, aktívne GIT krvácanie, gastrické alebo duodenálne vredy, ulcerácie a zápaly čriev v podobe ulceróznej kolitídy alebo Crohnovej choroby.

DISKUSIA

Početné benefity NSA sú v značnej miere zatienené vznikom častých gastrointestinálnych nežiaducich účinkov. Bolo dokázané, že až 50 % pacientov užívajúcich NSA majú GIT ažkosti prejavujúce sa dyspepsiou, pričom gastroduodenálne vredy potvrdené endoskopicky vznikajú približne u 10 – 20 % chorých pri liečbe NSA (Lukáč a kol., 2005). Vážne komplikácie GDV (obštrukcie, perforácie, krvácanie) postihuje 1 – 2 % jedincov, pričom úmrtnosť na spomínané komplikácie môže dosahovať hodnotu až 11 % (Fries, 1999). Z výsledkov observačnej štúdie vyplýva, že pomer respondentov užívajúcich NSA s potvrdeným GDV (10 %) je porovnateľný s údajmi uvedenými v iných literatúrach. Dyspeptické prejavy uviedlo až 78 % respondentov s potvrdeným GDV, pričom tento pomer bol u ľudí bez potvrdeného ochorenia výrazne nižší (45 %). Výskyt gastroduodenálneho vredu je v značnej miere závislý od charakteristiky užívateľa, na základe ktorých autor Herszényi (2007) vymedzuje tzv. „high risk“ skupinu pacientov, pričom prvým dôležitým faktorom ľudí patriacich do rizikovej skupiny je ich vek. Štúdia autorov Rybár a kol. (2006) došla k záveru, že výskyt žalúdočných vredov pri súčasnom užívaní NSA stúpa s vekom. Túto skutočnosť potvrdzujú aj výsledky našej analýzy, podľa ktorej až 92 % respondentov s potvrdeným gastroduodenálnym vredom boli osoby vo veku nad 40 rokov (68 % z nich vo veku nad 50 rokov). Z hľadiska zhodnotenia výskytu ochorenia na základe pohlavia sme dosiahli

výsledok podobný ako uvádza autor Konečný (2017), ktorý na základe ročnej prevalencie uvádza trojnásobne vyšší výskyt vredov u mužov ako u žien. V našom prípade bol vzniknutý pomer nižší, a to 1,4 : 1. Kľúčovou otázkou problematiky bolo, či frekvencia užívania NSA má priamy vplyv na výskyt gastroduodenálnej vredovej choroby. Z analýzy štruktúry frekvencie užívania voľnopredajných NSA vyplynulo, že až 54 % z počtu respondentov, u ktorých bola potvrdená diagnóza ochorenia, užívalo vybrané voľnopredajné NSA často, v priemere minimálne jeden krát týždenne (pozn.: pre účely našej analýzy sme za časté užívanie považovali odpovede „v priemere jeden krát týždenne“ a „viac ako jeden krát týždenne”). Na základe analýzy respondentov, ktorí uviedli, že vybrané voľnopredajné NSA užívajú často, sme dospeli k záveru, že podiel respondentov s potvrdeným GDV na celkovom počte respondentov predstavuje 21 %. Tento podiel je v súlade so štatistickými závermi vychádzajúcimi z množstva publikácií, prehľadových prác a kazuistík, ktoré uvádzajú, že GDV sú endoskopicky potvrdené u približne 10 % – 30 % pacientov užívajúcich NSA (Herszényi, 2007).

Analýzou spotreby jednotlivých liekov (voľnopredajných a viazaných na lekársky predpis) z farmakologickej skupiny NSA sme dospeli k záveru, že najpočetnejšia skupina respondentov užíva lieky s účinnou látkou ibuprofén a z liekov viazaných na preskripciu sú najčastejšie indikované lieky s účinnou látkou diklofenak. Na základe tohto zistenia sme realizovali štatistický súhrn celoštátnej spotreby (na základe datasetov NCZI) najpredávanejších liekov so spomínanými účinnými látkami za obdobie 2015 – 2022, analýzou ktorého sme zistili, že ich spotreba má s malými odchýlkami rastúci trend a vyčísluje sa v miliónoch balení ročne. Početné publikácie a štúdie dokazujú, že sa na vzniku gastropatií a žalúdočných vredov významne podieľa dlhodobé chronické užívanie NSA v kombinácii, alebo vo väčších dávkach a pozorovaný bol 3 až 5 krát častejší výskyt v porovnaní s ľuďmi, ktorí NSA neužívajú (Bátovský, 2010). V tejto súvislosti viacerí autori zistili, že rôzne NSA vykazujú odlišný stupeň gastrotoxicity. V rámci našej práce sme taktiež skúmali túto otázku na základe užívania liekov viazaných na lekársky predpis a prítomnosti gastroduodenálnej vredovej choroby. Naše zistenie bolo v korelácii s výsledkami štúdie autora Hawkey (2000), ktorý uvádza, že riziko vzniku GVD stúpa od účinnej látky aceklofenak cez diklofenak, ketoprofén, naproxén, dexketoprofén, nimesulid, frulbirofén až po najrizikovejší piroxikam.

Keďže sa na vzniku peptického vredu popri užívaní NSA významne podieľajú aj iné rizikové faktory (potvrdená infekcia *Helicobacter pylori*, pravidelná konzumácia alkoholu, chronický stres a fajčenie), ich výskyt u respondentov vyplňujúcich dotazníky bol dôležitou súčasťou našej analýzy. Z nášho zistenia vyplýva, že až 78 % respondentov s potvrdeným GDV sa týka prítomnosť aspoň jedného z uvedených rizikových faktorov. Početnosť dvoch rizikových faktorov (potvrdenej infekcie *H. pylori* a pravidelnej konzumácie alkoholu) bola v prípade respondentov s GDV vyššia (64 %) v porovnaní s ich výskytom u respondentov bez potvrdeného ochorenia. Infekcia *H. pylori* a abúzus NSA majú aj samostatne toxický vplyv na žalúdočnú sliznicu, práve preto je eradikácia *H. pylori* často diskutovanou témou v medicíne. Viacerí autori však uvádzajú, že vyšetrenie a následná eradikácia *H. pylori* sa odporúča pri plánovanej dlhodobej terapii liečivami zo skupiny NSA u rizikových pacientov s terapiou nízkymi dávkami kyseliny acetylsalicylovej, alebo s potvrdeným nehojacim sa peptickým vredom (Bureš, 2008). Zhrnutím informácií získaných o nesteroidných antiflogistikách musíme zdôrazniť, že prevencia ich nežiaducich účinkov na gastrointestinálny trakt je jedným zo základných pilierov účinnej liečby. Preventívne opatrenia je potrebné uskutočniť najmä u pacientov patriacich do rizikových skupín. Mali by spočívať v určení správnej diagnózy, znížení dávky liečiva na minimálne účinné množstvo, vyhýbaní sa kombinácii rôznych NSA, zhodnotení možných liekových interakcií (najmä s kyselinou acetylsalicylovou, kortikosteroidmi, antikoagulanciami) a vo vyšetrení pozitivity pacienta na infekciu *H. pylori*.

Autor Bátovský (2010) vo svojej publikácií uvá-

dza, že za najefektívnejšiu formu gastroprotekcie sa v súčasnosti považujú inhibítory protónovej pumpy (napr. omeprazol, pantoprazol, ezomeprazol). Medzi liečivá používané na prevenciu gastroduodenálnych ulcerácií patria aj antacidá (hydroxid hlinitý, hydroxid horečnatý), cytoprotektívne liečivá s obsahom bizmutu, sukralfát, misoprostol a antagonisti H2 receptorov (napr. ranitidín, famotidín). Uvedené liečivá sa však považujú za menej účinné, niektoré publikácie uvádzajú až zlyhanie ich terapie v súvislosti s gastrotoxickým účinkom NSA (Rybár, 2006). Z hľadiska gastroprotekcie v rámci NSA majú významné postavenie selektívne inhibítory COX-2 (koxiby), ktoré boli vyvinuté za účelom zníženia výskytu nežiaducich gastrointestinálnych príhod klasických NSA pri zachovaní ich analgetického a protizápalového účinku (Forejtová, 2012). Zváženie pomeru benefitu a rizika pri terapii koxibmi však musí byť základom liečby, pretože táto skupina liečiv je kontraindikovaná u pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami.

Pri analýze PIL jednotlivých NSA sme zistili, že užívateľov bez ochorení tráviaceho traktu vôbec neinformujú o možných GIT rizikách pri dlhodobom chronickom užívaní týchto liečiv. Takíto „zdraví“ užívatelia NSA si z toho dôvodu môžu vytvoriť mylný obraz o bezpečnosti užívania NSA (Bézayová, 2016). Dôležitý vplyv na výber voľnopredajného lieku s obsahom NSA zohráva aj reklama v televízii, printových a elektronických médiách. Tieto však často neposkytujú dostatočné informácie o možných rizikách pri ich užívaní, pretože ich cieľom je prezentovať tieto lieky len z pozitívneho hľadiska a tým ovplyvniť výber pacienta pri kúpe lieku.

ZÁVER

Na základe zosumarizovaných údajov observačnej štúdie realizovanej formou dotazníkov môžeme skonštatovať, že až u 10 % všetkých respondentov bol v priebehu ich života diagnostikovaný GDV, pričom incidencia ochorenia bola vyššia u mužov ako u žien v pomere 12,5 % : 9 %. Z analýzy vekového rozloženia respondentov s potvrdeným ochorením vyplynulo, že výskyt gastroduodenálneho vredového ochorenia má s narastajúcim vekom stúpajúcu tendenciu. Ďalšou kľúčovou informáciou získanou z dotazníkov bola skutočnosť, že až 84 % z celkového počtu respondentov užíva aspoň jeden z uvedených voľnopredajných liekov, pričom tento podiel bol v prípade respondentov s potvrdeným GDV ešte vyšší a predstavoval hodnotu 89 %. Najväčší podiel respondentov s potvrdeným ochorením ich užíval jeden až dvakrát týždenne (38 %), prevažne pri bolestiach krížov a iných častí pohybového aparátu a bolestiach hlavy. Podiel respondentov s potvrdeným GDV užívajúcich aspoň jeden z liekov z uvedených druhov NSA viazaných na lekársky predpis predstavoval 78 %. Pravidelné tráviace ťažkosti boli prítomné taktiež u veľkého podielu (78 %) respondentov s GDV. Z hľadiska možných rizikových faktorov sme dospeli k záveru, že až 78 % respondentov, u ktorých bol potvrdený GDV, malo pridružený aspoň jeden z uvedených rizikových faktorov.

K hlbšiemu objasneniu abúzu NSA v Slovenskej republike sme analýzou vybraných liekov z tejto farmakologickej skupiny počas osemročného obdobia v rokoch 2015 až 2022 potvrdili relevantnosť hlavnej premisy štúdie, nakoľko spotreba analyzovaných liekov mala počas sledovaného obdobia s miernymi odchýlkami rastúci trend a ročný predaj týchto liekov sa pohybuje v miliónoch balení.

Zhrnutím získaných údajov sme dospeli k záveru, že napriek ich častým a niekedy aj závažným gastrointestinálnym nežiaducim účinkom, má zastúpenie nesteroidných antiflogistík na farmaceutickom trhu rastúci trend. Ich toxický vplyv na GIT je možné znížiť v prvom rade minimalizovaním ich užívania u rizikových pacientov a keď je ich prítomnosť v liečbe nevyhnutná, je potrebné zvoliť vhodný spôsob gastroprotekcie.

ZOZNAM LITERATÚRY

Bátovský, M.: Gastroprotekcia pri dlhodobom užívaní nesteroidných antireumatík, resp. nízkych dávok kyseliny acetylosalicylovej [Gastropro-

tection during long-term use of non-steroidal antirheumatic drugs or low doses of acetylsalicylic acid]. *Čes. a Slov. Gastroent. a Hepatol*., 2010, 64 (3), 18 – 23.

Bézayová, T.: Voľnopredajné analgetiká a antireumatiká – „lentilky 21. storočia“ [Over-the--counter analgesics and antirheumatic drugs – „lentils of 21th century“]. *Alpha Medical*, 2016. https://www.unilabs.sk/clanky-invitro/volnopredajne-analgetika--antireumatika-lentilky-21-storocia. [cit. 2.3.2023].

Bjarnason, I., Scarpignato, C., Holmgren, E., Olszewski, M., Rainsford, K. D., Lanas, A.: Mechanisms of damage to the gastrointestinal tract from nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterology*, 2018, 154 (3), 500 – 514.

Bureš, J.: *Helicobacter pylori* a nesteroidní antiflogistiká. *Novinky v gastroenterologii a hepatologii* [*Helicobacter pylori* and nonsteroidal antiphlogistics. News in gastroenterology and hepatology]. Praha: Grada Publishing, 2008. 119 – 149.

Forejtová, Š.: Nesteroidní antirevmatika a analgetika. In: Pavelka K., Vencovský J., Horák P., Šenolt L., Mann H., Štepán J. a kol: *Revmatologie* [Rheumatology]. Maxdorf-Jessenius, 2012, 151 – 153.

Fries, J.: NSAIDs gastropathy: the second most deadly rheumatic disease? Epidemiology and risk appraisal. *J. Rheumatol*., 1999, 18 (Suppl. 28), 6 – 10.

Hawkey, C. J.: Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology*, 2000, 119 (2), 521 – 535.

Herszényi, L. A.: Nem szteroid gyulladáscsökkentő okozta gastropathia. *Lege Artist Medicinae*, 2007, 17 (4 – 5), 275 – 280.

Choi, S. H., Aid, S., Bosetti, F.: The distinct roles of cyclooxygenase-1 and-2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends in pharmacological sciences*, 2009, 30 (4), 174 – 181.

Killinger, Z., Šťeňová, E., Lukáč, Ľ.: Úskalia v liečbe nesteroidnými antiflogistikami [Pitfalls in treatment with non-steroidal antiphlogistics]. *Ambulantná terapia*, 2004, 2, 19 – 22.

Konečný, M.: Vředová choroba gastroduodenální [Peptic ulcer disease]. *Medicína pro praxi*, 2017, 14 (4), 177 – 179.

Kriška, M., a kol.: *Memorix klinickej farmakológie* [Memorix of Clinical Pharmacology]. 1. vyd. Slovak Academic Press, 2002, s. 879.

Lukáč, J., Rovenský, J., Lukáčová, O.: Nesteroidové antiflogistiká – riziká a prínos pre klinickú prax [Non-steroidal antiphlogistics – risks and benefits for the clinical practice]. *Súčasná klinická prax*, 2005, 3 (1), 21 – 28.

Mirossay, L., Mojžiš, J.: *Základná farmakológia a farmakoterapia* [Basic Pharmacology and Pharmacotherapy]. Equilibria, 2006, 533 s.

Rybár, I., Hlísta, M., Masaryk, P., Rovenský, J., Hyrdel, R., Kriška, M.: Podiel gastroduodenálnych komplikácií vo vzťahu k liečbe nesteroidovými antiflogistikami v Slovenskej republike: ročná prospektívna štúdia [Gastroduodenal complications associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs in Slovak Republic: results of one-year prospective study]. *Vnitř. Lék*., 2006, 52 (7 – 8), 673 – 676.

Shmerling, R. H.: Are you taking too much anti-inflammatory medications? *Harvard Health Publishing*, 2018. https://lnk.sk/eote. Accessed October 11, 2018.

Vostinaru, O.: Adverse effects and drug interactions of the non-steroidal anti-inflammatory drugs. In Al-kaf, A. G. A. (Ed.). Nonsteroidal Anti--Inflammatory Drugs. *InTech Open*, 2017, 17 – 31. Doi: 10.5772/intechopen.68198.

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: *Jozef Nagy*
Výkonná redaktorka/Deputy/Managing Editor: *Jana Koščová*
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. (Košice, 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), Roh, J. (Hradec Králové, Czech 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.

September 2023