

FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis
UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609



3

I • 2019



FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA je vedecký časopis vydávaný Univerzitou veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika. Časopis je vydávaný štvrtročne 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:

Výkonná redaktorka/Deputy/Managing Editor:

Redakčná rada/Editorial Board:

Jana Mojžišová

Zita Faixová

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 Naggat, El M. B. A. (Damanhour, Egypt), Getova, D. (Plovdiv, Bulgaria), Kyselovič, J. (Bratislava, Slovak Republic), Leddy, J. J. (Ottawa, Canada), Mojžiš, J. (Košice, Slovak Republic), Mučaji, P. (Bratislava, Slovak Republic), Opatřilová, R. (Brno, Czech Republic), Pirník, Z. (Košice, Slovak Republic), Pistl, J. (Košice, Slovak Republic), Şekeroğlu, N., (Turkey, Kilis), Šimůnek, T. (Hradec Králové, Czech Republic), Zitterl, K. (Vienna, Austria)

Vydavateľ/Publisher:

© Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2019

Adresa redakcie/Editor Address:

Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, e-mail: folia.pharma@uvlf.sk

Technická redaktorka/Technical Editor:

Holečková, Z., tel.: +421 917 729 873, e-mail: zuzana.holeckova@uvlf.sk

Grafická úprava/graphic design:

Báštiová, I.

ISSN: 2585-9609

EVČ: EV 5741/18

IČO: 00 397 474

On-line verzia časopisu sa nachádza na web sídle Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach:
<http://www.uvlf.sk/univerzitie-casopisy/folia-pharmaceutica-cassoviensia-vytlacky>.

August 2019

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

VYDÁVA
UNIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE V KOŠICIACH
SLOVAKIA



FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA
I., 3, 2019

PUBLISHED BY
THE UNIVERSITY OF VETERINARY MEDICINE AND PHARMACY IN KOŠICE
2019



EDITORIÁL

Vážení čitatelia,

čas rýchlo plynie a v čase letných dovolení sme pre Vás pripravili už tretie číslo vedeckého časopisu *Folia Pharmaceutica Cassoviensia*.

Český pedagóg, prírodovedec, humanista a filozof J. A. Komenský (1592-1670) povedal: „*Neverte všetkému, čo sa Vám predkladá. Skúmajte a presvedčte sa o všetkom sami!*“.

Tvorba vedeckého článku nie je jednoduchý proces, je potrebná zvedavosť a túžba nadobudnúť nové vedomosti. Štúdiom, získavaním poznatkov a najmä životných skúseností si človek buduje charakter a miesto v spoločnosti.

Verím, že príspevky obsiahnuté v tomto čísle Vám pomôžu si rozšíriť obzory poznania a vedomostí.

V treťom čísle *Folia Pharmaceutica Cassoviensia* nájdete príspevky týkajúce sa účinkov látok prírodného pôvodu. Prírodné látky sú v súčasnej dobe čoraz častejším cieľom vedeckého bádania. Môžete sa bližšie oboznámiť s agroekologickými a intenzifikačnými vplyvmi na obsahové látky drogy *Mentha x piperita* L. a *Mentha spicata* L., s metabolitmi produkovanými čínskymi liečivými hubami alebo s antifungálnymi účinkami rastlinných silíc na *Candida albicans*. Ďalej sa venujeme cytotoxickým účinkom vybraných rastlinných extraktov a antioxidačným účinkom ostropestreca mariánskeho. Zaujímavá je aj štúdia o využití probiotík pri ochoreniach kože.

Verím, že Vašu pozornosť si získa aj príspevok z chemickej oblasti o nosičových systémoch do nádorových sféroidov. Môžete sa oboznámiť aj s novými trendmi vo farmakoterapii cukrovky 2. typu alebo s kazuistikami zaoberajúcimi sa nešpecifickými zápalovými ochoreniami čriev.

V zmysle latinského hesla „*Labor omnia vincit*“ (úsilie všetko prekoná) Vám prajem ochotu sústavne sa vzdelávať, lebo vzdelávanie by malo byť neoddeliteľnou súčasťou života každého z nás.

Prajem Vám príjemné čítanie,

prof. MVDr. Zita Faixová, PhD.
výkonná redaktorka



EDITORIAL

Dear readers,

time goes by very fast and during a period of holidays we have prepared already the third issue of the scientific journal *Folia Pharmaceutica Cassoviensia* for you.

J. A. Comenius (1592 – 1670), the Czech pedagogue, naturalist, humanist and philosopher once said: „*Don't believe everything that is given to you. Examine it and prove it to yourself on your own*“.

Writing a scientific article is not a simple process, curiosity and desire to acquire new knowledge are needed as well. By constant studying, gaining information, and mainly life experience, a human builds a character and a place in society.

I believe that the articles included in this issue will help you broaden your horizons of cognition and knowledge.

In the third issue you will find articles concerning effects of substances of the natural origin. Nowadays, natural substances are still more frequent target of scientific research.

You can have a closer look at agroecological or intensification impacts on content substances of 2 drugs: *Mentha x piperita* L. and *Mentha spicata* L., metabolites produced by Chinese medicinal mushrooms or antifungal effects of herbal essential oils on *Candida albicans*.

We also focus on cytotoxic effects of the selected plant extracts and an antioxidant effect of *Silybum marianum*. Moreover, the study about the use of probiotics in the treatment of skin diseases is also very readable.

I believe that the article from the field of chemistry – related to the drug delivery systems into the tumour spheroids – will also get your attention. You can widen your knowledge about new trends in the pharmacotherapy of diabetes mellitus type 2 or pore through the case study dealing with non-specific inflammatory bowel diseases.

According to the Latin motto „*Labor omnia vincit*“ (Work conquers all) I wish you a strong will for a long-term study, as the education is something that should have been an inherent part of life for everyone of us.

I wish you a pleasant reading,

Prof. Zita FAIXOVÁ, DVM, PhD.
Managing Editor

O B S A H

Dvorčáková S., Luptáková L., Petrovová E.:

ANALÝZA GÉNOVEJ EXPRESIE VYBRANÝCH IZOFORMIEM CYTOCHRÓMOV P450 PO APLIKÁCII DMSO NA VYVÍJAJÚCU SA PEČEŇ GENE EXPRESSION ANALYSIS OF SELECTED CYTOCHROME ISOFORMS P450 IN DEVELOPING LIVER AFTER DMSO APPLICATION	7
---	---

Dudičová, M., Marcinčáková, D.:

CYTOTOXICKÉ ÚČINKY VYBRANÝCH RASTLINNÝCH EXTRAKTOV CYTOTOXIC ACTIVITY OF SELECTED PLANT EXTRACTS	15
---	----

Zelencová, D., Harvanová J., Nešporová, K.:

ŠTÚDIUM PRESTUPU NOSIČOVÝCH SYSTÉMOV DO NÁDOROVÝCH SFÉROIDOV STUDY OF DRUG DELIVERY SYSTEM EFFECTS ON MULTICELLULAR TUMOR SPHEROIDS	22
---	----

Faixová, D., Mudroňová, D.:

ANTIOXIDAČNÉ ÚČINKY OSTROPESTRECA MARIÁNSKEHO (<i>SILYBUM MARIANUM</i>) ANTIOXIDANT EFFECTS OF <i>SILYBUM MARIANUM</i>	34
---	----

Nemcová, R., Styková, E., Englerová, K.:

VYUŽITIE PROBIOTICKÝCH BAKTÉRIÍ A ICH BIOAKTÍVNYCH PRODUKTOV PRI KOŽNÝCH OCHORENIACH THE USE OF PROBIOTIC BACTERIA AND THEIR BIOACTIVE PRODUCTS IN SKIN DISEASES	43
---	----

Fečíková, N., Čonková, E.:

ANTIFUNGÁLNY ÚČINOK VYBRANÝCH RASTLINNÝCH SILÍC NA <i>CANDIDA ALBICANS</i> SAMOSTATNE A V KOMBINÁCII S ANTIMYKOTIKAMI ANTIFUNGAL EFFECT OF SELECTED ESSENTIAL OILS ON <i>CANDIDA ALBICANS</i> ALONE AND IN COMBINATION WITH ANTIMYCOTICS	59
---	----

Gazdová, M., Bačkorová, M.:

NOVÉ TRENDY FARMAKOTERAPIE DIABETES MELLITUS 2. TYPU NEW TRENDS IN PHARMACOTHERAPY OF DIABETES MELLITUS TYPE 2	66
---	----

Džupinová, M., Faixová, Z.:

LIEČBA PACIENTOV S RÔZNYMI ŠTÁDIAMI NEŠPECIFICKÝCH ZÁPALOVÝCH OCHORENÍ ČRIEV (KAZUISTIKA) TREATMENT IN PATIENTS WITH DIFFERENT STAGES OF NON-SPECIFIC INFLAMMATORY BOWEL DISEASES (CASE STUDY)	73
---	----

Ungvarská Maľučká, L., Pániková, Z.:

IZOLÁCIA A ANALÝZA BIOLOGICKY ZAUJÍMAVÝCH METABOLITOV PRODUKOVANÝCH ČÍNSKYMÍ LIEČIVÝMI HUBAMI ISOLATION AND ANALYSIS OF BIOLOGICALLY INTERESTING METABOLITES PRODUCED BY CHINESE MEDICINAL MUSHROOMS	80
---	----

Martiš, M., Eftimová, J.:

VPLYV INTENZIFIKAČNÝCH FAKTOROV NA KVALITU DROGY RODU MENTHA L. A MOŽNOSTI JEJ KONTAMINÁCIE THE IMPACT OF INTENSIFICATION FACTORS ON QUALITY OF MENTHA L. AND POSSIBILITIES OF ITS CONTAMINATION	91
---	----

Pokyny pre autorov	98
--------------------------	----



ANALÝZA GÉNOVEJ EXPRESIE VYBRANÝCH IZOFORIEM CYTOCHRÓMOV P450 PO APLIKÁCII DMSO NA VYVÍJAJÚCU SA PEČEŇ

GENE EXPRESSION ANALYSIS OF SELECTED CYTOCHROME ISOFORMS P450 IN DEVELOPING LIVER AFTER DMSO APPLICATION

Dvorčáková S., Luptáková L.¹, Petrovová E.²

¹ Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, ² Ústav anatómie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

lenka.luptakova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Na každý živý organizmus pôsobí v jeho prirodzenom prostredí široká škála xenobiotík. DMSO (dimetylsulfoxid) je cudzorodá látka so širokou škálou farmakologických vlastností. Viaceré štúdie poukazujú na toxický účinok dimetylsulfoxidu. Sledovali sme vplyv dimetylsulfoxidu na vyvíjajúcu sa pečeň kuracieho embrya. Pomocou real-time PCR sa analyzovala génová expresia vybraných cytochrómov P450 (CYP1A5, CYP3A37 a CYP3A4). Na 4. embryonálny deň sa na kuracie embryo (*area vasculosa*) metódou „window technique“ aplikovalo DMSO v objemoch 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 a 50 µL. Na 9. embryonálny deň boli odobraté vzorky pečene a pre dosiahnutie výsledkov sa porovnávala expresia génov v kontrolnej a

experimentálnej skupine. Pri testovaní bola zistená zvýšená expresia jednotlivých génov pri aplikačných dávkach 50, 35, 30, 25, 20 µL. Pri géne CYP1A5 a CYP3A37 sme pozorovali génovú indukciu aj pri dávke 15 µL. Génová expresia pri aplikačnej dávke 10 µl bola približne na úrovni kontrolných vzoriek a pri dávke 5 µL bolo zaznamenané zníženie génovej expresie pri všetkých skúmaných génoch.

Kľúčové slová: cytochrómy P450; dimetylsulfoxid; génová expresia; kuracie embryo

ABSTRACT

Each living organism is influenced by a wide range of xenobiotics in its natural environment. DMSO (dimethylsulfoxide) is a foreign substance

with a wide range of pharmacological properties. Several studies point to the toxic effect of dimethylsulfoxide. We monitored the effect of dimethyl sulfoxide on the developing liver of the chicken embryo. Gene expression of selected cytochromes P450 (CYP1A5, CYP3A37, and CYP3A4) was analyzed by real-time PCR. On the 4th embryonic day, DMSO was applied to chicken embryo (*area vasculosa*) using the „window technique“ in volumes of 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 50 μL . Liver samples were collected on embryonic day 9 and to achieve results gene expression in control and experimental groups was compared. The individual genes had increased gene expression at application rates of 50, 35, 30, 25, 20 μL . For the CYP1A5 and CYP3A37 genes, we observed gene induction at a dose of 15 μL . Gene expression at the applied dose of 10 μL was approximately at the control level. Using a dose of 5 μL , the decrease of gene expression was recorded in all studied cytochrome's genes.

Key words: cytochromes P450; dimethylsulfoxide; chicken embryo; gene expression

ÚVOD

Dimetylsulfoxid je vysoko polárna organická kvapalina, ktorá sa využíva ako rozpúšťadlo veľmi ťažko rozpustných až nerozpustných látok. Ďalšou príznačnou vlastnosťou je prienik cez membrány bez porušenia ich integrity, čo sa využíva pri lokálnej aplikácii liečiv. Po prieniku membránami vytesňuje z buniek vodu, čo našlo uplatnenie pri kryokonzervácii buniek (Dumont a kol., 2013). Smith a kol. už v roku 1967 zhrnuli, že dimetylsulfoxid má vysokú lokálnu toxicitu. Aplikácia dimetylsulfoxidu aktivuje v cieľovom organizme obranný detoxikačný metabolizmus za účelom exkrécie xenobiotík z organizmu. Za metabolizáciu zodpovedá enzymatický systém cytochrómov P450, vyskytujúci sa predovšetkým v pečeni. Génová expresia cytochrómov P450 sa prispôbuje aktuálnej

potrebe organizmu. Predmetom tejto štúdie bolo analyzovať génovú expresiu vybraných pečňových cytochrómov (CYP1A5, CYP3A37 a CYP3A4) po aplikácii rôznych objemov dimetylsulfoxidu.

MATERIÁL A METÓDY

Pokusné zvieratá

In vivo experimenty boli vykonané na 76 násadových kuracích vajciach (plemeno Lohmann Brown, Liaharenský podnik Nitra), do ktorých bol aplikovaný dimetylsulfoxid (100 % Sigma Aldrich, USA).

Inkubácia násadových vajec

Násadové vajcia boli vložené do termostatu s teplotou vzduchu $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ a vlhkosťou 60 %. Vajcia sa v intervale 3 hodín otáčali, aby sa zabránilo prichyteniu embrya na vaječnú membránu.

Aplikácia DMSO a odber vzoriek

Na 4. embryonálny deň (ED) bol tupý koniec dezinfikovaný 70 % alkoholom, prelepený lepiacou páskou a podľa metódy „window technique“ bol zúbkatými nožnicami vystrihnutý otvor, cez ktorý bol v objemoch 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 a 50 μL aplikovaný DMSO. DMSO bol aplikovaný cez *membrana papyracea* na *area vasculosa* embrya. Otvory boli prelepené izolantom a vložené naspäť do termostatu až do 9. ED. Na 9. ED bolo embryo vybrané, špendlíkmi prifixované na Petriho misku a bola mu odobratá pečeň, ktorá bola až do izolácie RNA uskladnená pri teplote -80°C .

Izolácia RNA a reverzná transkripcia

Na izoláciu RNA bol použitý izolačný kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Nemecko) a pri izolácii sa postupovalo podľa výrobcom odporúčaného návodu.

Prevod RNA do cDNA bol uskutočnený reverznou transkripciou RT-PCR použitím reagentov (vid' tab. 1) z kitu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA): RT buffer (10x konc.), dNTP (100 mM), Random priméry, Multiscribe

Tab. 1: Reagencie pre reverznú transkripciu

Mix	μL/1 reakcia
RT Buffer 10x	2,20
dNTP 100 mM	0,88
RT Random primers 10x	2,20
Multiscribe Rev. 50 U/μL	1,10
Rnase inhib. 20 U/μL	1,10
H ₂ O Rnase free	3,52
Total mix	11,00

Reverse Transcriptase (50 U/μL), RNA inhibítor (20 U/μL) a RNase free voda. Teplotný priebeh reverznej transkripcie znázorňuje tabuľka 2.

Analýza génovej expresie

Pri analýze génovej expresie všetkých študovaných génov bol ako housekeepingový gén použitý ubikvitín. Pre ubikvitín aj pre gény CYP1A5 a CYP3A37 bol ako fluorescenčné farbivo pre real-time PCR použitý SYBR Green. Použité reagencie a teplotný profil znázorňuje tabuľka 3 a 4. Pri každej analýze bola vykonaná melting analýza na odlíšenie

Tab. 2: Teplotný profil pre reverznú transkripciu

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklov
1	25	10 min.	1
2	37	120 min.	1
3	85	5 s.	1

špecifických a nešpecifických produktov. Celkový objem reakcie pre real-time PCR bol 10 μL a množstvo templátu bolo 0,8 μL. Každá vzorka bola analyzovaná ako triplikát.

Pri analýze génovej expresie CYP3A4 bola pre amplifikáciu použitá TaqMan sonda (ThermoFischer, USA). Použité reagencie a teplotný profil znázorňuje tabuľka 5 a 6. Celkový objem reakcie pre real-time PCR bol 10 μL a množstvo templátu bolo 0,8 μL.

Štatistická analýza

Získané dáta boli analyzované v programe GraphPad Prism (verzia 6.0, USA) pomocou jednocestnej ANOVA s testom Dunnett's multiple comparisons test. Hodnota štatistickej významnosti bola p -value; $p \leq 0,05$. Údaje boli vyhodnocované ako priemer $\pm$ SD (standard deviation).

Tab. 3: Reagencie pre real-time PCR – ubikvitín (gény CYP1A5 a CYP3A37)

Krok	Počiatočná koncentrácia (μM)	Konečný objem (μL)	μL Mix/triplikát
SYBR Green Mix	–	5	57
Primer FO	10	0,2	2,28
Primer RE	10	0,2	2,28
Voda	–	3,8	43,32
Spolu (μL)		9,2	104,88

Tab. 4: Teplotný profil pre real-time PCR – ubikvitín a gény CYP1A5 a CYP3A37

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklov
Iniciálna denaturácia	95	10 min.	1
Denaturácia	95	15 s.	40
Hybridizácia	60	1min.	
Melting analýza	60 – 95	10 s.	
Chladenie	4	∞	1

Tab. 5: Reagencie pre real-time PCR – TaqMan sonda (gén CYP3A4)

	$\mu\text{L}/\text{vzorka}$ (10 μL)	μL Mix/triplikát
TaqMan mix	5	19
primer-sonda	0,4	1,52
H ₂ O	3,8	14,44
Spolu	9,2	34,96

Tab. 6: Teplotný profil pre real-time PCR – TaqMan sonda (gén CYP3A4)

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklov
Iniciálna denaturácia	95	10 min.	1
Denaturácia	95	15 s.	40
Hybridizácia	60	1min.	
Chladienie	4	∞	1

VÝSLEDKY

Gén CYP1A5

Génová expresia génu CYP1A5 pri aplikovanom objeme DMSO 50 μL bola zvýšená 8,83-krát, 35 μL 5,96-krát, 30 μL 4,95-krát, 25 μL 4,21-krát, 20 μL 3,61-krát a pri 15 μL 2,84-krát. Pri objeme 10 μL bola génová expresia znížená v porovnaní s vyššími aplikovanými objemami a bola porovnateľná s expresiou vzoriek kontrolnej skupiny. Pri objeme 5 μL je génová expresia 0,45-krát znížená oproti kontrole (viď obr. 1). Pri sledovaní génovej expresie génu CYP1A5 bola vykonaná aj melting analýza v rozmedzí teplôt 82,3 – 82,7 °C na vylúčenie nešpecifických produktov (viď obr. 2).

Gén CYP3A37

Génová expresia génu CYP3A37 pri aplikovanom objeme DMSO 50 μL bola zvýšená 5,67-krát, 35 μL 3,67-krát, 30 μL 2,98-krát, 25 μL 2,55-krát, 20 μL 2,25-krát a pri 15 μL 1,77-krát. Pri objeme 10 μL bola génová expresia len mierne zvýšená 1,29-krát a pri objeme 5 μL je génová expresia 0,67-krát znížená oproti kontrole (viď obr. 3). Pri sledovaní génovej expresie génu CYP3A37 bola vykonaná aj melting

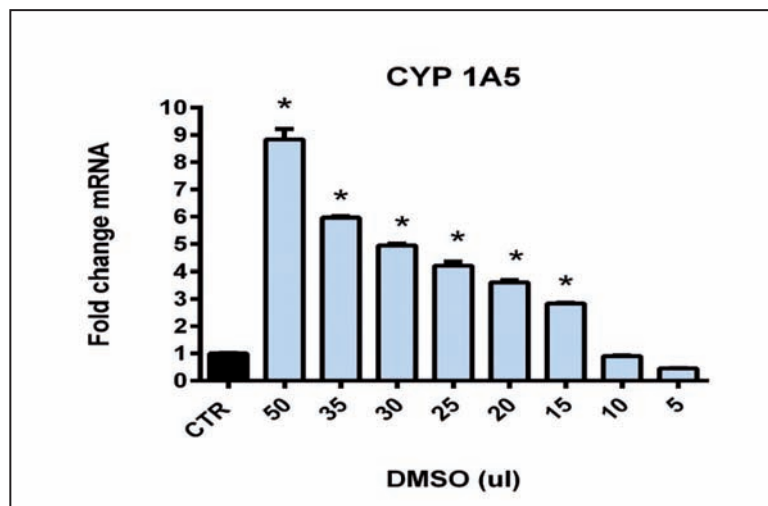
analýza v rozmedzí teplôt 80,2 – 80,7 °C na vylúčenie nešpecifických produktov (viď obr. 4).

Gén CYP3A4

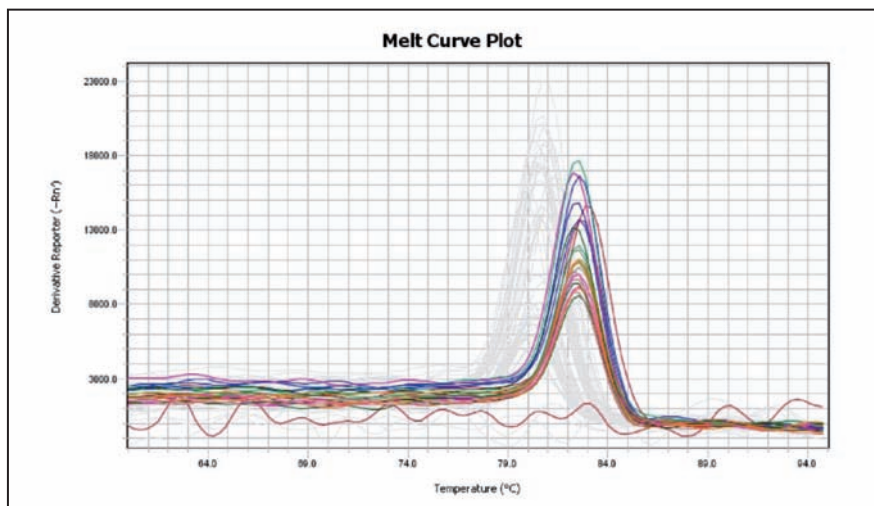
Génová expresia génu CYP3A4 pri aplikovanom objeme DMSO 50 μL bola zvýšená 3,37-krát, 35 μL 2,55-krát, 30 μL 2,08-krát, 25 μL 1,82-krát, 20 μL 1,58-krát. Pri objeme 15 a 10 μL bola génová expresia porovnateľná s génovou expresiou vzoriek kontrolnej skupiny a pri objeme 5 μL je génová expresia 0,75-krát znížená oproti kontrole (viď obr. 5).

Pri porovnaní výsledkov génovej expresie jednotlivých génov môžeme konštatovať, že aplikáciou DMSO v dávkach 50, 35, 30, 25, 20 a 15 μL došlo pri všetkých troch sledovaných génoch k indukcii génovej expresie v porovnaní s kontrolnými vzorkami bez DMSO. Pri aplikačných dávkach 10 a 5 μL došlo k mierne negatívnej regulácii génovej expresie a hodnoty sú v tomto prípade nižšie ako v kontrolných vzorkách. Najvýraznejšie bola génová expresia indukovaná pri géne CYP1A5, potom nasledoval gén CYP3A37 a najnižšie zvýšenie génovej expresie v sledovaných vzorkách bolo pozorované pri géne CYP3A4 (viď obr. 6).

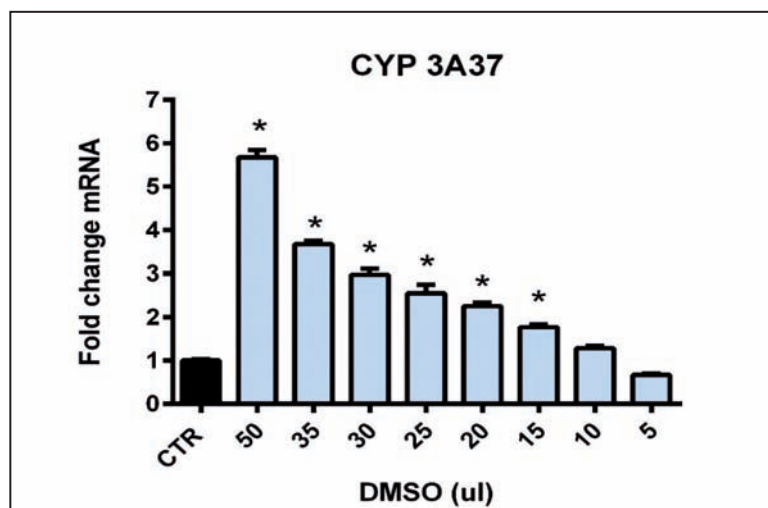
Obr. 1: Génová expresia génu CYP1A5 pri jednotlivých aplikačných dávkach DMSO – * $p \leq 0.05$



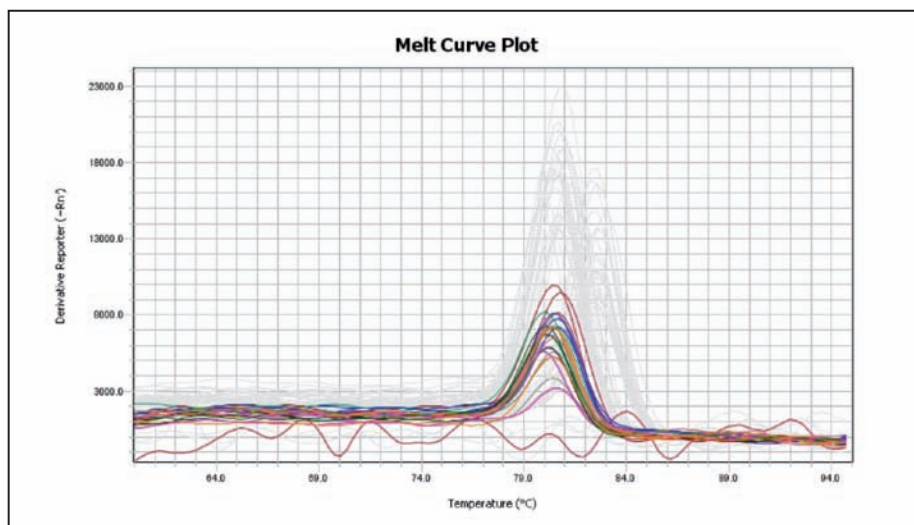
Obr. 2: Melting analýza vzoriek pri amplifikácii génu CYP1A5 (teplota melting analýzy sa pohybovala v rozmedzí 82,3 – 82,7 °C)



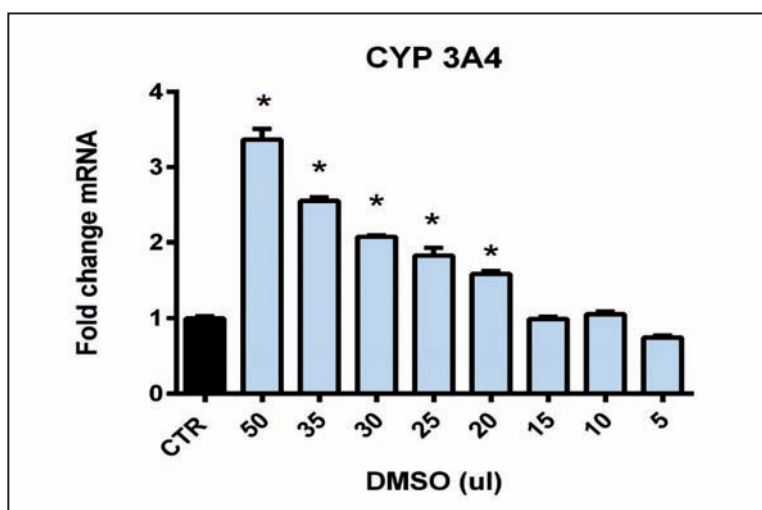
Obr. 3: Génová expresia génu CYP3A37 v jednotlivých aplikačných dávkach DMSO – * $p \leq 0.05$



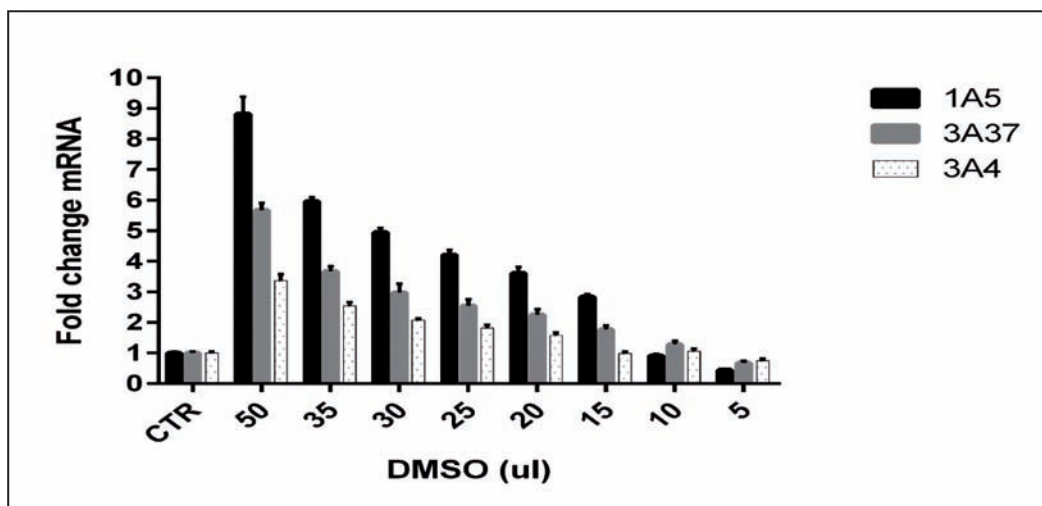
Obr. 4: Melting analýza vzoriek pri amplifikácii génu CYP3A37
(teplota melting analýzy sa pohybovala v rozmedzí 80,2 – 80,7 °C)



Obr. 5: Génová expresia génu CYP3A4 v jednotlivých aplikačných dávkach DMSO – *p ≤ 0.05



Obr. 6: Celkový prehľad výsledkov génovej expresie pri jednotlivých aplikačných dávkach DMSO



DISKUSIA

DMSO je bezfarebná kvapalina bez zápachu, ktorá vzniká ako vedľajší produkt výroby celulózy. Ako najdôležitejšia vlastnosť sa označuje schopnosť penetrácie cez biologické membrány a výborná rozpustnosť ťažko rozpustných látok. Z nežiadúcich účinkov bol pozorovaný erytém, suchosť slizníc alebo kontaktná urtikária (Iqbal a kol., 2017). Penazzi a kol. (2017) sledovali účinok DMSO pri chronickom podávaní nízkych, netoxických dávok 0,01 % DMSO u myší s diagnózou Alzheimerovej choroby v predklinickom štádiu. Výsledkom bolo zvýšenie hustoty tkaniva v hipokampe a možnosť ďalšieho využitia pri zlepšovaní kognitívnych funkcií a zlepšení funkcií pamäti.

Agentúra „Health Canada“ však odsúhlasila použitie DMSO len na zmiernenie genitourinárnych príznakov pri chronickej cystitíde, intersticiálnej cystitíde, radiačnej cystitíde, trigonitíde a prostatitíde. Ľahko preniká cez membrány a vytesňuje vodu, preto sa využíva ako kryoprotektívum pri konzervácii kmeňových buniek a kostnej drene (Menard, 2019).

Pre výbornú rozpúšťacu schopnosť sa DMSO používa ako rozpúšťadlo liekov v *in vitro* aj *in vivo* štúdiách. Väčšina štúdií sleduje toxicitu rozpúšťaných látok a toxicite samotného DMSO sa nevenuje pozornosť. Pri sledovaní akútnej toxicity DMSO na myšiach, potkanoch, králikoch a psoch bol pozorovaný stuhnutý chvost, hypotermia, zvýšená sekrécia slinných žliaz a u hlodavcov aj diuretický účinok. Záverom bola vysoká lokálna toxicita DMSO.

V našej štúdii bola analyzovaná génová expresia vybraných pečenečných cytochrómov po pôsobení DMSO na vyvíjajúcu sa pečeň kuracieho embrya.

Génová expresia pečenečných cytochrómov CYP1A5, CYP3A37 a CYP3A34 sa sledovala po aplikovaní DMSO v objemoch 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 a 50 μL . Výsledky štúdie boli vyhodnotené na základe porovnania génovej expresie pečenečných cytochrómov v kontrolnej a experimentálnej skupine. DMSO signifikantne indukoval génovú expresiu CYP1A5, CYP3A37 a CYP3A4 pri aplikovaných

objemoch 20, 25, 30, 35 a 50 μL . Signifikantné zvýšenie génovej expresie pri aplikovanom objeme 15 μL bolo pozorované len pri géne CYP1A5 a CYP3A37. Pri objemoch 5 a 10 μL bola vyhodnotená negatívna regulácia génovej expresie, ktorá sa pohybovala blízko hodnôt kontrolných vzoriek alebo boli hodnoty nižšie. Najvyššia indukcia génovej expresie génu CYP1A5 bola vyhodnotená pri aplikovanej dávke 50 μL DMSO. Génová expresia sa zvyšovala priamo úmerne so zvyšujúcou sa hodnotou aplikovanej dávky DMSO. Na základe výsledkov možno konštatovať, že génová expresia aplikovaním DMSO bola indukovaná v poradí génov CYP1A5 > CYP3A37 > CYP3A4. Najvyššia indukcia CYP1A5 sa spája so skutočnosťou, že DMSO aktivuje arylový hydrokarbónový receptor, ktorý reguluje génovú expresiu enzýmov zúčastňujúcich sa metabolizácie xenobiotík (Fujii-Kuriyama a Mimura, 2005). Aktivácia aryl hydrokarbónového receptora vedie k translokácii receptora do jadra a po naviazaní na promótor cieľového génu sa zvýši génová expresia (Zhang a kol., 2012). DMSO indukuje expresiu jadrového pregnánového a konštitutívneho androstánového receptora, čo vedie k indukcii expresie cytochrómov rodiny CYP3A (Su a Waxman, 2004). Jadrové receptory sa väzbou ligandu aktivujú, viažu sa na promótor DNA a začína sa proces transkripcie génu.

ZÁVER

Výsledky štúdie poukazujú na indukciu génovej expresie po aplikácii DMSO na kuracie embryo. Štúdia bola prínosom z hľadiska rozšírenia vedomostí v danom odbore a poskytuje možnosť sledovať vplyv DMSO aj na iné pečenečné gény, alebo vplyv iných xenobiotík na kuracie embryo.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná grantovým projektom MŠVVaŠ SR. VEGA 1/0050/19.

ZOZNAM LITERATÚRY

Dumont, L. J., Cancelas, J. A., Dumont, D. F., Siegel, A. H., Szczepiorkowski, Z. M., Rugg, N., Pratt, P. G., Worsham, D. N., Hartman, E. L., Dunn, S. K., O'Leary, M., Ransom, J. H., Michael, R. A., Macdonald, V. W.: A randomized controlled trial evaluating recovery and survival of 6% dimethyl sulfoxide-frozen autologous platelets in healthy volunteers. *Transfusion*, 2013, 53, 128 – 137.

Fujii-Kuriyama, Y. a Mimura, J.: Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 338, 311 – 317.

Iqbal, T., Kapadia, N., Ather, S., Iqbal, S., Mansoor, M., Faisal, S., Farooq, N., Fatima, F.: Efficacy of topical DMSO in Macular Amyloidosis. *Rawal Medical Journal*, 2017, 42, 43 – 47.

Menard, D.: *Canada.ca*. <http://publications.gc.ca/site/eng/9.835602/publication.html>. Updated March 5, 2019. Accessed March 12, 2019.

Penazzi, L., Lorengel, J., Sündermann, F., Golovyashkina, N., Marre, S., Mathis, C. M. B., Lewejohann, L., Brandt, R., Bakota, L.: DMSO modulates CNS function in a preclinical Alzheimer's disease model. *Neuropharmacology*, 2017, 113, 434 – 444.

Smith, E. R., Hadidian, Z., Mason, M. M.: The single- and repeated-dose toxicity of dimethyl sulfoxide. *Annals of the New York academy of sciences*, 1967, 141, 96 – 109.

Su, T. a Waxman, D. J.: Impact of dimethyl sulfoxide on expression of nuclear receptors and drug-inducible cytochromes P450 in primary rat hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 424, 226 – 234.

Zhang, H. F., Lin, X. H., Yang, H., Zhou, L. C., Guo, Y. L., Barnett, J. V., Guo, Z. M.: Regulation of the activity and expression of aryl hydrocarbon receptor by ethanol in mouse hepatic stellate cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2012, 36, 1873 – 1881.



CYTOTOXICKÉ ÚČINKY VYBRANÝCH RASTLINNÝCH EXTRAKTOV

CYTOTOXIC ACTIVITY OF SELECTED PLANT EXTRACTS

Dudičová, M., Marcinčáková, D.

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

dana.marcincakova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo skúmanie cytotoxických účinkov rastlinných extraktov. Na experiment bol použitý etanolový extrakt katarantu ružového (*Catharanthus roseus* – *Apocyanaceae*), vodný roztok mydlíce lekárskej (*Saponaria officinalis* – *Silenaceae*) a extrakt púpavy lekárskej (*Taraxacum officinale* – *Asteraceae*) pripravený pomocou polárneho rozpúšťadla triton X-100 v koncentrácii 125, 250, 500 a 1000 mg.l⁻¹.

V experimente bola sledovaná bunková odpoveď vyvolaná pôsobením týchto extraktov v reálnom čase na modelovej línii epitelových buniek obličiek kráľika (RK13) prostredníctvom xCELLigence systému počas 68 hodín. Monitorovaním sa zistilo, že najnižšia koncentrácia rastlinných extraktov vyvolala nárast adhérence buniek a bunkového indexu (CI) oproti bunkám bez ošetrovania. Najväčšia aktivita buniek bola

zaznamenaná u mydlíce lekárskej $113,43 \pm 7,65$ %. Zároveň sa zistilo, že najvyššie koncentrácie extraktov rastlín spôsobili výrazný pokles bunkového indexu, ktorý sa prisudzuje odlúpnutiu buniek od dna mikrotitračnej platničky. Najväčší pokles CI, až na hodnoty blížiac sa nule, bol zaznamenaný u buniek ošetrovaných extraktom púpavy ($P < 0,05$). Na stanovenie metabolickej aktivity buniek po pôsobení extraktov bol použitý kolorimetrický test metabolickej aktivity alebo viability buniek. Najvyššie hodnoty boli namerané po expozícii buniek extraktom púpavy vo všetkých použitých koncentráciách v porovnaní s ostatnými extraktmi. Hodnoty viability buniek exponovaných extraktom púpavy sa pohybovali medzi 88,43 – 108,63 %, pričom štatisticky významný rozdiel ($P < 0,05$) bol zaznamenaný u všetkých koncentrácií okrem koncentrácie 250 a 500 mg.l⁻¹. Ostatné sledované koncentrácie rastlinných extraktov taktiež ovplyvnili

metabolickú aktivitu buniek, pričom došlo k jej signifikantnému poklesu oproti kontrole ($P < 0,05$).

Kľúčové slová: bunky; extrakt; terapia; toxicita

ABSTRACT

The aim of the study was examination of cytotoxic effects of plant extracts. In the experiment we used the ethanol extract of *Catharanthus roseus* – *Apocyanaceae*, aqueous solution of *Saponaria officinalis* – *Silenaceae* and the extract of *Taraxacum officinale* – *Asteraceae* prepared with the polar solvent triton X-100 at a concentration of 125, 250, 500 and 1000 mg.l⁻¹.

We monitored cellular response due to the influence of these extracts in real time on the model line of the epithelial cells of the rabbit kidney (RK13) through the xCELLigence system during 68 hours. By the monitoring we found out that the lowest concentration of plant extracts induced an increase in adherence of the cells and the cell index (CI) compared to the untreated cells. The largest cell activity we saw in *Saponaria officinalis* – *Silenaceae* $113,43 \pm 7,65$ %. At the same time we found that the highest concentration of extracts of the plant caused a significant decrease in the cell index which is attributed to the peeling of the cells from the bottom of the microtiter plate.

The biggest decline of CI, near to the values approaching zero, we saw in cells treated with the extract of dandelion ($P < 0,05$). To determine metabolic activity of the cells after the treatment with the extracts, we used a colorimetric test of metabolic activity or cell viability. The highest values were observed in cells after the exposure of the extract of dandelion in all concentrations used in comparison with other extracts. The value of the viability of the cells treated with the extract of dandelion ranged between 88,43 – 108,63 %. A statistically significant difference ($P < 0,05$)

was observed at all concentrations except the concentration of 250 and 500 mg.l⁻¹. Other tested concentrations of plant extracts also affected metabolic activity of the cells, while there was a significant decrease compared to the control ($P < 0,05$).

Key words: cells; extract; therapy; toxicity

ÚVOD

Cytotoxicita je schopnosť chemickej, ale aj prírodnej látky poškodiť bunku alebo ju dokonca usmrtiť (Niles a kol., 2009). Na testovanie môžu byť použité aj ľudské bunkové línie pestované mimo živého organizmu, čím odpadá nutnosť extrapolácie získaných dát a testy sú tak presnejšie. Taktiež pri testovaní bezpečnosti liečiv je cytotoxicita jej najdôležitejším ukazovateľom. Pre odhalenie cytotoxicity bol preto vyvinutý celý rad *in vitro* cytotoxických testov (Niles a kol., 2009; Weijia a kol., 2015). Medzi najčastejšie využívané *in vitro* testy cytotoxicity patria kolorimetrické metódy na stanovenie toxicity zmenou sfarbenia použitých reagensí. Nevýhodou týchto metód je ale nemožnosť sledovania testovaných buniek v priebehu experimentu v reálnom čase. Takéto klasické testy nám poskytujú iba konečný výsledok, ale nie je možné zistiť účinok danej látky na bunky v jednotlivých časových bodoch. Tento problém však vyriešil systém xCELLigence RTCA (Real-Time Cell Analyzer), ktorý zaznamenáva bunkovú odpoveď v danom časovom intervale pomocou krivky. Testy na toxicitu sú preto neoddeliteľnou súčasťou vývoja nových liekov (Weijia a kol., 2015; Ozdemir a Mustafa, 2014). Účelom testovania je zisťovať a predchádzať neočakávanej alebo oneskorenej liekovej toxicite. Cieľom tejto štúdie bolo zistiť potenciálne cytotoxické účinky rastlinných extraktov v reálnom čase pomocou systému xCELLigence a ich vplyv na metabolickú aktivitu buniek pomocou kolorimetrického MTT testu.

MATERIÁL A METÓDY

V štúdií boli použité nasledujúce materiály a extrakty: etanolový extrakt katarantu ružového (*Catharanthus roseus*), vodný extrakt mydlice lekárskej (*Saponaria officinalis*), extrakt púpavy lekárskej (*Taraxacum officinale*) pripravený pomocou rozpúšťadla Triton X-100. Extrakty boli následne nariadené vodou krátko pred experimentom na koncentrácie 125 mg.l⁻¹, 250 mg.l⁻¹, 500 mg.l⁻¹ a 1000 mg.l⁻¹. Ďalšie použité materiály a extrakty boli: bunková kultúra králičích obličkových epitelových buniek RK13 (Rabbit Kidney Cells), kompletné kultivačné médium (KKM) – 10 % EMEM (Earl's Minimal Essential Medium), 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT, Roche Applied Science, Nemecko), roztok DMSO (dimetysulfoxid), Sorensenov glycinový pufer (Sigma Aldrich, Nemecko), PBS (fosfátový pufer), Synergy HT Biotek (Winooski, VT, USA).

Predmetom štúdie bolo sledovanie účinkov týchto extraktov na modelovej bunkovej línii králičích obličkových buniek RK13. Kultivácia buniek prebehla v kompletnom médiu na kultiváciu buniek 10 % EMEM (Earl's Minimal Essential Medium). Kultivácia prebiehala pri teplote 37 °C v atmosfére s 5 % obsahom CO₂, po dobu 3 – 4 dní. Bunkovú odpoveď sme sledovali u buniek exponovaných rastlinným extraktom v porovnaní s kontrolnými bunkami bez ošetrovania.

xCELLigence systém

xCELLigence systém (real-time cell analyser – RTCA) neinvazívne monitoruje stav buniek v reálnom čase, zmeny vyjadruje v hodnotách bunkového indexu (CI) a zaznamenáva ich do kriviek (ACEA Biosciences Inc., 2013; Vondráčková a kol., 2010). Pre optimalizáciu počtu buniek sme do e-doštičiek pridali najprv 100 µl kultivačného média a v RTCA analyzátore sme zmerali background. Potom sme k médiu pridali 50 µl suspenzie buniek. Platničky sme vložili do analyzátora a kultivovali 20 hodín. Keď dosiahol CI hodnotu približne 1,0 a bunky boli stále

v rastovej fáze, pridali sme k nim testované látky (48 hodín). Výsledkami meraní sú krivky zachytávajúce všetky zmeny impedancie buniek v jamke. RTCA softvér vypočítal normalizovaný bunkový index ako bunkový index v individuálnom čase, ktorý bol vydelený bunkovým indexom v čase normalizácie, t.j. v čase expozície buniek testovaným látkam (Teng a kol., 2013).

MTT test

V priebehu analýzy buniek v reálnom čase bol vykonaný súbežne aj kolorimetrický MTT test. Je to metóda používaná na stanovenie metabolickej aktivity živých buniek meraním enzymatickej redukcie žltej tetrazoliovej soli 3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) na purpurovo sfarbený formazán, ktorý je vo vode nerozpustný (Mahto a kol., 2010). Bunky boli nasadené do 96-jamkových e-platničiek a ošetrené rovnako ako pri RTCA analýze. Po 48 hodinovej expozícii buniek testovaným látkam sme do každej jamky pridali PBS na premytie adherovaných buniek. Následne sme znova pridali médium (90 µl) a 10 µl MTT farbiva v koncentrácii 5 mg.ml⁻¹ a nechali inkubovať 4 hodiny. Potom sme pridali 100 µl DMSO. Nakoniec sme pridali 12,5 µl Sorensenovho glycerínového pufru do každej jamky a hneď po pridaní sme odmerali absorbanciu pomocou spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 570 nm. Hodnoty namerané spektrofotometricky sme prepočítali na hodnotu % metabolickej aktivity.

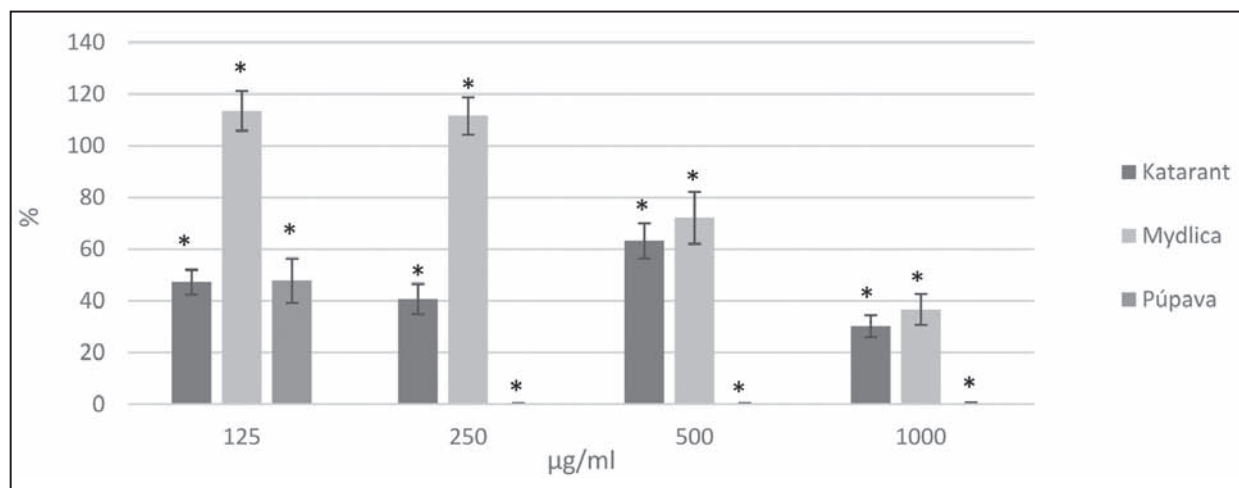
Štatistické spracovanie výsledkov

Výsledky boli vyjadrené ako priemerné hodnoty 3 meraní. Na štatistické spracovanie bol použitý program GrafiPad Prism 5.0 (2007), jednocestný Anova test. Hodnota P < 0,05 bola považovaná za štatisticky významný rozdiel.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zmeny v adherencii, teda aj v proliferácii buniek boli zaznamenávané xCELLigence systémom počas 68 hodín. Po približne 24 hodinovej kultivácii buniek

Graf 1: Porovnanie zmien adherencie buniek exponovaných extraktom (48. hod)



* – štatisticky významný rozdiel oproti kontrole ($P < 0,05$)

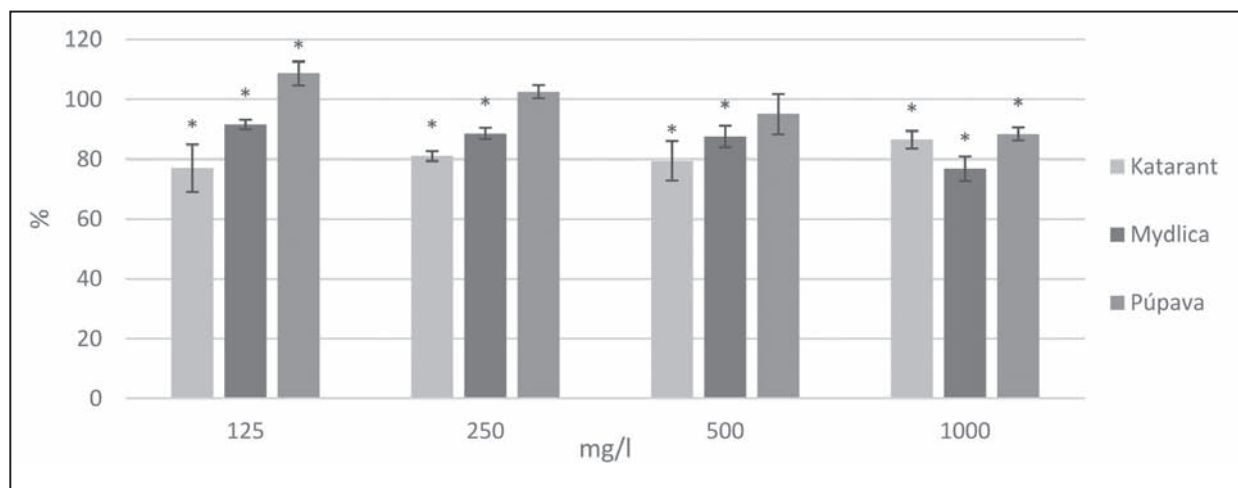
počas ich rastovej fázy boli vystavené účinkom testovaných extraktov púpavy lekárskej, mydlíce lekárskej a katarantu ružového po dobu 48 hodín. Pre jednoduchšie porovnanie zmien adherencie buniek exponovaných odlišným extraktom boli hodnoty bunkového indexu prepočítané na % zmeny adherencie (viď graf 1). Najnižšie koncentrácie mydlíce 125 a 250 mg.l⁻¹ vyvolali mierny nárast príľnutia buniek, a teda aj nárast bunkového indexu oproti kontrolnej vzorke (100 %). Pri ostatných sledovaných koncentráciách došlo k poklesu adherencie buniek. Signifikantný pokles CI až na hodnoty blízke sa nule môžeme sledovať u buniek exponovaných extraktom púpavy, najmä v koncentráciách 1000 mg.l⁻¹, 500 mg.l⁻¹, ale aj 250 mg.l⁻¹. Tento výsledok môže byť ovplyvnený rozpúšťadlom triton X-100, ktoré bolo použité na prípravu extraktu. Rozpúšťadlo môže pôsobiť ako permeabilizačné činidlo, ale v závislosti od dávky a trvania expozície sa môžu prejaviť aj detergentné účinky. Dlhšia expozícia buniek vyvoláva zmeny integrity fosfolipidovej membrány buniek (Maire a kol., 2000).

CI poklesol u buniek ošetrovaných katarantom v prípade koncentrácií 250 mg.l⁻¹ a 1000 mg.l⁻¹. Naopak, pri koncentrácii 500 mg.l⁻¹ bola pozorovaná vyššia hodnota CI oproti ostatným testovaným koncentráciám, ale aj táto hodnota bola výrazne nižšia

oproti kontrole. Všetky sledované extrakty spôsobili štatisticky významné zmeny stavu buniek ($P < 0,05$). Z uvedeného vyplýva, že nižšie koncentrácie extraktov majú pozitívny (povzbudzujúci) účinok a vyššie koncentrácie majú práve opačný efekt na ošetrované bunky – negatívny (toxický).

Stanovenie metabolickej aktivity buniek bolo vykonané v 48. hodine expozície buniek rastlinným extraktom púpavy, mydlíce a katarantu. Hodnoty namerané spektrofotometricky boli následne prepočítané pomocou kontrolných buniek na percento metabolickej aktivity. Graf 2 znázorňuje a porovnáva hodnoty metabolickej aktivity buniek po pôsobení jednotlivých extraktov. Z grafického znázornenia vyplýva, že metabolická aktivita bola v porovnaní s kontrolou (100 %) zvýšená len po vystavení účinku extraktu púpavy v koncentrácii 125 mg.l⁻¹ a 250 mg.l⁻¹. Po pôsobení vyšších koncentrácií extraktu klesala životaschopnosť buniek. Vysoké percento metabolickej aktivity prejavili vodné extrakty mydlíce aj etanolové extrakty katarantu v rovnakých koncentráciách. Avšak so zvyšujúcou sa koncentráciou dochádzalo k znižovaniu metabolickej aktivity. V prípade katarantu tieto výsledky neboli úplne jednoznačné, nakoľko práve tu boli v najvyššej koncentrácii (1000 mg.l⁻¹) zaznamenané aj vyššie hodnoty metabolickej aktivity. Tento jav môže

Graf 2: Metabolická aktivita buniek v 48.hodine expozície buniek extraktom (%)



* – štatisticky významný rozdiel oproti kontrole ($P < 0,05$)

Tab. 1: Percentuálne porovnanie výsledkov

koncentrácia (mg.l ⁻¹)	Katarant			
	MTT (%)	sd	RTCA	sd
125	77,02	± 7,90	47,18	± 4,80
250	81,09	± 1,65	40,69	± 5,82
500	79,46	± 6,58	63,22	± 6,80
1000	86,54	± 2,91	30,21	± 4,21
koncentrácia (mg.l ⁻¹)	Mydlica			
	MTT (%)	sd	RTCA	sd
125	91,59	± 1,69	113,43	± 7,65
250	88,62	± 1,84	111,53	± 7,23
500	87,61	± 3,57	72,06	± 9,99
1000	76,8	± 4,05	36,63	± 5,91
koncentrácia (mg.l ⁻¹)	Púpava			
	MTT (%)	sd	RTCA	sd
125	108,63	± 4,02	47,75	± 8,58
250	102,55	± 2,18	0	± 0,45
500	95,1	± 6,72	0	± 0,45
1000	88,43	± 2,19	0	± 0,70

± sd – smerodajná odchýlka

MTT – test metabolickej aktivity

RTCA – test stavu buniek v reálnom čase

súvisieť s rozdielnou prítomnosťou obsahových látok oproti predošlým rastlinným extraktom, ktorým boli bunky vystavené, keďže hlavnými obsahovými látkami sú vinca alkaloidy. Prítomné vinca alkaloidy majú vo všeobecnosti mitoticky inhibičný účinok (Cragg a Newman, 2005). Čisté alkaloidy sú málo rozpustné vo vode a skôr sa rozpúšťajú v organických rozpúšťadlách (Větrovská, 2013). Keďže vinca alkaloidy sú lepšie rozpustné v organických rozpúšťadlách (napríklad etanol), vyvolali vysokú metabolickú aktivitu v bunkách, aj keď po dlhšom pôsobení by sme zrejme mohli pozorovať smrť buniek. Veľmi dôležitým faktorom pri realizácii experimentu bol výber vhodného typu rozpúšťadla a doba jeho pôsobenia.

Tabuľka 1 obsahuje výsledky získané oboma meraniami. Keďže obe metódy majú odlišné princípy, hodnoty nekorelujú, ale percentuálne vyjadrenie uľahčilo vzájomné porovnanie dosiahnutých výsledkov.

Pri hodnotení adherencie sme zaznamenali najvyšší pokles oproti kontrolným bunkám u všetkých koncentrácií púpavy a nárast oproti kontrole u mydlíce (125 a 250 mg.l⁻¹). Pri hodnotení metabolickej aktivity sme zistili nárast viability buniek len po ošetrení extraktom púpavy, zatiaľ čo u všetkých ostatných extraktov došlo k signifikantnému zníženiu viability ($P < 0,05$).

Príčinou namerania takýchto nižších hodnôt metabolickej aktivity mohol byť tiež vplyv použitých rozpúšťadiel alebo prítomnosť rôznych obsahových látok v daných rastlinách. Niektoré z nich, ako napríklad saponíny (mydlíca lekárska) interagujú s cholesterolom v bunkových membránach, a tak vytvárajú komplexy. Stabilizované komplexy tvoria póry, ktoré umožňujú priechod vody a iných malých molekúl (Korchowiec a kol., 2015). V súčasnosti sa preto saponíny používajú aj v terapii rakoviny na eflux liečiva a inhibíciu angiogenézy. Taktiež sa vyznačujú antimetastatickými vlastnosťami (Sudji, 2015).

ZÁVER

V súčasnej dobe ľudia čoraz viac siahajú po tradičných formách liečenia, ktoré ponúkajú najmä prírodné rastlinné zdroje. Rastlinné extrakty môžu ovplyvňovať organizmus pozitívne – cytoprotektívne, ale môžu pôsobiť aj negatívne – cytotoxicky, a to najmä pri použití vysokej koncentrácie rozpúšťadla alebo prípadne pri použití nevhodného rozpúšťadla. Vždy musíme brať do úvahy zámer a spôsob využitia, pre ktorý bude extrakt pripravený. Extrakčné činidlo zabezpečuje získavanie odlišných alebo aj viacerých zložiek z extraktu, avšak jeho reziduá môžu ostať prítomné v lyofilizovanom extrakte (napr. detergentné rozpúšťadlá) a po rozpustení vo vode sa stávajú opäť aktívnymi a nebezpečnými pre organizmus. Vďaka vedeckému bádaniu a objavom dokážeme v súčasnosti využívať účinné zložky rastlín nielen na ochranu a regeneráciu buniek jednotlivých orgánov, či celého organizmu, ale ich vyššie koncentrácie s preukázanými cytotoxickými účinkami nachádzajú uplatnenie pri terapii nádorových ochorení.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia vznikla s podporou Národného referenčného laboratória pre pesticídy Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

ZOZNAM LITERATÚRY

ACEA Biosciences Inc. The xCELLigence system: Discover what you've been missing. 2013. <https://www.aceabio.com/wp-content/uploads/xCELLigence-RTCA-SP-MP-Instruments.pdf>. Updated November 11, 2017. Accessed November 11, 2017.

Cragg, G. M. a Newman, D. J.: Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 100, 72 – 79.

Korchowiec, B., Gorczyca, M., Wojszko, K., Janikowska, M., Henry, M., Rogalska, E.: Impact of two different saponins on the organization of model

lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2015, 1848, 1963 – 1973.

Mahto, S. K., Chandra, P., Rhee, S. W.: In vitro models, endpoints and assessment methods for the measurement of cytotoxicity. *Toxicology and environmental health sciences*, 2010, 2, 87 – 93.

Maire, M. L., Champeil, P., Moller, J. V.: Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1508, 86 – 111.

Niles, A. L., Moravec, R. A., Riss, T. L.: In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Curr. Chem. Genomics*, 2009, 3, 34 – 40.

Ozdemir, A. a Mustafa, A. R. K.: XCELLigence Real Time Cell Analysis System: A new method for cell proliferation and cytotoxicity. *Niche Journal*, 2014, 2, 15 – 17.

Sudji, I. R.: *Bioactivity of Steroid and Triterpenoid Saponins: Influence on Membrane Permeability and Drug Absorption*. Dizertačná práca. Indonesia: Sabang, 2015, s. 145.

Teng, Z., Kuang, X., Wang, J., Zhang, X.: Real-time cell analysis – A new method for dynamic, quantitative measurement of infectious viruses and antiserum neutralizing activity. *Journal of Virological Methods*, 2013, 193, 364 – 370.

Větrovská, E.: *Rostlinné alkaloidy a jejich účinky na lidský organismus*. Bakalárska práca. Praha: Karlova univerzita v Prahe, 2013. 92 s.

Vondráčková, L., Horvath, V., Žurek, D.: O zlatých elektrodách. *Labor Aktuell*, 2010.

Weijia, L., Zhou, J., Xu, Y.: Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports*, 2015, 3, 617 – 620.



ŠTÚDIUM PRESTUPU NOSIČOVÝCH SYSTÉMOV DO NÁDOROVÝCH SFÉROIDOV STUDY OF DRUG DELIVERY SYSTEM EFFECTS ON MULTICELLULAR TUMOR SPHEROIDS

Zelencová, D.¹, Harvanová J.¹, Nešporová, K.²

¹Ústav farmaceutickej chémie, Katedra chémie, biochémie a biofyziky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

²Contipro a.s., Dolní Dobrouč
Česká Republika

zelencova.dominika@gmail.com

ABSTRAKT

Predklinický výskum na hodnotenie terapeutického účinku protirakovinových liečiv sa zvyčajne vykonáva v dvojrozmerných (2D) rakovinových bunkových kultúrach. Avšak tie nie sú schopné reprodukovat' vlastnosti pevných nádorov *in vivo*, ako aj ich odolnosť voči terapeutikám. To prispelo k vývoju nových trojrozmerných (3D) modelov poskytujúcich mikroprostredie, ktoré hrá významnú úlohu pri progresii nádorov a bunkovej odpovedi na lieky.

Pre optimalizáciu prípravy 3D sféroidov (z nádorovej línie buniek HT-29) bola použitá kvapalná prekrývajúca technika. Následne bol sledovaný rast, viabilita, nekróza a apoptóza vo sféroidoch. Pre nádorové sféroidy bola charakteristická vonkajšia vrstva proliferujúcich

živých buniek a stredná zóna pokojových a nekrotických buniek. Pomocou kvantitatívnej RT-PCR bolo zistené, že v porovnaní s 2D kultúrou táto komplexná štruktúra sféroidov mení expresiu génov. V budúcnosti by sa uvedené rozdiely mohli zohľadniť pri vývoji nových terapeutík v predklinických štúdiách liečby rakoviny. Ďalej sa testovali polymérne micely pripravené z amfifilnej kyseliny hyalurónovej (HA) modifikovanej krátkou (C6) a dlhou (C18:1) mastnou kyselinou. Pomocou kolorimetrickej metódy MTT bola stanovená ich toxicita v 2D a 3D kultúre. V porovnaní s HAC6 nosičom bol výhodnejší nosič HAC18:1, pretože mal vyššiu toxicitu voči nádorovým bunkám oproti zdravým, čo znamená, že môže zvyšovať protinádorový účinok použitého liečiva a zlepšovať jeho aplikáciu. Následne boli tieto polymérne micely naplnené farbivami

kurkumínom (CUR) a nílskou modrou (NB) a boli využité ako fluorescenčné sondy na monitorovanie prestupu v 2D a 3D kultúre. Analýza sa vykonala histologickými rezmi, konfokálnou mikroskopiou a prietokovou cytometriou. Prestup značených nosičov do sféroidov bol koncentračne a časovo závislý. Výhodou je, že použité nosiče penetrovali aj do hypoxických oblastí sféroidu za pomerne krátky čas, predlžovali dobu zotrvania liečiva v bunkách a vyznačovali sa nezávislým prestupom cez CD44 receptor. Prijem a distribúcia testovaných polymérnych nosičov vo sféroide môže tak predurčovať ich správanie v prítomnosti nádorov *in vivo*.

Kľúčové slová: 3D kultivácia; kyselina hyalurónová; nanonosič; rakovina; transport liečiva

ABSTRACT

Preclinical research evaluating the therapeutic effect of anticancer drugs is typically performed in two-dimensional (2D) cancer cell cultures. However, it is unable to reproduce the properties of solid tumors *in vivo* as well as its resistance to the drugs. This has led to the development of new three-dimensional (3D) models providing microenvironment that play a significant role in tumor progression and cellular response to the drugs.

To optimize the preparation of 3D spheroids (from the tumor cell line HT-29) a liquid overlay technique has been used. Subsequently growth, viability, necrosis and apoptosis in the spheroids were observed. They were characterized by the outer layer of proliferating living cells and the middle zone of resting and necrotic cells. By quantitative RT-PCR we found that compared to 2D culture, this complex structure of the spheroid alters the genes expression. In the future, these differences could lead to the consideration of using

them in the development of new therapeutics in preclinical studies of the cancer treatment. Then the polymeric micelles prepared from amphiphilic hyaluronic acid (HA) modified with short (C6) and long (C18:1) fatty acid were tested. By the MTT method, their toxicity in 2D and 3D culture was determined. Compared to the HAC6 carrier, the HAC18:1 carrier was more preferable because of higher toxicity on tumor cells compared to the healthy cells. It means that it can increase the antitumor effect of the used drug and also improve its application. Subsequently, these polymeric micelles were loaded with the Curcumin (CUR) together with the Nile blue (NB) and they were used as the fluorescent probes to monitor transmission in 2D and 3D cultures. The analysis was performed by histological sections, confocal microscopy and flow cytometry. Transfer of nanocarriers to the spheroids was concentration and time dependent. The advantage is that the carriers penetrated into the hypoxic regions of the spheroid in a relatively short time, prolonged the duration of the drug in the cells and were also characterized by independent transmission through the CD44 receptor. Thus, the uptake and distribution of polymeric carriers in the spheroid can predetermine their behavior in the presence of tumors *in vivo*.

Key words: cancer; 3D cultivation; drug delivery; hyaluronic acid (HA); nanocarrier

ÚVOD

Predklinické modely rakoviny, ktoré predpovedajú výsledky klinickej liečby, sú naliehavo potrebné pri včasnom vývoji protirakovinových liekov. V súčasnosti sa vynakladá veľké úsilie na rozvoj rafinovaných predklinických modelov na preklopenie medzery medzi modelmi *in vitro* a *in vivo* (Zanoni a kol., 2016). Model sféroidov je založený na fyziologickom spôsobe kultivácie buniek v ich prirodzenom 3D stave, kde bunky agregujú na vytvorenie viacbunkových guľovitých štruktúr. V

porovnaní s 2D bunkovou kultúrou sú 3D sféroidy schopné presne napodobniť niektoré znaky tuhých nádorov, ako je ich priestorová štruktúra, kinetika rastu, fyziologické odpovede, bunková signalizácia, génová expresia a mechanizmy rezistencie voči liekom (Costa a kol., 2016).

Zároveň je pozornosť zameraná na vývoj nanočastíc, ktoré boli navrhnuté na zlepšenie biodistribúcie liekov proti rakovine pre optimálnu veľkosť a povrchové charakteristiky, schopnosť zvyšovať rozpustnosť hydrofóbných liečiv vo vode, zvýšenie terapeutických indexov a ich cirkulačného času v krvnom riečisku (Ulbrich a kol., 2016). Sú schopné selektívne transportovať účinné liečivá do rakovinových buniek využitím zmenenej patofyziológie nádorov, ako je ich zvýšená permeabilita a retenčný účinok (EPR) (pasívne zacielenie), alebo aktívneho zacielenia používajúceho ligandy alebo protilátky namierené proti vybraným nádorovým cieľom. Rôzne formy HA sú dnes študované pre ciele podávanie liekov proti rakovine, a to hlavne kvôli špecifickej väzbe HA na CD44 receptor, ktorý je vysoko exprimovaný na povrchu rakovinových buniek v porovnaní s normálnymi bunkami, jej biologickej odbúrateľnosti a biokompatibilite (Huang a kol., 2018). Vzhľadom na prítomnosť viacerých funkčných skupín na HA štruktúre bolo možné chemicky konjugovať rôzne protinádorové liečivá za účelom produkcie micelárnych systémov, ktorých príjem a distribúcia je v našej štúdii testovaná na inovatívnych 3D modeloch nádorových sféroidov.

MATERIÁL A METÓDY

Bunkové línie

V štúdii bola použitá HT-29 (ATCC®) nádorová línia buniek izolovaná z hrubého čreva človeka s ochorením kolorektálneho adenokarcinómu kultivovaná v McCoy's médiu a NHDF (ATCC®) línia normálneho ľudského dermálneho fibroblastu izolovaná z kože tváre človeka kultivovaná v DMEM médiu. Pre overenie zapojenia molekuly CD44 do

mechanizmu príjmu HA bola nádorová bunková línia HT-29 zaslaná firme Cellecta, kde bol do buniek vložený lentivírusový vektor exprimujúci po pridaní vybraného antibiotika (v našom prípade doxycyklínu) krátku vlásenku RNA (shRNA), ktorá sa viaže na cieľový mRNA transkript, a tak zabraňuje jeho prekladu do podoby proteínu. Týmto spôsobom je v danej bunkovej populácii inducibilne dosiahnuté zníženie expresie požadovaného proteínu minimálne o 70 %. Táto línia je ďalej v texte značená ako HT-29 SH.

Príprava sféroidov

V štúdii bola použitá kvapalná prekrývajúca technika s antiadhezívnym agarózovým gélom (1,5 % roztok agarózy vo fosfátovom tlmivom roztoku (PBS), na každú jamku 70 µl, 15 min tuhnutie). Do jamiek s agarózou bolo pridané kultivačné médium a bol vypočítaný objem bunkovej suspenzie pre založenie sféroidu. Rast sféroidov a nekróza jadra boli pozorované fluorescenčným mikroskopom (Nikon ECLIPSE Ti). Rast sféroidov bol vyhodnotený meraním plochy sféroidov pomocou programu NIS-Elements. Pre väčšinu nasledujúcich pokusov boli použité sféroidy s nasadzovacou koncentráciou 5000 a 50 000 buniek kultivovaných po dobu 48 – 72 hodín.

Sledovanie viability, nekrózy a apoptózy buniek v sféroide

Farbenie viabilných a mŕtvych buniek bolo uskutočnené pomocou 50 µl roztoku Calcein AM (1 µl.ml⁻¹) (λ_{ex} 490 nm, λ_{em} 515 nm) a 50 µl roztoku propidium jodid (PI) (1 µl.ml⁻¹) (λ_{ex} 535 nm, λ_{em} 617 nm). Inkubácia pri 37 °C trvala 15 minút. Nekróza jadra bola sledovaná fluorescenčným mikroskopom.

Podľa návodu k ApoFlowEx® FITC kit (Exbio) bola uskutočnená desintegrácia sféroidov na jednotlivé bunky (5 min) pridaním 50 µl Accutase (I.T.A. – Intertact s.r.o., San Diego) do každej jamky. Bunková suspenzia bola nariadená pomocou média na 500 µl a centrifugovala sa (1500 rpm, 5 min, 22 °C) na centrifúge Eppendorf® Minispin® C3361 (SIGMA). Meranie sa uskutočnilo na prietokovom

cytometri NovoCyte® (ACEA Biosciences) pri vlnových dĺžkach 488 nm pre excitáciu žiarenia, pri vlnových dĺžkach 525 nm pre emisiu žiarenia (kanál FITC) a 617 nm (kanál PI).

Stanovenie expresie CD44 a vaskulárneho endotelového rastového faktora (VEGFA) (2D vs 3D)

V práci boli použité línie: HT-29, HT-29 SH a HT-29 SH+DOXY kultivované v McCoy's médiu a HT-29+DOXY kultivované v McCoy's médiu, do ktorého bol ešte pridaný doxycyklín (1 µl/1ml). Izolácia RNA bola uskutočnená podľa návodu v RNeasy® Mini Kit (50) (Qiagen) a následne bola použitá automatizovaná izolácia pomocou prístroja QIAcube (Qiagen).

Na syntézu cDNA bolo použité vypočítané množstvo celkovej RNA, doplnené ultra čistou sterilnou vodou ošetrovanou dietyľ pyrokarbonátom (DEPC), a mastermix pripravený z reagensií High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Po centrifugácii boli vzorky vložené do termocykléra (Termocycler Biometra Tone). Reakčná zmes bola pripravená z mastermixu (TaqMan™ Fast Advanced Master Mix, Applied Biosystems) a sondy (TaqMan Gene expression Assay, Applied Biosystems). Meranie sa uskutočnilo pomocou prístroja StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems.

Stanovenie viability buniek

Deriváty kyseliny hyalurónovej HAC18:1 a HAC6 boli rozpustené v RPMI médiu v koncentráciách 500, 200, 100 a 10 µg.ml⁻¹. Stanovenie sa uskutočnilo pomocou kolorimetrickej metódy MTT na líniiach HT-29 a NHDF. Na prípravu solubilizačného roztoku bolo potrebné zmiešať izopropyl alkohol (IPA) a dimetyl sulfoxid (DMSO) v pomere 1:1. K tejto zmesi bola pridaná 37 % HCl a surfaktant Triton X-100. Absorbancia sa merala na multifunkčnom spektroskope EnSight (Perkin Elmer) pri vlnovej dĺžke 570 nm a 690 nm (pozadie). Ďalšie dni sa merala postupne viabilita buniek pomocou MTT pre čas T24, T48, T72.

Test toxicity sféroidov

Na tento test sa používali sféroidy tvorené bunkami bunkovej línie HT-29 v počte 5000 a 50 000 buniek. Rast sféroidov bol fotený fluorescenčným mikroskopom v priechodnom svetle pred a po ovplyvnení testovanými látkami HAC18:1 a HAC6 rozpustenými v McCoy's médiu. Vyhodnocovala sa veľkosť plochy sféroidov v jednotlivých časoch.

Prietoková cytometria – prestup značených nosičov 2D

Použité vzorky HAC6-NB + CUR (0,48 % CUR) a HAC18:1-NB + CUR (0,62 % CUR): 0,25 mg.ml⁻¹; CUR (zásobný roztok v DMSO 5 mg.ml⁻¹): 5 µl.ml⁻¹ a nílka modrá (NB) (zásobný roztok v DMSO 1 mg.ml⁻¹): 0,05 µl.ml⁻¹ boli rozpustené v McCoy's médiu. Vstup bol zaznamenávaný v čase 0 – 30 minút konfokálnym mikroskopom (Leica TCS SP8 X) pri fluorescencii nílскеj modrej (Ex/Em 628/660 nm, kanál APC) a kurkumínu (Ex/Em 488/530 nm, kanál FITC).

Prestup značených nosičov 3D

Koncentrácie nosičov: 1 mg.ml⁻¹ a 5 mg.ml⁻¹, kontroly – iba čisté bezsérové médium, následne prebehla príprava histologických preparátov a sledovanie konfokálnym mikroskopom.

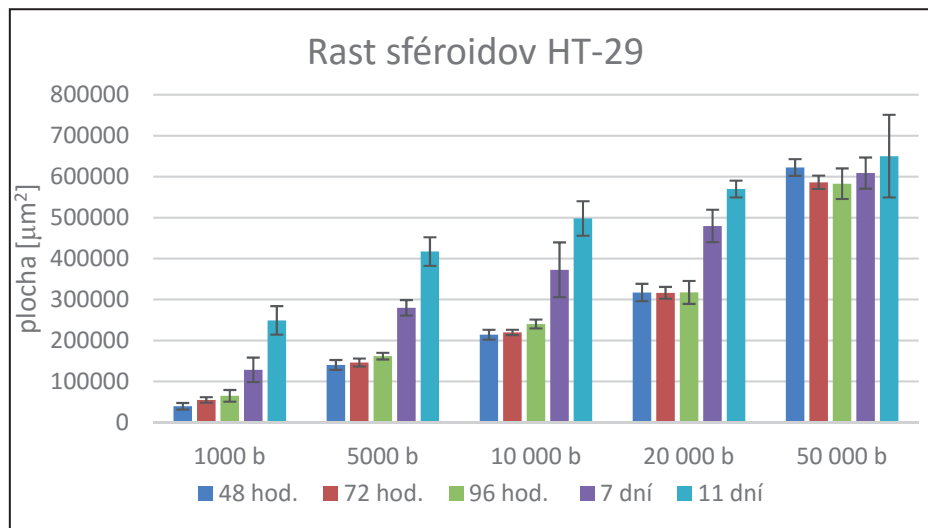
Príprava histologických preparátov

Nefixované sféroidy boli premyté pomocou PBS a zaliatie zalievacím médiom CRYOMOUNT. Formy boli zmrazené (– 20 °C) a preparáty boli narezané na veľkosť rezu 5 nm s následným prichytením na podložné sklička.

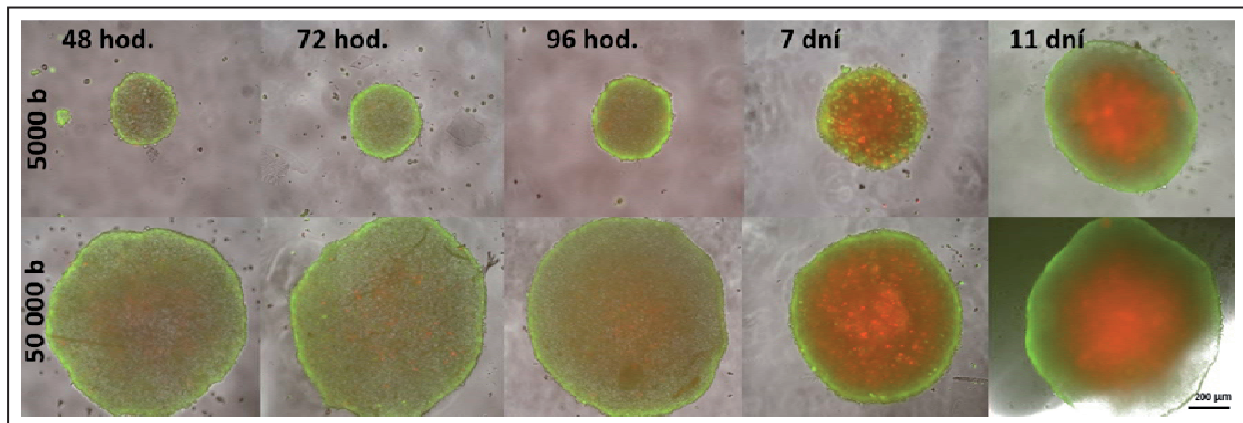
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri sledovaní rastu sféroidov s rôznymi koncentraciami buniek (viď graf 1) bola rýchlosť rastu menších sféroidov vyššia ako u väčších sféroidov, čo uvádza aj Gong (2015) vo svojej štúdii. Môžeme to vysvetliť obmedzenou difúziou živín a kyslíka do ich stredu, aj kvôli silnejším medzibunkovým

Graf 1: Rast sféroidov



Obr. 1: Nekróza jadra sféroidov



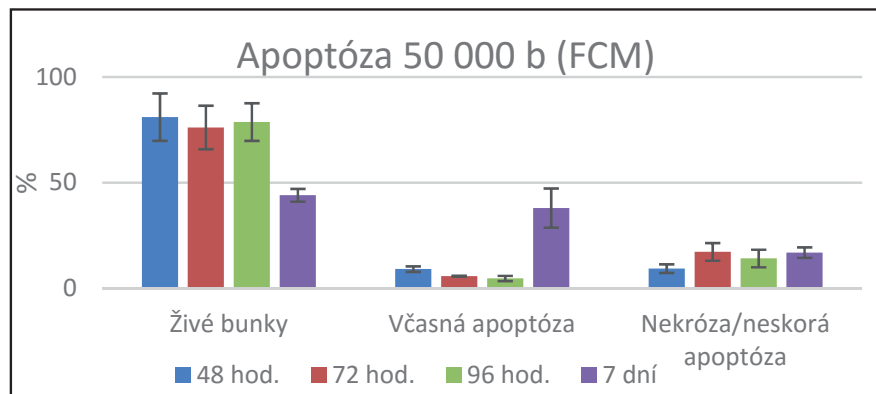
interakciám. Sledovanie sa uskutočňovalo do 11 dňa, pretože väčšia časť už bola nekrotická. Pre ďalšie pokusy sa pracovalo so sféroidmi s hustotou buniek 5000 a 50 000 ako príklad malého a veľkého sféroidu.

Edmondson (2014) vo svojom výskume potvrdzuje, že zatiaľ čo bunky v 2D kultúre sú väčšinou proliferujúce, bunky v 3D kultúrach sú zvyčajne zmesou buniek v rôznych štádiách. Viabilita buniek klesala so zvyšujúcou sa veľkosťou sféroidu (viď obr. 1). Viabilné bunky sa vyznačujú zelenou fluorescenciou (Calcein AM) a nekrotické – červená fluorescencia (PI). Po 7 dní sú živé bunky rozložené vo vonkajších vrstvách a mŕtve bunky v stredných zónach sféroidu. Vysokú mieru živých proliferujúcich

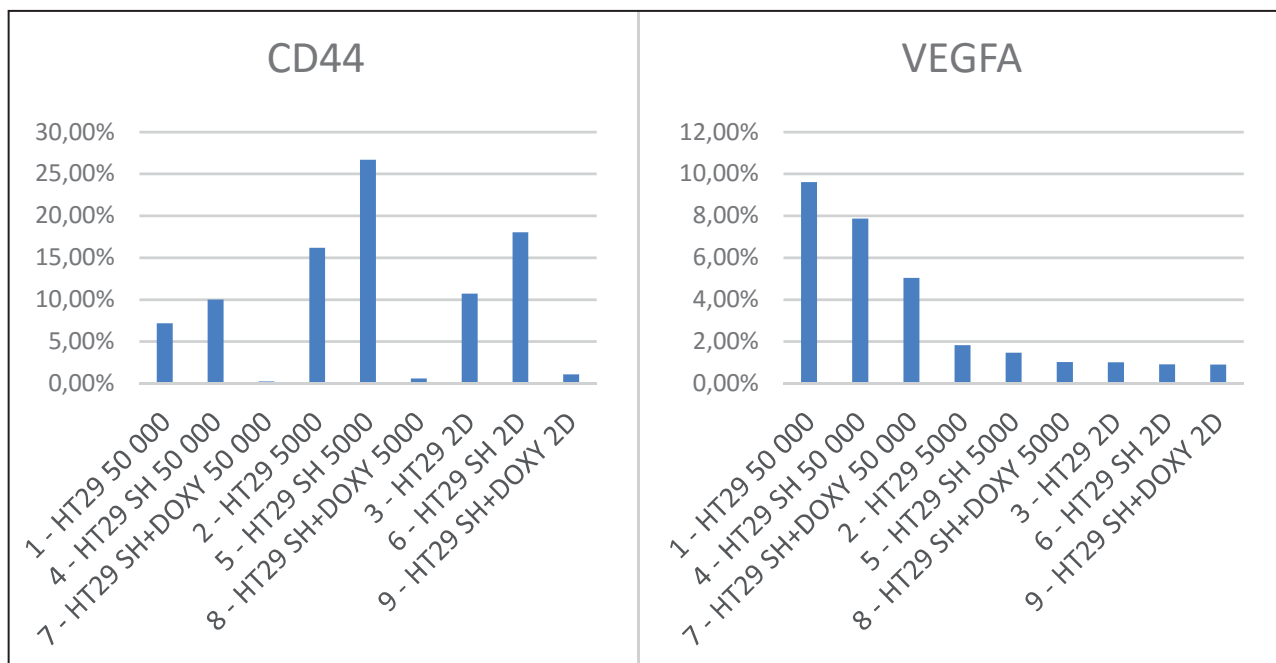
buniek môžeme vysvetliť ich ľahším prístupom ku kyslíku a živinám, oproti tomu ich nedostatok vedie k pokojovému alebo nekrotickému stavu buniek v strednej zóne.

Pomocou prietokovej cytometrie umožnila kombinácia Annexinu V a PI oddeliť od seba 3 populácie buniek: živé, včasne apoptické a neskoro apoptické až nekrotické (viď graf 2). Životaschopnosť buniek teda klesala v priebehu času (48 hod. – 7 dní) a apoptóza sa počas predĺženej kultivácie naopak zvýšila, čo sa zhoduje aj s vizuálnym sledovaním sféroidov v čase. Pre ďalšie experimenty sme preto pracovali so sféroidmi kultivovanými po dobu maximálne 72 hodín.

Graf 2: Apoptóza sféroidov



Graf 3: Expresia CD44 a VEGF-A

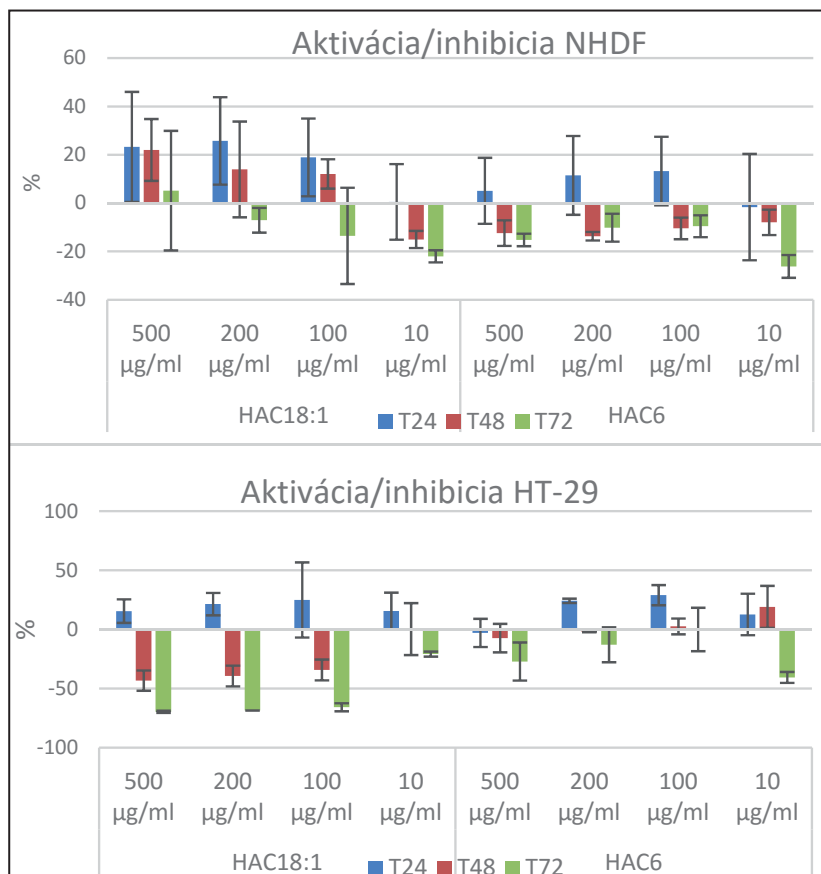


Táto komplexná priestorová a fyzikálna štruktúra sféroidov ovplyvňuje signálnu transdukciu a nakoniec mení bunkovú fenotypovú expresiu a správanie buniek. Vzor génovej expresie vo sféroidoch je porovnateľný s tým, ktorý sa pozoroval v tuhých nádoroch *in vivo* (Gosh a kol., 2005). Preto sa kvantifikovala a porovnávala expresia vybraných génov – CD44 a VEGFA (viď graf 3) v 2D aj 3D kultúre rôznych bunkových línií. Receptor CD44 je nadmerne exprimovaný v mnohých bunkách pevných nádorov a podieľa sa na rakovinových metastázach.

Sféroidy s koncentráciou buniek 5000 vykazovali väčšiu expresiu CD44 v porovnaní s 2D kultúrou. Potvrdilo sa, že sféroidy línie HT-29 SH + DOXY (so zníženou CD44) CD44 neexprimovali. Ďalej v dôsledku hypoxie môže byť indukovaný angiogénny faktor VEGF-A, ktorý je dôležitý pri iniciovaní angiogenézy. Sféricke bunky exprimovali vysoké hladiny VEGF-A v porovnaní s monovrstvou.

Predchádzajúcimi výsledkami sa potvrdilo, že sféroidy majú mnoho vlastností tuhých nádorov a môžu slúžiť ako modelové systémy na štúdium

Graf 4: Aktivácia/ inhibícia NHDF a HT-29

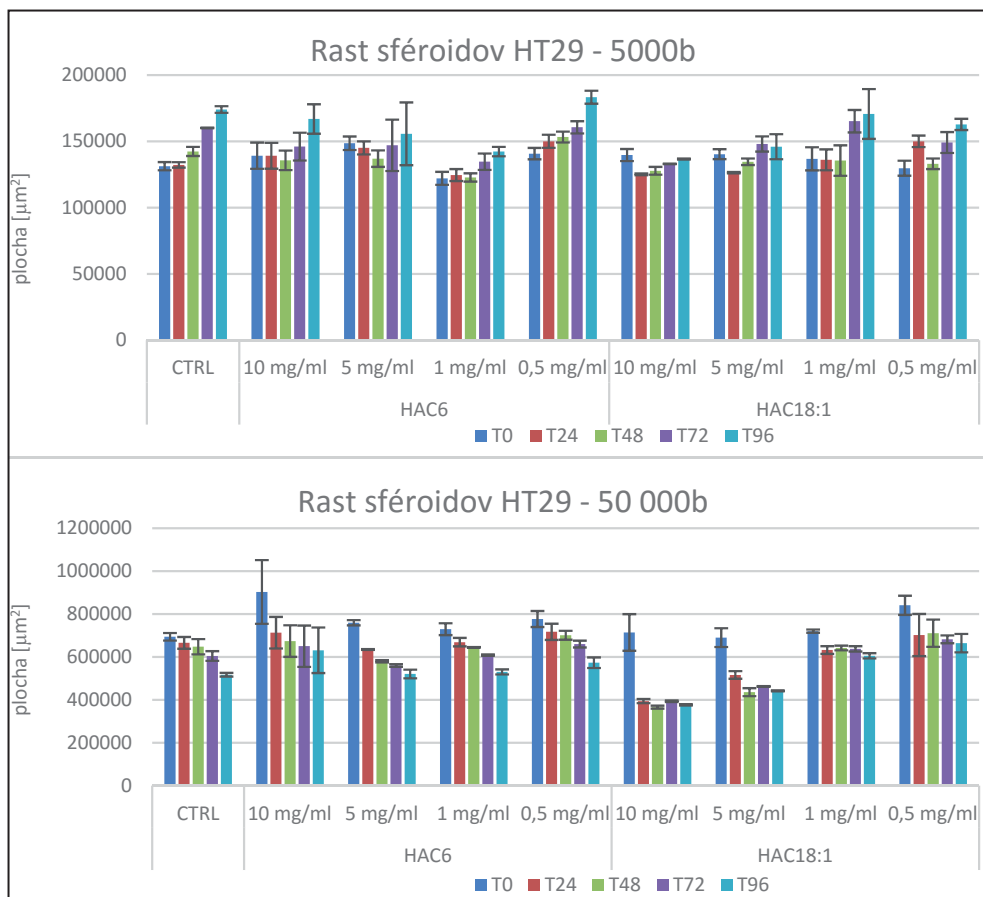


prestupu liečiv a ich nosičov do nádorov. V tejto štúdii boli testované nosičové systémy, ktorými boli polymérne micely pripravené z amfifilnej kyseliny hyaluronovej modifikovanej krátkou (hexánovou – C6) a dlhou (olejovou – C18:1) mastnou kyselinou. Nešporová (2016) vo svojej štúdii uvádza, že HAC6 derivát sám o sebe nemá vplyv na životaschopnosť buniek, pričom pri deriváte HAC18:1 už boli preukázané antiproliferatívne účinky v niekoľkých bunkových líniiach hrubého čreva. To sa čiastočne zhoduje aj s našimi výsledkami (viď graf 4). Výsledky sú uvedené ako percento aktivácie (kladné hodnoty), alebo inhibície (záporné hodnoty) životaschopnosti v porovnaní s neovplyvnenými bunkami (kontrolou – hodnota 0), pričom viac ako – 20 % predstavuje toxický účinok, ktorý bol selektívnejší pri bunkách

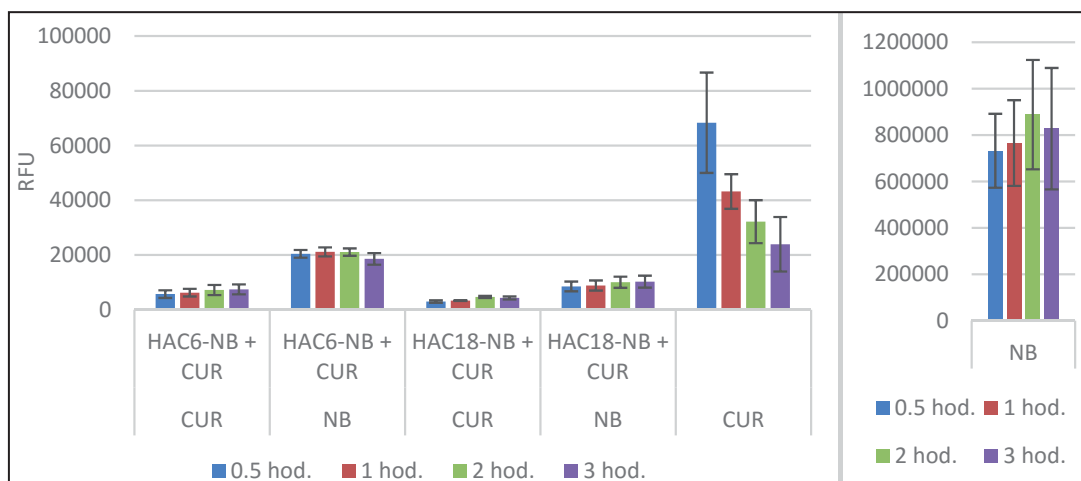
HT-29 hlavne po ovplyvnení derivátom HAC18:1, kde je možné vidieť aj koncentračnú závislosť. Naopak, na bunkách NHDF inhibícia rastu nebola výrazná. Väčšie odchýlky môžu byť vysvetlené tým, že fibroblasty sú bunky primárne, čo vedie k značnej variabilite vo výsledkoch.

3D sféroidná kultúra bola menej citlivá oproti 2D kultúre, pretože bolo potrebné použiť 10x vyššiu koncentráciu derivátov HA pre sledovanie toxického efektu (viď graf 5). Rast sféroidov s počtom buniek 5000 bol inhibovaný hneď na začiatku u derivátu HAC18:1 oproti kontrole, ktorá svoju plochu úmerne zväčšovala, avšak neskôr nemali použité deriváty HA na rast sféroidov až taký vplyv. Naopak, u sféroidov s počtom buniek 50 000 bola táto zmena výraznejšia a vidíme, že hlavne derivát HAC18:1 spôsobil inhibíciu

Graf 5: Toxicita sféroidov



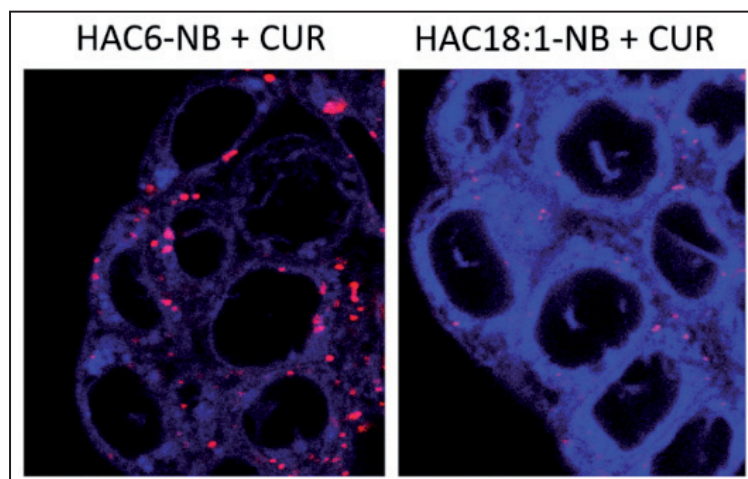
Graf 6: Prestup značených nosičov 2D (FCM)



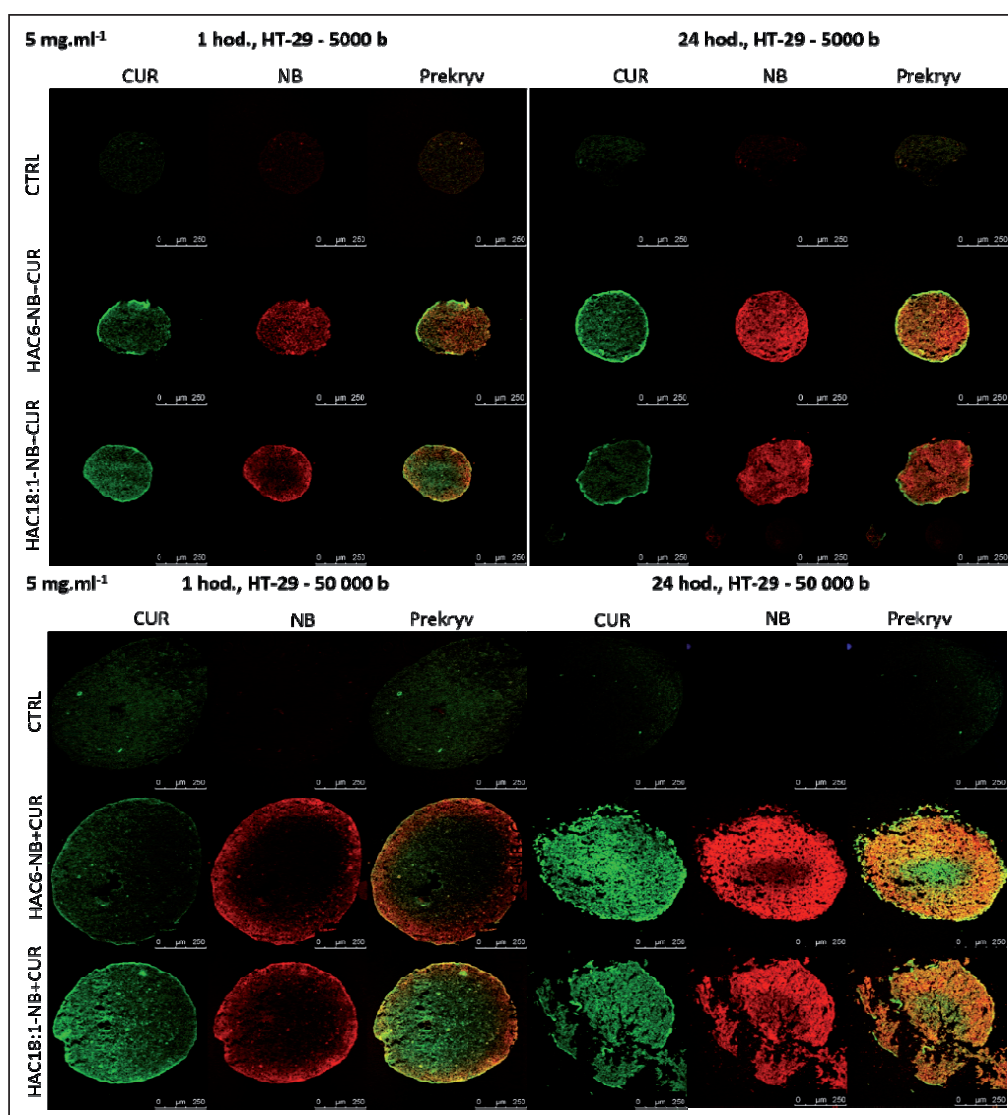
rastu a zmenšenie plochy sféroidov, pričom plocha klesala aj u kontroly. To mohlo byť spôsobené tým, že počas doby sledovania nebolo menené kultivačné medium.

Vo výskume rakoviny získal kurkumín pozornosť vďaka cytotoxicite voči rôznym rakovinovým bunkovým líniam, ale jeho nerozpustnosť vo vode a nestabilita spôsobujú nízku biologickú dostupnosť.

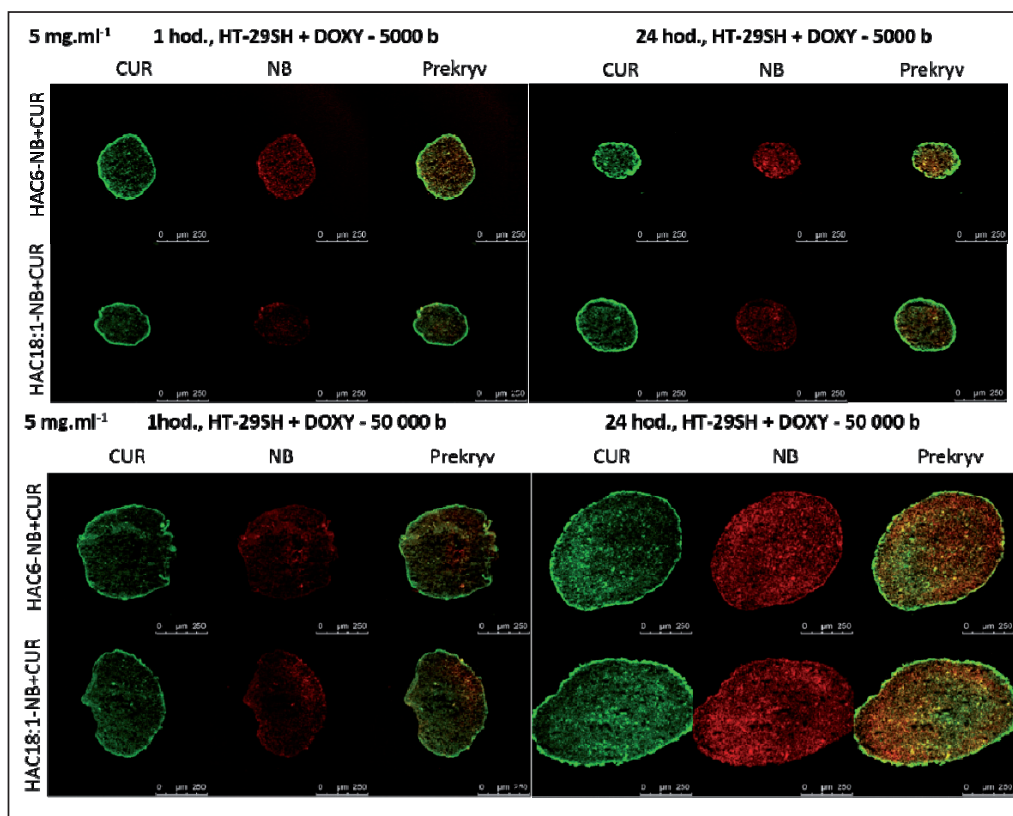
Obr. 2: Prestup značených nosičů 2D



Obr. 3: Prestup značených nosičů do sféroidů – HT-29



Obr. 4: Prestup značených nosičov do sféroidov - HT-29 SH + DOXY



Stratégiou na zlepšenie jeho aplikácie môže byť práve zapuzdrenie kurkumínu v polymérnych micelách, ktoré boli v našom prípade zaťažené CUR. Spoločne s NB a sondou značiacou kyselinu hyaluronovú boli využité tiež ako fluorescenčné sondy na monitorovanie prestupu v 2D (vid' graf 6 a obr. 2) a 3D kultúre (vid' obr. 3 a 4). Bunky, ktoré boli ovplyvnené CUR a NB bez nosičov do buniek síce difundovali, ale následne boli z nich exportované, na rozdiel od nosičov, u ktorých bola akumulácia CUR a NB počas doby sledovania pomerne konštantná. Prestup sa vyznačoval rýchlou akumuláciou (0,5 – 3 hod.) (vid' graf 6). Pomocou konfokálnej laserovej skenovacej mikroskopie bol nafotený prestup nosičov v čase 0 – 30 min. Akumulácia značených micel v cytosole buniek bola zobrazená modrou (CUR) a červenou (NB) fluorescenciou, ktorá sa v čase stupňovala. Koreluje to aj s výsledkami z prietokovej

cytometrie, kedy sa taktiež nosiče rýchlo akumulovali v bunkách do 30 min a v ďalších časoch už množstvo zostávalo konštantné.

Prestup značených nosičov do sféroidov bol koncentračne závislý. Najprv sa pracovalo s koncentráciou testovaných nosičov 1 mg.ml⁻¹, no táto koncentrácia nebola postačujúca pre vizualizáciu. Preto sme použili vyššiu koncentráciu – 5 mg.ml⁻¹ a pozorovali absorpciu micel po 1 a 24 hod (vid' obr. 3). Absorpcia micel bola znázornená výraznou fluorescenciou (zelená – CUR, červená – NB) oproti kontrole. Pri väčších sféroidoch bol transport CUR a NB výraznejší po 1 hod s nosičom HAC18:1 hlavne na periférii, pričom po 24 hod nosiče prestupovali do celého sféroidu, ale pri väčších sféroidoch je fluorescencia pre NB v stredných zónach menej výrazná. Pri menších sféroidoch bola intenzita fluorescencie taktiež výraznejšia po 24 hod. Medzi

nosičmi HAC6 a HAC18:1 nebol pozorovaný rozdiel. Zatiaľ čo absorpcia v 2D kultúre bola relatívne rýchlym procesom (viď graf 5), difúzia v celom 3D sféroide bola pomalšia. Rozdiely medzi transportnou účinnosťou HAC6-NB + CUR a HAC18:1-NB + CUR možno vysvetliť odlišnou veľkosťou a polydisperzitou micel (Nešporová a kol., 2016).

De Kruijff (2018) vo svojej štúdii zistil, že asi po 4 dňoch polymérne nanonosiče difundovali takmer v celom sféroide a po 7 dňoch bola distribúcia úplne homogénna, pričom mechanizmus, ktorým polyméry difundovali sféroidom, bol pravdepodobne transcelulárny transport. V našej štúdii bol pozorovaný prestup aj do hlbších vrstiev už po 24 hod, čo môže byť spôsobené menšou veľkosťou micel. Rovnomernejšie rozloženie pozorované v našich sférodoch naznačuje, že micely sú schopné prechádzať aj hypoxickými oblasťami.

Wickens (2017) vo svojej štúdii uvádza, že micely využívajú hlavne interakciu HA s receptormi CD44 na vstup do cytosolu prostredníctvom endocytózy sprostredkovanej receptorom. To je však v rozpore s našim zistením, pretože pri sférodoch bunkovej línie HT-29 SH + DOXY (so zníženou CD44 – bolo predtým overené, viď graf 3) značené nosiče penetrovali do stredu taktiež (viď obr. 4) a môžeme skonštatovať, že prestup testovaných nosičov do sféroidov nebol závislý na receptoch CD44.

ZÁVER

Touto štúdiou bolo potvrdené, že bunky v 3D kultivačnom prostredí sa líšia morfológicky a fyziologicky od buniek v prostredí 2D kultúry. Zistili sme, že sféroidy majú mnoho vlastností tuhých nádorov *in vivo* a môžu poskytnúť typické bunkové mikroprostredie. Je pre nich charakteristická vonkajšia vrstva proliferujúcich živých buniek a stredná zóna pokojových a nekrotických buniek, ktoré môžu obmedzovať účinnú difúziu látok. Taktiež bolo zistené, že v porovnaní s 2D kultúrou komplexná štruktúra sféroidov mení expresiu génov. Uvedené rozdiely by mohli viesť k zohľadneniu pri

vývoji nových terapeutík v predklinických štúdiách liečby rakoviny. Zároveň sa nám týmito zisteniami podarilo potvrdiť, že sféroidy môžu slúžiť ako modelové systémy na štúdium prestupu liečiv a ich nosičov do nádorov. V našej štúdii sme sa zamerali na polymérne micely na báze HA, pričom môžeme povedať, že v porovnaní s HAC6 nosičom je výhodnejší nosič HAC18:1, pretože má vyššiu toxicitu na nádorové bunky oproti zdravým a môže tak zvyšovať protinádorový účinok použitého liečiva. Taktiež bola 3D sféroidná kultúra odolnejšia voči derivátom oproti 2D kultúre, čo je podobné s nádormi *in vivo*, ktoré vykazujú častú rezistenciu na liečivá. Ďalšou výhodou je, že použité nosiče penetrujú aj do hypoxických oblastí sféroidu za pomerne krátky čas oproti údajom v literatúre, predlžujú dobu zotrvania liečiva v bunkách a vyznačujú sa nezávislým prestupom cez CD44 receptor. Prijem a distribúcia testovaných polymérnych nosičov vo sféroide môže tak predurčovať ich správanie v prítomnosti nádorov *in vivo*. V budúcnosti by ako ďalšou možnosťou výskumu mohlo byť zistenie mechanizmu vstupu do buniek, ktorý lepšie odhalí i mechanizmus prestupu do sféroidov.

POĎAKOVANIE

Podakovanie patrí firme Contipro, a.s. za umožnenie vykonania experimentálnej časti výskumu na ich pracovisku a Ing. Jane Šógorkovej za odborné poradenstvo.

ZOZNAM LITERATÚRY

Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., Correia, I. J.: 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology advances*, 2016, 34, 8, 1427 – 1441.

De Kruijff, R. M., Van der Meer, A. J. G. M., Windmeijer, C. A. A., Kouwenberg, J. J. M., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., Sminia, P., Denkova, A. G.: The therapeutic potential of

polymersomes loaded with ^{225}Ac evaluated in 2D and 3D in vitro glioma models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2018, 127, 85 – 91.

Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., Yang, L.: Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*, 2014, 12, 4, 207 – 218.

Ghosh, S., Spagnoli, G. C., Martin, I., Ploegert, S., Demougin, P., Heberer, M., Reschner, A.: Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: A high density oligonucleotide array study. *Journal of cellular physiology*, 2005, 204, 2, 522 – 531.

Gong, X., Lin, C., Cheng, J., Su, J., Zhao, H., Liu, T., Wen, X., Zhao, P.: Generation of multicellular tumor spheroids with microwell-based agarose scaffolds for drug testing. *PLoS One*, 2015, 10, 6.

Huang, G. a Huang, H.: Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug delivery*, 2018, 25, 1, 766 – 772.

Nešporová, K., Šógorková, J., Šmejkalová, D., Kulháněk, J., Huerta-Angeles, G., Kubala, L., Velebný, V.: Influence of serum albumin on intracellular delivery of drug-loaded hyaluronan polymeric micelles. *International journal of pharmaceutics*, 2016, 511, 638 – 647.

Ulbrich, K., Hola, K., Subr, V., Bakandritsos, A., Tucek, J., Zboril, R.: Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies. *Chemical reviews*, 2016, 116, 9, 5338 – 5431.

Wickens, J. M., Alsaab Kesharwani, P., Bhise, K., Amin, M. C. I. M., Tekade, R. K., Gupta, U., Iyer, A. K.: Recent advances in hyaluronic acid-decorated nanocarriers for targeted cancer therapy. *Drug discovery today*, 2017, 22, 4, 665 – 680.

Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, Ch., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., Tesei, A.: 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific reports*, 2016, 6.



ANTIOXIDAČNÉ ÚČINKY OSTROPESTRECA MARIÁNSKEHO (*SILYBUM MARIANUM*)

ANTIOXIDANT EFFECTS OF *SILYBUM MARIANUM*

Faixová, D., Mudroňová, D.

Ústav imunológie
Katedra mikrobiológie a imunológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

dominika.faixova@student.uvlf.sk

ABSTRAKT

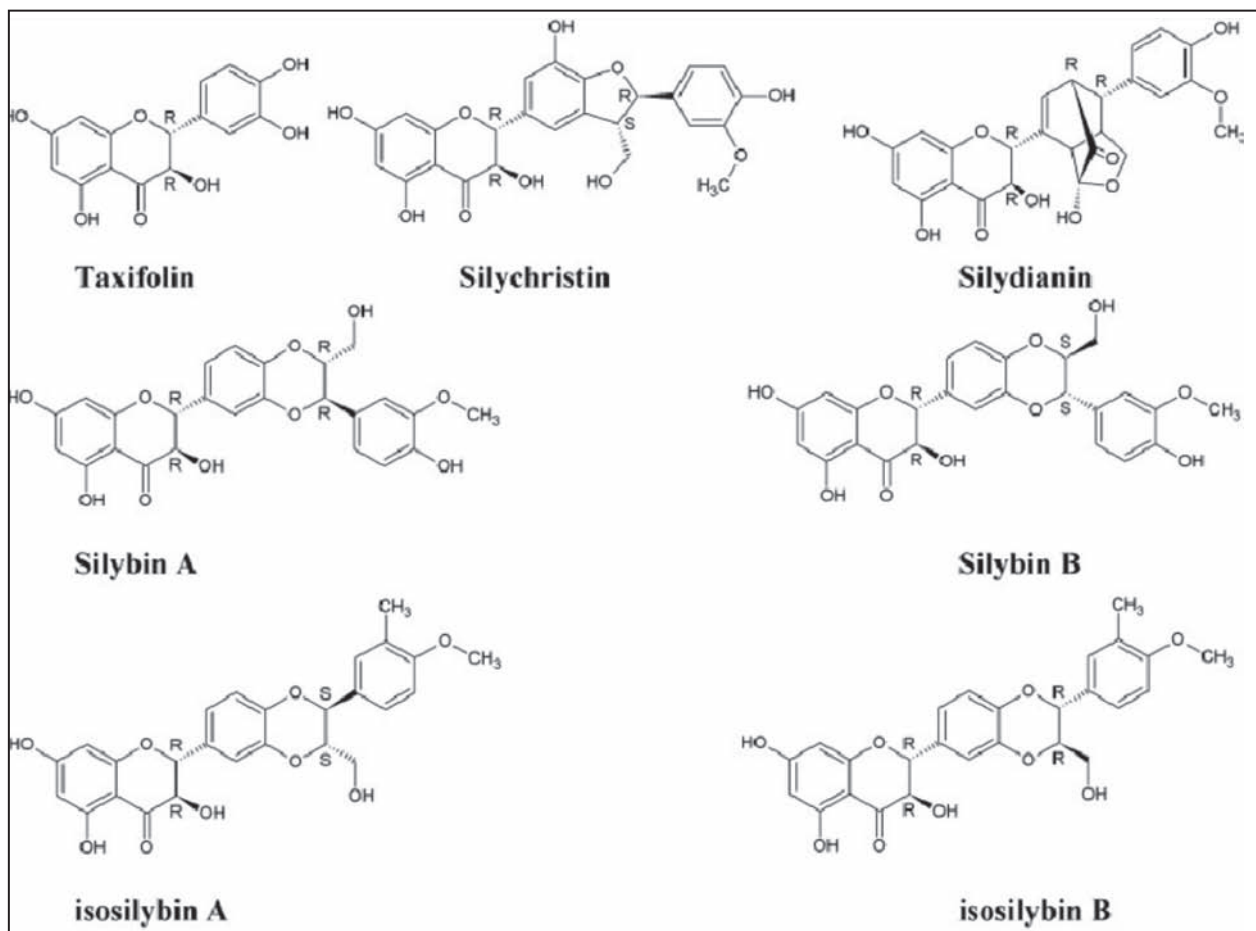
Silybum marianum (Asteraceae) je jednoročná alebo dvojročná bylina, ktorá dorastá do výšky 30 – 200 cm. Rastlina pochádza z hôr Stredomoria a jej plody s obsahom silymarínového komplexu sa využívajú vo fytoterapii už niekoľko stoviek rokov. Okrem hepatoprotektívnych a antioxidačných vlastností boli dokázané aj jeho imunomodulačné a protinádorové účinky. Moderné vedecké tímy skúmajú jeho účinok pri terapii napr. parazitárnych ochorení, diabetu, Alzheimerovej choroby, Parkinsonovej choroby či dermatologických ťažkostí. Cieľom tohto prehľadového článku je opísať antioxidačné vlastnosti silymarínu v prípade intoxikácie rôznymi látkami chemického pôvodu.

Kľúčové slová: antioxidačné účinky; *Silybum marianum*; silymarín

ABSTRACT

Silybum marianum (Asteraceae) is an annual or biennial plant that grows to a height of 30 – 200 cm. The plant comes from the mountains of the Mediterranean. Milk thistle has been used for hundreds of years by herbalists and contains a silymarin complex – a mixture of flavonolignans. Besides hepatoprotective and antioxidant effects of silymarin, immunomodulatory and anticancer properties were also demonstrated. Modern scientific teams study the effects of silymarin in therapy of e. g. parasitic diseases, diabetes, Alzheimer's disease, Parkinson's disease or dermatological disorders. This article summarizes

Obr. 1: Štruktúrne vzorce hlavných obsahových látok silymarínového komplexu, hlavnej účinnej zložky rastliny *Silybum marianum* (L.).



zdroj: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-the-major-constituents-of-silymarin_fig1_276033344

antioxidant properties of silymarin in case of intoxication by different chemical drugs.

Key words: antioxidant effects; *Silybum marianum*; silymarin

ÚVOD

Plody ostropestreca mariánskeho (*Silybum marianum*, L.) sa používajú už vyše 2000 rokov na liečbu chorôb pečene, žlčníka a na prevenciu pri otravách chemickými a prírodnými toxínmi (uštipnutia hadmi, poštipania hmyzom, otravy hubami, prípadne alkoholom). *Theoprastus* (4. storočie pred Kristom) bol pravdepodobne prvý, ktorý opísal túto rastlinu pod názvom „Pternix“ a

neskôr ju spomenuli aj *Dioskurides* s *Pliniom* v práci „Materia Medica“ (1. storočie po Kristovi). Už od stredoveku sa poznatky o tejto rastline objavovali v mnohých významných medicínskych herbáriách, ktoré napísali napr. *Hildegarda von Bingen* (1098 – 1179), *Hyeronymus Bock* (1593), *Jacobus Theodorus* (1664), *Mattioli* (1626), *Valentini* (1719) a *Von Haller* (1755) (Morazzoni a Bombardelli, 1995).

Zloženie a vlastnosti *Silybum marianum*

Hlavná zložka *Silybum marianum* je silymarín – štandardizovaný extrakt získaný zo semien, ktorý obsahuje približne 70 – 80 % silymarínových flavonolignánov a približne 20 – 30 % chemicky nedefinovaných frakcií, najmä polyfenolových zložiek. Hlavná zložka silymarínového komplexu

je silybín (niektorí autori uvádzajú názov silybinín). Okrem silybínu, ktorý je zmesou dvoch diastereoizomérov A a B (cca v pomere 1:1), je silymarínový komplex tvorený značným množstvom iných flavanolignánov – izosilybín, dehydrosilybín, silychristín, silydianín a flavonoidmi, hlavne taxifolínom (viď obr. 1). Bielokvitnúca odroda *S. marianum* obsahuje navyše 3-deoxyflavanolignány silandrín, silymonín, silyhermín a neosilyhermín A a B (Gažák a kol., 2007).

Nakoľko silymarín je len obmedzene rozpustný vo vode, ihneď po podaní sa absorbuje zo žalúdka (Kour a Agarwal, 2007). Celková biologická dostupnosť silymarínu môže byť zvýšená vytvorením komplexu s fosfatidylcholínom (Barzaghi a kol., 1990) alebo β -cyklodextrínom (Arcari a kol., 1992), prípadne použitím kapsúl ako obalového materiálu. Vo vode málo rozpustné flavonoidné molekuly sa môžu prekonvertovať na molekulové komplexy rozpustné v lipidoch – fytozómy (Kidd a Head, 2003).

Proces separácie silymarínového komplexu zo semien spočíva v ich lisovaní za vzniku suchých extraktov s obsahom účinnej látky a oleja ako odpadového materiálu s minimálnym množstvom účinnej látky. Nakoľko sa silymarín ťažko rozpúšťa vo vode, vodné výluhy zo semien tejto rastliny obsahujú menšie množstvo účinnej látky.

V Slovenskej republike je v súčasnosti (máj 2019) kategorizovaný jeden liek s liečivom silymarín. Liek je viazaný na lekársky predpis a je preskripčne obmedzený (môže ho predpísať iba psychiater, onkológ, nefrológ, interný lekár, infektológ, hepatológ, gastroenterológ, geriatra, diabetológ a klinický farmakológ). Jedna obalená tableta obsahuje 240,0 mg suchého extraktu z plodu *ostropestreca mariánskeho* a odporúčané dávkovanie sa uvádza 1 až 2 tablety denne. Liečivo sa zaraďuje do farmakoterapeutickej skupiny liečiv na žlčové cesty a pečeň, hepatoprotektív, lipotropných liečiv s ATC kódom (Anatomicko-Terapeuticko-Chemický systém): A05BA03 (ŠÚKL – Štátny ústav pre kontrolu liečiv).

Antioxidačné účinky silymarínu

Silymarín sa zúčastňuje antioxidačnej ochrany rôznymi spôsobmi; priamo degradáciou voľných radikálov, inhibíciou špecifických enzýmov zodpovedných za tvorbu voľných radikálov, zúčastňujúc sa na zachovaní optimálnej redoxnej hladiny v bunke aktiváciou širokého spektra antioxidačných enzýmov a neenzýmových antioxidantov, hlavne pomocou transkripčných faktorov (Nrf2 – erythroid 2-related factor 2, NF- κ B – nukleárny faktor kappa B) a nakoniec aktiváciou vitagénov zodpovedných za syntézu protektívnych molekúl, zahŕňajúc HSP (napr. HO-1 – heme oxygenase), tioredoxín (Trx), sirtuín, atď. (Surai a Dvorska, 2005).

Antioxidačné vlastnosti silymarínu a silybínu, spočívajúce v degradácii voľných radikálov, dokážu obnoviť endogénne antioxidačné enzýmy (napr. superoxid dismutázu – SOD, katalázu – CAT, glutatión peroxidázu – GSH-Px) a neenzymatické antioxidanty (vitamín E, C) v pečeni, znížiť lipidovú a proteínovú oxidáciu, fragmentáciu DNA a apoptózu, redukovať sekréciu ALT (alanínaminotransferáza), AST (aspartátaminotransferáza), ALP (alkalická fosfatáza) z pečene do plazmy počas poškodení pečene zapríčinenými ROS (reaktívne formy kyslíka), sú schopné obnoviť Nrf2 a HO-1 aktivitu, znížiť koncentráciu prozápalových cytokínov, vrátane TNF (faktor nekrotizujúci tumor). Je pravdepodobné, že použitie silymarínu/silybínu je účinnejšie pred alebo tesne po intoxikácii ako v prípade chronických ochorení pečene (Mateen a kol., 2013).

V pečeni dochádza k biotransformácii toxínov pochádzajúcich z jedla, prípadne z chemických látok. Toxíny, ktoré sú absorbované z intestinálneho traktu, prechádzajú najprv pečeňou, kde dochádza k ich premene (Ingawale a kol., 2014). Mnohé toxíny boli použité v testovaniach na dôkaz antioxidačných ochranných vlastností silymarínu. Tieto skúšky sú veľmi dôležité, pretože silymarín sa v klinickej praxi používa primárne na ochranu, podporu a regeneráciu pečene (Soria a kol., 2010; Muthumani a Prabu, 2012).

Arzén

Arzénom vyvolaná intoxikácia sa spája so zvýšením produkcie ROS so zvýšením lipidovej peroxidácie, karbonylácie proteínov, s oxidáciou DNA a s prerušením bunkového cyklu, čo vedie k apoptóze bunky (Rashid a kol., 2013). Arzén znižuje účinok antioxidantných enzýmov (SOD, CAT, GSH-Px, glukóza-6-fosfátdehydrogenáza) a neenzymatických antioxidantov (GSH, vitamín C, E) v pečeni a srdci potkanov a znižuje účinok Nrf2 a HO-1 v srdci (Muthumani a Prabu, 2014). Podobne boli opísané arzénom indukované zmeny v obličkách potkanov, zníženie účinku antioxidantných enzýmov (SOD, CAT, GSH-Px, atď.), GSH, kyseliny askorbovej a vitamínu E a zvýšenie TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), peroxidácie lipidov, karbonylácie proteínov a zvýšená expresia NAD(P)H oxidázy (nikotínamid adenín dinukleotid fosfát oxidáza), iNOS (indukovaná syntáza oxidu dusnatého) a NF- κ B. Silybín v dávke (50 – 75 mg/kg ž. hm.) významne prispieva k udržaniu antioxidantného účinku antioxidantných enzýmov a neenzymatických antioxidantov u potkanov intoxikovaných arzénom. Všetky tieto zmeny boli sprevádzané znížením poškodenia DNA počas histopatologických pozorovaní v pečeni (Soria a kol., 2010; Muthumani a Prabu, 2012).

Tetrachlórmetán

Tetrachlórmetán (CCl₄) patrí medzi hepatotoxíny a niekoľkými spôsobmi oxidačne pôsobí na hepatocyty. Metabolizmus CCl₄ prebieha pomocou enzýmu CYP2E1 na vysoko reaktívne ROS (Manibusan a kol., 2007). CCl₄ vo vzorkách pečene potkanov inhibuje antioxidantné enzýmy (SOD, GSH-Px a CAT) a GSH a znižuje sekréciu ALT, AST a ALP. Prakticky všetky zvyšujúce sa indexy oxidačného stresu spôsobené CCl₄ boli obnovené na pôvodnú fyziologickú hladinu po liečbe silymarínom v dávke 25 – 100 mg/kg ž. hm. (Abbas a kol., 2014; Krishnapa a kol., 2014).

Mykotoxíny

Niektoré mykotoxíny (napr. aflatoxín – AF,

ochratoxín A – OTA, T-2 toxín a fumonizíny – FM) spôsobujú oxidačný stres a apoptózu buniek. Okrem toho mykotoxíny podporujú syntézu ROS, ktoré zapríčiňujú lipidovú a proteínovú oxidáciu a vedú k zmenám integrity bunkovej membrány (Surai a Dvorska, 2005). Essid a kolektív (2012) opísali silybín ako účinnú ochrannú zložku proti apoptóze a cytotoxicite spôsobenej ochratoxínom. Silybín v dávke 130 – 260 μ M chráni pred aktiváciou kaspázy-3, fragmentáciou apoptickej DNA a lipidovou peroxidáciou, ktoré boli vyvolané ochratoxínom, H₂O₂ a ActD/TNF- α . Okrem toho, silybín (0,04 – 26,0 μ M) vykazoval protektívny účinok proti ochratoxínom alebo LPS spôsobeným úbytkom TNF- α (Al-Anati a kol., 2009). Potkany, ktorým bola podávaná dávka 100 mg/kg ž. hm. silymarínu vykazovali signifikantnú ochranu proti aflatoxínu B1, ktorý spôsobuje deštrukciu pečene. V tomto výskume bol zaznamenaný pokles patologicky zvýšených hladín AST, ALT a zníženie hladiny GSH (Shyamal a kol., 2010).

Tioacetamid

Tioacetamid (TAA) je silná hepatotoxická látka, ktorá sa používa najmä v chemických kvantitatívnych analýzach. Cirhózy pečene, ktoré sú vyvolané intoxikáciou TAA, sú mnohokrát výsledkom oxidačného stresu a vysokého stupňa lipidovej peroxidácie (Fazal a kol., 2015). Silymarín sa ukazuje ako účinná látka, ktorá je schopná ochrany pred oxidačným stresom u potkanov (Kadir a kol., 2014). Vedci podávali potkanom TAA (0,03 % w/v) po dobu dvanástich týždňov za účelom vyvinutia fibrózy pečene. Následne bola potkanom podaná liečba silymarínom (50 mg/kg ž. hm.) a zistilo sa signifikantné zvýšenie antioxidantných enzýmov (SOD, CAT and GSH-Px) (Singh a kol., 2012).

Cisplatina

Cisplatina (CDDP) je chemoterapeutikum, ktoré sa používa na liečbu rôznych druhov rakoviny a jeho nefrotoxicita je spôsobená najmä produkciou ROS a oxidačného stresu (Dos Santos a kol., 2012).

El-Awady a kolektív (2011) opísali, že cisplatina spôsobuje v potkanej pečeni zníženie účinku antioxidačných enzýmov (SOD a GSH-Px) a GSH, zvýšenie malondialdehydu (MDA) a signifikantné zvýšenie aktivity laktátdehydrogenázy (LDH) a kreatínkinázy (CK). Silymarín v dávke 100 mg/kg ž. hm. chránil pred oxidačnými zmenami spôsobenými podaním cisplatiny. V *in vitro* testovaní bola podávaná dávka 25 – 200 μ M silymarínu a následne podaná cisplatina. Zistilo sa, že rastlinný výťažok je schopný ochrany pred zánikom bunky, ktorý je spôsobený cisplatinou (Ninsontia a kol., 2011).

Mangán

Je známe, že toxicita spôsobená mangánom má spojitosť so zvýšeným oxidačným stresom, apoptózou a zápalom (Karki a kol., 2013). Zvieratá, ktorým bol podaný chlorid mangánu, vykazovali zvýšené hladiny TBARS spojené so zníženými hladinami antioxidačných enzýmov (SOD, CAT, GSH-Px) a neenzymatických antioxidantov (GSH, vitamín C), mali zvýšenú lipidovú a proteínovú oxidáciu a fragmentáciu DNA (Chtourou a kol., 2010). Potkany, ktoré boli vystavené chloridu mangánu a následne im bol podaný silymarín v dávke 100 mg/kg ž. hm. vykazovali obnovenú antioxidačnú ochranu a došlo k obnove poškodení pečene, obličiek a mozgu (Chtourou a kol., 2013).

Benzo[a]pyrén

Protektívny účinok silymarínu/silybínu v dávke 400 – 500 μ M bol dokázaný aj pri pokusoch s benzo[a]pyrénom (Vijayaraman a kol., 2012). Bola zistená znížená deštrukcia DNA a znížená apoptóza, prevencia pred oxidáciou tiolových proteínov a antioxidačných enzýmov (SOD, GSH-Px, CAT), obnova redoxného stavu v bunke, úprava enzýmov metabolizujúcich glutatión (Kiruthiga a kol., 2010). Silymarín podávaný potkanom v dávke 50 – 250 mg/kg ž. hm. vykazoval protektívny účinok proti zmenám vyvolaným benzo[a]pyrénom; inhibíciu fázy I detoxifikačného enzýmu CYP1A1 a úpravu fázy II konjugáčnych enzýmov (glutatión-S-

transferázy, epoxidhydroxylázy, uridíndifosfát-glukuronyltransferázy a NAD(P)H) (Kiruthiga a kol., 2013).

Doxorubicín

Doxorubicín (DOX, alebo tiež nazývaný adriamycín) je účinné chemoterapeutikum, avšak medzi jeho vedľajšie účinky patrí kardiotoxicita, ktorá je spôsobená oxidačným stresom, dysfunkciou mitochondrií a apoptózou (Dirks-Naylor, 2013). Bolo zistené, že silymarín (50 mg/kg ž. hm.) dokázal ochrániť pred biochemickými a histopatologickými zmenami vyvolanými doxorubicínom u potkanov. Ochranný účinok silymarínu spočíva v redukcii karbonylového stresu vyvolaného doxorubicínom a v znížení poškodenia DNA (Malekinejad a kol., 2012). Silymarín v dávke 16 mg/kg ž. hm. signifikantne znižuje oxidačný stres vyvolaný doxorubicínom u potkanov a takisto znižuje MDA a DNA fragmentáciu v pečeni (Patel a kol., 2010). U potkanov, ktorým bola vyvolaná toxicita doxorubicínom, vykazoval silymarín protektívny účinok na pečenné a srdcové tkanivo v dávke 60 mg/kg ž. hm. Tento efekt je spájaný s prevenciou pred zvýšenými hladinami AST a CK v sére (Raškovič a kol., 2011).

Etanol

Oxidačný stres hrá dôležitú úlohu v patogenéze alkoholom poškodenej pečene. Počas metabolizmu alkoholu sa aj vďaka oxidačnému stresu tvoria ROS a RNS (reaktívne dusíkaté medziprodukty) (Galicía-Moreno a Gultiérrez-Reyes, 2014). Suplementácia štandardizovaným silymarínom (200 mg/kg ž. hm.) znižuje oxidačný stres vyvolaný alkoholom, zlepšuje prevenciu pred zvýšením aktivity ALT v sére, znížením hepatálneho GSH, hepatálneho TNF a pred lipidovou peroxidáciou (Song a kol., 2006). Silymarín (100 – 200 mg/kg ž. hm.) účinne chráni pečeň pred oxidačným stresom vyvolaným alkoholom, vrátane znižujúcich sa hladín ALT a AST v sére, zvyšujúcich SOD a GSH-Px, a znižujúcich hladín MDA v pečeni (Zhang a kol., 2013). Okrem toho, silybín (250 mg/kg ž. hm.) normalizuje alkoholom ovplyvnené

antioxidačné parametre v myšacej krvi, vrátane antioxidačných enzýmov (SOD, CAT, GSH-Px), GSH a TBARS (Das a Mukherjee, 2012).

Ostatné toxíny

Antioxidačný účinok silymarínu/silybínu sa prejavuje u myší infikovaných bleomycínom, akroleínom a fluoridom sodným. Silymarín znižuje oxidačný stres v pečeni potkanov po intoxikácii dietylnitrozamínom (Pradeep a kol., 2007). *In vitro* štúdie vykonané na zvieratách ukázali, že silymarín/silybín blokuje toxické účinky arzénu, CCl₄, mnohých mykotoxínov, tioacetamidu, cisplatiny, doxorubicínu, etanolu a niektorých iných toxínov znížením abnormálne vysokej tvorby ROS v živých bunkách a zmenou génovej expresie.

ZÁVER

Nové smery v štúdiu vlastností silymarínového komplexu

Silybín/silymarín je v centre pozornosti najmä vďaka jeho benefitom, ktoré nepriamo súvisia s jeho hepatoprotektívnym a/alebo antioxidačným účinkom. Rozšírením možností aplikácie sa rozšírili aj miesta účinku, napr. liečba porúch funkcie pankreasu, liečba pľúcnych a obličkových ochorení, liečba rôznych ťažkostí spojených s prostatou vrátane adenokarcinómu a nakoniec aj jeho využitie v kozmetickom priemysle. Vedecké štúdie sa v súčasnosti zaoberajú novými účinkami silybínu a jeho derivátov na bunkovej a molekulárnej úrovni, napr. estrogénne účinky, modulácia liekových transportérov (P-glykoproteín) a špecifický účinok na DNA-expresiu cez supresiu nukleárneho faktora NF-κB (Gažák a kol., 2007).

Guo a kolektív (2019) sledovali pozitívny vplyv silymarínu pri liečbe Alzheimerovej choroby, podávaný bol aj ako ochranná látka pri rádiokontrastne vyvolanej nefropatii u myší (de Souza Santos a kol., 2019) a sledované boli aj jeho antivirotické účinky (Liu a kol., 2019). Bolo dokázané, že silymarín má pozitívny účinok aj v prípade antiparazitárnej

terapie, kedy zvyšuje účinnosť primárnej liečby chemoterapeutikami, súčasne znižuje patologické následky infekcií u hostiteľa a pôsobí imunostimulačne (Hrčková a Velebný, 2013). Existuje množstvo štúdií, ktoré sa venujú protirakovinovému účinkom tohto rastlinného výťažku a mnohé z *in vitro* a *in vivo* pokusov tento účinok aj potvrdzujú (Vaid a Katiyar, 2010). Hepatoprotektivita tohto fytofarmaka spočíva najmä v jeho schopnosti stabilizácie bunkových a mitochondriálnych membrán (Sailou a kol., 1998), stimulácii biosyntézy proteínov, príp. podpory regenerácie poškodených hepatocytov (Škottova a Krečman, 1998).

Nové poznatky vedú k progresu v chémii a farmakológii silymarínu/silybínu vrátane separácie a štruktúrnej determinácie jeho diastereoizomérov a k syntéze nových derivátov s podobnými, prípadne lepšími farmakokinetickými a farmakodynamickými vlastnosťami (Gažák a kol., 2007).

ZOZNAM LITERATÚRY

Abbas, A. T., El-Shitany, N. A., Shaala, L. A., Ali, S. S., Azhar, E. I., Abdel-Dayem, U. A., Youssef, D. T.: Red Sea Suberea mollis sponge extract protects against CCl₄-induced acute liver injury in rats via an antioxidant mechanism. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2014. DOI: 10.1155/2014/745606.

Al-Anati, L., Essid, E., Reinehr, R., Petzinger, E.: Silibinin protects OTA-mediated TNF- α release from perfused rat livers and isolated rat Kupffer cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2009, 53, 460 – 466.

Arcari, M., Brambilla, A., Brandt, A., Caponi, R., Corsi, G., Di Rella, M., Solinas, F., Wachter, W. P.: A new inclusion complex of silibinin and beta-cyclodextrins: in vitro dissolution kinetics and in vivo absorption in comparison with traditional formulations. *Boll. Chim. Farm.*, 1992, 131, 205 – 209.

Barzaghi, N., Crema, F., Gatti, G., Pifferi, G., Perucca, E.: Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin-phosphatidylcholine complex, in

healthy human subjects. *Eur. J. Drug Metabol. and Pharmacokinet.*, 1990, 15, 333 – 338.

Das, S. K. a Mukherjee, S.: Biochemical and immunological basis of silymarin effect, a milk thistle (*Silybum marianum*) against ethanol-induced oxidative damage. *Toxicol. Mech. Methods*, 2012, 22, 409 – 441.

De Souza Santos, V., Peters, B., Côco, L. Z., Alves, G. M., de Assis, A., Nogueira, B. V., Meyrelles, S. S., Porto, M. L., Vasquez, E. C., Campagnaro, B. P., Pereira, T. M. C.: Silymarin protects against radiocontrast-induced nephropathy in mice. *Life Sci.*, 2019, 40, 658 – 665.

Dirks-Naylor, A. J.: The role of autophagy in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Life Sci.*, 2013, 93, 913 – 916.

Dos Santos, N. A., Carvalho Rodrigues, M. A., Martins, N. M., Dos Santos, A. C.: Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update. *Arch. Toxicol.*, 2012, 86, 1233 – 1250.

El-Awady, El-S. E., Moustafa, Y. M., Abo-Elmatty, D. M., Radwan, A.: Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur. J. Pharmacol.*, 2011, 650, 335 – 341.

Essid, E., Dernawi, Y., Petzinger, E.: Apoptosis induction by OTA and TNF- α in cultured primary rat hepatocytes and prevention by silibinin. *Toxins (Basel)*, 2012, 4, 1139 – 1156.

Fazal, Y., Fatima, S. N., Shahid, S. M., Mahboob, T.: Effects of curcumin on angiotensin-converting enzyme gene expression, oxidative stress and anti-oxidant status in thioacetamide-induced hepatotoxicity. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone Syst.*, 2015, 16, 1046 – 1051.

Galicía-Moreno, M. a Gutiérrez-Reyes, G.: The role of oxidative stress in the development of alcoholic liver disease. *Rev. Gastroenterol. Mex.*, 2014, 79, 135 – 144.

Gažák, R., Walterová, D., Křen, V.: Silybin and silymarin – new and emerging application in medicine. *Curr. Med. Chem.*, 2007, 14, 315 – 338.

Guo, H., Cao, H., Cui, X., Zheng, W.,

Wang, S., Yu, J., Chen, Z.: Silymarin's inhibition and treatment effects for alzheimer's disease. *Molecules*, 2019, 6, 24.

Hrčková G. a Velebný S.: *Pharmacological potential of selected natural compounds in the control of parasitic diseases*. Košice: Springer, 2013. 125 s.

Chtourou, Y., Fetoui, H., Sefi, M., Trabelsi, K., Barkallah, M., Boudawara, T., Kallel, H., Zeghal, N.: Silymarin, a natural antioxidant, protects cerebral cortex against manganese-induced neurotoxicity in adult rats. *Biometals*, 2010, 23, 985 – 996.

Chtourou, Y., Garoui, E., Boudawara, T., Zeghal, N.: Therapeutic efficacy of silymarin from milk thistle in reducing manganese-induced hepatic damage and apoptosis in rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2013, 32, 70 – 81.

Ingawale, D. K., Mandlik, S. K., Naik, S. R.: Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanisms: A critical discussion. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2014, 37, 118 – 133.

Kadir, F. A., Kassim, N. M., Abdulla, M. A., Kamalidehghan, B., Ahmadipour, F., Yehye, W. A.: PASS-predicted hepatoprotective activity of *Caesalpinia sappan* in thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Sci. World J.*, 2014, ID 301879.

Karki, P., Lee, E., Aschner, M.: Manganese neurotoxicity: A focus on glutamate transporters. *Ann. Occup. Environ. Med.*, 2013, 25, 4.

Kidd, P. a Head, K.: Comparative bioavailability of silibinin in healthy male volunteers. *Int. J. of Clin. Pharmacol. Ther.*, 2003, 41, 593 – 596.

Kiruthiga, P. V., Pandian, S. K., Devi, K. P.: Silymarin protects PBMC against B(a)P induced toxicity by replenishing redox status and modulating glutathione metabolizing enzymes—An in vitro study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2010, 247, 116 – 128.

Kiruthiga, P. V., Karthikeyan, K., Archunan, G., Karutha Pandian, S., Pandima Devi, K.: Silymarin prevents benzo(a)pyrene-induced toxicity in Wistar rats by modulating xenobiotic-metabolizing enzymes. *Toxicol. Ind. Health.*, 2013.

DOI: 10.1177/0748233713475524.

Kour, M. a Agarwal, R.: Silymarin and epithelial cancer chemoprevention: how close we are to beside? *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2007, 224, 350 – 359.

Krishnappa, P., Venkatarangaiah, K., Shivamogga, V., Rajanna, S. K., Prakash, K., Gupta, R.: Antioxidant and prophylactic effects of *Delonix elata* L., stem bark extracts, and flavonoid isolated quercetin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 11, 6, 935 – 943.

Liu, Ch., Jassey, A., Hsu, H. Y., Lin, L. T.: Antiviral activities of silymarin and derivatives. *Molecules*, 2019, 24, 1552.

Malekinejad, H., Janbaz-Acyabar, H., Razi, M., Varasteh, S.: Preventive and protective effects of silymarin on doxorubicin-induced testicular damages correlate with changes in c-myc gene expression. *Phytomedicine*, 2012, 19, 1077 – 1084.

Manibusan, M. K., Odin, M., Eastmond, D. A.: Postulated carbon tetrachloride mode of action: A review. *J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, 2007, 25, 185 – 209.

Mateen, S., Raina, K., Agarwal, R.: Chemopreventive and anti-cancer efficacy of silibinin against growth and progression of lung cancer. *Nutr. Cancer.*, 2013, 65, 3 – 11.

Morazzoni, P. a Bombardelli, E.: *Silybum marianum* (Cardus marianus). *Fitoterapia*, 1995, 66, 3 – 42.

Muthumani, M. a Prabu, S. M.: Silibinin potentially protects arsenic-induced oxidative hepatic dysfunction in rats. *Toxicol. Mech. Methods*, 2012, 22, 277 – 288.

Muthumani, M. a Prabu, S. M.: Silibinin potentially attenuates arsenic-induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and dyslipidemia in rats. *Cardiovasc. Toxicol.*, 2014, 14, 83 – 97.

Ninsontia, C., Pongjit, K., Chaotham, C., Chanvorachote, P.: Silymarin selectively protects human renal cells from cisplatin-induced cell death. *Pharm. Biol.*, 2011, 49, 1082 – 1090.

Patel, N., Joseph, C., Corcoran, G. B., Ray, S. D.: Silymarin modulates doxorubicin-induced oxidative stress, Bcl-xL and p53 expression while preventing apoptotic and necrotic cell death in the liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2010, 245, 143 – 152.

Pradeep, K., Mohan, C. V., Gobianand, K., Karthikeyan, S.: Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 2007, 560, 110 – 116.

Rashid, K., Sinha, K., Sil, P. C.: An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. *Food Chem. Toxicol.*, 2013, 62, 584 – 600.

Rašković, A., Stilinović, N., Kolarović, J., Vasović, V., Vukmirović, S., Mikov, M.: The protective effects of silymarin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Molecules*, 2011, 16, 8601 – 8613.

Sailou, C., Rihn, B., Cillard, J., Okamoto, T., Packer, L.: Selective inhibition of NF- κ B activation by the flavonoid hepatoprotector silymarin in HepG2. Evidence for different activating pathways. *Febs Lett.*, 1998, 440, 1 – 2.

Shyamal, S., Latha, P. G., Suja, S. R., Shine, V. J., Anuja, G. I., Sini, S., Pradeep, S., Shikha, P., Rajasekharan, S.: Hepatoprotective effect of three herbal extracts on aflatoxin B1-intoxicated rat liver. *Singapore Med. J.*, 2010, 51, 326 – 331.

Singh, K., Singh, N., Chandy, A., Manigauha, A.: *In vivo* antioxidant and hepatoprotective activity of methanolic extracts of *Daucus carota* seeds in experimental animals. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2012, 2, 385 – 388.

Song, Z., Deaciuc, I., Song, M., Lee, D. Y., Liu, Y., Ji, X., McClain, C.: Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2006, 30, 407 – 413.

Soria, E. A., Eynard, A. R., Bongiovanni, G. A.: Modulation of early stress-related biomarkers in cytoplasm by the antioxidants silymarin and quercetin using a cellular model of acute arsenic poisoning. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2010, 107, 982 –

987.

Surai, P. F. a Dvorska, Y. E.: Effect of mycotoxins on antioxidant status and immunity. *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press: Nottingham, UK, 2005, 93 – 137.

Škottova, N. a Krečman, V.: Silymarin as a potential hypocholesterolamic drug. *Physiol. Res.*, 1998, 47, 1 – 7.

Vaid, M. a Katiyar, S. K.: Molecular mechanisms of inhibition of photocarcinogenesis by silymarin, a phytochemical from milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) (Review). *Int. J. Oncol.*, 2010, 36, 1053 – 1060.

Vijayaraman, P. K., Muruganantham, S., Subramanian, M., Shunmugiah, K. P., Kasi, P. D.: Silymarin attenuates benzo(a)pyrene induced toxicity by mitigating ROS production, DNA damage and calcium mediated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2012, 86, 79 – 85.

Zhang, B., Buys, M., Qin, W., Sun, C., Cai, H., Xie, Q., Xu, B., Wu, Y.: Anthocyanins from Chinese bayberry extract activate transcription factor Nrf2 in β cells and negatively regulate oxidative stress-induced autophagy. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61, 8765 – 8772.

VYUŽITIE PROBIOTICKÝCH BAKTÉRIÍ A ICH BIOAKTÍVNYCH PRODUKTOV PRI KOŽNÝCH OCHORENIACH

THE USE OF PROBIOTIC BACTERIA AND THEIR BIOACTIVE PRODUCTS IN SKIN DISEASES

Nemcová, R.¹, Styková, E.², Englerová, K.¹

¹Katedra mikrobiológie a imunológie

²Klinika koní

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

radomira.nemcova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Koža je najväčším orgánom organizmu, ktorý je neustále vystavený fyzikálnym, chemickým a mikrobiálnym vplyvom. Výsledky klinických štúdií naznačujú, že probiotiká a ich bioaktívne produkty vyvolávajú systémové účinky, ktoré môžu priamo ako aj nepriamo ovplyvniť vybrané funkcie kože. Cieľom tejto štúdie bolo ponúknuť súhrn súčasných poznatkov v oblasti využitia probiotických baktérií a ich bioaktívnych produktov v prevencii, resp. pri liečbe dermatologických ochorení.

Kľúčové slová: bioaktívne látky; dermatitída; dysbióza; koža; mechanizmus účinku; probiotiká

ABSTRACT

The skin is the largest organ of an organism that is constantly exposed to physical, chemical and microbial influences. Clinical trial results suggest that probiotics and their bioactive products produce systemic effects that can directly or indirectly affect the selected skin functions. The aim of this study was to offer a summary of current knowledge in the field of the use of probiotic bacteria and their bioactive products in the prevention and treatment of dermatological diseases.

Key words: bioactive substances; dermatitis; dysbiosis; mechanism of action; probiotics; skin

ÚVOD

Probiotiká a ich úloha v prevencii ochorení tráviaceho traktu boli podrobne preskúmané už pred desaťročiami. Podobne myšlienka využitia probiotík na potlačenie ochorení kože sa zdá byť reálna a sľubná. Nedávne klinické štúdie preukázali, že probiotiká môžu vykazovať ďalšie pozitívne zdravotné účinky nad rámec črevného traktu, ako je zlepšenie atopického ekzému, atopickej dermatitídy, hojenie popálenín a jaziev, omladenie pokožky a zlepšenie prirodzenej imunity kože. V roku 2010 Arck a kolektív navrhli koncept osi črevo-mozog-koža, ktorý naznačuje, že modulácia črevnej mikrobioty probiotikami môže vyvolať signifikantné priaznivé účinky, napríklad na zápal a homeostázu kože. Existujú dôkazy potvrdzujúce asociáciu určitých ochorení kože s výraznou dysbiózou, kde aplikácia probiotík signifikantne zoslabila symptómy súvisiace s daným ochorením. Väčšina existujúcich štúdií sa však zameriavala na perorálne podávanie probiotík. Vedeckých poznatkov týkajúcich sa ich lokálnej aplikácie je málo, ale nové riešenia sa rýchlo objavujú, bez ohľadu na to, že sú obmedzené regulačnými aspektmi. Výskum tzv. „lokálnych probiotík“ bol podporený technológiami ako 3D hmotnostná spektrometria a 16S-rRNA, umožňujúcimi detailnejšie štúdium priestorového vzťahu kože a jej mikrobioty s cieľom vyvinúť produkty viac „šité na mieru“.

Mechanizmus účinku probiotík na kožu

Probiotiká sú živé mikroorganizmy, ktoré podávané v dostatočných množstvách majú preukázateľný pozitívny účinok na hostiteľa (FAO/WHO, 2001). Najčastejšie používanými probiotickými mikroorganizmami sú zástupcovia rodov *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* a *Saccharomyces*.

Výsledky klinických štúdií naznačujú, že probiotiká vyvolávajú systémové účinky, ktoré môžu ovplyvniť aj vybrané funkcie kože. Obrázky 1 a 2

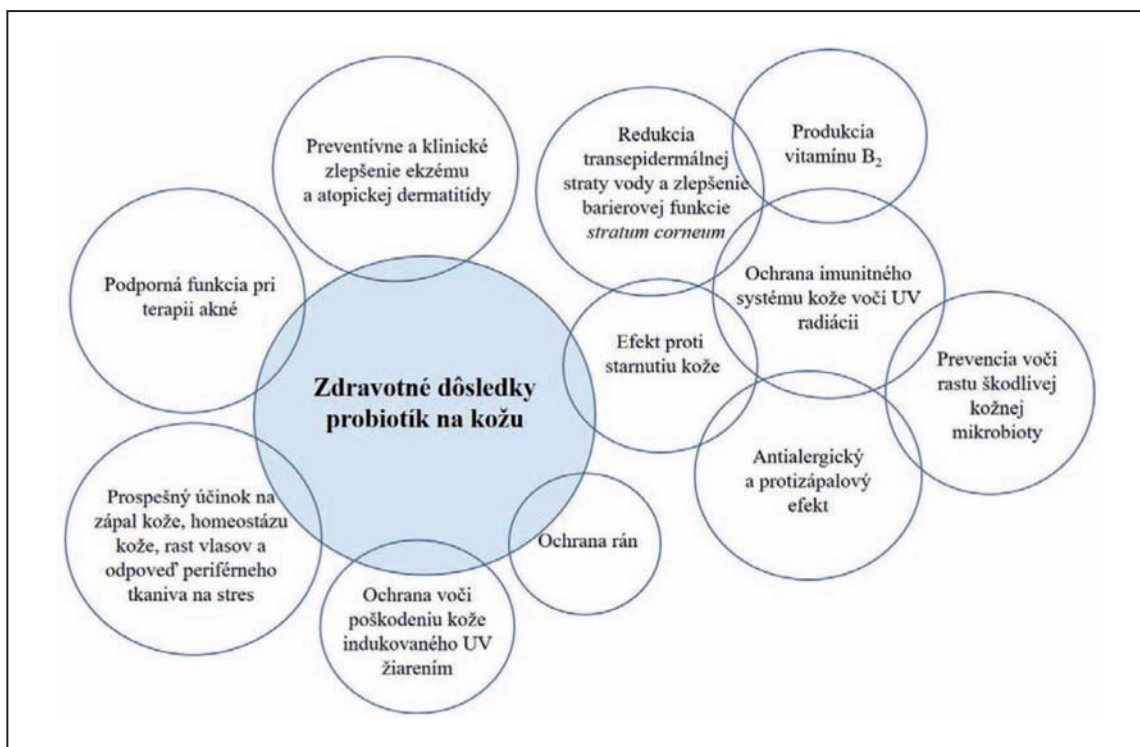
prezentujú možné zdravotné účinky probiotík na kožu a hlavné mechanizmy zodpovedné za prospešné účinky probiotík na kožu.

Probiotiká môžu ovplyvňovať zdravie kože priamo (topická/lokálna aplikácia), prostredníctvom topických liekových foriem alebo nepriamo (perorálna aplikácia), napríklad prostredníctvom výživových doplnkov. Hlavným mechanizmom priameho vplyvu je tzv. kolonizačná rezistencia, ktorá zahŕňa napríklad kompetitívnu exklúziu, vytváranie nevyhovujúceho prostredia pre rast kožných patogénov, modifikáciu lokálneho kožného mikroenviromentu zvýšením hustoty a diverzity prospešných komponentov kožnej mikrobioty a moduláciu sekrécie antimikrobiálnych peptidov hostiteľom. Mechanizmom nepriameho vplyvu je harmonizácia črevnej mikrobioty a zmeny systémového imunitného systému, pričom sa predpokladá, že stav kože by mohol byť pozitívne ovplyvnený posilnenou homeostázou v čreve (Roudsari a kol., 2015).

Účinok probiotík pri ekzéme a atopickej dermatitíde

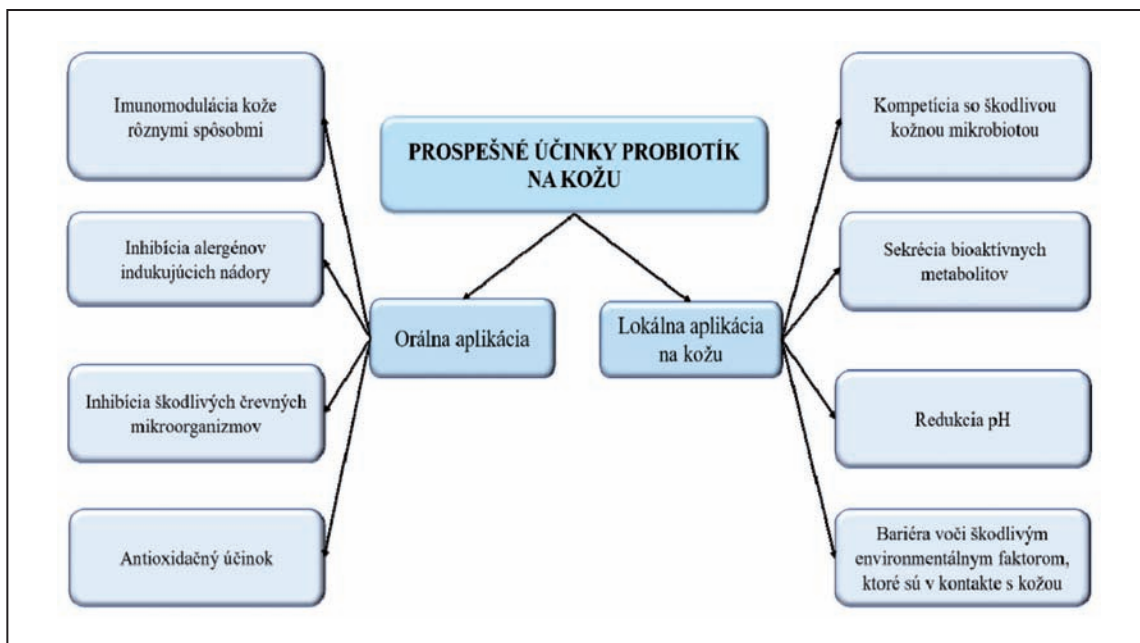
Medzi jedno z najčastejšie sa vyskytujúcich ochorení kože patrí atopická dermatitída (atopický ekzém). Je to chronická, neinfekčná, zápalová dermatóza s komplexnou etiopatogenezou, v ktorej sa kombinuje genetická predispozícia, porušená epidermálna bariérová funkcia a imunitná dysregulácia. Objavuje sa už v dojčenskom alebo detskom veku a v približne jednej tretine prípadov ťažkosti pretrvávajú až do dospelosti (Halvarsson a Loden, 2007). U novorodencov sú odpovede na antigény vonkajšieho prostredia vychýlené k Th2 cytokínovému profilu, ktorý je charakteristický pre alergické ochorenia. V priebehu prvého roka života imunitný systém vyzrieva v dôsledku expozície rôznym mikrobiálnym antigénom a imunitné odpovede nadobúdajú charakter kontraregulačného Th1 profilu, ktorý je typickou odpoveďou na mikrobiálne antigény. U atopických detí k tejto reorientácii imunitnej odpovede nedochádza a ďalej pretrváva Th2 typ odpovede. Vhodné podmienky

Obr. 1: Zdravotné účinky probiotík na kožu



Zdroj: upravené podľa Roudsari a kol., 2015

Obr. 2: Hlavné mechanizmy zodpovedné za prospešné účinky probiotík na kožu



Zdroj: upravené podľa Roudsari a kol., 2015

pre takýto vývoj vytvára nedostatočná expozícia mikrobiálnym antigénom v dôsledku vysokej životnej úrovne s prehnanou hygienou, častým a opakovaným podávaním antibiotík, ako aj menším počtom členov rodiny.

Účinok *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) a *Bifidobacterium lactis* Bb-12 u detí s atopickým ekzémom preukázali definitívne Isolauri a kol. v roku 2000 (Isolauri a kol., 2000) v randomizovanej, dvojito zaslepenej a placebom kontrolovanej štúdii. Výhradne kojené deti s atopickým ekzémom boli preorientované na výživu s vysoko hydrolyzovanou srvátkou s probiotikami alebo bez nich. Po dvoch mesiacoch sa stav probiotickej skupiny výrazne zlepšil, čo sa prejavilo znížením sérového CD4 a eozinofilného proteínu X v moči. Môžeme teda predpokladať, že niektoré probiotiká sú schopné modifikovať prejavy alergického zápalu a môžu ovplyvniť zápalovú odpoveď aj mimo čreva. Táto interpretácia je v zhode so zmenami ďalších indikátorov alergickej odpovede po podaní probiotík. Perorálna aplikácia LGG a niektorých ďalších laktobacilov u detí s atopickou dermatitídou je sprevádzaná zvýšením sérového IL-10 v dôsledku stimulácie regulačných T-buniek. Súčasne dochádza k zvýšeniu imunitných odpovedí Th1 typu prostredníctvom IFN- γ (Prescott a kol., 2005).

Epidemiologické štúdie preukázali nižší výskyt atopickej kože a hypersenzitivity u detí so stabilnou gastrointestinálnou populáciou laktobacilov a bifidobaktérií v porovnaní s tými, ktoré mali nedostatok týchto mikroorganizmov (Cross, 2002). Atopici majú celkovo chudobnejšiu mikrobiotu a pri výraznejšom postihnutí sa zvyšujú počty bakteroidov a znižujú sa počty bifidobaktérií. Aplikácia *B. lactis* Bb-12 zabraňuje zvýšeniu počtu bakteroidov, čo môže zmierniť alergický zápal (Viljanen a kol., 2005). *L. fermentum* VRI-033 PCC podávaný po dobu 4 mesiacov zlepšil stredne ťažkú a ťažkú atopickú dermatitídu detí vo veku 6 – 18 mesiacov (Weston a kol., 2005). Rosenfeldt a kol. sledovali účinky *L. rhamnosus* 19070-2 a *L. reuteri* DSM 12246 u 1 – 13 ročných detí s atopickou dermatitídou.

Počas terapie rozsah ekzému a tráviace problémy významne ustúpili, bariérová funkcia stanovená testom priepustnosti sa zlepšila a sérová koncentrácia eozinofilného kationového proteínu sa znížila (Rosenfeldt a kol., 2004). Účinnosť probiotickej terapie pravdepodobne klesá s vekom dieťaťa a obmedzuje sa hlavne na IgE-senzibilizované deti (Sistek a kol., 2006). Wickens a kol. (2008) študovali úlohu probiotík v prevencii vývoja ekzému a atopie v ranom živote, do dvoch rokov veku dieťaťa, v dvojito zaslepenej, randomizovanej placebom kontrolovanej štúdii. Tehotné ženy užívali denne, od 35. týždňa gravidity až do šiestich mesiacov, pokiaľ kojili, kmene *L. rhamnosus* HN001, *B. animalis* ssp. *lactis* HN019 alebo placebo a ich dojčatá dostávali rovnakú liečbu od narodenia až do dvoch rokov. Zistilo sa, že suplementácia *L. rhamnosus* HN001 v priebehu prvých dvoch rokov života podstatne znížila kumulatívnu prevalenciu ekzému.

Antialergické a protizápalové účinky probiotík na kožu

Zloženie črevnej mikrobioty významne ovplyvňuje vznik alergických ochorení a probiotické kmene môžu pozitívne ovplyvňovať harmonizáciu črevného ekosystému a vývoj zdravých imunitných reakcií, zúčastňujúcich sa v mikroeekológii čreva a na prevencii a potenciálnom liečení alergických ochorení (Zutavern a kol., 2006). Preniknutie alergénov cez kožu môže viesť k systémovej senzibilizácii zahŕňajúcej črevnú mukózu. Tiež sa uvádza, že zápal hrá dôležitú úlohu pri starnutí kože (Pillai a kol., 2005).

Rovnováhu gastrointestinálnej mikrobioty môžu negatívne ovplyvňovať mnohé faktory. Sú to napr. genetické faktory, strava, frekvencia infekcií, antibiotická terapia, pasívne fajčenie, znečistenie, očkovanie, psychologický stres, zníženie imunologickej aktivity, vývoj alergických ochorení a niektorých zápalových ochorení (Halken, 2004). Zistilo sa, že doplnková výživa s použitím určitých probiotických kmeňov zvyšuje aktivitu interferónu v krvi človeka a deti narodené v rodinách, ktoré

konzumujú fermentované potraviny s obsahom laktobacilov majú menší výskyt alergií v porovnaní s rodinami, ktoré konzumujú viac sterilných potravín (Caramia a kol., 2008). Potvrdilo sa, že črevná mikrobiota detí, u ktorých sa vyvinuli alergie, vykazuje nízke hladiny bifidobaktérií, G⁺ aeróbných organizmov a enterokokov, ale zvýšené hladiny klostrídií a *Staphylococcus aureus*.

Aj keď úloha probiotík v prevencii alergických ochorení nie je jasne definovaná, ukazuje sa, že probiotiká majú špecifické antialergické účinky na epitelálne a imunitné bunky. Nie všetky probiotické kmene majú identické imunologické vlastnosti. Protizápalové vlastnosti boli pozorované u bunkových homogenátov *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705, *B. animalis* Bb-112, *L. acidophilus* NCFB-L61748, *L. bulgaricus* ATCC 11842, *Streptococcus thermophilus* T101 a *Propionibacterium freudenreichii* kmeň Shermanii JS (Kankaanpää a kol., 2002). Probiotické baktérie môžu sprostredkovať antialergénne účinky stimuláciou produkcie Th1-cytokínov, transformujúceho rastového faktora- β a črevných IgA (Ouwehand, 2007).

U atopických detí bolo preukázané, že majú hyperaktívne fagocyty, ktoré môžu prispieť k alergickému zápalu. Ukazuje sa, že probiotiká modulujú fagocytózu inak u zdravých a inak u alergických jedincov. Napríklad *L. rhamnosus* GG (LGG) znížil aktivitu fagocytov indukovanú kravským mliekom u pacientov s hypersenzitivitou na mlieko (Kirjavainen a kol., 1999). Aj v iných štúdiách sa preukázalo, že podávanie LGG spolu s mliekom bolo spojené s imunostimulačnými účinkami u zdravých hostiteľov, zatiaľ čo u hypersenzitívnych dojčiat bolo spojené s protizápalovými účinkami (Peltó a kol., 1998).

Účinok probiotík na kožu poškodenú ultrafialovým žiarením

Ultrafialové žiarenie vyvoláva kožné zápal s vývojom erytému, edému a hyperproliferácie epidermy, ktoré spôsobujú jej odlupovanie alebo odstraňovanie. Bouilly-Gauthier a kol. (2010) použili

L. johnsonii La1 a nutričné dávky karotenoidov u 139 zdravých žien vo veku nad 18 rokov počas 10 týždňov na ochranu homeostázy kožného imunitného systému po expozícii UV žiareniu. Dospeli k záveru, že výživové doplnky obsahujúce *L. johnsonii* a dávky karotenoidov znížili UV indukované poškodenie kože spôsobené stimulovanou alebo prirodzenou slnečnou expozíciou. Taktiež zistili, že probiotické výživové doplnky významne znížili indukciu CD45⁺ kožných zápalových buniek, čo naznačuje ich priaznivý účinok na zápal vyvolaný UV žiarením a pravdepodobne aj na starnutie kože.

Účinok probiotík na rany

Potenciálne použitie probiotických mikroorganizmov schopných produkovať antimikrobiálne látky (bakteriocíny, organické kyseliny a peroxid vodíka) získalo zvýšenú pozornosť v dôsledku úspešnej prevencie adhézie patogénov a eliminácie nežiaducich druhov mikroorganizmov (Gillor a kol., 2008). Preukázalo sa, že niektoré produkty probiotických baktérií majú antiadhezívne a antimikrobiálne vlastnosti pri aplikácii na kožné a slizničné povrchy (Rodriguez a kol., 2005). Probiotické mikroorganizmy sa môžu pomocou znižovania pH podieľať na tvorbe antimikrobiálnej kožnej bariéry a regulovať jej homeostázu (Arck a kol., 2010).

Bakteriocín získaný z *Lactococcus* sp. HY 449 bol schopný inhibovať rast baktérií vyvolávajúcich zápal, ako sú *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* a *P. acnes* prostredníctvom bakteriolytickej aktivity na bunkovú stenu a membránu, špeciálne u *P. acnes* (Oh a kol., 2006).

Metabolické produkty laktobacilov stimulujú produkciu beta-defenzínov kožnými bunkami (Sullivan a kol., 2009) a môžu byť využité aj ako konzervačné látky v kozmetických produktoch (Cinque a kol., 2011). *L. plantarum* a jeho bioaktívne produkty v *in vitro* podmienkach inhibovali produkciu quorum-sensing signálnych molekúl u *Pseudomonas aeruginosa* – N-acyl homoserín laktónov a dvoch faktorov virulencie (elastáza a biofilm), ktoré sú

nimi kontrolované (Valdéz a kol., 2005). Peral a kol. (2009) zistili, že topická aplikácia *L. plantarum* u pacientov s popáleninami kože znižovala bakteriálnu kontamináciu, podporovala granuláciu tkaniva a hojenie rán a tento efekt bol porovnateľný s účinkom sulfadiazínového krému so striebrom.

Hansen a Jespersen (2010) vyvinuli tkanivový obväz obsahujúci laktobacily (*L. sporogenes*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. delbrückii* a *Lactococcus lactis*), používaný na hojenie rán a urýchlenie ich hojenia. Tieto druhy baktérií mliečneho kvasenia boli schopné znížiť pH v otvorenom prostredí rany, zabezpečiť vzájomné kompetitívne vylúčenie nežiaducich bakteriálnych druhov a uplatniť imunomodulačný účinok produkciou látok podporujúcich hojenie rán.

Ouwehand a kol. (2003) študovali v *in vitro* podmienkach schopnosť potenciálnych probiotických propionibaktérií (*P. acidipropionici* 4900, *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* 4902, *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* 20271, *P. thoenii* 20277, *P. jensenii* 20278) a *L. rhamnosus* produkovať antimikrobiálne substancie voči vybraným kožným patogénom (*Malassezia furfur* 6170, *M. furfur* L1510, *M. furfur* L1796, *Candida albicans* 1665, *C. albicans* 3454, *S. aureus* 346 a *S. aureus* 20231), ako aj ich schopnosť adherovať na keratín – hlavný proteín kože. *S. aureus* 346 vykazoval najvyššiu adhezivitu spomedzi všetkých testovaných kmeňov vrátane probiotických a kmene *C. albicans* boli najsenzitívnejšie voči účinku *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* 20271 a *L. rhamnosus* 5.5a. Hoci obidva uvedené kmene propionibaktérií a kmeň *L. rhamnosus* 5.5a boli schopné adherovať na kreatín v najvyšších počtoch v porovnaní s ostatnými testovanými probiotickými kmeňmi, signifikantne neovplyvnili adhérenciu testovaných kožných patogénov. Výsledky poukazujú na nutnosť štúdia selekčných kritérií výberu kmeňov pre aplikácie na kožu, ako sú adhérenca, produkcia antimikrobiálnych substancií a inhibícia patogénov.

Bioaktívne látky prospešných baktérií

Viacere literárne údaje uvádzajú, že niektoré

bakteriálne komponenty, ako sú fragmenty buniek a ich metabolity, môžu vyvolať určité imunitné reakcie na koži a zlepšiť funkcie kožnej bariéry (viď obr. 3). Tieto poznatky by mohli pomôcť pri skríningu probiotických kmeňov s prospešnými vlastnosťami pre lokálne aplikácie na kožu.

Kyselina hyalurónová

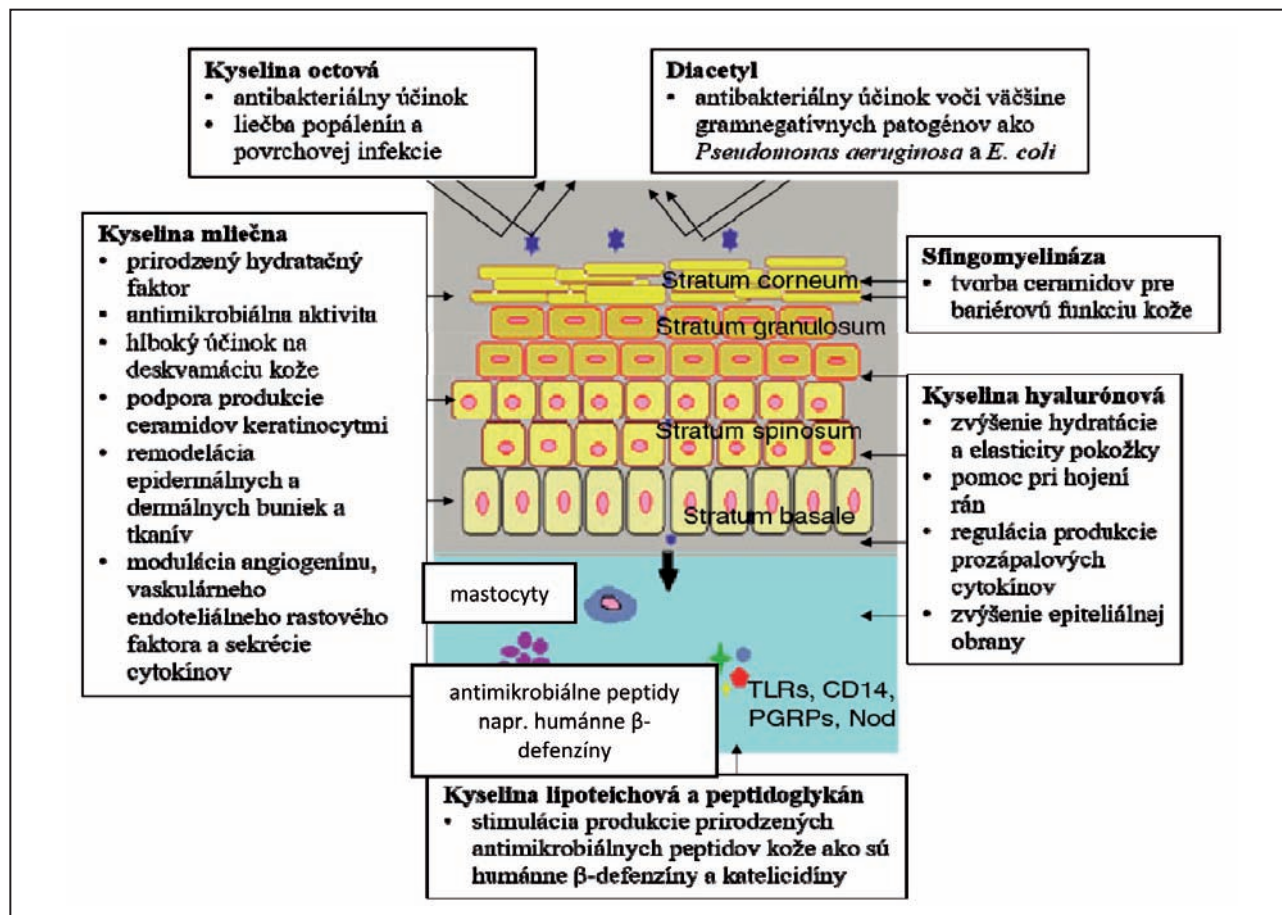
Kyselina hyalurónová (HA) je tvorená z opakujúcich sa jednotiek N-acetylglukozamínu a kyseliny glukurónovej. HA sa široko využíva v dermatológii ako biomateriál na bioinžinierske účely, ako aj na stimuláciu hojenia rán (Kogan a kol., 2007).

Väčšina HA sa u cicavcov nachádza v koži. Je nevyhnutná na udržanie normálnej štruktúry *stratum corneum* a zachovanie funkcií epidermálnej bariéry. Hrá dôležitú úlohu napr. pri imobilizácii vody v tkanive, ovplyvňovaní bunkovej proliferácie, diferenciácie a pri reparácii tkanív. Vzhľadom na vysokú schopnosť viazať vodu, HA prispieva k udržaniu extracelulárnej matrice kože a uľahčuje transport molekúl rozpustných vo vode a iónových rozpúšťadiel. Vysoko osmotická povaha HA je pravdepodobne dôležitá pri kontrole hydratácie tkaniva počas zápalových procesov (Anilkumar a kol., 2011). HA s nízkou molekulárnou hmotnosťou zvyšuje obranyschopnosť epitelu stimulovaním produkcie antimikrobiálneho peptidu β -defenzínu-2 prostredníctvom toll-like receptorov (TLR) (Gariboldi a kol., 2008). Fragmenty HA sa uvoľňujú počas zranenia, čo vedie k zvýšenej expresii chemokínu IL-8 v endotelových bunkách a následnej stimulácii endotelu, aby rozpoznal poškodenie a inicioval hojenie rany (Taylor a kol., 2004). Počas hojenia rany antioxidantné vlastnosti HA bránia poškodeniu granulačného tkaniva voľnými kyslíkovými radikálmi (Trabucchi a kol., 2002).

V zásade existujú dva spôsoby výroby HA. Prvý a starší spočíva v extrakcii z kohútích hrebienkov (Swann, 1968). Novšia metóda je založená na fermentačnom procese pomocou baktérií.

Niektoré baktérie (streptokoky skupiny A a C a *Pasteurella multocida*) dokážu tvoriť HA, ktorá má

Obr. 3: Mechanizmus účinku bioaktívnych látok prospešných baktérii na kožu



TLRs-toll-like receptory, CD14-protilátky, PGRPs-peptidoglykán rozoznávajúce proteíny, NOD-receptory obsahujúce nukleotídy viažucu oligomerizačnú doménu
Zdroj: upravené podľa Lew a Liong, 2013b

pre nich ochranný význam, pretože vytvára kapsulu okolo celej baktérie. Literárne údaje popisujú novú alternatívnu metódu získania vyššieho výťažku HA prostredníctvom fermentácie rekombinantných GRAS(všeobecne uznávaných ako bezpečné) baktérií. HA sa úspešne produkovala v rekombinantnom *Bacillus subtilis* 168 expresiou génu *Streptococcus equisimilis* *hasA* a endogénneho génu *tuaD* (Widner a kol., 2005). HA produkujúci rekombinantný kmeň *Lc. lactis* LL-NAB bol skonštruovaný pomocou koexpresie *hasA* a *hasB* génu *S. equisimilis* ssp. *zooepidemicus* v expresnom systéme kontrolovanom nizínom (Chien a Lee, 2007). Kmeň *Streptococcus thermophilus* YIT2084 bol transformovaný tak, aby

produkoval viac ako 1g.liter⁻¹ HA pomocou expresie génov *hasA*, *hasB* a *glmU* získaných z nepatogénnych baktérií (Izawa a kol., 2011). Niektoré kmene laktobacilov, ako napr. *L. rhamnosus* FTDC 8313 a *L. gasseri* FTDC 8131, boli tiež schopné produkovať HA v koncentráciách vyšších ako 1g.liter⁻¹, keď sa kultivovali v odstredenom mlieku, čo naznačuje ich potenciál pri kožných aplikáciách (Lew a kol., 2013a).

Sfingomyelináza

Sfingomyelináza (SMáza) je enzým hydrolyzujúci sfingomyelín na ceramid. Ceramidy sú druhom lipidových molekúl, ktoré sa prirodzene vyskytujú

v pokožke. Sú kľúčové pre obnovu a hydratáciu kožnej bariéry. Pokles ceramidu v *stratum corneum* spôsobuje stratu vody a bariérovú dysfunkciu kože, vrátane straty ochrany proti antigénom a baktériám (Mizutani a kol., 2009). Takýto pokles je považovaný za možný etiologický faktor atopickej dermatitídy, psoriázy, kontaktnej dermatitídy a iritačnej kontaktnej dermatitídy (Berardesca a kol., 2001).

SMáza je lokalizovaná v epidermálnych lamelárnych telieskach a medzerách *stratum corneum* a bola klasifikovaná ako kyslá, alkalická a neutrálna. Kyslá SMáza je rozpustný glykoproteín s optimálnou aktivitou pri pH 5. Neprítomnosť tohto enzýmu u ľudí vedie k neurologickej poruche, Niemann-Pickovej chorobe. U pacientov s týmto ochorením boli zistené abnormality v bariérovej kožnej homeostáze. Vzhľadom na to, že kyslá SMáza sa nachádza vo vonkajšej epiderme, je zodpovedná za tvorbu ceramidov. Okrem toho, zníženie vnútornej epidermálnej kyslej SMázy je spojené aj so starnutím kože (Schmuth a kol., 2000). Neutrálna SMáza je na druhej strane spojená s bunkovou membránou a je dôležitá pre signalizáciu buniek počas obnovy permeability bariéry prostredníctvom zvýšenej akumulácie ceramidu. Znížená aktivita neutrálnej SMázy vo vonkajších, ako aj vo vnútorných epidermálnych vrstvách bola zistená v starnúcej koži, pravdepodobne v dôsledku zníženého stupňa proliferácie, čo viedlo k redukcii kapacity reparačných procesov kožnej bariéry (Jensen a kol., 2005).

SMáza bola detegovaná v baktériách, kvasinkách a cicavčích bunkách. Kým cicavčia neutrálna SMáza je proteín viazaný na membránu, bakteriálna SMáza je sekrečný proteín uvoľnený z buniek do média (Di Marzio a kol., 2001). V *in vitro* štúdií Di Marzio a kol. (1999) sa množstvo ceramidu v humánnej keratinocytovej bunkovej línii HaCat zvýšilo 50 – 60 násobne oproti kontrole po 18 hodinovej kokultivácii so sonikovanými bunkami *S. thermophilus*. Zvýšená hladina ceramidu bola pripísaná SMáze ($> 0,1 \text{ mU.ml}^{-1}$) získanej zo sonikovaných buniek *S. thermophilus*. Tieto pozorovania autori potvrdili aj v *in vivo* podmienkach. Výsledky randomizovaného,

dvojito zaslepeného, párového porovnávacieho projektu ukázali, že krém aplikovaný na povrch kože na volárnej strane predlaktia obsahujúci sonikovaný *S. thermophilus* indukoval významný ($P < 0,05$) nárast hladín ceramidu po 7 dňoch topickej liečby ($639 \pm 136,21 \text{ pmol ceramidov na } 1 \mu\text{g proteínu}$) v porovnaní s kontrolami ($136 \pm 25 \text{ pmol ceramidov na } 1 \mu\text{g proteínu}$). Zvýšenie obsahu ceramidu bolo detegované v *stratum corneum* u všetkých subjektov po topickej aplikácii krému obsahujúceho lyzovaný *S. thermophilus* rovnako ako krému obsahujúceho SMázu ($4 \text{ ng na } 50 \mu\text{l PBS na ml základného krému}$). Kyslá aj neutrálna SMáza môže byť produkovaná aj kmeňmi laktobacilov a bifidobaktérií v koncentráciách dostatočných pre podporu produkcie ceramidov v kožných bunkách s možnosťou zlepšenia vlastností kožnej bariéry (Lew a kol., 2013a).

Kyselina lipoteichová

Lipoteichová kyselina (LTA) je štrukturálnou zložkou bunkových stien G⁺ baktérií. Hrá dôležitú úlohu v ich raste a fyziológii a je jednou z imunostimulačných zložiek (Kim a kol., 2008). Predchádzajúce štúdie ukázali, že LTA môže fungovať ako dôležitý, s patogénmi asociovaný molekulárny model, vedúci k produkcii prozápalových cytokínov, oxidu dusnatého, aktivácii transkripčného faktora NF- κ B a ďalších prozápalových mediátorov (Lebeer a kol., 2012).

Zápalová odpoveď je pokus organizmu obnoviť a udržať homeostázu po infekcii alebo poranení. LTA z patogénnych G⁺ baktérií, ako je *S. aureus*, však môže spôsobiť nadmerný zápal, čo vedie k rozvoju syndrómu systémovej zápalovej odpovede, ako je septický šok (De Kimpe a kol., 1995). Hoci väčšina molekúl LTA má podobnú základnú štruktúru, štúdie vzťahu medzi štruktúrou a aktivitou preukázali silnú kmeňovú špecifitu. Kim a kol. (2008) uvádzajú, že LTA izolovaná z prospešných baktérií, ako je *L. plantarum* KCTC10887BP (pLTA), indukovala toleranciu prostredníctvom ochrany proti nadprodukcii prozápalových cytokínov, napr. TNF- α , spojených so sepsou. Inhibičné účinky pLTA sa

ďalej potvrdili *in vivo* testom prostredníctvom LPS (lipopolysacharid)-indukovaného endotoxínového šoku u BALB/c myši. Výsledky ukázali, že keď sa myšiam podala pLTA 24 hodín pred podaním LPS (45 mg.kg^{-1}), došlo k signifikantne vyššiemu prežitiu zvierat v závislosti od dávky pLTA.

Po lokálnej aplikácii sa zistilo, že LTA stimuluje obranu kože proti mikrobiálnym infekciám prostredníctvom indukcie TLR. Aktivácia TLR v systéme rozpoznávania kožných patogénov spúšťa uvoľnenie rozpustných efektorov, ako sú antimikrobiálne peptidy (β -defenzíny a katelicidíny), ktoré udržujú sterilitu zamše (Schauber a Gallo, 2008). Výsledná lokálna akumulácia antimikrobiálnych proteínov ponúka rýchly a veľmi účinný spôsob, ako zabrániť vzniku mikrobiálnych infekcií. Význam antimikrobiálnych peptidov ďalej potvrdili Niyonsaba a Ogawa (2005), ktorí zistili, že znížená expresia antimikrobiálnych peptidov, ako je humánný β -defenzín hBD2, bola spojená s opätovným výskytom kožných infekcií vyvolaných *S. aureus* u pacientov s atopickou dermatitídou. Okrem antimikrobiálnych vlastností LTA prispieva k hojeniu rán na koži a vykonáva sériu imunomodulačných funkcií. Nepôsobí teda len ako prozápalový činiteľ, ale aj ako kľúčové spojenie medzi vrodenným a adaptívnym imunitným systémom (Niyonsaba a kol., 2007). Wang a kol. (2012) nedávno preukázali, že LTA získaná z nepatogénnych komenzálnych baktérií zvýšila antimikrobiálnu aktivitu kožných žírnych buniek proti vírusom vakcínie, a to prostredníctvom aktivácie TLR2, čo naznačuje potenciálnu úlohu tejto kyseliny v antivírusovej terapii.

Peptidoglykán

Peptidoglykán (PG) je hlavnou štruktúrnou zložkou bunkovej steny baktérií. Je to polymér zložený z $\beta(1-4)$ viazaného N-acetylglukozamínu a N-acetylmurámovej kyseliny, zosieťovaný krátkymi peptidmi obsahujúcimi striedajúce sa L- a D-aminokyseliny (Dziarski, 2003).

Peptidoglykán zohráva dôležitú úlohu pri ochrane kože pred patogénmi. Stimuluje vrodenný imunitný

systém prostredníctvom TLR2, čo vedie k uvoľneniu rôznych cytokínov a chemokínov, ktoré sú zapojené do imunitných odpovedí (Niebuhr a kol., 2010). Taktiež sa preukázalo, že aktivuje nukleárny faktor κB a výrazne indukuje produkciu IL-8 z keratinocytov (Matsubara a kol., 2004). Viaceré výsledky naznačujú, že PG z laktobacilov stimuluje vrodennú imunitnú reakciu prostredníctvom TLR2 a tiež indukuje produkciu IL-12 a ďalších regulačných faktorov makrofágmi, čím prispieva k ochrane pokožky (Sun a kol., 2005; Paradis-Bleau a kol., 2007; Shida a kol., 2009). PG v množstve $10 - 100 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ je nevyhnutný na stimuláciu bunkových odpovedí, avšak na druhej strane môže byť účinný aj pri nižších koncentráciách prostredníctvom synergizmu s LTA (Lew a kol., 2013a).

Kyselina mliečna a octová

Kyselina mliečna je organická kyselina s jednou hydroxylovou skupinou v alfa polohe. Vzniká ako produkt anaeróbnej glykolýzy alebo ako fermentačný produkt mliečnych baktérií.

Jedným z dôvodov, prečo sú α -hydroxy kyseliny (AHA), ako je aj kyselina mliečna, široko používané ako exfoliátory a chemické peelingové prostriedky, je ich účinok na deskvamáciu kože. Deskvamácia je spôsobená disociáciou bunkových adhézií, ktorá je výsledkom zníženej koncentrácie iónov vápnika v epidermis v dôsledku chelatačného účinku AHA. Znížená hladina vápenatých iónov podporuje rast buniek a spomaľuje bunkovú diferenciáciu, čím vznikne mladšie vyzerajúca koža (Wang, 1999). Kyselina mliečna je schopná zlepšiť bariérovú funkciu *stratum corneum* a zvýšiť produkciu ceramidov keratinocytmi. Taktiež je súčasťou prirodzeného zvlhčujúceho faktora, ktorý zachováva vlhkosť pokožky a zohráva dôležitú úlohu vo fyzikálnych vlastnostiach *stratum corneum* (Nakagawa a kol., 2004). Zdokumentovaná bola aj jej antimikrobiálna aktivita voči širokému spektru kožných patogénov (Pasricha a kol., 1979). Okrem toho sa kyselina mliečna odporúča ako preventívny prostriedok pri liečbe *acne vulgaris* v dôsledku jej

netoxických a nesenzitivujúcich vlastností. Klinické štúdie zahrňujúce osoby s *acne vulgaris* preukázali, že dlhodobá topická aplikácia 5 % kyseliny mliečnej na tvár signifikantne znížila počet lézií (Garg a kol., 2002).

Kyselina octová sa vyrába priemyselne, a to buď synteticky alebo bakteriálnou fermentáciou heterofermentatívnych mliečnych baktérií. Patrí medzi najlepšiu alternatívu voči infekciám, ktoré vyvolávajú kmene rezistentné na antibiotiká a kde sú liečebné postupy nepostačujúce (Nagoba a kol., 2008). Výsledky štúdie Ryssel a kol. (2009) preukázali 100 % inhibíciu *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa* a *Acinetobacter baumannii* po 5 minútach inkubácie v 3 % roztoku kyseliny octovej, zatiaľ čo rast *S. epidermidis* a *S. aureus* bol úplne inhibovaný po 30 minútach, a kmene *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* a meticilín rezistentný *S. aureus* boli úplne eliminované po 60 minútach inkubácie.

Antimikrobiálny efekt obidvoch kyselín súvisí s narušením membránového potenciálu atakovanej bunky, inhibíciou aktívneho transportu cez membránu, redukciou intracelulárneho pH a inhibíciou rôznych metabolických funkcií bakteriálnej bunky. Najväčší inhibičný efekt sa prisudzuje nedisociovannej forme organických kyselín. Bunková membrána baktérií je nepermeabilná pre disociované frakcie kyselín, zatiaľ čo nedisociované frakcie difundujú cez membránu pasívne a následne sa ionizujú v závislosti na intracelulárnom pH, čo zapríčiňuje okysľovanie cytoplazmy a tvorbu inhibítorov (Nagoba a kol., 2008).

Diacetyl

Diacetyl (2,3-butándión) vzniká enzymaticky riadenou oxidatívnou dekarboxyláciou acetolaktátu, ktorý je medziproduktom metabolizmu pyruvátu u niektorých druhov baktérií mliečneho kvasenia, ako sú *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *L. acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *Leuconostoc lactis*, *Leuc. mesenteroides* ssp. *Cremoris* a *Pediococcus acidilactici* (Tamime, 2008).

Mechanizmus antimikrobiálneho účinku diacetylú spočíva v jeho špecifickej reakcii s arginínom v štruktúre proteínov, pričom vznik komplexu diacetyl-arginín vedie k obmedzeniu katalytickej funkcie enzýmov a k imunologickej odpovedi na modifikovaný proteín. Inhibičný efekt diacetylú sa spája tiež s jeho schopnosťou depolarizovať membránové štruktúry a inhibovať tak transport iónov. Kmene laktobacilov a bifidobaktérií sú schopné produkovať diacetyl v koncentráciách do 30 mg.ml⁻¹, čo naznačuje jeho potenciálne dermálne antimikrobiálne účinky, s vyššou citlivosťou voči G-baktériám a hubám v porovnaní s G+ baktériami (Lew a kol., 2013a). Diacetyl mal baktericídne účinky na *E. coli* a *S. aureus* už v koncentrácii 100 ppm (Lanciotti a kol., 2003). Hoci antibakteriálna aktivita diacetylú bola dobre zdokumentovaná, výskum jeho topickej aplikácie je takmer nedostupný a vyžaduje si ďalšie skúmanie.

Bakteriocíny

Bakteriocíny sú definované ako proteínové zlúčeniny s baktericídnu aktivitou. V oblasti medicíny je snaha o náhradu antibiotík bakteriocínmi z viacerých dôvodov. Bakteriocíny sú pre eukaryotickú bunku v porovnaní s antibiotikami relatívne netoxické, v organizme ľahko degradovateľné proteolytickými enzýmami bez vedľajších metabolitov, nebola voči nim zaznamenaná žiadna rezistencia, sú bez senzorických vlastností a nežiaducich účinkov aké poznáme u antibiotík, sú termostabilné s vysokou účinnosťou pri nízkych koncentráciách a širokom rozsahu pH (Hassan a kol., 2012). Inhibičné spektrum týchto látok je prevažne zamerané na baktérie, ktoré sú úzko spojené s kmeňom produkujúcim bakteriocíny, zatiaľ čo tento kmeň je voči vlastným produktom odolný. Spomedzi kožných baktérií medzi hlavných producentov bakteriocínov patrí *S. epidermidis*, ktorý produkuje lantibiotiká ako je epidermín, Pep5, epilancín K7 a epicidín 280 (Bastos a kol., 2009). Tieto lantibiotiká sú schopné inhibovať meticilín rezistentný *S. aureus* (MRSA) a koaguláza negatívne stafylokoky, ktoré zapríčiňujú

infekcie u ľudí. Z baktérií mliečného kvasenia bolo najviac bakteriocínov popísaných u zástupcov rodu *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a *Leuconostoc*.

Exopolysacharidy

Schopnosť produkovať exopolysacharidy (EPS) je medzi baktériami značne rozšírená. Bakteriálne EPS sú hlavným komponentom extracelulárnej matrice biofilmov a poskytujú bunkám celý rad biologických funkcií, vrátane ochrany pred nepriaznivými podmienkami ako je vysušenie, nedostatok živín, toxické zlúčeniny, bakteriofágy a osmotický stres (Badel a kol., 2011). V závislosti od ich chemického zloženia a štruktúry, EPS produkované baktériami môžu byť homopolysacharidy, zložené z opakujúcej sa monosacharidovej jednotky (glukány, fruktány) a heteropolysacharidy zahŕňajúce viac rôznych sacharidov, ktoré sa mnohonásobne opakujú v oligosacharidových jednotkách.

Baktérie mliečného kvasenia (LAB) sú významnými producentmi EPS využívaných ako v priemysle, tak aj v medicíne. Okrem technologických výhod využiteľných v potravinárskom priemysle majú EPS syntetizované LAB aj priaznivé účinky na zdravie. Boli popísané ich imunomodulačné, antivírusové, antioxidačné a prebiotické účinky (Oleksy a kol., 2018).

Mikrobiálne EPS nachádzajú uplatnenie aj pri kožných aplikáciách. Napríklad dextrán (produkt *L. mesenteroides*) sa dlho využíva ako plazmový expandér pri eliminácii zápalových procesov v rane. EPS na báze alginátu získané z *Azotobacter vinelandii* a *P. aeruginosa* sa využívajú ako vlákna v hemostatických obväzoch na rany a spolu so xantanom ako stabilizéry vo farmakologických suspenziách a emulziách pre dermatologické aplikácie (Moscovici, 2015). Okrem vyššie uvedeného majú bakteriálne EPS schopnosť inhibovať tvorbu biofilmov u širokého spektra baktérií a húb, a to ako v *in vitro* aj *in vivo* podmienkach, cestou modifikácie fyzikálnych vlastností bakteriálnych

buniek, reguláciou expresie génov zodpovedných za tvorbu biofilmu, ako aj kompetitívnou inhibíciou karbohydrát-proteínových interakcií s následným blokovaním fimbrií a pili (Rendueles a kol., 2013). Polysacharidy s antibiofilmovou aktivitou boli izolované zo *Streptococcus phocae* PI80 (Kanmani a kol., 2011) a *L. acidophilus* A4 (Kim a kol., 2009).

Biosurfaktanty

Biosurfaktanty (BS) sú povrchovo aktívne biomolekuly produkované mikroorganizmami so širokým spektrom použitia. Po chemickej stránke sú to vysokomolekulárne (proteíny, lipoproteíny, polysacharidy, lipopolysacharidy, rhamnolipidy, trehalolipidy a sophorolipidy) alebo nízkomolekulárne látky (glykolipidy a lipopeptidy). BS sú zložené z hydrofilnej a hydrofóbnej časti, čo umožňuje ich zhlukovanie na rozhraní medzi kvapalinami s rôznou polaritou, ako sú uhlíkovodíky a voda, a tým znižujú medzipovrchové napätie. Taktiež sa zistilo, že zlepšujú transport živín cez membrány a ovplyvňujú rôzne interakcie medzi hostiteľom a mikróboom (Shekhar a kol., 2018).

Niektoré BS sa ukázali ako vhodné bezpečné alternatívy k syntetickým liekom a antimikrobiálnym látkam. Sú užitočné nielen ako antibakteriálne, antifungálne a antivirotické látky, ale tiež preukazujú antiadhezívnu aktivitu a spôsobujú rozpad biofilmu (Rodrigues a kol., 2007). Surlaktin produkovaný kmeňom *L. acidophilus* RC14 inhiboval adherenciu uropatogénnych kmeňov *E. faecalis* a *E. coli* a BS izolovaný z *L. paracasei* A20 preukazoval antiadhezívnu aktivitu voči *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* a *Streptococcus agalactiae* (Golek a kol., 2009). Sambanthamoorthy a kol. (2014) *in vitro* zistili na koncentrácii závislú antimikrobiálnu, antiadhezívnu a antibiofilmovú aktivitu BS izolovaných z *L. jensenii* a *L. rhamnosus* voči klinickým izolátom *A. baumannii*, *E. coli* a *S. aureus* (MRSA). Manozylerytritolové lipidy sú jednými zo sľubných glykolipidových biosurfaktantov pre kožné aplikácie. U manozylerytritolových lipidov produkovaných zo sójového oleja kvasinkou

Pseudozyma antarctica T-34 bola zistená potenciálna hydratačná aktivita porovnateľná s prirodzenými ceramidmi (Santos a kol., 2016).

ZÁVER

Harmonizácia kožnej mikrobioty probiotikami má svoju budúcnosť. Bežné lokálne metódy ošetrovania kožných infekcií založené na obmedzovaní nežiaducej mikroflóry vedú k cyklickému navodeniu mikrobiálnej disharmónie a ak sa v priebehu liečby a rekonvalescencie neobnoví normálna kvalita ochranných systémov kože, dochádza k neriešiteľným recidívam. Rekolonizácia mikrobiocenózy kože probiotikami môže mať nielen terapeutický efekt, ale najmä v rekonvalescencii môže uviesť ochranný systém kože do stabilného stavu. Významná je aj skutočnosť, že takéto probiotické aplikácie bude potrebné personalizovať vzhľadom na rôznorodosť a heterogenitu bakteriálnych spoločenstiev kože.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja č. APVV-15-0377 a č. APVV-16-0203 a VEGA 1/0081/17.

ZOZNAM LITERATÚRY

Anilkumar, T. V., Muhamed, J., Jose, A., Jyothi, A., Mohanan, P. V., Krishnan, L. K.: Advantages of hyaluronic acid as a component of fibrin sheet for care of acute wound. *Biologicals*, 2011, 39, 81 – 88.

Arck, P., Handjiski, B., Hagen, E., Pincus, M., Bruenahl, C., Bienenstock, J., Paus, R.: Is there a 'gut-brain-skin axis'? *Exp. Dermatol.*, 2010, 19, 5, 401 – 405.

Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P.: Research review paper: New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.*, 2011, 29, 54 – 66.

Bastos, M. C., Ceotto, H., Coelho, M. L.,

Nascimento, J. S.: Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2009, 10, 1, 38 – 61.

Berardesca, E., Barbareschi, M., Veraldi, S., Pimpinelli, N.: Evaluation of efficacy of a skin lipid mixture in patients with irritant contact dermatitis, allergic contact dermatitis or atopic dermatitis: a multicenter study. *Contact Dermatitis*, 2001, 45, 280 – 285.

Bouilly-Gauthier, D., Jeannes, C., Maubert, Y., Duteil, L., Queille-Roussel, C., Piccardi, N., Montastier, C., Manissier, P., Pierard, G., Ortonne, J. P.: Clinical evidence of benefits of a dietary supplement containing probiotic and carotenoids on ultraviolet-induced skin damage. *Br. J. Dermatol.*, 2010, 163, 534 – 543.

Caramia, G., Atzei, A., Fanos, V.: Probiotics and the skin. *Clin. Dermatol.*, 2008, 26, 1, 4 – 11.

Cinque, B., Palumbo, P., La Torre, C., Melchiorre, E., Corridoni, D., Miconi, G., Di Marzio, L., Cifone, M. G., Giuliani, M.: Use of probiotics for dermal applications. In Liong, M. T. (Eds.). *Probiotics. Microbiology Monographs*. Nemecko: Springer, 2011, 21, 221 – 241.

Cross, M. L.: Immunoregulation by probiotic lactobacilli: Pro-Th1 signals and their relevance to human health. *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, 2002, 3, 3, 115 – 125.

De Kimpe, S. J., Kengatharan, M., Thiernemann, C., Vane, J. R.: The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 1995, 10359 – 10363.

Di Marzio, L., Cinque, B., De Simone, C., Cifone, M. G.: Effect of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* on ceramide levels in human keratinocytes *in vitro* and *stratum corneum in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, 1999, 113, 98 – 106.

Di Marzio, L., Russo, F. P., D'Alo, S., Biordi, L., Ulisse, S., Amicosante, G., De Simone, C.,

Cifone, M. G.: Apoptotic effects of selected strains of lactic acid bacteria on a human T leukemia cell line are associated with bacterial arginine deiminase and/or sphingomyelinase activities. *Nutr. Cancer*, 2001, 40, 185 – 196.

Dziarski, R.: Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. *Cell Mol. Life Sci.*, 2003, 60, 1793 – 1804.

Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). Health and nutritional properties of Probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Report of a Joint FAO/WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*, 2001, Cordoba, Argentina.

Garg, T., Ramam, M., Pasricha, J. S., Verma, K. K.: Long term topical application of lactic acid/lactate lotion as a preventive treatment for *acne vulgaris*. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 2002, 68, 137 – 139.

Gariboldi, S., Palazzo, M., Zanobbio, L., Selleri, S., Sommariva, M., Sfondrini, L., Cavicchini, S., Balsari, A.: Low molecular weight hyaluronic acid increases the self-defense of skin epithelium by induction of beta-defensin 2 via TLR2 and TLR4. *J. Immunol.*, 2008, 181, 3, 2103 – 2110.

Gillor, O., Etzion, A., Riley, M. A.: The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 81, 591 – 606.

Golek P., Bednarski, W., Brzozowski, B., Dziuba, B.: The obtaining and properties of biosurfactants synthesized by bacteria of the genus *Lactobacillus*. *Ann. Microbiol.*, 2009, 59, 1, 119 – 126.

Halken, S.: Prevention of allergic disease in childhood: Clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2004, 15, 16, 9 – 32.

Halvarsson, K. a Loden, M.: Increasing quality of life by improving the quality of skin in patients with atopic dermatitis. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2007, 29, 69 – 83.

Hansen, J. E. a Jespersen, L. K.: Wound or tissue dressing comprising lactic acid bacteria. *Patent application publication*, 2010, US 2010/0143447 A1.

Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., Lotfipour, F.: Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.*, 2012, 113, 4, 723 – 736.

Chien, L. J. a Lee, C. K.: Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 77, 339 – 346.

Isolauri, E., Arvola, T., Sut'as, Y.: Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin. Exp. Allergy*, 2000, 30, 11, 1604 – 1610.

Izawa, N., Serata, M., Sone, T., Omasa, T., Ohtake, H.: Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. *J. Biosci. Bioeng.*, 2011, 111, 6, 665 – 670.

Jensen, J. M., Forl, M., Winoto-Morbach, S., Seite, S., Schunck, M., Proksch, E., Schutze, S.: Acid and neutral sphingomyelinase, ceramide synthase, and acid ceramidase activities in cutaneous aging. *Exp. Dermatol.*, 2005, 14, 609 – 618.

Kankaanpaa, P. E., Yang, B., Kallio, H. P., Isolauri, E., Salminen, S. J.: Influence of probiotic supplemented infant formula on composition of plasma lipids in atopic infants. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2002, 13, 6, 364 – 369.

Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., Arul, V.: Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresour. Technol.*, 2011, 102, 7, 4827 – 4833.

Kim, H. G., Kim, N. R., Gim, M. G., Lee, J. M., Lee, S. Y., Ko, M. Y., Kim, J. Y., Han, S. H., Chung, D. K.: Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* inhibits lipopolysaccharide-induced TNF- α production in THP-1 cells and endotoxin shock in mice. *J. Immunol.*, 2008, 180, 2553 – 2561.

Kim, Y., Kwon, J. H., Ahn, S. H., Lee, S. I., Han, Y. S., Choi, Y. O., Lee, S. Y., Ahn, K. M., Ji, G. E.: Released exopolysaccharide (r-EPS) produced

from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, 379, 2, 324 – 329.

Kirjavainen, P. V., Apostolou, E., Salminen, S. J., Isolauri, E.: New aspects of probiotics - a novel approach in the management of food allergy. *Allergy*, 1999, 54, 909 – 915.

Kogan, G., Soltes, L., Stern, R., Gemeiner, P.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol. Lett.*, 2007, 29, 17 – 25.

Lanciotti, R., Patrignani, F., Bagnolini, F., Guerzoni, M. E., Gardini, F.: Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiol.*, 2003, 20, 5, 537 – 543.

Lebeer, S., Claes, I. J., Vanderleyden, J.: Antiinflammatory potential of probiotics: lipoteichoic acid makes a difference. *Trends Microbiol.*, 2012, 20, 5 – 10.

Lew, L. C., Gan, C. Y., Liong, M. T.: Dermal bioactives from lactobacilli and bifidobacteria. *Ann. Microbiol.*, 2013a, 63, 3, 1047 – 1055.

Lew, L. C. a Liong, M. T.: Bioactives from probiotics for dermal health: functions and benefits. *J. Appl. Microbiol.*, 2013b, 114, 5, 1241 – 1253.

Matsubara, M., Harada, D., Manabe, H., Hasegawa, K.: *Staphylococcus aureus* peptidoglycan stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating factor production from human epidermal keratinocytes via mitogen-activated protein kinases. *FEBS Lett.*, 2004, 566, 195–200.

Mizutani, Y., Mitsutake, S., Tsuji, K., Kihara, A., Igarashi, Y.: Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie*, 2009, 91, 784–790.

Moscovici, M.: Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Front. Microbiol.*, 2015, 6, 1012.

Nagoba, B., Wadher, B., Kulkarni, P., Kolhe, S.: Acetic acid treatment of pseudomonas wound infections. *EJGM*, 2008, 5, 104 – 106.

Nakagawa, N., Sakai, S., Matsumoto, M., Yamada, K., Nagano, M., Yuki, T., Sumida, Y., Uchiwa, H.: Relationship between NMF (lactate and potassium) content and the physical properties of the stratum corneum in healthy subjects. *J. Invest. Dermatol.*, 2004, 122, 3, 755 – 763.

Niebuhr, M., Baumert, K., Werfel, T.: TLR-2-mediated cytokine and chemokine secretion in human keratinocytes. *Exp. Dermatol.*, 2010, 19, 10, 873 – 877.

Niyonsaba, F., Ushio, H., Nakano, N., Ng, W., Sayama, K., Hashimoto, K., Nagaoka, I., Okumura, K., Ogawa, H.: Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J. Invest. Dermatol.*, 2007, 127, 3, 594 – 604.

Niyonsaba, F. a Ogawa, H.: Protective roles of the skin against infection: implication of naturally occurring human antimicrobial agents beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. *J. Dermatol. Sci.*, 2005, 40, 157 – 168.

Oh, S., Kim, S. H., Ko, Y., Sim, J. H., Kim, K. S., Lee, S. H., Park, S., Kim, Y. J.: Effect of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449 on skin-inflammatory bacteria. *Food Chem. Toxicol.*, 2006, 44, 8, 552 – 559.

Oleksy, M. a Klewicka, E.: Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2018, 58, 3, 450 – 462.

Ouwehand, A. C., Batsman, A., Salminen, S.: Probiotics for the skin: A new area of potential application? *Lett. Appl. Microbiol.*, 2003, 36, 327 – 331.

Ouwehand, A. C.: Antiallergic effects of probiotics. *J. Nutr.*, 2007, 137, (3 Suppl 2), 794S – 797S.

Paradis-Bleau, C., Cloutier, I., Lemieux, L., Sanschagrin, F., Laroche, J., Auger, M., Garnier, A., Levesque, R.C.: Peptidoglycan lytic activity of the *Pseudomonas aeruginosa* phage phiKZ gp144 lytic transglycosylase. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, 266,

201 – 209.

Pasricha, A., Sharma, K., Bhalla, P.: Evaluation of lactic acid as an antibacterial agent. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 1979, 45, 149 – 161.

Pelto, L., Isolauri, E., Lilius, E. M., Nuutila, J., Salminen, S.: Probiotic bacteria downregulate the milk-induced inflammatory response in milkhypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin. Exp. Allergy*, 1998, 28, 1474 – 1479.

Peral, M. C., Rachid, M. M., Gobbato, N. M., Martinez, M. A. H., Valdez, J. C.: Interleukin-8 production by polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic infected leg ulcers treated with *Lactobacillus plantarum*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009, 16, 6285, 281 – 286.

Pillai, S., Oresajo, C., Hayward, J.: Ultraviolet radiation and skin aging: Role of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation induced: A review. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2005, 27, 17 – 34.

Prescott, S. L., Dunstan, J. A., Hale, J.: Clinical effects of probiotics are associated with increased interferon-gamma responses in very young children with atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy*, 2005, 35, 1557 – 1564.

Rendueles, O., Kaplan, J. B., Ghigo, J. M.: Antibiofilm polysaccharides. *Environ. Microbiol.*, 2013, 15, 2, 334 – 346.

Rodrigues, L. Banat, I. M., Teixeira, J., Oliveira, R.: Strategies for the prevention of microbial biofilm formation on silicone rubber voice prostheses. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 2007, 81B, 358 – 370.

Rodriguez, K. L. Caputo, L. R. G., Carvalho, J. C. T., Evangelista, J., Schneedorf, J. M.: Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2005, 25, 5, 404 – 408.

Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Valerius, N. H., Pærregaard, A., Michaelsen, K. F.: Effect of probiotics

on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *J. Pediatr.*, 2004, 145, 612 – 616.

Roudsari, M. R., Karimi, R., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M.: health effects of probiotics on the skin. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2015, 55, 9, 1219 – 1240.

Ryssel, H., Kloeters, O., Germann, G., Schafer, T., Wiedemann, G., Oehlbauer, M.: The antimicrobial effect of acetic acid—an alternative to common local antiseptics? *Burns*, 2009, 35, 5, 695 – 700.

Sambanthamoorthy, K., Feng, X., Patel, R., Patel, S., Parnavitana, Ch.: Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. *BMC Microbiol.*, 2014, 14, 1, 197.

Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., Sarubbo, L.A.: Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, 17, 3, 401.

Shekhar, S., Sundaramanickam, A., Saranya, K., Meena, M., Kumaresan, S., Balasubramanian, T.: Production and characterization of biosurfactant by marine bacterium *Pseudomonas stutzeri* (SSASM1). *Int. J. Env. Science Tech.*, 2018, 1 – 10.

Shida, K., Kiyoshima-Shibata, J., Kaji, R., Nagaoka, M., Nanno, M.: Peptidoglycan from lactobacilli inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through Toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. *Immunology*, 2009, 128, e858 – e869.

Schauber, J. a Gallo, R. L.: Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, 122, 2, 261 – 266.

Schmuth, M., Man, M. Q., Weber, F., Gao, W., Feingold, K. R., Fritsch, P., Elias, P. M., Holleran, W. M.: Permeability barrier disorder in Niemann-Pick disease: sphingomyelin-ceramide processing required for normal barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.*, 2000, 115, 459 – 466.

Sistek, D., Kelly, R., Wickens, K., Stanley, T., Fitzharris, P., Crane, J.: Is the effect of probiotics

on atopic dermatitis confined to food sensitized children? *Clin. Exp. Allergy*, 2006, 36, 629 – 633.

Sullivan, M., Schnittger, S. F., Mammone, T., Goyarts, E. C.: Skin treatment method with *Lactobacillus* extract. *US Patent*, 2009, US7510734B2 1655.

Sun, J., Shi, Y. H., Le, G. W., Ma, X. Y.: Distinct immune response induced by peptidoglycan derived from *Lactobacillus* sp. *World J. Gastroenterol.*, 2005, 11, 6330 – 6337.

Swann, D.A.: Studies on hyaluronic acid. *BBA*, 1968, 156, 17 – 30.

Tamime, A. Y.: *Probiotic Dairy Products*. Hoboken: Wiley Blackwell, 2008. 409 s.

Taylor, K. R., Trowbridge, J. M., Rudisill, J. A., Termeer, C. C., Simon, J. C., Gallo, R. L.: Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 17079 – 17084.

Trabucchi, E., Pallotta, S., Morini, M., Corsi, F., Franceschini, R., Casiraghi, A., Pravettoni, A., Foschi, D., Minghetti, P.: Low molecular weight hyaluronic acid prevents oxygen free radical damage to granulation tissue during wound healing. *Int. J. Tissue React.*, 2002, 24, 65 – 71.

Valdéz, J. C., Peral, M. C., Rachid, M., Santana, M., Perdigón, G.: Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: The potential use of probiotics in wound treatment. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2005, 11, 472 – 479.

Viljanen, M., Savilahti, E., Haahtela, T.: Probiotic effects on faecal inflammatory markers and on faecal IgA in food allergic atopic eczema/dermatitis syndrome infants. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2005, 16, 1, 65 – 71.

Wang, X.: A theory for the mechanism of action of the alpha-hydroxy acids applied to the skin. *Med. Hypotheses*, 1999, 53, 380 – 382.

Wang, Z., Macleod, D. T., Di Nardo, A.: Commensal bacteria lipoteichoic acid increases skin mast cell antimicrobial activity against vaccinia viruses. *J. Immunol.*, 2012, 189, 4, 1551 – 1558.

Weston, S., Halbert, A., Richmond, P.: Effects of probiotics on atopic dermatitis: A randomised controlled trial. *Arch. Dis. Child.*, 2005, 90, 892 – 897.

Wickens, K., Black, P. N., Stanley, T. V., Mitchell, E., Fitzharris, P., Tannock, G. W., Purdie, G., Crane, J.: A differential effect of 2 probiotics in the prevention of eczema and atopy: A double-blind, randomized, placebocontrolled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, 122, 4, 788 – 794.

Widner, B., Behr, R., Von Dollen, S., Tang, M., Heu, T., Sloma, A., Sternberg, D., Deangelis, P. L., Weigel, P.H., Brown, S.: Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71, 3747 – 3752.

Zutavern, A., Brockow, I., Schaaf, B.: Timing of solid food introduction in relation to atopic dermatitis and atopic sensitization: Results from a prospective birth cohort study. LISA Study Group. *Pediatrics*, 2006, 117, 2, 401 – 411.



ANTIFUNGÁLNY ÚČINOK VYBRANÝCH RASTLINNÝCH SILÍC NA *CANDIDA ALBICANS* SAMOSTATNE A V KOMBINÁCII S ANTIMYKOTIKAMI

ANTIFUNGAL EFFECT OF SELECTED ESSENTIAL OILS ON *CANDIDA ALBICANS* ALONE AND IN COMBINATION WITH ANTIMYCOTICS

Fečíková, N., Čonková, E.

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

eva.conkova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Liečba kandidóz sa v posledných rokoch stáva čoraz väčším problémom hlavne kvôli vzrastajúcej rezistencii patogénov. Viaceré štúdie poukazujú na synergický účinok dosiahnutý kombináciou silíc a antimykotík. Antifungálna aktivita dvoch antimykotík (itraconazol a nystatín) a dvoch silíc (škoricová a yzopová) voči izolátom *Candida albicans* bola testovaná pomocou štandardnej mikrodilučnej metódy M27-A3 (CLSI 2009). Vzájomná interakcia kombinácie antimykotík a silíc bola zisťovaná šachovnicovým testom. Pri testovaní samotných antimykotík bola zistená 77,3 % antifungálna aktivita itraconazolu. Avšak pri nystatíne bola pozorovaná 100 % rezistencia. Kombináciou itraconazolu so škoricovou silicou bol dosiahnutý indiferentný účinok pri 95,5 % izolátoch, s yzopovou silicou bol účinok však antagonistickejší (86,4 %). Výhodnejšou sa javí

kombinácia nystatínu so škoricovou silicou, pri ktorej bol zistený 100% aditívny účinok.

Pri kombinácii nystatínu s yzopovou silicou bol účinok indiferentný (95,5 %). Dosiahnuté výsledky poukazujú na význam testovania kombinácií konvečných antimykotík a silíc používaných s cieľom inhibície rastu *C. albicans*.

Kľúčové slová: antimykotiká; *Candida albicans*; rastlinné silice

ABSTRACT

Candidiasis treatment has become a bigger problem in recent years due to increasing resistance of pathogens. Many studies point out the synergic effect caused by the combination of essential oils and antimycotics. Antifungal activity of antimycotics (itraconazole and nystatin) and essential oils (cinnamon and hyssop) against *Candida albicans*

was tested by the standard microdilution method M27-A3 (CLSI 2009). Mutual interaction of antimycotics and essential oils combination was verified by checkerboard test. 77.3 % antifungal activity of itraconazole was found out during the testing of antimycotics. However, 100 % resistance was observed for nystatin. The indifferent effect of 95.5 % of samples was achieved by the combination of itraconazole with cinnamon oil, but with hyssopic oil the effect was antagonistic (86.4 %). The combination of nystatin and cinnamon oil was more useful – a 100 % additive effect was found. The indifferent effect (95.5 %) was reached by the combination of nystatin and hyssop essential oil. The results demonstrate the importance of testing of the combination of convective antimycotics and essential oils used for inhibition of the growth of *C. albicans*.

Key words: antimycotics; *Candida albicans*; essential oils

ÚVOD

Rod *Candida* predstavuje oportunistické mikroorganizmy, ktoré sa podieľajú na rôznych mykotických infekciách, známych ako kandidózy. Príčinou vzniku týchto infekcií sú zvyčajne hormonálne zmeny, terapia imunosupresívami alebo zmena prirodzenej mikroflóry (Tömölová a Zmrhal, 2005). Napriek tomu, že rod *Candida* zahŕňa viacero druhov, *C. albicans* je najčastejším patogénom schopným kolonizovať a napadnúť sliznice, príp. kožu a nechty (Silva a kol., 2016). Na terapiu kandidóz sa využívajú antimykotiká so systémovým alebo lokálnym účinkom, hlavne azoly (klotrimazol, itraconazol) a polyény (nystatín, amfotericín B).

Avšak v posledných rokoch je pozorovaný narastajúci vývoj rezistencie kvasiniek rodu *Candida* na tieto liečivá (Khan a kol., 2012). Mnoho odborníkov sa preto zameriava nielen na objavovanie nových liečiv s antimykotickými vlastnosťami, ale aj na hľadanie alternatívnych metód, ktoré sa môžu

uplatniť v liečbe kandidóz. Viaceré štúdie poukazujú na možnosť využitia prírodných látok s potenciálnymi antimykotickými vlastnosťami (Marcos-Arias a kol., 2011).

Predpokladá sa, že rastlinné silice ovplyvňujú bunkovú stenu, bunkovú membránu a narúšajú intracelulárne procesy, ktoré sú dôležité pre prežitie kandid (Shahina a kol., 2018). V súčasnosti sú vedecké práce zamerané na testovanie kombinácií syntetických a prírodných látok, s cieľom dosiahnuť lepšiu účinnosť liečby (de Castro a kol., 2015). Predmetom tejto štúdie bolo vyhodnotiť antifungálnu aktivitu vybraných rastlinných silíc (škoricová a yzopová) samostatne a v kombinácii s antimykotikami (itraconazol a nystatín) na izolátoch *C. albicans*.

MATERIÁL A METÓDY

In vitro experimenty boli vykonané na 22 izolátoch *C. albicans*, poskytnutých Ústavom lekárskej a klinickej mikrobiológie Univerzitnej nemocnice Louisa Pasteura v Košiciach a referenčnom kmeni *Candida albicans* CCM 8320 (Česká sbírka mikroorganizmů, Brno, Česká republika), ktorý slúžil na validáciu kvality testovania.

Na stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) rastlinných silíc a antimykotík bola použitá štandardná mikrodilučná metóda M27-A3 (CLSI 2009). Východzie koncentrácie ($400\ 000\ \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) rastlinných silíc, škoricová – *Cinnamomi aetheroleum* (*Cinnamomum zeylanicum*, Lauraceae) a yzopová – *Hyssopi aetheroleum* (*Hyssopus officinalis*, Lamiaceae) (Calendula a.s., Nová Ľubovňa, SR), boli pripravené vo forme emulzií s arabskou gumou, ktorá predstavovala 30 % z objemu silice. Sterilita emulzií bola zabezpečená prefiltrovaním cez $0,22\ \mu\text{m}$ sterilný filter. Na testovanie boli použité 96-jamkové sterilné mikrotitračné platničky, v ktorých bolo priamo vykonané dvojkové riedenie pripravených silíc, v rozpätí $400\ 000 - 800\ \mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$. Najprv bolo do jamiek č. 2 – 10 a č. 12 napipetované po $100\ \mu\text{l}$ SB (Sabouraud dextrózový bujón – SB, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Bombaj, India) a do jamky č. 11 (negatívna

kontrola) 200 µl SB. Do jamky č. 1 bola aplikovaná silica v množstve 200 µl silice a následne bolo 100 µl prenesených do jamky č. 2. Po premiešaní so SB bolo opäť 100 µl prenesených do jamky č. 3. Tento postup bol vykonávaný až po jamku č. 10, z ktorej zvyšných 100 µl bolo vyhodnených do odpadu. K nariedeným siliciam a do jamky č. 12 (pozitívna kontrola) bolo pridaných 100 µl inokula, s obsahom $1 - 5 \times 10^3$ CFU.ml⁻¹, pripraveného z jednotlivých izolátov kandid nariedených v SB. Výsledné koncentrácie silíc predstavovali 200 000 µg.ml⁻¹; 100 000 µg.ml⁻¹; 50 000 µg.ml⁻¹; 25 000 µg.ml⁻¹; 12 500 µg.ml⁻¹; 6250 µg.ml⁻¹; 3125 µg.ml⁻¹; 1562 µg.ml⁻¹; 800 µg.ml⁻¹ a 400 µg.ml⁻¹. Platničky boli inkubované v termostate 24 hodín pri 35 °C.

Obdobný postup bol použitý aj pri testovaní antimykotík. Keďže itraconazol a nystatín (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) sú látky nerozpustné vo vode, na prípravu základnej koncentrácie (1 600 µg.ml⁻¹) bol ako rozpúšťadlo použitý dimetyl sulfoxid – DMSO (Lachema, Neratovice, Česká republika). Dvojkovým riedením v SB boli zo základného roztoku pripravené koncentrácie od 32 µg.ml⁻¹ do 0,0625 µg.ml⁻¹, ktoré sa po pridaní 100 µl inokula pohybovali od 16 µg.ml⁻¹ do 0,0313 µg.ml⁻¹.

Hodnoty MIC testovaných rastlinných silíc a antimykotík boli vyhodnotené vizuálne, na základe prítomnosti, resp. absencie zákalu v jamkách, ktoré sme porovnávali s pozitívnu a negatívnu kontrolou. Ak zákal nebol prítomný, látka bola účinná. V prípade tvorby zákalu boli testované antifungálne látky považované za neúčinné, čiže kvasinka bola rezistentná. Pre vizuálne hodnotenie bola použitá nasledovná numerická škála: 0 – opticky čistá jamka, 1 – mierny zákal, 2 – výrazné zníženie zákalu, 3 – slabá redukcia zákalu, 4 – žiadna redukcia zákalu (M27-A3; CLSI, 2009). Hodnoty MIC pre nystatín a silice boli odčítané v jamke s opticky čistým médiom. Pre odčítanie hodnôt MIC itraconazolu bola použitá numerická škála 2. Citlivosť izolátov *C. albicans* a referenčného kmeňa na itraconazol bola vyhodnotená podľa interpretačných kritérií M27-A3: citlivý (S), ak bola MIC ≤ 0,125 µg.ml⁻¹; citlivý v závislosti

na dávke (S-DD), ak bola MIC 0,25 – 0,5 µg.ml⁻¹ a rezistentný (R), ak bola MIC ≥ 1 µg.ml⁻¹. Pri nystatíne boli použité kritériá podľa Nelsona a kol. (2013): citlivý (S), ak bola MIC ≤ 1 µg.ml⁻¹ a rezistentný (R) ak bola MIC > 1 µg.ml⁻¹.

Efektivita kombinácie antimykotík a silíc bola zisťovaná prostredníctvom stanovenia indexu frakčnej inhibičnej koncentrácie (FICI), na základe testovania pomocou šachovnicového testu. Interakcia medzi týmito látkami sa hodnotí ako synergický, aditívny, indiferentný alebo antagonistický účinok.

Koncentrácie itraconazolu pri testovaní kombinácií so silicami zodpovedali MIC90 x 8; MIC90 x 4; MIC90 x 2; MIC90; MIC90 : 2; MIC90 : 4; MIC90 : 8; MIC90 : 16; MIC90 : 32 a MIC90 : 64. Pre nystatín boli vybraté nasledovné koncentrácie: MIC90 x 2; MIC90; MIC90 : 2; MIC90 : 4; MIC90 : 8; MIC90 : 16; MIC90 : 32; MIC90 : 64; MIC90 : 128 a MIC90 : 256.

Yzopová a škoricová silica boli testované v koncentráciách zodpovedajúcich MIC90 x 16; MIC90 x 8; MIC90 x 4; MIC90 x 2; MIC90; MIC90 : 2; MIC90 : 4; MIC90 : 16.

Jednotlivé koncentrácie antimykotík boli do platničky pridávané v množstve 50 µl vertikálne, zatiaľ čo silice boli aplikované v rovnakom objeme (50 µl) horizontálne. Takto bola zabezpečená kombinácia každej koncentrácie silice s každou koncentráciou antimykotika a opačne. K testovaným látkam bolo následne pridané inokulum, 100 µl. Po 24 hodinovej inkubácii pri 35 °C bola odčítaná minimálna inhibičná koncentrácia kombinácie (MICC). Hodnoty MIC a MICC boli použité pre výpočet FICI:

$$FICI = \frac{MICC}{MIC} \text{ silica} + \frac{MICC}{MIC} \text{ antimykotikum}$$

Na základe FICI boli výsledky interpretované nasledovne: synergický účinok (FICI < 0,5), aditívny účinok (FICI 0,5 – < 1,0), indiferentný účinok (FICI ≥ 1,0 – < 4,0), antagonistický účinok (FICI > 4,0) (Silva a kol., 2016).

Tab. 1: MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) vybraných rastlinných silíc a antimykotík a ich štatistické vyhodnotenie

Parameter	Škorica	Yzop	Itrakonazol	Nystatín
min-max	400	400	0,03 – 4	2
x	400	400	0,56	2
SD	0	0	0,90	0
Mo	400	400	0,125	2
Me	400	400	0,19	2
MIC50	400	400	0,25	2
MIC90	400	400	1	2
Citlivosť (n/%)				
S	–	–	11/50	0/0
S-DD	–	–	6/27,3	0/0
R	–	–	5/22,7	22/100

min-max – rozpätie minimálnych a maximálnych hodnôt MIC, x – aritmetický priemer, SD – smerodajná odchýlka, Mo – modus, Me – medián, MIC50 a MIC90 – koncentrácie, označujúce 50 % a 90 % izolátov, ktoré boli inhibované; S – citlivé, S – DD – citlivé v závislosti od dávky, R – rezistentné, n – počet

Výsledky práce boli spracované štatisticky prostredníctvom Excel Microsoft Office 2003. Pri MIC sme hodnotili aritmetický priemer (x), smerodajnú odchýlku (SD), modus (Mo) a medián (Me).

VÝSLEDKY

Hodnoty MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) vybraných silíc a antimykotík a ich štatistické spracovanie prezentuje tabuľka 1.

Pri všetkých izolátoch *C. albicans* bola pri škoricovej aj yzopovej silici zistená rovnaká hodnota MIC: $400 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Podobne pri nystatíne hodnota MIC bola rovnaká: $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$. MIC itrakonazolu sa pohybovala v rozpätí $0,03 - 4 \mu\text{g.ml}^{-1}$, s MIC90 $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Na základe interpretačných kritérií boli všetky izoláty na nystatín rezistentné (100 %). Na itrakonazol vykazovalo citlivosť 11 izolátov (50 %), v závislosti od dávky bolo citlivých 6 izolátov (27,3 %) a 5 izolátov (22,7 %) bolo rezistentných.

MIC itrakonazolu pri referenčnom kmeni *C. albicans* CCM 8320, použitého na kontrolu kvality testovania, bola $0,03 \mu\text{g.ml}^{-1}$, čo je v zhode s interpretačnými kritériami metódy M27-A3.

Tabuľka 2 dokumentuje štatistické spracovanie údajov MICC (minimálna inhibičná koncentrácia kombinácie), získaných pri testovaní kombinácie itrakonazolu so škoricovou, resp. yzopovou silicou.

MICC itrakonazolu v kombinácii so škoricovým esenciálnym olejom dosahovala $0,015 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a v kombinácii s yzopovou silicou bola v rozpätí $0,015 - 0,125 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Hodnoty MICC škoricovej silice sa pohybovali od 400 do $800 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a pri yzopovej silici od 800 do $3130 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

Vyhodnotenie účinnosti kombinácie itrakonazolu a silíc na základe FIC indexu uvádza tabuľka 3.

Pri kombinácii itrakonazolu so škoricovou silicou nebol ani v jednom prípade zistený synergický účinok. Jedna vzorka (4,5 %) vykazovala aditívny účinok a pri zvyšných 21 izolátoch (95,5 %) bol účinok indiferentný. Pri kombinácii itrakonazolu s yzopovou silicou bol až pri 19 kmeňoch (86,4 %) zaznamenaný antagonistický účinok. Pri troch vzorkách (13,6 %) bol účinok indiferentný.

Popisnú štatistiku výsledkov MICC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) získaných pri kombinácii nystatínu s testovanými silicami dokumentuje tabuľka 4. Hodnoty MICC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) nystatínu sa pohybovali od 0,008 do $0,016 \mu\text{g.ml}^{-1}$. MICC pri škoricovej silici dosahovala 400

Tab. 2: Vyhodnotenie MICC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) itrakonazolu a silíc

Parameter	Itrakonazol	Škorica	Itrakonazol	Yzop
min-max	0,015	400 – 800	0,015 – 0,125	800 – 3130
x	0,015	440	0,025	1780
SD	0	100	0,03	700
Mo	0,015	400	0,015	1600
Me	0,015	400	0,015	1600

min-max – rozpätie minimálnych a maximálnych hodnôt MIC, x – aritmetický priemer, SD – smerodajná odchýlka, Mo – modus, Me – medián

Tab. 3: Vyhodnotenie účinnosti (%) kombinácie itrakonazolu so silicami

FICI	Itrakonazol	
	Škorica (n/%)	Yzop (n/%)
<0,5 synergický účinok	0/0	0/0
0,5 – < 1,0 aditívny účinok	1/4,5	0/0
$\geq 1,0$ – < 4,0 indiferentný účinok	21/95,5	3/13,6
>4,0 antagonistický účinok	0/0	19/86,4

FICI – index frakčnej inhibičnej koncentrácie

Tab. 4: Vyhodnotenie MICC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) nystatínu a silíc

Parameter	Nystatín	Škorica	Nystatín	Yzop
min-max	0,008	400	0,008 – 0,016	800 – 3120
x	0,008	400	0,009	1700
SD	0	0	0,00	500
Mo	0,008	400	0,008	1600
Me	0,008	400	0,008	1600

min-max – rozpätie minimálnych a maximálnych hodnôt MIC, x – aritmetický priemer, SD – smerodajná odchýlka, Mo – modus, Me – medián

Tab. 5: Vyhodnotenie účinnosti (%) kombinácie nystatínu a testovaných silíc

FICI	Itrakonazol	
	Škorica (n/%)	Yzop (n/%)
<0,5 synergický účinok	0/0	0/0
0,5 – < 1,0 aditívny účinok	22/100	0/0
$\geq 1,0$ – < 4,0 indiferentný účinok	0/0	21/95,5
>4,0 antagonistický účinok	0/0	1/4,5

FICI – index frakčnej inhibičnej koncentrácie

$\mu\text{g.ml}^{-1}$ a pri yzopovej silici bola v rozpätí 800 – 3120 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Účinnosť nystatínu v kombinácii so silicami vyhodnocuje tabuľka č. 5. Kombináciou nystatínu so škoricovou silicou bol dosiahnutý 100% aditívny účinok. Avšak pri kombinácii s yzopovou silicou bol účinok prevažne indiferentný (95,5 %). Antagonistický účinok bol zaznamenaný iba pri jednej vzorke (4,5 %).

DISKUSIA

Lieky na báze itrakonazolu a nystatínu sú v klinickej praxi pomerne často používané. Kým itrakonazol ako zástupca azolových antimykotík sa uplatňuje v terapii systémových i topických kandidóz, polyénové antimykotikum nystatín je pre svoju toxicitu preferovaný na lokálne použitie. Fungistatický účinok itrakonazolu spočíva v inhibícii 14- α -demetylázy, v dôsledku čoho sa narušuje biosyntéza ergosterolu, významného komponentu bunkovej membrány, čo sa prejaví hromadením toxických sterolov, poruchami tvorby bunkovej membrány a následným zastavením rastu bunky (Buchta a kol., 2009). Rovnako nystatín pôsobí v bežných koncentráciách fungistaticky. Jeho účinok je založený na vytvorení väzby s ergosterolom fungálnych buniek. To má za následok tvorbu pórov, cez ktoré unikajú z bunky ióny a esenciálne makromolekuly, čo vedie k jej zániku (Mirossay a kol., 2009). V poslednej dobe sa zistilo, že časté používanie antimykotík s rovnakým mechanizmom účinku je príčinou zvýšeného nárastu rezistentných kmeňov kandid. Preto u pacientov nereagujúcich na liečbu konvenčnými antimykotikami alebo v prípade opakujúcich sa kandidóz je potrebné hľadať vhodnú náhradnú liečbu (Katirae a kol., 2017).

Prírodné produkty tvoria bohatý zdroj bioaktívnych látok, pri ktorých viaceré štúdie potvrdzujú antimykotický účinok (Silva a kol., 2016).

V našej štúdii bola otestovaná antifungálna aktivita škoricovej a yzopovej silice samostatne a v kombinácii s itrakonazolom a nystatínom.

Antifungálny efekt škoricovej silice sa pripisuje

tróm hlavným komponentom, transcinnamaldehydu, eugenolu a linaloolu, ktoré predstavujú až 82,5 % z celkového zloženia, a ktoré sa zrejme podieľajú na zmene permeability bunkovej membrány kvasiniek. Bolo zistené, že transcinnamaldehyd spôsobuje stenčenie bunkovej steny *Candida albicans* v dôsledku inhibície β -1-3 glukósyntetázy. Rovnako eugenol a linalool zasahujú do integrity bunkovej membrány (Shahina a kol., 2018). Kombináciou itrakonazolu so škoricovou silicou bol pozorovaný v našom experimente indiferentný účinok (95,5 %). Napriek tomu, že priemerná hodnota MICC kombinovaného itrakonazolu bola nižšia ($0,015 \mu\text{g.ml}^{-1}$) ako pri testovaní samotného itrakonazolu (priemerná MIC = $0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$), hodnoty MICC škoricovej silice boli vyššie ($440 \mu\text{g.ml}^{-1}$) ako MIC samotnej silice ($400 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Výhodnejšiu kombináciu predstavuje škoricová silica s nystatínom, pri ktorej bol zaznamenaný 100 % aditívny účinok. Kým priemerná hodnota MIC nystatínu dosahovala $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$, v kombinácii so škoricovou silicou sa výrazne znížila (MICC = $0,008 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Priemerné hodnoty MIC a MICC ostali nezmenené ($400 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Podobne, ako v našom experimente, aj de Castro a kol. (2013) zistili potenciačný účinok kombinácie škoricovej silice a nystatínu pri inhibícii rastu *C. albicans*.

Pri nami testovaných vzorkách kandid bola pozorovaná pomerne dobrá citlivosť aj na yzopovú silicu samotnú (MIC = $400 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Hlavnými zložkami silice sú *cis*-pinokamfón, β -pinén, *trans*-pinokamfón a β -felandrén. Jej účinok závisí od množstva látok, ktoré obsahuje. Zistilo sa, že komponenty obsiahnuté v yzopovom esenciálnom oleji vykazujú silnejší antikandidózný účinok ako samotná silica. Antimykotický účinok silice je pripisovaný obsahovým látkam, ktoré zvyšujú permeabilitu bunkovej membrány kvasiniek a narušujú normálny membránový transport (Hristova a kol., 2015). Pri kombinácii yzopovej silice s itrakonazolom bol indiferentný účinok zaznamenaný pri 95,5 % vzorkách, ale v kombinácii s nystatínom bol účinok antagonistický až pri 86,5 % izolátoch. Keďže v dostupnej literatúre nie sú doposiaľ známe

výsledky s takouto kombináciou, vyžadujú sa ďalšie testovania pre objasnenie tohto účinku.

ZÁVER

Napriek tomu, že ani pri jednej kombinácii testovaných silíc a antimykotík nebol zistený synergický účinok, je možné považovať výsledky nášho experimentu z hľadiska rozšírenia poznatkov v tejto oblasti za prínosné. Získané výsledky vytvárajú priestor pre ďalšie možnosti zisťovania efektivity kombinácie antimykotických syntetických a prírodných látok.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-15-0377.

ZOZNAM LITERATÚRY

Buchta, V., Slezák, R., Špaček, J., Košťálová, M., Vejsová, M., Doležal, M.: Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. *Medicína pro praxi*, 2009, 6, 155 – 164.

CLSI. Clinical and laboratory standards institute. National committee for clinical laboratory standards: reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard – second edition. *NCCLS global consensus standard*. 2009, 22.

de Castro, R. D., de Souza, T. M., Bezerra, L. M., Ferreira, G. L., Costa, E. M., Cavalcanti, A. L.: Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 15, 417.

Hristova, Y., Wanner, J., Jirovetz, L., Stappen, I., Iliev, I., Gochev, V.: Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Hyssopus*

officinalis L. from Bulgaria against clinical isolates of *Candida* species. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015, 29, 592 – 601.

Katiraei, F., Ahmadi, A. S., Rahimi Pirmahalleh, S. F., Shokri, H.: In vitro antifungal activity of essential oils extracted from plants against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans*. *Current Medical Mycology*, 2017, 3, 1 – 6.

Khan, M. S., Malik, A., Ahmad, I.: Anticandidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Med. Mycol.*, 2012, 50, 33 – 42.

Marcos-Arias, C., Eraso, E., Madariaga, L., Quindós, G.: In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complement. Alter. Med.*, 2011, 11, 119 – 123.

Mirossay, L., Mojžis, J. a kol.: Základná farmakológia a farmakoterapia. 2.vyd. Košice: Equilibria, s.r.o., 2009. 533 s.

Nelson, M., Wanjiru, W. M., Margaret, M.: Identification and susceptibility profile of vaginal *Candida* species to antifungal agents among pregnant women attending the Antenatal Clinic of Thika District Hospital, Kenya. *Open Journal of Medical Microbiology*, 2013, 3, 239 – 247.

Shahina, Z., El-Ganiny, A. M., Minion, J., Whiteway, M., Sultana, T., Dahms, T. E. S.: *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil induces cell wall remodelling and spindle defects in *Candida albicans*. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2018, 5, 16.

Silva, I. C. G., Pontes Santos, H. B., Cavalcanti, Y. W., Nonaka, C. F. W., Sousa, A., Castro, R. D.: Antifungal activity of eugenol and its association with nystatin on *Candida albicans*. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 2016, 17, 3235.

Tömölová Z. a Zmrhal, J.: Mykotické vulvovaginitidy v našich ambulanciách. *Prakt. Gyn.*, 2005, 9, 35 – 39.



NOVÉ TRENDY FARMAKOTERAPIE DIABETES MELLITUS 2. TYPU

NEW TRENDS IN PHARMACOTHERAPY OF DIABETES MELLITUS TYPE 2

Gazdová, M., Bačkorová, M.

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

miriam.backorova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Diabetes mellitus patrí medzi závažné metabolické ochorenia, pri ktorom sú pacienti odkázaní na celoživotnú terapiu. Dodržiavanie terapeutického režimu je kľúčovým faktorom určujúcim úspešnosť terapie. V súčasnosti máme k dispozícii nové terapeutické prístupy v liečbe diabetes mellitus, predovšetkým diabetes mellitus 2. typu, ktoré sa vyznačujú vysokou účinnosťou, nízkym výskytom nežiaducich účinkov a pozitívnou komplianciou pacientov. Cieľom predloženej štúdie bolo vyhodnotiť údaje získané zo sledovania spotreby najnovších liečiv používaných v terapii diabetes mellitus 2. typu vo vybranej verejnej lekárni v Košiciach za obdobie 7 rokov. Na základe získaných výsledkov, ktoré poukazujú na nárast preskripcie najnovších antidiabetických preparátov, sme vybrali kazuistiku pacientky za účelom analýzy jej farmakoterapie. Zavedením inhibítorov sodíkovo-glukózového kotransportéra

2 (SGLT-2) do terapie diabetes mellitus 2. typu sa zlepšila adherencia k terapii a zvýšila kvalita života pacientky. Z predloženej štúdie vyplýva, že efektívna terapia diabetes mellitus 2. typu je náročná a je nevyhnutné hľadať stále nové a účinnejšie terapeutické prístupy v každodennej klinickej praxi.

Kľúčové slová: agonisty GLP-1; diabetes mellitus 2. typu; inhibítory DPP-IV; inhibítory SGLT-2

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a group of major metabolic diseases in which patients rely on a lifelong therapy. The key factor of successful therapy is to comply with the therapeutical conditions. Nowadays, there are new therapeutic approaches in the treatment of diabetes mellitus, particularly diabetes mellitus type 2, which are characterized

by high efficacy, low incidence of adverse effects and positive compliance of patients. The objective of the study was to evaluate the data obtained from monitoring the usage of the newest drugs used in the treatment of diabetes mellitus type 2 in the selected Pharmacy in Košice in the period of 7 years. Based on the obtained results, which suggest an increase in the prescription of the most recent antidiabetic preparations, we selected a case study of a patient to analyze her pharmacotherapy. The initiation of sodium-glucose co-transporter -2 inhibitors (SGLT-2) in therapy of diabetes mellitus type 2 improved adherence to the therapy and improved the quality of the patient's life. The result of the presented study is that an effective therapy of diabetes mellitus type 2 is challenging and it is necessary to look for new and more effective therapeutic approaches in everyday clinical practice.

Key words: diabetes mellitus type 2; DPP-IV inhibitors; GLP-1 receptor agonists; SGLT-2 inhibitors

ÚVOD

Diabetes mellitus (DM) je chronický metabolický syndróm porušeného metabolizmu glukózy. Zahŕňa absolútnu alebo relatívnu poruchu sekrécie inzulínu, prípadne obe poruchy (ADA, 2014). Pojem diabetes mellitus 2. typu (DM 2. typu) sa používa pre pacientov, u ktorých sa v patogenéze ochorenia v rôznom vzájomnom pomere zúčastňujú dva hlavné mechanizmy: 1. znížená citlivosť tkanív na inzulín a 2. kvalitatívne a kvantitatívne poruchy sekrécie inzulínu. Všetky tieto poruchy môžu byť výsledkom viacerých abnormalít, ktoré sú podmienené geneticky a umocnené faktormi prostredia, kde dôležitú úlohu zohráva stres, nadmerný energetický príjem, nesprávne kvalitatívne zloženie potravy, nedostatočná fyzická aktivita a civilizačné zlovyky. DM 2. typu sa vyskytuje v dospelom veku, zvyčajne po 35. – 40. roku života, často nenápadne. Diagnostika je neraz

náhodná a neskorá (Goyal R. a kol., 2018).

K základným laboratórnym nástrojom diagnostiky DM patrí meranie glykémie (nalačno $< 6,1 \text{ mmol.l}^{-1}$ a na konci druhej hodiny po záťaži orálnou glukózou $< 7,8 \text{ mmol.l}^{-1}$), orálny glukózotolerančný test (oGTT), meranie koncentrácie glukózy v moči (glykozúria) a meranie glykovaného hemoglobínu (HbA_{1c}). Hlavným znakom DM je hyperglykémia. Medzi prejavy spájajúce sa s hyperglykémiou patrí únava, malátnosť, polyúria, suchosť v ústach, smäd, polydipsia, úbytok hmotnosti, rozmazané videnie, zlé hojenie rán, suchosť kože, svrbenie pokožky, impotencia a opakované infekcie (ADA, 2014). Pri DM 2. typu, sa príznaky vôbec nemusia prejaviť, resp. sú menej intenzívne, vyvíjajú sa pomaly a pacient si na nich postupne zvyká. Prvými prejavmi pri DM 2. typu sú často až príznaky z rozvíjajúcich sa mikrovaskulárnych a makrovaskulárnych komplikácií (Mokán a kol., 2008).

Od roku 1980 do roku 2014 vzrástol počet ľudí s DM zo 108 miliónov na 422 miliónov. Globálna prevalencia DM medzi dospelými jedincami nad 18 rokov vzrástla od roku 1980 z 4,7 % na 8,5 % v roku 2014. Výskyt DM je výraznejší v krajinách s nízkym a stredným príjmom. DM je hlavnou príčinou slepoty, zlyhania obličiek, infarktu myokardu, mŕtvice a amputácie končatín. V roku 2015 bolo 1,6 milióna úmrtí zapríčinených DM a v roku 2012 bolo 2,2 milióna úmrtí v dôsledku vysokej hladiny glukózy v krvi. Takmer polovica úmrtí v dôsledku vysokej hladiny glukózy v krvi sa objavila ešte pred dovŕšením 70 rokov života. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) predpokladá, že DM bude v roku 2030 siedmou hlavnou príčinou úmrtí vo svete (WHO, 2016).

Na Slovensku bol v roku 2011 publikovaný Algoritmus liečby DM 2. typu v klinickej praxi, toto znenie je aktuálne aj v roku 2018 (Schroner a kol., 2015). Jeho základnou filozofiou je nasadenie terapie podľa hodnôt HbA_{1c} . Podľa metabolickej kompenzácie je možné rozdeliť začiatok, prípadne úpravu terapie DM 2. typu do 3 skupín v rozmedzí HbA_{1c} 6,5 – 7,5 %; 7,6 – 9,0 % a nad 9,0 %. Algoritmus

vychádza z údajov medicíny založenej na dôkazoch, odráža aktuálne prístupy v medzinárodných algoritmoch a rešpektuje indikačné obmedzenia Slovenskej republiky platné k 1. 10. 2011 (Uličiansky a kol., 2011).

Väčšina štandardných perorálnych antidiabetík je vhodná na úvodnú terapiu (HbA_{1c} 6,5 – 7,5 %) so zohľadnením kontraindikácií, ktoré môžu nastať u konkrétného pacienta. Metformín, sulfonylureové deriváty, glinidy, tiazolidíndióny, agonisty glukagónu podobného peptidu 1 (GLP-1) a inhibítory dipeptidylpeptidázy IV (DPP-IV) majú porovnateľnú účinnosť pri danej úvodnej hodnote HbA_{1c} . Terapia týmito liečivami sa má začať spolu s úpravou životného štýlu v čase diagnózy. Pridanie ďalšieho antidiabetika (HbA_{1c} 7,6 – 9,0 %) závisí od zvolenej iniciálnej terapie. Ak sa terapia začala metformínom, potom u pacientov s duálnym deficitom (inzulínová rezistencia + deficit inzulínu) je vhodné pridať sulfonylureový derivát, prípadne repaglinid. U pacientov s výraznou inzulínovou rezistenciou do úvahy prichádza pridanie pioglitazónu. Pridanie agonistov GLP-1 receptorov prichádza do úvahy hlavne u pacientov s obezitou. Vo väčšine prípadov sa terapia založená na účinku inkretínov používa v kombinácii s metformínom a je možné ju bezpečne kombinovať s tiazolidíndiónom. Inhibítory DPP-IV sú porovnateľne účinné, nevyvolávajú hypoglykémiu, sú hmotnostne neutrálne a majú zriedkavé nežiaduce účinky. Inhibítory SGLT-2 sa používajú hlavne v dvojkombinácii a v trojkombinácii. Podľa indikačného obmedzenia sa terapia môže indikovať u dospelých pacientov s DM 2. typu pri nedostatočnej glykemickej kompenzácií ($HbA_{1c} \geq 7\%$), v kombinácii s metformínom a sulfonylureovým derivátom alebo v kombinácii s inzulínom a metformínom (Schroner a kol., 2015).

Pri hodnotách $HbA_{1c} > 9,0\%$, ak pacient nemá výrazné klinické príznaky a jeho celkový stav je stabilizovaný, je možné začať s dvojkombináciou liečiv s rôznym mechanizmom účinku pri starostlivom monitorovaní glykémie a s rýchlou titráciou dávky. U symptomatického pacienta je najúčinnnejším

spôsobom zlepšenia metabolickej kompenzácie terapia inzulínom. Po úvodnej metabolickej kompenzácií a zlepšení glukotoxicity a lipotoxicity dochádza k postupnému poklesu požiadaviek na inzulín a metabolická kontrola v niektorých prípadoch môže byť udržiavaná perorálnymi antidiabetikami v monoterapii alebo v kombinovanej terapii. Liečivá schválené na kombináciu s inzulínom sú metformín, sulfonylureové deriváty, tiazolidíndióny, glinidy, inhibítory DPP-IV a inhibítory SGLT-2. Optimálny časový prechod z jednotlivých úsekov algoritmu sú 3 mesiace. V indikačných obmedzeniach Slovenskej republiky je pri väčšine liekov udávaný časový údaj 6 mesiacov (Uličiansky a kol., 2011). Predložená štúdia analyzuje vývoj preskripcie najnovších liečiv používaných v terapii DM 2. typu a popisuje terapiu pacientky s DM 2. typu, ako aj prehľad laboratórnych nálezov, ktoré dokázali účinnosť terapie novými liečivami.

MATERIÁL A METÓDY

Výsledky analýzy preskripcie liečiv používaných v terapii DM 2. typu boli zisťované rozborom lekárskeho predpisu sprístupnených verejnou lekárnou v Košiciach a vyhodnotené pomocou lekárenského počítačového programu FeMA, s. r. o. Prostredníctvom programu boli vyfiltrované recepty za obdobie od 1. 1. 2011 do 31. 12. 2017, na ktorých bola podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb (MKCH-10) uvedená diagnóza Diabetes mellitus 2. typu (E11). Celkovo bolo analyzovaných 17 247 receptov. Do analýzy boli zahrnuté liečivá používané v konvenčnej terapii (metformín, gliklazid, pioglitazón) a nové antidiabetiká zo skupiny agonistov GLP-1 (exenatid, liraglutid), inhibítorov DPP-IV (linagliptín, sitagliptín, vildagliptín) a inhibítorov SGLT-2 (dapagliflozín, empagliflozín). Kazuistika bola získaná v spolupráci so súkromnou diabetologickou ambulanciou v Košiciach. Pri spracovaní údajov sa postupovalo v zmysle zákona o ochrane osobných údajov.

Tab. 1: Vývoj preskripcie jednotlivých predstaviteľov antidiabetík

LIEČIVO	ROK							SPOLU (n)
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	
Metformín	1554	1570	1643	1666	1683	1600	1696	11412
Gliklazid	545	535	575	670	640	573	577	4115
Pioglitazón	170	91	107	59	30	45	63	565
Exenatid	1	0	0	0	0	33	9	43
Liraglutid	3	6	24	17	22	8	7	87
Linagliptín	0	20	16	21	29	29	38	153
Sitagliptín	79	41	50	64	79	78	93	484
Vildagliptín	33	12	4	8	13	44	110	224
Dapagliflozín	0	0	0	17	34	12	23	86
Empagliflozín	0	0	0	0	7	34	37	78
SPOLU (n)	2385	2275	2419	2522	2537	2456	2653	17247

n – celkový počet analyzovaných receptov

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýza receptov preukázala nárast preskripcie nových skupín liečiv používaných v terapii DM 2. typu (viď tab. 1). Výhodou nových skupín antidiabetík sú minimálne nežiaduce účinky (nauzea, vomitus, bolesť hlavy). Podávajú sa 1-krát denne a ich užívanie nevedie k zvyšovaniu hmotnosti (Vlček a kol., 2010). Tabuľka 1 dokumentuje najvyššiu preskripciu inhibítorov DPP-IV. Liečivom prvej voľby pri preskripcii z tejto skupiny antidiabetík je sitagliptín. Národné centrum zdravotníckych informácií v 3. štvrtroku 2017 zverejnilo štatistiku Top 50 liekov vybraných na recept hrađených z verejného zdravotného poistenia podľa úhrady zdravotných poisťovní, v ktorej na 18. mieste figuroval prípravok Janumet 50 mg/1000 mg/196 tbl. (sitagliptín + metformín) a na 42. mieste preparát Januvia 100mg/ 98 tbl. (sitagliptín). Ostatné farmakoterapeutiká, agonisty GLP-1 a inhibítory SGLT-2, boli predpisované sporadicky.

Kazuistika pacientky a DM 2. typu

V roku 2005 navštívila diabetologickú ambulanciu v Košiciach tehotná žena vo veku 27 rokov na odporúčanie gynekológa. Pacientka absolvovala

oGTT so 75 g glukózy. Laboratórne výsledky potvrdili gestačný DM (glykémia nalačno 9,1 mmol.l⁻¹). Následne bol pacientke odporúčaný diétny režim. Medicínska nutričná terapia je kľúčovým aspektom v manažmente a starostlivosti o diabetika. Jej cieľom je zabezpečiť diabetikovi taký príjem živín a takého charakteru, aby sa čo najviac priblížil normálnemu metabolickému stavu. Nutričná intervencia by mala zabezpečiť redukciu diabetických komplikácií, a teda morbiditu a mortality (Drury a kol., 2005). Rodinná anamnéza: matka sa liečila na DM 2. typu. Osobná anamnéza: pacientka bola vydatá, s hmotnosťou 101 kg a indexom telesnej hmotnosti (BMI) 35,79 kg/m² – obezita. Po 4 rokoch, v januári 2009, pacientka opäť navštívila diabetologickú ambulanciu. Laboratórne vyšetrenie ukázalo hodnotu glykémie nalačno 7,6 mmol.l⁻¹ a hodnotu HbA_{1c} 6,29 %. Podľa MKCH-10 bola pacientke stanovená diagnóza Diabetes mellitus typ 2 s bližšie neurčenými komplikáciami, kompenzovaný (E 11.80). Pacientke bola indikovaná terapia metformínom per orálne 1 x 500 mg večer. Metformín sa pokladá za úvodné farmakum pri terapii DM 2. typu a je to vo všeobecnosti dobre tolerované liečivo (Kvapil, 2006). V rámci terapie metformínom dochádzalo od roku 2009 do roku

2013 len k úprave dávkovania a počtu tabliet. V apríli 2013 došlo k výraznému zhoršeniu jej zdravotného stavu: glykémia nalačno $11,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, HbA_{1c} 9,8 % a tlak krvi 140/90 mmHg. Pacientke bola indikovaná per orálna terapia metformínom 2 x 1000 mg denne v kombinácii s vildagliptínom 2 x 50 mg denne. Diabetológ pacientke doporučil oftalmologické a angiologické vyšetrenie. Výsledky vyšetrení nezaznamenali známky komplikácií diabetu. Po 2 mesiacoch liečby sa pacientka sťažovala na pocit únavy, zvýšený pocit hladu a neuspokojivú redukciu telesnej hmotnosti. Väčšina nežiaducich reakcií na inhibítory DPP-IV je mierna a prechodná a nevyžaduje si ukončenie terapie. Dôvodom na zmenu terapie je nedostatočná kompenzácia diabetu (Mokáň a kol., 2008). Lekár v liečbe nahradil vildagliptín exenatidom subkutánne 1 x 2 mg týždenne. Pacientkin zdravotný stav sa nezlepšoval a v máji 2014 bola nastavená na trojkombináciu liečiv metformín 1 x 1000 mg ráno a 1 x 2000 mg večer, gliklazid 1 x 60 mg ráno perorálne a liraglutid 1 x 0,6 mg denne subkutánne (po jednom týždni zvýšiť dennú dávku na 1 x 1,2 mg). Na začiatku terapie liraglutidom pacientka kontaktovala diabetologickú ambulanciu z dôvodu pocitu nauzey a vertiga. Diabetológ jej odporučil znížiť dennú dávku liečiva na 1 x 0,6 mg subkutánne a merať tlak krvi. Vedľajšie účinky po určitom čase ustúpili. Výsledky metaanalýzy ohľadom účinnosti a bezpečnosti pri podávaní liraglutidu v kombinácii s metformínom oproti placebo alebo glimepiridu, v kombinácii s metformínom u jedincov doposiaľ liečených perorálnymi antidiabetikami poukazujú, že hodnoty HbA_{1c} boli v porovnaní s placebom významne znížené vo všetkých skupinách pacientov, kde bol aplikovaný liraglutid. Telesná hmotnosť sa znížila u všetkých skupín pacientov liečených s liraglutidom (1,8 – 2,8 kg), v skupinách pacientov liečených s glimepiridom došlo k nárastu hmotnosti (o 1 kg). Výskyt ľahkých hypoglykemických príhod v skupine pacientov užívajúcich liraglutid (3 %) bol porovnateľný s placebom, ale menší ako v skupine pacientov s indikovaným glimepiridom (17 %). Nauzea bola pozorovaná v 11 – 19 % v skupine

pacientov liečených liraglutidom oproti 3,4 % v skupine pacientov užívajúcich placebo a glimepirid (Kvapil, 2010). Koncom roka 2015 bol pacientke v terapii liraglutid nahradený lixisenatidom 1 x 10 g denne subkutánne (po 14 dňoch mala zvýšiť dennú dávku na 1 x 20 μg). Po aplikácii lixisenatidu pacientka popisovala pretrvávajúcu tachykardiu a začiatkom roka 2016 jej bola opäť zmenená terapia na trojkombináciu liečiv metformín 2 x 1000 mg denne, gliklazid 2 x 60 mg denne perorálne a exenatid 1 x 2 mg týždenne subkutánne. Pacientkin zdravotný stav sa naďalej zhoršoval, inhibítory GLP-1 nepriniesli žiadany efekt, do terapie jej bol pridaný inhibítor SGLT-2. Inhibítory SGLT-2 znižujú reabsorpciu glukózy v proximálnom tubule obličiek, zvýši sa vylučovanie glukózy močom a osmotická diuréza s následným znížením hyperglykémie. Vylučovaním glukózy močom dochádza k strate energie, k zníženiu hmotnosti, k osmotickej diuréze a k zvýšeniu objemu moču (Bakris a kol., 2009). Riziko klinicky významných interakcií je nízke. Inhibítory SGLT-2 sa používajú hlavne v dvojkombinácii a v trojkombinácii (Schroner a kol., 2015). Od júna 2016 je pacientka nastavená na trojkombináciu liečiv perorálne metformín 2 x 1000 mg denne, gliklazid 2 x 60 mg denne a empagliflozín 1 x 10 mg ráno. Laboratorne vyšetrenie v októbri 2016 vyhodnotilo glykémiu nalačno $4,1 \text{ mmol.l}^{-1}$, HbA_{1c} 6,2 % a tlak krvi 120/75 mmHg. Výsledky metaanalýzy ohľadom použitia empagliflozínu ako prídavnej liečby k terapii metformínom a derivátom sulfonylmočoviny poukazujú, že v porovnaní s východiskovou hodnotou viedlo užívanie empagliflozínu 10 mg, resp. 20 mg k signifikantnému poklesu HbA_{1c} (– 0,82 % resp. – 0,77 %). V porovnaní s placebom liečba empagliflozínom viedla tiež k redukcii telesnej hmotnosti. Jednalo sa o placebo kontrolovanú štúdiu v trvaní 24 týždňov u pacientov s DM 2. typu s nedostatočnou glykemickou kompenzáciou napriek liečbe metformínom a derivátom sulfonylmočoviny. Do štúdie bolo zaradených 666 pacientov – placebo ($n = 225$), empagliflozín 10 mg ($n = 225$), empagliflozín 25 mg ($n = 216$) (Haring a kol., 2013). U pacientky

Tab. 2: Vyhodnotenie MICC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) itrakonazolu a silíc

DÁTUM	VYŠETRENIE			FARMAKOTERAPIA(n)
	glykémia nalačno ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	HbA _{1c} ($< 6,0 \%$)	tlak krvi (mmHg)	
01/2005	9,1	–	130/80	diétny režim
01/2009	7,6	6,29	–	metformín 1 x 500 mg večer
01/2010	5	5,81	115/80	metformín 1 x 1000 mg večer
02/2013	16,9	–	–	metformín 1 x 2000 mg večer
04/2013	11,9	9,8	140/90	metformín 2 x 1000 mg denne vildagliptín 2 x 50 mg denne
06/2013	9,4	–	120/80	metformín 2 x 1000 mg denne exenatid 1 x 2 mg týždenne
01/2014	8,7	–	130/80	metformín 1 x 1000 mg ráno a 1x 2000 mg večer exenatid 1 x 2 mg týždenne
05/2014	–	7,98	130/75	metformín 1 x 1000 mg ráno a 1x 2000 mg večer gliklazid 1 x 60 mg ráno liraglutid 1 x 0,6 mg denne (1 x 1,2 mg denne)
12/2015	–	–	125/70	metformín 2 x 1000 mg denne gliklazid 2 x 60 mg denne lixisenatid 1 x 10 μg denne (1 x 20 μg denne)
02/2016	8,5	8,2	130/80	metformín 2 x 1000 mg denne gliklazid 2 x 60 mg denne exenatid 1 x 2 mg týždenne
06/2016	–	8,3	130/85	metformín 2 x 1000 mg denne gliklazid 2 x 60 mg denne empagliflozín 1 x 10 mg ráno
10/2016	4,1	6,2	120/75	metformín 2 x 1000 mg denne gliklazid 1 x 60 mg večer empagliflozín 1 x 10 mg ráno
02/2017	5,7	–	125/70	metformín 2 x 1000 mg denne gliklazid 1 x 60 mg večer empagliflozín 1 x 10 mg ráno
01/2018	6,9	–	–	metformín 2 x 1000 mg denne gliklazid 1 x 60 mg večer empagliflozín 1 x 10 mg ráno

HbA_{1c} – glykovaný hemoglobín

došlo k výraznému zlepšeniu zdravotného stavu. Indikovaná terapia bola ponechaná, došlo len k úprave dávkovania gliklazidu 1 x 60 mg večer. V januári 2018 bola pacientke vyhodnotená glykémia nalačno $6,9 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, váha 82 kg a BMI $29,05 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ – nadváha. Takmer dva roky nebola pacientke zmenená terapia, liečba zlepšila kvalitu jej života, nežiaduce

účinky ustúpili a zlepšila sa aj adherencia k terapii. Pacientke bola okrem DM 2. typu diagnostikovaná sínusová tachykardia, ktorú kompenzuje perorálne nebivololom 3 x 5 mg denne a dyslipidémia, na ktorú jej bol indikovaný perorálne atorvastatín 1 x 10 mg večer. Prehľad farmakoterapie vo vzťahu k laboratórnym vyšetreniam od roku 2005 do roku 2018 znázorňuje tabuľka 2.

ZÁVER

V súčasnosti je diabetológia jedným z najdynamickejších sa rozvíjajúcich odborov vnútorného lekárstva. V máloktorom odbore bolo za posledných pár rokov vyvinutých toľko liekov, ktoré boli registrované na klinické použitie alebo sú v záverečných fázach klinického skúšania s reálnou perspektívou, že budú v dohľadnom čase dostupné v klinickej praxi. Predložená štúdia je zameraná na význam nových liečiv, odporúčania a postupy používané v terapii DM 2. typu. Zavedením nových preparátov do terapie DM 2. typu dochádza k zníženiu nežiaducich účinkov ochorenia, zlepšeniu adherencie a kompliance pacientov s terapiou a zvýšeniu ich šance na kvalitný a produktívny život.

ZOZNAM LITERATÚRY

American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 2014, 37, S81 – S90. <http://care.diabetesjournals.org/content/37/Supplement_1/S81>. Accessed June 10, 2018.

Bakris, G. L., Fonseca, V. A., Sharma, K., Wright, E. M.: Renal sodium – glucose transport: role in diabetes mellitus and potential clinical implications. *Kidney International*, 2009, 75, 1272 – 1277.

Drury, P. a Gatling, W.: Diabetes. Your questions answered. Edinburgh, London, New York, Oxford: Churchill Livingstone, 2005, 341 s.

Goyal R. a Jialal, I.: Diabetes Mellitus, Type 2. *Europe PMC*, 2018. <<https://europepmc.org/books/NBK513253;jsessionid=C606C0B3DDC082B130CA4208FFFF17C8>>. Accessed August 10, 2018.

Häring H. U., Merker, L., Seewaldt-Becker, E., Weimer, M., Meinicke, T., Woerle, H. J., Broedl, U. C., EMPA-REG METSU Trial Investigators: Empagliflozin as add-on to metformin and sulfonylurea in patients with type 2 diabetes: a 24-week, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Care*, 2013, 36, 11, 3396 – 3404.

Kvapil, M. (ed.): *Diabetologie*. Praha: Triton, 2010. 27 – 34.

Kvapil, M.: Rosiglitazon/metforminum – fixní kombinace. *Remedia*, 2006, 16, 2, 133 – 141.

Mokáň, M., Martinka, E., Galajda, P.: *Diabetes mellitus a vybrané metabolické ochorenia*. 1. vyd. Martin: P + M, 2008. 1003 s.

Schroner, Z. a Uličiansky, V.: Inhibitory SGLT2 – nová cesta v liečbe diabetes mellitus 2. typu. Košice: SchronerMED, s. r. o., 2015. 65 s.

Uličiansky a kol.: Algoritmus liečby diabetes mellitus 2. typu v klinickej praxi. *Diabetes a obezita*. 2011, 22, 16, 9 – 32.

Vlček, J., Fialová, D. a kol.: *Klinická farmacie I*. Praha: Grada, 2010. 368 s.

World Health Organization. Global report on diabetes. *Report of a WHO*. France: WHO, 2016. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf?sequence=1>. Accessed January 30, 2018.



LIEČBA PACIENTOV S RÔZNYMI ŠTÁDIAMI NEŠPECIFICKÝCH ZÁPALOVÝCH OCHORENÍ ČRIEV (KAZUISTIKA)

TREATMENT IN PATIENTS WITH DIFFERENT STAGES OF NON-SPECIFIC INFLAMMATORY BOWEL DISEASES (CASE STUDY)

Džupinová, M., Faixová, Z.

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

zita.faixova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Štúdia sa zaoberá nešpecifickými zápalovými ochoreniami čriev – Crohnovou chorobou a ulceróznou kolitídou. Crohnova choroba je chronické zápalové ochorenie, ktoré má segmentálny charakter a postihuje stenu tráviacej trubice od úst až po análny otvor, vo všetkých jej vrstvách. Ulcerózna kolitída je chronické zápalové ochorenie sliznice konečníka a príľahlej časti, prípadne celého hrubého čreva. V štúdii sme sa zamerali na jednotlivé typy liečby pri pacientoch s rôznymi štádiami nešpecifických črevných zápalov na základe poskytnutých kazuistík. Získané poznatky o liečbe Crohnovej choroby

a ulceróznej kolitídy naznačujú, že aj napriek nemožnosti ich vyliečenia je možné zlepšiť kvalitu života pacienta na základe dodržiavania stanovenej liečby a diéty aj v prípade remisie ochorenia.

Kľúčové slová: Crohnova choroba; hnačka; liečba; ulcerózna kolitída; zápal čreva

ABSTRACT

The study deals with non-specific inflammatory bowel diseases – Crohn's disease and ulcerative colitis. Crohn's disease is a chronic inflammatory disease that has segmental character and affects the wall of the digestive tube from the mouth to the

anus in all its layers. Ulcerative colitis is a chronic inflammatory disease of the rectum mucosa and the adjacent parts, or the entire colon. In our study we focused on different types of treatment in patients with different stages of nonspecific intestinal inflammation based on the case reports. The findings of the treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis suggest that despite the inability to cure it is possible to improve the quality of life on the basis of adherence to the established treatment and diet, even in case of remission.

Key words: Crohn's disease; diarrhea; inflammation; treatment; ulcerative colitis

ÚVOD

Výskyt ochorení, ktoré postihujú tráviaci systém sa v súčasnosti zvyšuje. Pojem idiopatické črevné zápal zahŕňa stavy charakterizujúce chronickú alebo relabujúcu aktiváciu a zápal gastrointestinálneho traktu. Nešpecifické zápal sú ochorenia postihujúce tenké a hrubé črevo, ktoré môžu byť sprevádzané ochorením ďalších orgánov. Príčina vzniku týchto zápalov nie je v súčasnej dobe známa. Predpokladá sa účasť genetických faktorov, porúch obranyschopnosti, diétnych vplyvov, infekčných faktorov a psychických stresorov (Güngör a kol., 2019).

Z epidemiologického hľadiska je zaznamenaný nárast výskytu týchto ochorení v celej populácii, hlavne u adolescentov a pacientov v mladšom dospelom veku (Cohen a kol., 2019; Kolesárová a Vaščurová, 2019). Crohnova choroba (CN) a ulcerózna kolitída (UC) sú dve majoritné formy idiopatických črevných zápalov, ktoré majú veľa rovnakých klinických a epidemiologických charakteristík a naznačujú, že základná podstata týchto ochorení môže byť podobná. V skutočnosti nie je v praxi problémom rozlíšenie ulceróznej kolitídy a Crohnovej choroby, avšak obe ochorenia sú samostatné jednotky s rozdielnou etiopatogenézou, terapiou, prognózou a komplikáciami (Lo a kol., 2018; Rogler a kol., 2018). Ulceróznou kolitídu môžeme definovať ako ulcerózne

zápal konečníka šíriaci sa do vyšších častí hrubého čreva. Makroskopické zmeny na sliznici sú prekrvenie, zdureníe, krvácanie a atrofia klkov. Crohnova choroba je lokalizovaná v tenkom aj hrubom čreve segmentálne a vzácne sa vyskytuje aj vo vyšších častiach tráviacej trubice. Makroskopicky na začiatku ochorenia pozorujeme hyperémiu a opuch. Neskôr sa formujú povrchové vredy, ktoré sa postupne prehlbujú (Everhov a kol., 2019).

Veľa pacientov má len obmedzené vedomosti o tom, že trpí práve týmito zápalovými ochoreniami, pretože ich nešpecifické príznaky ako hnačka a bolesti brucha sa dajú ľahko pomýliť s iným typom ochorenia (Nóbrega a kol., 2018; Olén a kol., 2019).

Cieľom našej štúdie bolo získanie poznatkov a objasnenie problematiky nešpecifických zápalových ochorení, ich prezentácia formou štyroch kazuistík a porovnanie rôznych typov liečby v rôznych štádiách ochorenia.

OPIS PRÍPADOV

Jednotlivé typy liečby pacientov sme porovnávali na základe štyroch kazuistík. Pacienti opísaní v kazuistikách boli vyšetřovaní na endoskopicko-gastroenterologickom pracovisku v 1. Súkromnej nemocnici Košice Šaca, a. s. Každý pacient podstúpil iný typ liečby s rôznou úspešnosťou. Vek pacientov sa pohyboval od 23 do 74 rokov.

Kazuistika číslo 1

Žena, 74 rokov

Objektívny nález: výška 168 cm, hmotnosť 71 kg, BMI 25, v minulosti podstúpila abdominálnu hysterektómiu.

Rodinná anamnéza: obaja rodičia zomreli. Otec bol liečený na arteriálnu hypertenziu, súrodenci sú údajne zdraví.

V roku 2002 bola žena prijatá na kliniku.

Anamnéza: 2 týždne mala opakovane riedku stolicu (v noci až 6 krát), výrazne schudla, nemala sa dobre, bola slabá, pociťovala bolesť brucha.

Diagnostika: kolonoskopicko-rektoskopické a labo-

ratórne vyšetrenie, ultrazvuk brušných orgánov. Pri kolonoskopii boli viditeľné hemoragicko-katarálne zmeny s drobnými ulceráciami, prítomné vonkajšie a vnútorné hemoroidy I. a II. stupňa, sliznica červenoružovej farby, polypoidne zhrubnutá riasa bola odobratá na histologické vyšetrenie.

Záverom vyšetrení bolo stanovenie diagnózy ulcerózna kolitída – subtotálne ľavostranné postihnutie, ktorej hlavným spúšťačom bol stres a sekundárna anémia stredne ťažkého stupňa. Pacientke bol nasadený prednizón a mesalazínové čapíky.

V roku 2003 sa stav napriek liečbe nezlepšoval, pacientka mala stolicu 10 až 15-krát denne, niekedy vylučovala len krv. Došlo k zmene liečby, nepodávala sa *p. o.*

Liečba: mesalazín a prednizón boli vysadené a nahradené inými liekmi, napr. azatioprínom 100 mg, ktorý bol u pacientky prípravou na možnú biologickú liečbu.

Pri histologickom vyšetrení sa neskôr u pacientky potvrdila prítomnosť *H. pylori*, bol nasadený omeprazol, klaritromycín a metronidazol. Laboratórne výsledky krvného obrazu naznačili dôsledok imunosupresívnej liečby azatioprínom.

Opakovane bola vysádzaná a nasádzaná liečba imunosupresívami v závislosti od remisie ochorenia. V roku 2004 došlo z ekonomických dôvodov k zmene liečby na Salofalk (mesalazín).

V rokoch 2005 a 2008 bola pacientka hospitalizovaná na internom oddelení pre relaps ochorenia. Bola nasadená nasledujúca liečba: mesalazín *supp.*, vysoké dávky prednizónu a prísne diétno-režimové opatrenia.

V roku 2009 nastalo dočasné zhoršenie stavu, kedy sa u pacientky objavila stolica s prímiesou krvi a tenezmy v dôsledku užívania nimesulidu (Coxtral).

V súčasnosti je pacientka v remisii, návštevy lekára nie sú také časté (3 – 4 x ročne) ako pri relapse ochorenia (17 x ročne), pacientka pravidelne užíva lieky a dodržiava prísne diétno-režimové opatrenia.

Kazuistika číslo 2

Žena, 40 rokov

Pacientke s anamnézou dyspeptických ťažkostí od júna 2009 bola až po opakovaných vyšetreniach v júli 2010 potvrdená diagnóza – Crohnova choroba s postihnutím tenkého aj hrubého čreva – fistulujúca forma. Pacientke boli nasadené kortikoidy aj azatioprín. Napriek liečbe pretrvávala zápalová aktivita a aj recidivujúce abscesy, pre ktoré bola opakovane hospitalizovaná na klinike. Pacientka netolerovala budezonid. Z týchto dôvodov bola podaná žiadosť o zváženie aplikácie biologickej liečby.

Súčasná liečba zahŕňa azatioprín, mesalazín, *acidum folicum*, ciprofloxacín, metronidazol, pantoprazol a železo.

Konvenčná liečba bola u tejto pacientky málo efektívna, preto pacientka v rokoch 2011 – 2012 užívala prípravok Remicade s účinnou látkou infliximab. Biologická liečba nebola úspešná. Stav pacientky hlavne z aspektu fistúl nebol dobrý, preto bola indikovaná chirurgická liečba. V roku 2012 bola vykonaná ľavostranná hemikolektómia a vľavo vyvedená transverzostómia, ktorú má pacientka doteraz.

V súčasnosti musí pacientka užívať lieky mesalazín a azatioprín aj napriek odstráneniu časti hrubého čreva. Bola jej odporúčaná bezzvyšková diéta a pravidelné kontroly.

Kazuistika číslo 3

Žena, 23 rokov

Rodinná anamnéza: v rodine sa vyskytuje ochorenie štítnej žľazy a cukrovka.

Liečba: mesalazín 500 mg, ciprofloxacín, probiotiká, enterálna imunomodulačná podpora.

Objektívny nález: v roku 2011 bola pacientke diagnostikovaná Crohnova choroba bližšie neurčená s extraintestinálnymi prejavmi, napr. *erythema nodosum* a oligoartritídou.

Pacientke bola vykonaná MR enterografia bez *i. v.* podania kontrastnej látky a spazmolytika pre výraznú fragilitu čriev. Vyšetrenie malo zníženú výpovednú

hodnotu a iba orientačný charakter.

V januári 2014 došlo pri kolonoskopii k perforácii céka, preto bola potrebná axiálna ileostómia.

V septembri 2014 pacientka podstúpila chirurgický zákrok a bola vykonaná resekcia terminálneho ilea a céka pre stenózu ilea a axiálna ileostómia bola zrušená.

Nasadená medikamentózna liečba spočívala v užívaní mesalazínu, azatioprínu a rôznych dávok prednizónu.

V súčasnosti pacientka nerešpektuje rady lekára (non-compliance) a pri zlepšení stavu neužíva lieky, preto sa očakáva recidíva ochorenia. Pri zhoršení stavu a opätovnom prepuknutí ochorenia bude znovu potrebný operačný zákrok.

Kazuistika číslo 4

Žena, 49 rokov

Rodinná anamnéza: bez pozoruhodností.

Objektívny nález: pacientka sa nelieči na žiadne ochorenie, v roku 2000 podstúpila pravostrannú hemikolektómiu kvôli Crohnovej chorobe.

V roku 2003 pacientka po hemikolektómii navštívila kliniku kvôli dlhšie pretrvávajúcim ťažkostiam. Sťažovala sa na bolesti brucha, zvracanie, zvýšenú teplotu, stolicu mala 1 – 2 x denne bez prímiesí.

Pacientka podstúpila kolonoskopiu. V úseku *colon transversum* pred lineárnou flexúrou v úseku približne 15 cm boli pozorované deformované slizničné riasy. Prítomný bol obraz dlaždicových kociek a znížená kontraktibilita postihnuteho úseku čreva.

Pacientke bola diagnostikovaná Crohnova choroba s parciálnou stenózou tenkého čreva. Pri zliečbe prednizónom v nižšej dávke – 20 mg črevo prejavovalo známky exacerbácie ochorenia – subakútnu obštrukciu. Dávky prednizónu sa zvýšili na 40 mg. Naďalej mala užívať mesalazín, metronidazol a vysoké dávky azatioprínu. Následne jej boli znížené dávky azatioprínu. Nutné bolo kontrolovať krvný obraz. Pacientke bolo odporúčené vylúčenie nikotínu, bezzvyšková diéta a prechodne bola podávaná enterálna výživa. Dávky azatioprínu a prednizónu sa

pravidelne menili v závislosti od priebehu ochorenia. V roku 2008 bolo pacientke vykonané zobrazovacie vyšetrenie – CT iridografia. Záverom vyšetrenia bol nález miernej progresie stenózy. Ojedinele sa vyskytli črevné kľučky v pravom mezogastriu s hrubšou stenou a výrazným postkontrastným sýtením.

V roku 2013 pacientka podstúpila polypektómiu a odstránenie polypov z *c. transversum* bolo vykonané bez komplikácií.

V súčasnosti sú v tenkom čreve minimálne katarálne zmeny, ojedinelé erózie až ulcerácie a sliznica je bez patologických povlakov. Pacientka pravidelne užíva predpísané lieky – mesalazín 500 mg.

DISKUSIA

V gastroenterologickej ambulancii sa lekári takmer denne stretávajú s pacientmi trpiacimi nešpecifickými črevnými zápalmi. Súčasným trendom v terapii týchto ochorení je individuálny prístup k pacientom vzhľadom na špecifickosť každého pacienta (Agrawal a Colombel, 2019). Deriváty kyseliny 5-aminosalicylovej zostávajú aj v období vývoja a nástupu novších liekov stále kľúčovým terapeutickým prostriedkom pri ľahkých a stredne závažných formách ulceróznej kolitídy a dôležité miesto majú aj u pacientov s Crohnovou chorobou.

Každý pacient očakáva od liečby plnohodnotný život bez symptómov ochorenia, nežiaducich účinkov liečby a bez potreby chirurgického zákroku (Chung a kol., 2018). Dôležitým kritériom spokojnosti pacienta sú aj len občasné návštevy pacienta u lekára. Lekár od nastavenej liečby očakáva stabilizáciu zdravotného stavu pacienta a vyhnutie sa invalidizácii, a to všetko pri únosných finančných nákladoch (Greguš, 2017; Raffáč a kol., 2017). Terapia pacientov do veku 18 rokov sa do veľkej miery odlišuje od liečby dospelých (Dalzell a Ba'Ath, 2019). Problémy s adherenciou k liečbe nastupujú u pacientov s obdobím puberty. Viaceré štúdie poukazujú na klesajúcu adherenciu medzi 8. až 18. rokom života pacienta (Mosnárová,

2017).

Chirurgická liečba prichádza do úvahy pri neúspechu konzervatívnej liečby alebo v prípade komplikácií (Spiceland a Lodhia, 2018), kedy sa odstraňujú celé úseky čreva postihnuté chorobou a vytvorí sa trvalý črevný vývod v koncovej časti, tzv. terminálna ileostómia. Recidívy sú pomerne časté, a preto sa väčšina lekárov snaží čakať s operáciou čo najdlhšie obdobie (Rahal a kol., 2018). Zlyhaním konzervatívnej liečby sa rozumie neschopnosť zvládnuť akútny atak a nedosiahnuť remisiu ani po 2 – 3 mesiacoch liečby, často s prejavmi nežiaducich účinkov liekov. Medzi dostupné operačné techniky zaradíme bypass, resekciu s ileostómiou, rôzne typy dočasných stómií a iné (Pechan, 1997). Stómie rozlišujeme trvalé a dočasné (Hlavatý, 2013). Starostlivosť o stómiu je dôležitou súčasťou liečby a začína ihneď po operácii, ako u pacientiek v kazuistike číslo 2 a 3, ktorým bolo stomické vrecúško na črevný vývod pripevnené už na operačnej sále.

Konzervatívna farmakoterapia je zastúpená aminosalicylátmi, kortikosteroidmi, imunosupresívami a antibiotikami. Táto liečba je indikovaná skoro u všetkých pacientov, ako to bolo aj v prípade uvedených kazuistík. Pacienti musia užívať tieto liečivá aj napriek tomu, že podstúpili napríklad chirurgickú liečbu. Účinné látky môžu byť podávané nielen systémovo, ale aj lokálne ako čapíky, rektálne peny alebo rektálne nálevy. Pri lokálnych prípravkoch však treba brať do úvahy ich obmedzený rozsah pôsobenia.

Aminosalicyláty sú považované za prvú líniu liečby pri miernej a stredne ťažkej forme ulceróznej kolitídy a pri Crohnovej chorobe. Dominantné postavenie pri terapii týchto ochorení má v súčasnosti kyselina 5-aminosalicylová.

Kortikosteroidy sú látky, ktorých výhodou je rýchly nástup účinku a vysoká efektívnosť. Ak je liečba kortikodependentná alebo kortikorezistentná a bez kortikoidov nedochádza k zlepšeniu stavu, začína sa liečba imunosupresívami.

Cyklosporín A je vďaka svojmu rýchlemu nástupu účinku považovaný za liek prvej voľby pri kolitíde a

toxickom megakolone.

Biologická terapia je najnovším typom terapie ulceróznej kolitídy a Crohnovej choroby v prípadoch, keď pacienti nereagujú na konvenčnú liečbu kortikoidmi a imunosupresívami (Dreesen a Gils, 2019). Potom sa v terapii využíva napríklad infliximab v konvenčnej dávke 5 mg/kg (Bunganič a Fedurco, 2008; Lata a Bures, 2010; Church a kol., 2019).

ZÁVER

Idiopatické črevné zápaly patria medzi ochorenia so zvyšujúcou sa incidenciou a prevalenciou. Príčina vzniku týchto zápalov nie je v súčasnej dobe známa. Na vzniku týchto ochorení sa podieľa viacero faktorov ako stres, fajčenie, genetická predispozícia a mnoho ďalších, ktoré sme podrobnejšie opísali v texte. Tieto ochorenia postihujú pacientov vo všetkých vekových kategóriách a negatívne ovplyvňujú kvalitu ich života. Typické brušné symptómy týchto ochorení sú hnačka, bolesti brucha, zvracanie. Charakteristické pre tieto ochorenia sú aj mimobrušné prejavy ako postihnutie kĺbov, očí, kože a podobne. Medzi dôležité vyšetrenia odhaľujúce tieto ochorenia patrí predovšetkým kolonoskopia a histologické vyšetrenie.

Snahou lekárov u pacientov so zápalovými ochoreniami čriev je nastavenie optimálneho liečebného postupu, ktorý musí byť vzhľadom na rôznorodosť priebehu ochorenia individuálny. Crohnova choroba a ulcerózna kolitída sú chronické ochorenia, ktoré si vyžadujú celoživotnú liečbu a častokrát mnohopočetné chirurgické zákroky. Keďže ide o nevyliciteľné ochorenia, je veľmi dôležitá aj dôvera v lekára, čo môže ovplyvniť nielen spoluprácu pacienta pri liečbe (compliance), ale aj efekt samotnej liečby.

V štúdií sme chceli poukázať na rôzny priebeh týchto ochorení v závislosti od disciplíny pacientov. Pacienti, ktorí dodržiavajú diétno-režimové opatrenia a pravidelne užívajú lekárom predpísané lieky aj v období remisie, majú nižšie riziko relapsu ochorenia ako nedisciplinovaní pacienti.

POĎAKOVANIE

Chceme sa poďakovať zástupcovi primára Internej kliniky MUDr. Štefanovi Muchovi, ktorý pôsobí ako vedúci lekár na endoskopicko-gastroenterologickom pracovisku v I. súkromnej nemocnici Košice Šaca, a. s. za poskytnutie kazuistik a pomoc pri ich spracovaní.

ZOZNAM LITERATÚRY

Agrawal, M. a Colombel, J. F.: Treat-to-Target in inflammatory bowel diseases, What is the target and how do we treat? *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.*, 2019, 29, 3, 421 – 436.

Bunganič, I. a Fedurco, M.: *Choroby hrubého čreva a konečníka*. 1. vyd. Prešov: Gastro I., 2008. 227 s.

Cohen, J. S., Lyons, J. S., Benchimol, E. I., Carman, N., Guertin, C., Mack, D. R.: The pediatric inflammatory bowel disease INTERMED: A new clinical tool to assess psychosocial needs. *J. Psychosom. Res.*, 2019, 119, 26 – 33.

Dalzell, A. M. a Ba’Ath, M. E.: Paediatric inflammatory bowel disease: review with a focus on practice in low- to middle-income countries. *Paediatr. Int. Child. Health*, 2019, 39, 1, 48 – 58.

Dreesen, E. a Gils, A.: Pharmacodynamic monitoring of biological therapies in chronic inflammatory diseases. *Ther. Drug Monit.*, 2019, 41, 2, 131 – 141.

Everhov, Å. H., Sachs, M. C., Malmberg, P., Nordenvall, C., Myrelid, P., Khalili, H., Elmgren, M., Ekblom, A., Askling, J., Jakobsson, G., Halfvarson, J., Ludvigsson, J. F., Olén, O.: Changes in inflammatory bowel disease subtype during follow-up and over time in 44,302 patients. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2019, 54, 1, 55 – 63.

Greguš, M.: Súčasné trendy v liečbe ulceróznej kolitídy: od systémovej k selektívnej imunosupresii. *Kompendium medicíny*, 2017, 8, 16 – 20.

Güngör, D., Nadaud, P., Dreibelbis, C., LaPergola, C. C., Wong, Y. P., Terry, N., Abrams,

S. A., Beker, L., Jacobovits, T., Järvinen, K. M., Nommsen-Rivers, L. A., O’Brien, K. O., Oken, E., Pérez-Escamilla, R., Ziegler, E. E., Spahn, J. M.: Infant milk-feeding practices and diagnosed celiac disease and inflammatory bowel disease in offspring: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2019, 109, Suppl. 7, 838S – 851S.

Hlavatý, T.: *Život s Crohnovou chorobou a ulceróznou kolitídou*. 1. vyd. Brno: Grifart, 2013. 147 s.

Chung, A. E., Vu, M. B., Myers, K., Burris, J., Kappelman, M. D.: Crohn’s and Colitis Foundation of America Partners Patient-Powered Research Network: patient perspectives on facilitators and barriers to building an impactful Patient-Powered Research Network. *Med. Care*, 2018, 56, Suppl. 10, S33 – S40. DOI: 10.1097/MLR.0000000000000771.

Church, P. C., Ho, S., Sharma, A., Tomalty, D., Frost, K., Muise, A., Walters, T. D., Griffiths, A. M.: Intensified infliximab induction is associated with improved response and decreased colectomy in steroid-refractory paediatric ulcerative colitis. *J. Crohns Colitis*, 2019. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjz019.

Kolesárová, M. a Vaščurová, M.: Neúčinná konvenčná terapia u pacienta s Crohnovou chorobou (kazuistika). *Folia Pharmaceutica Cassoviensia*, 2019, 1, 2, 54 – 63.

Lata, J. a Bures, J.: *Gastroenterologie*. Praha: Galén, 2010. 256 s.

Lo, B., Julsgaard, M., Vester-Andersen, M. K., Vind, I., Burisch, J.: Disease activity, steroid use and extraintestinal manifestation are associated with increased disability in patients with inflammatory bowel disease using the inflammatory bowel disease disability index: a cross-sectional multicentre cohort study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2018, 10, 1130 – 1136.

Mosnárová, A.: Chronické intestinálne zápaly v detskom veku – diagnostika a liečba. *Lekárske listy*, 2017, roč. 17, 6 – 9.

Nóbrega, V. G., Silva, I. N. N., Brito, B. S., Silva, J., Silva, M. C. M. D., Santana, G. O.: The onset of clinical manifestations in inflammatory

bowel disease patients. *Arq. Gastroenterol.*, 2018, 55, 3, 290 – 295.

Olén, O., Askling, J., Sachs, M. C., Frumento, P., Neovius, M., Smedby, K. E., Ekbom, A., Malmborg, P., Ludvigsson, J. F.: Increased mortality of patients with childhood-onset inflammatory bowel diseases, compared with the general population. *Gastroenterology*, 2019, 156, 3, 614 – 622.

Pechan, J.: *Chirurgická liečba pre Crohnovu chorobu*. 2. vyd. Bratislava: Slovak Academic Press, 1997. 79 s.

Raffáč, Š., Gombošová, L., Gabzdilová, J., Novotná, L., Šajtyová, K., Pekárová, T., Kopolovets, I., Tóth, Š.: Detection of anti-infliximab antibodies in Slovak IBD patients and its costs saving effect. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 2017, 38, (Suppl. 1), 5 – 9.

Rahal, M. A., Karaoui, W. R., Mailhac, A., Tamim, H., Shaib, Y.: Surgical outcomes among inflammatory bowel disease patients undergoing colectomy : results from a national database. *Acta Gastroenterol. Belg.*, 2018, 81, 3, 387 – 392.

Rogler, G., Biedermann, I., Scharl, M.: New insights into the pathophysiology of inflammatory bowel disease: microbiota, epigenetics and common signalling pathways. *Swiss Med. Wkly.*, 2018, 148, 14599.

Spiceland, C. M. a Lodhia, N.: Endoscopy in inflammatory bowel disease: Role in diagnosis, management, and treatment. *World J. Gastroenterol.*, 2018, 24, 35, 4014 – 4020.



IZOLÁCIA A ANALÝZA BIOLOGICKY ZAUJÍMAVÝCH METABOLITOV PRODUKOVANÝCH ČÍNSKÝMI LIEČIVÝMI HUBAMI

ISOLATION AND ANALYSIS OF BIOLOGICALLY INTERESTING METABOLITES PRODUCED BY CHINESE MEDICINAL MUSHROOMS

Ungvarská Maľučká, L., Pániková, Z.

Katedra chémie, biochémie a biofyziky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

lucia.ungvarska.malucka@uvlf.sk

ABSTRAKT

Cordyceps (húsenica čínska) patrí k najcennejším hubám tradičnej čínskej medicíny. Ide o jedlú parazitickú hubu, ktorá rastie v nadmorských výškach nad 3 500 metrov hlavne v oblasti hôr Tibetu, v čínskych provinciách Sichuan a Yunnan. Pozitívne ovplyvňuje mnohé systémy ľudského organizmu: obehový, respiračný a imunitný systém. V tradičnej čínskej medicíne sa používa aj ako pomocná látka v prípade onkologických ochorení. Štúdiá sa zaoberá stanovením antioxidantnej a enzymatickej aktivity pripravených alkoholových extraktov, ktoré pochádzajú z dvoch kmeňov: *Ophiocordyceps sinensis* (MFTCCB025/0216, MFTCCB027/0216) a *Paecilomyces hepiali* (MFTCCB023/0216). Tieto

boli kultivované na ryžovom substráte *Oryza sativa indica* a *Oryza sativa japonica*. Najlepšiu schopnosť vychytávať stabilný DPPH radikál mal extrakt pripravený z *Ophiocordyceps sinensis*, ktorý bol kultivovaný na *Oryza sativa indica* (IC_{50} 2,00 mg.mL⁻¹). Pri stanovení enzymatickej-proteolytickej aktivity na substrát kazeín, extrakt z *Paecilomyces hepiali* pestovaný na *Oryza sativa japonica* vykazoval aktivitu porovnateľnú s aktivitou trypsínu v množstve 3,32 µg. Využitím NMR spektroskopie (1D a 2D NMR spektrá) boli v pripravených metanolových extraktoch identifikované nasledovné chemické zlúčeniny: kyselina olejová, kyselina linolová, kyselina octová, kyselina jantárová, močovina, tyrozín, fenylalanín, uracil a glycerol. Vybrané extrakty sa následne testovali na štyroch typoch nádorových

bunkových línií: HCT, Jurkat, HeLa a MCF-7, pričom rozdiel v inhibícii rastu jednotlivých bunkových línií bol medzi pripravenými extraktmi výrazný. Hodnoty inhibičnej koncentrácie IC₅₀ sa pohybovali v rozmedzí 0,150 – 2,786 mg.ml⁻¹.

Kľúčové slová: antioxidačná a enzymatická aktivita; DPPH radikál; extrakcia; kultivácia; NMR spektroskopia; *Ophiocordyceps sinensis*; *Paecilomyces hepiali*

ABSTRACT

Cordyceps is one of the most valuable mushrooms in traditional Chinese medicine. It is an edible parasitic fungus that grows at above 3 500 meters mainly in the Tibet mountains and the Chinese provinces of Sichuan and Yunnan. Cordyceps has positive effects on many systems of human body: the circulatory, respiratory and immune system. In traditional Chinese medicine, it is also used as an adjuvant for oncological diseases. The study deals with the determination of antioxidant and enzymatic activity of alcohol extracts from two strains of Cordyceps: *Ophiocordyceps sinensis* (MFTCCB025/0216, MFTCCB027/0216) and *Paecilomyces hepiali* (MFTCCB023/0216). Those were cultivated on the rice substrates *Oryza sativa indica* and *Oryza sativa japonica*. The extract of *Ophiocordyceps sinensis*, which was cultivated on *Oryza sativa indica*, had the best ability to uptake a stable DPPH radical (IC₅₀ 2,00 mg.ml⁻¹). When determining enzymatic-proteolytic activity on a casein substrate, the *Paecilomyces hepiali* extract grown on *Oryza sativa japonica* showed activity comparable to trypsin activity of 3.32 µg. Using NMR spectroscopy (1D and 2D NMR spectra) the following chemical compounds were identified in methanol extracts: oleic acid, linoleic acid, acetic acid, succinic acid, urea, tyrosine, phenylalanine, uracil and glycerol. The selected extracts were tested on four types of tumor cell lines: HCT, Jurkat, HeLa and MCF-7, wherein the difference

in growth inhibition of individual cell lines was significant. IC₅₀ inhibitory concentration values ranged from 0,150 – 2,786 mg.ml⁻¹.

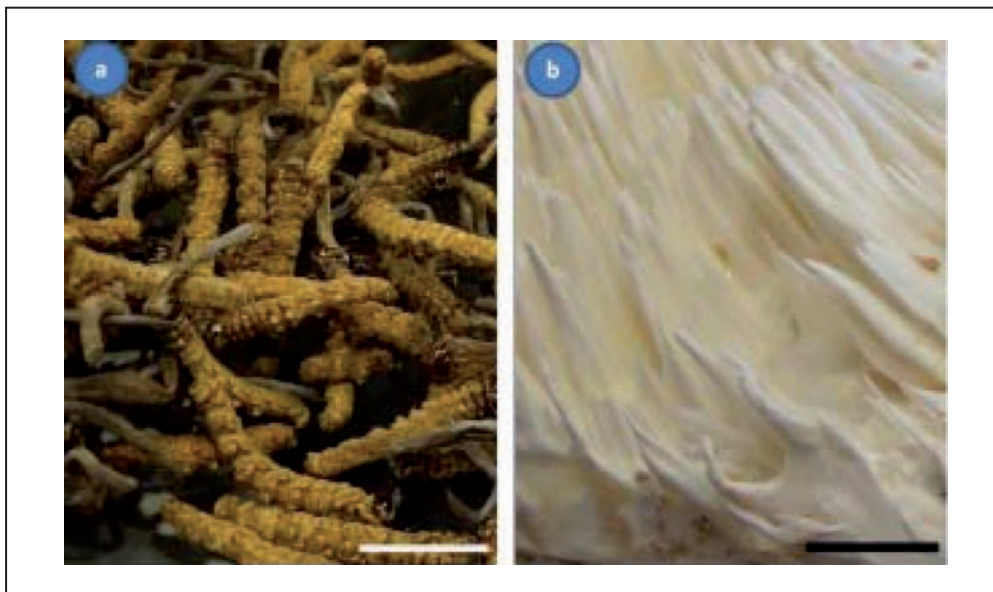
Key words: antioxidant and enzymatic activity; DPPH radical; extraction; cultivation; NMR spectroscopy; *Ophiocordyceps sinensis*; *Paecilomyces hepiali*

ÚVOD

Cordyceps patrí medzi vzácne a liečivé parazitické huby, ktoré sú súčasťou tradičnej čínskej a tibetskej medicíny. Jej liečivé účinky na ľudský organizmus sú známe už viac ako 2000 rokov. Názov Cordyceps pochádza z latinských slov cord a ceps, ktoré znamenajú palica-kyjak a hlava. Jej tvar dal aj základ slovenskému názvu tejto huby – žezlovka. V Číne sa nazýva „DongChongXiaCao“, v preklade „v zime červ, v lete tráva“. Kmeň Cordyceps sa zo systematického hľadiska zaraďuje do ríše huby, aj keď z hľadiska taxonomického sa o hubu ako takú nejedná. Telo *Ophiocordyceps sinensis* pozostáva z mumifikovaných pozostatkov lariev hmyzu, predovšetkým himalájskej netopierej mole *Hepialus armoricanus* Oberthur (Lepidoptera) (Coates a kol., 2010). Za široké spektrum biologickej aktivity je zodpovedné rozmanité zastúpenie chemických zlúčenín. Medzi najzaujímavejšie účinky tejto parazitujúcej huby patria antibakteriálne, antioxidačné, antivírusové a protinádorové účinky, huba pozitívne vplyva na krvný tlak, obličky, pečeň, pľúca, znižuje hladinu cukru v krvi, podporuje imunitu, ale aj sexuálnu potenciu a pôsobí protistresovo (Yao a kol., 2014).

V roku 2008 sa cena prírodného Cordycepsu v San Franciscu pohybovala okolo 75 000 \$ za kilogram. Vysoká cena plodníc bola príčinou veľkého záujmu o zber na náhorných plošinách Tibetu, Nepálu či Bhutánu. Pre miestnych obyvateľov bol príjem z predaja žezloviek hlavnou časťou príjmov, čo sa prejavilo agresívnejším spôsobom zberu (Holliday a kol., 2008). Nadmerný zber mal za

Obr. 1: a) prírodný *Ophiocordyceps sinensis*, b) umelo kultivovaný *Paecilomyces hepiali* (Chioza a kol., 2014)



následok devastáciu územia a narušenie ekologickej rovnováhy. Vzhľadom na dopyt a cenu sa na trhu objavujú aj iné huby z rodu *Cordyceps*, napr. *Cordyceps militaris*. Vďaka DNA sekvenovaniu sa podarilo identifikovať kmeň CS-4 (*Paecilomyces hepiali*), ktorý sa pod týmto označením predáva od roku 2005 (Yu a kol., 2016; Pang a kol., 2018). CS-4 je považovaný za najúčinnjší kmeň mycelia *Cordycepsu*, ktorý je pestovaný umelo, na substráte (viď obr. 1, Chioza a kol., 2014). V minulosti sa ako substrát najčastejšie používala sója, ale pri použití geneticky modifikovanej sóje sa na ňu objavovali alergie, ako aj spojitosť so vznikom rakoviny prsníka. Neskôr bola sója nahradená iným substrátom – ryžou.

Štúdia je zameraná na štúdium alkoholových extraktov pripravených práve z týchto dvoch kmeňov húb – *Ophiocordyceps sinensis* a *Paecilomyces hepiali*, ktoré boli kultivované na dvoch typoch ryžových substrátov (*Oryza sativa indica* a *Oryza sativa japonica*). Zaoberá sa testovaním ich antioxidantnej, enzymatickej a biologickej aktivity (bunkové línie HCT, Jurkat, HeLa a MCF-7) s následným stanovením obsahových látok v extraktoch pomocou NMR spektroskopie.

MATERIÁL A METÓDY

Vzorky húb

Celkovo boli testované tri vzorky – extrakty, ktoré pochádzajú z rôznych produkčných kmeňov húb *Ophiocordyceps sinensis* (MFTCCB025/0216, MFTCCB027/0216) a *Paecilomyces hepiali* (MFTCCB022/022013), ktoré pochádzajú z firmy Mykoforest Veľčice (Slovenská republika). Tie boli kultivované na dvoch substrátoch ryže (*Oryza sativa indica* a *Oryza sativa japonica*).

Chemikálie

Chemikálie sa použili v komerčne dostupnom stave bez ďalšieho čistenia: metanol (Sigma-Aldrich, USA); 2,2-difeny-1-pikrylhydrazylový radikál, 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetylfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazólium bromid; dihydrogénfosforečnan draselný (Mikrochem, Slovenská republika), hydroxid sodný, kazeín, kyselina trichlóroctová; trypsín 250 U.mg⁻¹ (American Pharmaceutical Review, Severná Amerika); deuterovaný dimetylsulfoxid DMSO-*d*₆ (Merck Millipore, Nemecko). Rozpúšťadlá určené na meranie UV/VIS spektier sa použili v komerčne dostupnom

stave. Na monitorovanie počtu chemických látok v extraktoch sa použila tenkovrstvová chromatografia (TLC) na alumíniových platničkách Merck Millipore (Nemecko), SiO_2 60 F₂₅₄.

Prístroje

Pri práci boli použité nasledovné prístroje: *Spektrofotometer Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader* (Biotek, Winooski, VT, USA); *spektrofotometer Biochrom Libra S12* (USA), *pH meter InoLab* (WTW, pH 720, Nemecko); *rotačná vákuová odparka IKA RV 10 digital* (Nemecko); *sušiareň ED APT Line II* (Binder, Nemecko); *NMR spektrometer VNMRs 600 MHz* (Varian, Palo Alto, Kalifornia, USA).

Príprava extraktov

Metanolové extrakty boli pripravené dvoma technikami: refluxovaním a maceráciou do metanolu. Pri oboch technikách sa navážilo 5 g vzorky 1 (*Ophiocordyceps sinensis*, *Oryza sativa indica*), 2 (*Paecilomyces hepiali*, *Oryza sativa japonica*) a 3 (*Ophiocordyceps sinensis*, *Oryza sativa japonica*). Vzorky 1 – 3 sa po hodinovom refluxovaní prefiltrovali a odparili do sucha na rotačnej vákuovej odparke. Následne sa vypočítala výťažnosť extraktov 1 – 3. K vzorkám 1 – 3 sa pridalo 50 ml metanolu a dalo sa to na 24 hodín macerovať do tmavej miestnosti. Tak, ako v predchádzajúcom postupe, aj tieto extrakty sa prefiltrovali, odparili dosucha na rotačnej vákuovej odparke a vypočítala sa ich percentuálna výťažnosť.

Stanovenie antioxidačnej aktivity

Pri stanovení antioxidačnej aktivity sa využila DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylový radikál) metóda. Pri meraniach sa použil vždy čerstvo pripravený 0,2 mmol.dm⁻³ zásobný metanolový roztok stabilného DPPH radikálu s maximálnou hodnotou λ_{max} 517 nm. Extrakty sa nariedili metanolom v koncentrácii 10,000 mg.ml⁻¹; 5,000 mg.ml⁻¹; 2,500 mg.ml⁻¹; 1,250 mg.ml⁻¹; 0,625 mg.ml⁻¹ a 0,312 mg.ml⁻¹. K takto nariedeným vzorkám sa pridal 1 ml 0,2 mmol.dm⁻³ DPPH radikálu. Extrakty vzoriek sa

nechali inkubovať 30 minút pri laboratórnej teplote v tme. Po tomto čase sa merala absorbancia pri 517 nm oproti slepej vzorke – čistý metanol. Každé meranie sa pre každú vzorku uskutočnilo 3-krát. Výsledky meraní sú uvádzané ako IC₅₀ (koncentrácia substrátu, ktorá spôsobuje 50 % stratu aktivity DPPH radikálu) (Wang a kol., 2005).

Stanovenie enzymatickej aktivity

Pri stanovení proteolytickej aktivity sa využili nasledujúce roztoky: tlmivý dihydrogénfosforečnanový roztok s koncentráciou 0,2 mol.dm⁻³ s pH 7,5; zásobný roztok trypsínu (100 mg trypsínu rozpusteného v 100 ml fosforečnanového tlmivého roztoku) a 1 % roztok kazeínu pripravený rozpustením 0,1 g kazeínu v 10 ml fosforečnanového tlmivého roztoku. 200 mg vzorky 1 – 3 v 2 ml dihydrogénfosforečnanového tlmivého roztoku sa inkubovalo pri 37 °C 1 hodinu. Po tomto čase sa k vzorkám pridali 2 ml 1 % kazeínu vo fosforečnanovom tlmivom roztoku s pH = 7,5. Zmes sa nechala inkubovať 1 hodinu pri 37 °C.

Enzymatická reakcia sa následne zastavila pridaním 3 ml 10 % kyseliny trichlóroctovej. Zrazenina sa nechala formovať 20 minút a po odfiltrovaní sa merala absorbancia roztokov pri 280 nm oproti slepému pokusu, ktorý sa pripravil pre každú vzorku zvlášť: 3 ml 10 % kyseliny trichlóroctovej + 200 mg vzorky 1, 2, resp. 3 + 2 ml 0,2 mol.dm⁻³ tlmivého roztoku s pH 7,5 + 2 ml 1 % roztoku kazeínu v tlmivom roztoku (Wu a kol., 2011). Pri výpočte množstva trypsínu v jednotlivých vzorkách 1 – 3 sa využil program Microsoft Excel, kde sa pomocou kalibračnej priamky pre trypsin na základe funkcie $A = f(\text{hmotnosť trypsínu})$ stanovilo množstvo trypsínu vo vzorkách húb.

Biologická aktivita

Antiproliferatívna aktivita sa stanovila MTS testom (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetylfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazólium bromid)). Sledovala sa bunková viabilita na štyroch typoch bunkových línii HeLa (bunková

Tab. 1: Označenie vzoriek, kmeň, substrát a výťažnosť podľa zvolenej techniky extrakcie

Vzorka	Kmeň	Substrát	Výťažnosť (%)	
			Reflux	Macerácia
1	<i>Ophiocordyceps sinensis</i> (MFTCCB025/0216)	<i>Oryza sativa indica</i>	10,12	7,10
2	<i>Paecilomyces hepiali</i> (MFTCCB022/022013)	<i>Oryza sativa japonica</i>	10,84	5,88
3	<i>Ophiocordyceps sinensis</i> (MFTCCB027/0216)	<i>Oryza sativa japonica</i>	4,90	5,32

línia rakoviny krčka maternice), MCF-7 (bunková línia rakoviny prsníka), Jurkat (bunky akútnej T-lymfocytovej leukémie) a HCT (bunková línia rakoviny hrubého čreva). Biologická aktivita sa stanovila metodikou podľa literatúry Aung a kol., 2007. Bunky sa nasadili na 96-jamkovú platničku v danom počte podľa typu bunkovej línie. Po 24 hodinovej inkubácii (37 °C, 5 % CO₂) sa pridali testované extrakty vzoriek 1 – 3 v požadovaných koncentráciách. Vychádzalo sa z koncentrácie 1 mg.ml⁻¹ a tá sa následne riedila ešte 6-krát. Po 72 hodinách od inkubácie (37 °C, 5 % CO₂) s testovanými extraktmi vzoriek 1 – 3 sa pridalo 10 µl roztoku MTS/jamka (pripravená zmes MTS a PMS 20 : 1). Platničky sa inkubovali 2 hodiny. Po inkubácii sa nechali 5 minút na trepačke a na spektrofotometri sa merala absorbancia pri 490 nm. Výsledky antiproliferatívnej aktivity sú vyjadrené ako IC₅₀ v mg.ml⁻¹.

Meranie NMR spektier

Spektrálna analýza sa uskutočnila na spektrometri Varian VNMRs 600 MHz. Extrakty vzoriek 1 – 3 (20 – 30 mg) sa rozpustili v 0,6 ml deuterovaného dimetylsulfoxidu (DMSO-*d*₆) v kremenných NMR kyvetách. Určenie štruktúry chemických zlúčenín v metanoloých extraktoch vzoriek 1 – 3 si vyžadovalo kompletnú analýzu 1D a 2D NMR spektier. Aby sa z protónového NMR spektra určila kvalita ako aj kvantita chemických zlúčenín, musela sa uskutočniť dôkladná analýza 2D NMR spektier (COSY, HMBC

a HSQC). Získané dáta sú uvedené nasledovne: chemický posun v δ-škále, multiplicita signálov, integrovaná intenzita.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Priprava extraktov

V tabuľke 1 sa nachádzajú výťažnosti pre jednotlivé extrakty vzoriek 1 – 3 pripravené refluxovaním a maceráciou.

Ako vyplýva z tabuľky 1, najlepšia výťažnosť sa dosiahla u extraktu vzorky 2 (10,84 %) pripravenej refluxovaním. Vzorka bola kultivovaná na substráte *Oryza sativa japonica*, kmeň *Paecilomyces hepiali*. Najnižšia výťažnosť, dvojnásobne nižšia v porovnaní so vzorkou 2, bola zaznamenaná u extraktu vzorky 3 (4,90 %), ktorá bola pripravená rovnakou extrakčnou technikou. Z porovnaní priemerných výťažností extraktov pripravených refluxovaním a maceráciou (8,62 : 6,03) vyplýva, že extrakty 1 – 3 pripravené refluxovaním majú v priemere lepšiu výťažnosť ako extrakty získané maceráciou o 1,42 %. Rozdiely vo výťažnosti môžu byť spôsobené v pestovaní na rôznom substráte, v rozdielnom kmeni húb ako aj použitím rôznych extrakčných techník.

Antioxidačná aktivita

V tabuľke 2 sa nachádzajú výsledky antioxidačnej aktivity pripravených extraktov stanovené DPPH metódou. Výsledky sú uvedené ako IC₅₀ (koncentrácia

Tab. 2: Hodnoty IC₅₀ extraktov vzoriek 1 – 3 pripravených refluxovaním a maceráciou

Vzorka	Antioxidačná aktivita IC ₅₀ (mg.ml ⁻¹)	
	Reflux	Macerácia
1	2,00	3,60
2	5,45	4,20
3	4,14	3,56

extraktu, ktorá spôsobí 50 %-nú stratu aktivity DPPH radikálu) v mg.ml⁻¹.

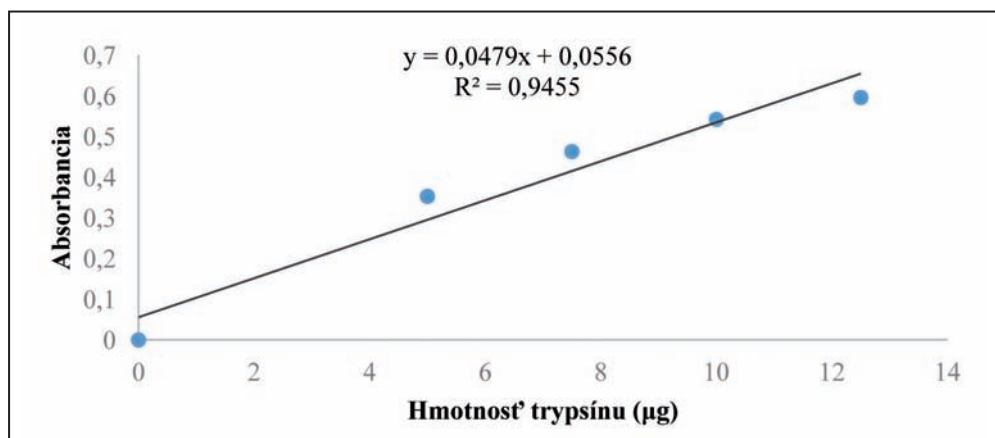
V prípade extraktov pripravených refluxovaním najlepšíu antioxidačnú aktivitu (IC₅₀) vykazoval extrakt vzorky 1 (2,00 mg.ml⁻¹) kultivovanej na substráte *Orzya sativa indica*, kmeň *Ophiocordyceps sinensis*. Takmer trojnásobne nižšiu schopnosť vychytávať radikál mal extrakt vzorky 2 (5,45 mg.ml⁻¹) kultivovanej na *Oryza sativa japonica*, kmeň *Paecilomyces hepiali*. Najlepšia schopnosť vychytávať stabilný DPPH radikál u extraktov pripravených maceráciou sa namerala u extraktu pripraveného zo vzorky 3 (3,56 mg.ml⁻¹), ktorá bola kultivovaná na substráte *Oryza sativa japonica*, kmeň *Ophiocordyceps sinensis*. Najvyššia hodnota IC₅₀ (najmenej aktívny extrakt), sa namerala u extraktu vzorky 2 (4,20 mg.ml⁻¹), ktorá bola pripravená kultiváciou na *Oryza sativa japonica* kmeň

Paecilomyces hepiali. Z porovnania hodnôt IC₅₀ extraktov pripravených maceráciou a refluxovaním vyplýva, že najnižšia hodnota IC₅₀ bola nameraná u extraktu vzorky 1 (pripravená refluxovaním, *Ophiocordyceps sinensis*, *Orzya sativa indica*) a najmenej aktívnymi sa ukázali extrakty vzorky 2 (kmeň *Paecilomyces hepiali*, *Oryza sativa japonica*) pripravené oboma extrakčnými technikami. Rozdielna antioxidačná aktivita môže byť zapríčinená použitím rôznych extrakčných techník (pri refluxovaní je použitá zvýšená teplota, ktorá môže zvýšiť rozpustnosť chemických látok vo vzorkách húb do rozpúšťadla). Taktiež odlišný kmeň húb (*Paecilomyces hepiali* vs. *Ophiocordyceps sinensis*) môže vplývať na rozdielne hodnoty antioxidačnej aktivity pripravených extraktov a v neposlednom rade aj použitý ryžový substrát, ktorý sa taktiež líši v obsahovom zastúpení látok s antioxidačnou aktivitou (glutatión, γ-tokoferol, γ-tokotrienol a pyridoxal-5'-fosfát) (Hu a kol., 2014).

Proteolytická aktivita

Extracelulárne proteázy sú známe ako kľúčové enzýmy v procese hubovej invázie. Prostredníctvom proteolytických enzýmov ničia chitín viažuce proteíny hmyzu. Aj u kmeňa *Ophiocordyceps sinensis* boli identifikované serínové proteázové gény (scp1 a csp2) (Semenova a kol., 2011). Pomocou kalibračnej priamky pre trypsín a nameraných hodnôt absorbancií jednotlivých vzoriek 1 – 3 sa stanovilo množstvo trypsínu v týchto vzorkách (viď graf 1).

Graf 1: Kalibračná priamka pre trypsín



Tab. 3: Hodnoty absorbancií vzoriek 1 – 3 merané pri 280 nm

Vzorka	A (280 nm)	m trypsínu (µg)*
1	0,150	1,97
2	0,215	3,32
3	0,040	–

*aktivita trypsínu je 250 U.mg⁻¹, prepočítané na hmotnosť trypsínu pomocou kalibračnej priamky
A = f (hmotnosť trypsínu)

V tabuľke 3 sa nachádzajú hodnoty absorbancií merané pri 280 nm na stanovenie proteolytickej aktivity vzoriek 1 – 3 pomocou 1 % substrátu roztoku kazeínu v 0,2 mol.dm⁻³ tlmivom roztoku KH₂PO₄-NaOH s pH 7,5.

Pri štúdiu enzymatickej-proteolytickej aktivity na substrát kazeín sa vzorka 3 ukázala byť neúčinná. Vzorka 2 vykazovala aktivitu porovnateľnú s aktiviitou trypsínu v množstve 3,32 µg. Išlo o vzorku kultivovanú na *Oryza sativa japonica*, kmeň *Paecilomyces hepiali*. Vzorka 1 kultivovaná na *Oryza sativa indica*, kmeň *Ophiocordyceps sinensis* vykazovala aktivitu ako trypsin v množstve 1,97 µg. Ako vidieť, rozdiel medzi týmito dvoma vzorkami je 1,7-násobne väčší v prospech vzorky 2. Rozdielna enzymatická aktivita mohla byť spôsobená v kultivovaní na rôznom substráte a takisto aj v rozdielnych kmeňoch húb.

Biologická aktivita

U pripravených extraktov sa stanovila antiproliferatívna aktivita/cytotoxicita pomocou MTS testu. V tabuľke 4 sa nachádzajú hodnoty IC₅₀ v mg.ml⁻¹. V priemere vykazovali všetky tri extrakty zvýšenú antiproliferatívnu aktivitu na bunkové línie HCT a Jurkat. Najnižšia aktivita sa v priemere pozorovala na MCF-7 a HeLa bunky. Extrakt vzorky 3 (*Ophiocordyceps sinensis*, *Oryza sativa japonica*) vykazoval najlepšiu schopnosť inhibovať rast Jurkat buniek v koncentrácii 0,150 mg.ml⁻¹. Pomerne nízku hodnotu IC₅₀ mal aj extrakt vzorky 2 (*Paecilomyces hepiali*, *Oryza sativa japonica*), ktorý pôsobil cytotoxicky na bunky HCT línie. Naopak, najnižšiu antiproliferatívnu aktivitu vykazovali extrakty vzoriek 1 a 2 na bunkovú líniu MCF-7 (2,786 mg.ml⁻¹) a HeLa (2,708 mg.ml⁻¹).

NMR spektroskopia

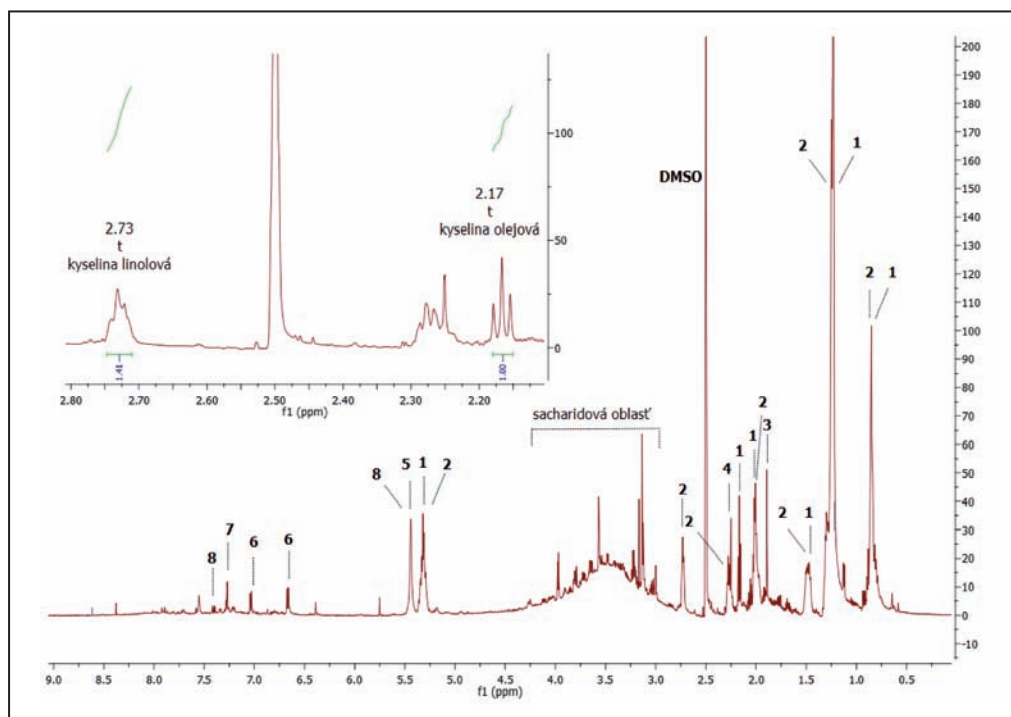
Pomocou NMR analýzy (¹H, ¹³C, COSY, TOCSY, HSQC a HMBC) spektier sa podarilo určiť chemické zloženie extraktov 1 – 3. Identifikovala a stanovila sa chemická štruktúra pre deväť chemických zlúčením (kyselina olejová, kyselina linolová, kyselina octová, kyselina jantárová, močovina, tyrozín, fenylalanín, uracil, glycerol). Na spracovanie a analýzu nameraných NMR dát sa použil softvér Mnova-MestReNova, version 11.0.4-18998, 2017 (Cobas a kol., 2017). Na obrázku 2 sa nachádza vybrané ¹H NMR spektrum extraktu vzorky 2 pripravené z kmeňa *Paecilomyces hepiali*.

Tab. 4: Biologická aktivita extraktov vzoriek 1 – 3

Vzorka/bunková línia	IC ₅₀ (mg.ml ⁻¹)			
	HCT	Jurkat	MCF-7	HeLa
1	0,351	0,879	2,786	2,708
2	0,190	0,269	1,629	0,756
3	0,421	0,150	0,291	1,937

HCT – bunková línia rakoviny hrubého čreva, Jurkat – bunky akútnej T-lymfocytovej leukémie, MCF-7 – bunková línia rakoviny prsníka, HeLa – bunková línia rakoviny krčka maternice

Obr. 2: ^1H NMR spektrum extraktu vzorky 2 (*Paecilomyces hepiali*, *Oryza sativa japonica*) merané v DMSO*



*číslovanie zlúčenín v ^1H NMR spektre (kyselina olejová 1, kyselina linolová 2, kyselina octová 3, kyselina jantárová 4, močovina 5, tyrozín 6, fenylalanín 7, uracil 8, glycerol 9)

V tabuľke 5 sa nachádza NMR charakterizácia chemických zlúčenín získaná kompletnou analýzou 1D a 2D NMR spektier pre extrakty 1 – 3 pripravené refluxovaním.

Na určenie pomeru majoritných chemických zlúčenín uvedených v tabuľke 5 sa využila integrácia ich odlišných protónových signálov. V tabuľke 6 sa nachádza pomer zlúčenín v zmesných spektrách extraktov 1 – 3. Integrovali sa nasledujúce protónové signály: kyselina olejová (2,15 ppm, t, 2H); kyselina linolová (2,73 ppm, t, 2H); kyselina octová (1,90 ppm, s, 3H); kyselina jantárová (2,25 ppm, s, 4H); močovina (5,50 ppm, s, 4H); tyrozín (7,01 ppm, d, 2H), fenylalanín (7,27 ppm, m, 5H); uracil (7,40 ppm, d, 1H); glycerol (3,25 ppm, dd, 2H). Integrovaná intenzita sa prepočítala na 1H.

V porovnaní s literatúrou (Park a kol., 2013) sa v pripravenom extrakte vzorky 2 stanovili zlúčeniny fenylalanín a tyrozín, ktoré boli taktiež prítomné u kmeňa *Cordyceps bassiana*. Ako vyplýva z tabuľky 6, majoritné zlúčeniny u extraktov vzoriek 1 – 3 boli kyselina olejová a kyselina linolová a u všetkých troch

bola prítomná aj močovina. Z porovnania všetkých troch extraktov vyplýva, že u extraktu vzorky 2 (*Paecilomyces hepiali*) sa stanovilo najviac odlišných chemických zlúčenín – metabolitov. Je zaujímavé, že extrakty vzoriek 1 a 3 (oba *Ophiocordyceps sinensis*), ktoré mali najlepšiu schopnosť vychytávať DPPH radikál, obsahovali ako majoritné len kyselinu olejovú a linolovú v pomere 2 : 1. Z literatúry je známe, že izoméry konjugovanej kyseliny linolovej vykazujú antioxidačné vlastnosti (Liangli a kol., 2001; Fagali a kol., 2008). Na základe chemického zloženia pripravených extraktov a literatúry môžeme predpokladať, že za antioxidačnú aktivitu sú zodpovedné vyššie masné kyseliny. Prítomnosť ďalších chemických látok (v extrakte vzorky 2) negatívne ovplyvňuje schopnosť deaktivovať DPPH radikál. Naopak, extrakt vzorky 2, ktorý obsahoval najviac rôznych chemických zlúčenín, vykazoval v priemere najlepšiu antiproliferatívnu aktivitu na študované bunkové línie (HCT, Jurkat, HeLa a MCF-7). Na základe NMR analýzy môžeme predpokladať, že za antiproliferatívnu aktivitu môžu

Tab. 5: NMR charakterizácia majoritných zlúčenín v extraktoch 1 – 3

Chemická zlúčenina	¹ H NMR δ ppm (multiplicita signálu*, integrovaná intenzita, označenie vodíka)	¹³ C NMR δ ppm (označenie uhlíka)
kyselina olejová	5,32 (m, 1H, H-10); 5,30 (m, 1H, H-9); 2,15 (t, 2H, H-2); 2,03–1,96 (m, 4H, H-8,11); 1,46 (qi, 2H, H-3); 1,32–1,23 (m, 20H, H-4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15, 16, 17); 0,85 (t, 3H, H-18)	174,6 (C-1); 129,7 (C-10); 127,7 (C-9); 33,9 (C-2); 26,6 (C-8,11); 24,6 (C-3); 22,0–29,1 (C- 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15, 16, 17); 13,9 (C-18)
kyselina linolová	5,35–5,27 (m, 4H, H-9,10,12,13); 2,73 (t, 2H, H-11); 2,01 (t, 2H, H-2); 2,00–1,96 (m, 4H, H-8,14); 1,46 (qi, 2H, H-3); 1,32–1,23 (m, 14H, H-4,5,6,7,15,16,17); 0,84 (t, 3H, H-18)	176,9 (C-1); 129,7 (C-9,10); 127,7 (C-12,13); 34,0 (C-2); 29,0 (C-14); 27,0 (C-8); 25,3 (C-11); 25,2 (C-3); 22,0–29,1 (C-4, 5, 6, 7, 15, 16, 17); 13,9 (C-18)
kyselina octová	1,90 (s, 3H, H-2)	172,0 (C=O); 20,8 (C-2)
kyselina jantárová	2,25 (s, 4H, H-2,3)	173,5 (C=O); 29,0 (C-2,3)
močovina	5,50 (bs, 4H, NH ₂)	159,5 (C=O)
tyrozín	7,01 (d, 2H, H-3,5); 6,64 (d, 2H, H-2,6), 3, 42 (dd, 1H, CH), 2,85 (dd, 1H, CH ₂), 2,70 (dd, 1H, CH ₂)	175,0 (C=O); 155,9 (C-4); 131,7 (C-2,6); 127,8 (C-1); 116,9 (C-3,5); 57,2 (C-CH); 36,5 (C-CH ₂)
fenylalanín	7,30–7,17 (m, 5H, CHAr); 3,85 (dd, 1H, CH); 3,15 (dd, 1H, CH ₂); 2,98 (dd, 1H, CH ₂)	173,5 (C=O); 135,0 (Co-); 128,9 (Cm-); 127,5 (Cp-); 55,7 (C-CH); 36,4 (C-CH ₂)
uracil	7,40 (d, 1H, H-5); 5,48 (d, 1H, H-6)	165,0 (C=O); 152,3 (C=O); 142,9 (C-6); 101,0 (C-5)
glycerol	3,41 (qi, 1H, H-2); 3,33 (dd, 2H, H-1,3); 3,25 (dd, 2H, H-1,3)	72,3 (C-2); 62,7 (C-1,3)

*s-singlet, d-dublet, t-triplet, qi-kvintet, bs-broad singlet, dd-dublet dubletu, m-multiplet

Tab. 6: Pomer majoritných chemických zlúčenín určený z ¹H NMR spektier extraktov 1 – 3

Vzorka	Integrovaná intenzita odlišených signálov
	Kyselina olejová : kyselina linolová : kyselina octová : kyselina jantárová : močovina : tyrozín : fenylalanín : uracil : glycerol
1	0,50 : 0,25 : 0 : 0 : 0,22 : 0 : 0 : 0 : 0
2	0,50 : 1,18 : 0,16 : 0,16 : 0,72 : 0,26 : 0,06 : 0,10 : 0
3	0,50 : 0,33 : 0 : 0 : 0,18 : 0 : 0 : 0 : 0,23

byť zodpovedné polysacharidy, ktorých chemickú štruktúru sa nepodarilo určiť, no v prácach mnohých autorov sú práve tieto chemické zlúčeniny izolované z húb zodpovedné za antitumorovú aktivitu (Meng a kol. 2016; Nurmatamat a kol. 2018; Yang a kol., 2014; Zhang a kol., 2007).

ZÁVER

Štúdia sa zaoberá štúdiom troch kmeňov húb (*Ophiocordyceps sinensis* MFTCCB025/0216, MFTCCB027/0216 a *Paecilomyces hepiali* MFTCCB023/0216), ktoré boli kultivované na dvoch odlišných ryžových substrátoch (*Oryza sativa indica* a *Oryza sativa japonica*). Z týchto kmeňov sa pripravili metanolové extrakty, a to refluxovaním a maceráciou. Najlepšia výťažnosť sa dosiahla u vzorky 2 (10,8 %) pripravenej refluxovaním, produkčný kmeň *Paecilomyces hepiali* (MFTCCB023/0216), ktorá bola kultivovaná na japonskej ryži. Z nameraných výsledkov antioxidačnej aktivity vyplýva, že extrakt vzorky 1 pripravenej refluxovaním (*Ophiocordyceps sinensis*, MFTCCB025/0216) vykazoval najlepšiu antioxidačnú aktivitu (IC_{50} 2,00 mg.ml⁻¹) v porovnaní s najmenej účinným extraktom vzorky 2 (*Paecilomyces hepiali*), ktorý bol pripravený rovnako refluxovaním (IC_{50} 5,45 mg.ml⁻¹). Z troch študovaných extraktov sa proteolytická aktivita potvrdila u dvoch. Vzorka 3 kultivovaná na *Oryza sativa japonica* (*Ophiocordyceps sinensis*) sa ukázala byť neučinná. Vzorky 1 a 2 sa líšili 1,7-násobne v množstve trypsínu v prospech vzorky 2 (*Paecilomyces hepiali*). Táto vzorka vykazovala proteolytickú aktivitu porovnateľnú s aktivitou trypsínu v množstve 3,32 µg. Rozdielna enzymatická aktivita mohla byť spôsobená v kultivovaní na rôznom substráte, a taktiež aj v rozdielnych kmeňoch húb. Pomocou NMR analýzy sa určilo zastúpenie majoritných chemických zlúčenín v alkoholových extraktoch. Pri testovaní biologickej aktivity extrakty vzoriek 1 (IC_{50} 0,351 mg.ml⁻¹, *Ophiocordyceps sinensis*, *Oryza sativa indica*) a 2 (IC_{50} 0,190 mg.ml⁻¹, *Paecilomyces hepiali*) vykazovali najlepšiu účinnosť na HCT

bunkovú líniu a extrakt vzorky 3 (IC_{50} 0,150 mg.ml⁻¹, *Ophiocordyceps sinensis*, *Oryza sativa japonica*) inhiboval najlepšie rast Jurkat buniek.

POĎAKOVANIE

Za nameranie NMR spektier patrí poďakovanie RNDr. Márii Vílkovej, PhD. a doc. RNDr. Jánovi Imrichovi, CSc. (Laboratórium nukleárnej magnetickej rezonancie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach). Za testovanie biologickej aktivity pripravených extraktov patrí poďakovanie prof. MVDr. Jánovi Mojžišovi, DrSc. (Ústav farmakológie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach).

ZOZNAM LITERATÚRY

Aung, H. H., Wang, C. Z., Ni, M., Fishbein, A., Mehendale, S. R., Xie, J. T., Shoyama, C. Y., Yuan, C. S.: Crocin from crocus sativus possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells. *Exp. Oncol.*, 2007, 29, 175 – 80.

Coates, P. M., Betz, J. M., Blackman, M. R., Cragg, G. M., Levine, M., Moss, J., White, J. D.: *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 2nd edn., United Kingdom: Informa, 2010, 185 – 192.

Cobas, C., Domínguez, S., Larin, N., Iglesias, I., Geada, C., Seoane, F., Sordo, M., Monje, P., Fraga, S., Cobas, R., Peng, Ch., García, J. Á., Goebel, M., Vaz, E.: *Mnova-MestReNova*, version 11.0.4-18998, 2017.

Fagali, N. a Catalá A.: Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH techniques. *Bioophys. Chem.*, 2008, 137, 56 – 62.

Holliday, J. a Cleaver, M.: Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) link (Ascomycetes). A Review. *Int. J. Med. Mushr.*, 2008, 10, 219 – 234.

Hu, Ch., Shi, J., Quan, S., Cui, B., Kleessen, S., Nikoloski, Z., Tohge, T., Alexander, D., Guo, L.,

- Lin, H., Wang, J., Cui, X., Rao, J., Luo, Q., Zhao, X., Fernie, A. R., Zhang, D.: Metabolic variation between japonica and indica rice cultivars as revealed by non-targeted metabolomics. *Metabolomics plant physiology*, 2014, 4, 1 – 10.
- Chioza, A. a Ohga, S.: A Comparative study on chemical composition and pharmacological effects of paecilomyces hepiali and wild Ophiocordyceps sinensis. *Advances in Microbiology*, 2014, 4, 839 – 848.
- Liangli, Y.: Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 3452 – 3456.
- Meng, X., Liang, H., Luo, L.: Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydrate research*, 2016, 424, 30 – 41.
- Nurmamat, E., Xiao, H., Zhang, Y., Jiao, Z.: Effects of different temperatures on the chemical structure and antitumor activities of polysaccharides from Cordyceps militaris. *Polymers*, 2018, 10, 430.
- Pang, F., Wang, L., Jin, Y., Guo, L., Song, L., Liu, G.: Transcriptome analysis of Paecilomyces hepiali at different growth stages and culture additives to reveal putative genes in cordycepin biosynthesis. *Genomics*, 2018, 10, 162 – 170.
- Park, S. J., Hyun, S. H., Suh, H. W., Lee, S. Y., Sung, G. H., Kim, S. H., Choi, H. K.: Biochemical characterization of cultivated Cordyceps bassiana mycelia and fruiting bodies by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics*, 2013, 9, 236 – 246.
- Semanova, T. A., Belozersky, M. A., Belyakova, G. A., Borisov, B. A., Semenova, S. A., Dunaevsky, Y. E.: Secreted protease of the entomopathogenic fungus Cordyceps militaris. II. Enzyme properties and adsorption on the insect cuticle. *Microbiology*, 2011, 80, 889 – 892.
- Wang, J., Nie, S., Kan, L., Chen, H., Cui, S. W., Phillips, A. O., Phillips, G. O., Xie, M.: Comparison of structural features and antioxidant activity of polysaccharides from natural and cultured Cordyceps sinensis. *Food Sci. Biotechnol.*, 2017, 26, 55 – 62.
- Wu, Y. Y., Wang, H. X., Ng, T. B.: A Novel metalloprotease from the wild basidiomycete mushroom Lepista nuda. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 3, 256 – 62.
- Yao, X., Meran, S., Fang, Y., Martin, J., Midgley, A., Pan, M. M., Liu, B. Ch., Cui, S. W., Phillips, G. O., Phillips, A. O.: Cordyceps sinensis: In vitro anti-fibrotic bioactivity of natural and cultured preparations. *Food Hydrocolloids*, 2014, 35, 444 – 452.
- Yang, S., Jin, L., Ren, X., Lu, J., Meng, Q.: Optimization of fermentation process of Cordyceps militaris and antitumor activities of polysaccharides in vitro. *Journal of food and drug analysis*, 2014, 22, 468 – 476.
- Yu, Y., Wang, W., Wang, L., Pang, F., Guo, L., Song, L., Liu, G., Feng, C.: Draft Genome Sequence of Paecilomyces hepiali, isolated from Cordyceps sinensis. *Genome Announc.*, 2016, 4, e00606-16.
- Zhang, M., Cui, S. W., Cheung, P. C. K., Wang, Q.: Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, 2007, 18, 4 – 19.



VPLYV INTENZIFIKAČNÝCH FAKTOROV NA KVALITU DROGY RODU MENTHA L. A MOŽNOSTI JEJ KONTAMINÁCIE

THE IMPACT OF INTENSIFICATION FACTORS ON QUALITY OF MENTHA L. AND POSSIBILITIES OF ITS CONTAMINATION

Martiš, M., Eftimová, J.

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

jarmila.eftimova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Mäta pieporná (*Mentha x piperita* L.) a mäta kučeravá (*Mentha spicata* L.) patria do rodu *Mentha* L., čeľade *Lamiaceae* a sú bohaté na silice (mentol, menton, jasmón, karvón, pulegón), celkové polyfenoly (kyselina kávová, kyselina rozmarínová) a flavonoidy (eriocitrín a luteolínové deriváty). Produkčnú schopnosť porastov, ako aj kvalitu drogy *Mentha x piperita* L., a *Mentha spicata* L. ovplyvňujú vonkajšie agroekologické faktory (podnebie, pôda, terén), ale aj živiny, spôsob a termín zberu a sušenie.

Cieľom predloženej štúdie bolo overiť vplyv agroekologických a intenzifikačných faktorov (pestovateľské substráty, hnojivá) na obsahové látky drogy *Mentha x piperita* L. a *Mentha spicata* L.

Na základe našich pokusov sme zistili,

že najpriaznivejší vplyv na obsah celkových polyfenolov v *Mentha x piperita* L. mala kombinácia substrátu s tuhým hnojivom (6,35 %). Naopak, najmenšiu hodnotu celkových polyfenolov (2,31 %) sme namerali vo variante kombinácie substrátu s dvomi tekutými hnojivami. Pri druhu *Mentha spicata* L. sme namerali najvyššiu hodnotu celkových polyfenolov (6,46 %) pri použití len jedného hnojiva zapracovaného do pôdy. Najnižšie hodnoty celkových polyfenolov (2,23 %) boli zaznamenané v kombinácii substrátu a dvoch tekutých hnojív. Všetky vzorky sme podrobili DPPH testu na antioxidačnú aktivitu a zistili sme najnižšiu schopnosť redukcie u druhu *Mentha spicata* L. (52,66 %) a *Mentha x piperita* L. (60,59 %). Najvyššia schopnosť redukcie bola zistená u *Mentha x piperita* L. (84,81%) a *Mentha spicata* L. (84,79 %).

Kľúčové slová: antioxidačná aktivita DPPH; celkové polyfenoly; *Mentha x piperita*; *Mentha spicata*

ABSTRACT

A Peppermint (*Mentha x piperita*) and a Spearmint (*Mentha spicata*) are members of *Mentha* L. genus, *Lamiaceae* species and are rich in essential oils (menthol, menthone, jasmone, carvone, pulegone), total polyphenols (caffeic acid, rosmarinic acid) and flavonoids (eriocitrine and derivatives of luteoline). External agroecological factors such as climate, soil and landscape conditions together with nutrients, drying and time of harvest affect the production ability as well as quality of *Mentha x piperita* L. and *Mentha spicata* L.

The aim of this study was to verify the impact of agroecological and intensification factors (growing medium, fertilisers) on *Mentha x piperita* and *Mentha spicata* contents.

Our experiments resulted in the following findings: the most beneficial effect on total polyphenol count (6,35 %) in *Mentha x piperita* L. was achieved by the combination of substrate with a solid fertiliser; on the other hand, the smallest amount of total polyphenols (2,31 %) was detected with the use of substrate and two fluid fertilisers in combination. The highest count of total polyphenols (6,46 %) in *Mentha spicata* L. species was detected with the use of only one fertiliser mixed with soil. The combination of substrate with two fluid fertilisers showed the smallest amount (2,23 %) of total polyphenols in *Mentha spicata* L. All samples were tested with the DPPH antioxidant assay. The smallest ability of reduction detected was 52,66 % in *Mentha spicata* L., 60,59 % in *Mentha x piperita* L. and the highest (84,81 %) in *Mentha x piperita* L., and 84,79 % in *Mentha spicata* L.

Key words: DPPH antioxidant assay; *Mentha x piperita*; *Mentha spicata*; total polyphenols

ÚVOD

Stále vyšší záujem o získavanie kvalitných vstupných surovín vo farmaceutickom priemysle prináša potrebu hľadať nové spôsoby ako zlepšiť kvalitu ovplyvnením intenzifikačných faktorov.

Hlavným cieľom predloženej štúdie bolo v pokusoch overiť vplyv agroekologických a intenzifikačných faktorov na obsahové látky drogy *Mentha x piperita* L. a *Mentha spicata* L. a na základe dosiahnutých výsledkov navrhnúť optimalizáciu priebehu pestovania *Mentha x piperita* L. a *Mentha spicata* L. s cieľom zvýšiť obsahové látky a kvalitu drogy, ale zároveň upozorniť aj na možnú kontamináciu drogy.

Rod mäta (*Mentha* L.) patrí medzi taxonomicky zložité druhy, u ktorých často dochádza k hybridizácii a následne sa rozmnožuje už iba vegetatívne. Pre obsah silíc, najmä mentolu, sa najčastejšie používa na prípravu čajov, tinktúr alebo extraktov. Tieto produkty majú vzhľadom na obsah mentolových zlúčenín príjemnú vôňu a obsahujú veľké množstvo polyfenolových zlúčenín, vďaka ktorým majú pozitívny vplyv na zdravie človeka. Medzi antioxidanty obsiahnuté v rode *Mentha* L. patria zlúčeniny ako karotenoidy, fenolové kyseliny, flavonoidy a triterpény. Takisto obsahujú aj lipofilné polysubstituentné flavóny, triesloviny či horčiny. Tieto obsahové látky môžu znížiť škodlivé oxidačné reakcie v ľudskom tele, najmä viazaním voľných radikálov.

Hlavným cieľom tejto štúdie bolo experimentálne na dvoch druhoch mäty overiť, ako výrazne je možné ovplyvniť obsahové látky v rastline použitím rôznych druhov pôd a hnojív. Naším cieľom bolo vytvoriť čo najoptimálnejšie podmienky na pestovanie a zistiť ich vplyv na obsah celkových polyfenolov a antioxidačnú aktivitu.

Tab. 1: Rozdelenie substrátov a hnojív, dávkovanie hnojív počas celej doby experimentu

Vzorky	Substráty + hnojivá	1. dávka hnojiva	Dávkovanie hnojív
Vzorka 1	Profimix	x	x
Vzorka 2	Natura Substrát Bylinková Záhradka, Natura kvapalné hnojivo Bylinková Záhradka	po 3 týždňoch	1/14 dní, 15 ml/ 2 l vody
Vzorka 3	Záhradnícky substrát	x	x
Vzorka 4	Záhradnícky substrát + NPK	po 4 týždňoch	60 g/m ²
Vzorka 5	Záhradnícky substrát + Cererit	po 4 týždňoch	30 g/m ²
Vzorka 6	Záhradnícky substrát + maštalný hnoj	zapracovať do pôdy	3 l/m ²
Vzorka 7	Maštalný hnoj	zapracovať do pôdy	3 l/m ²
Vzorka 8	Záhradnícky substrát + Multicote	zapracovať do pôdy	d'alej nehnojiť
Vzorka 9	Záhradnícky substrát + Kristalon Gold	po 4 týždňoch	1/7 dní
Vzorka 10	Záhradnícky substrát + Kristalon Gold + VK Univerzál	po 4 týždňoch	15ml/1l vody (Striedať 1/7 dní Kristalon a 1/7 dní VK Univerzál)

MATERIÁL A METÓDY

Rastlinný materiál

Mentha x piperita L. a *Mentha spicata* L. boli pestované v troch odlišných substrátoch (Záhradnícky substrát, Profimix, Bylinková Záhradka) za použitia 7 rôznych hnojív (Bylinková Záhradka – kvapalné hnojivo, NPK, Cererit, maštalný hnoj, Multicote, Vitali Complex, Kristalon Gold). Týmto spôsobom sme vytvorili 10 variantov rôznych kombinácií vzoriek. Rozdelenie substrátov a hnojív, ako aj dávkovanie hnojív počas celej doby experimentu je zhrnuté v tabuľke 1.

Stanovenie sekundárnych metabolitov

Spektrofotometrické stanovenie celkového množstva polyfenolov je založené na oxidačno-redukčnej reakcii v alkalickom prostredí. Z

analyzovanej vzorky sme navážili 0,5 g drogy, doplnili do 150 ml destilovanej vody a varili 30 minút. Potom sme zmes viali do 250 ml odmerky, doplnili destilovanou vodou a prefiltrovali. Z filtrátu sme použili 5 ml a doplnili ho destilovanou vodou do 25 ml. Celkové množstvo polyfenolov prítomných vo vzorkách sme zisťovali kolorimetrickou metódou s použitím Folin-Ciocalteuovho činidla (Singleton a Rossi, 1965) pri absorbanzii 750 nm. Po zreagovaní fenolových zlúčenín s činidlom Folin-Ciocalteu vzniklo modré sfarbenie. Koncentrácia celkových polyfenolov bola prepočítaná na sušinu v droge a vyjadrená percentuálnym obsahom pyrogalolu.

Stanovenie antioxidačnej aktivity

Všetky analyzované vzorky pozostávali z naváženia 1g zhomogenizovaných lístkov dvoch druhov *Mentha* a 100 ml destilovanej vody. Zmes

sa varila 30 minút. Straty odparením vody sa doplnili, extrakt sa prefiltraval a použil na stanovenie antioxidačnej aktivity.

Na meranie antioxidačnej aktivity bola použitá DPPH metóda založená na reakcii DPPH radikálu s antioxidačne pôsobiacimi látkami roztoku. Výsledky boli vyjadrené ako percentuálny podiel redukcie radikálu.

Štatistické metódy

Výsledky v tejto štúdii sú prezentované ako priemer zo 4 nezávislých meraní. Následne boli výsledky štatisticky vyhodnotené a uvedené v tabuľke. Grafy boli vytvorené softvérom Microsoft Excel 2013.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rámci taxónu *M. x piperita* sme zistili, že najvyšší obsah polyfenolov mala vzorka 4 (6,35 %) s použitím záhradníckeho substrátu a hnojiva NPK, ktoré sa aplikovalo vždy 1 x za mesiac. Takmer totožná hodnota bola dosiahnutá aj pri vzorke 5 (záhr. substrát + Cererit). Jednalo sa o tuhé granulované hnojivo s podobným zložením anorganických zložiek, ktoré sa líšili len minimálne. Ostatné vzorky dosiahli mierne nadpriemerné hodnoty [vzorka 3 (4,25 %), 6 (4,88 %), 7 (4,82 %), 8 (4,17 %)]. Pri vzorke 3 to bolo dosiahnuté pestovaním len v čistom záhradníckom substráte, zatiaľ čo pri ostatných vzorkách bol použitý maštalný hnoj zapracovaný do pôdy alebo dlhodobo pôsobiace hnojivo Multicote. Výsledky dosiahnuté pri vzorkách 1 (2,43 %), 2 (2,67 %), 9 (3,26 %) a 10 (2,31 %) boli mierne podpriemerné, avšak pri vzorke 1 sme použili len samotný substrát bez doplnenia hnojiva. Pri vzorke 2 sa používal bylinkový substrát s doplnením o kvapalné hnojivo, a pri vzorkách 9 a 10 sa používalo totožné kryštalické hnojivo doplnené ešte o kvapalné hnojivo pri vzorke 10. Pri vzorkách 2, 9 a 10 sme predpokladali, že práve v týchto prípadoch sa potvrdí alebo vyvráti fakt, že ani kombinované používanie hnojív nezabezpečí najvyšší výnos.

V taxóne *M. spicata* sme zistili, že najvyšší obsah

polyfenolov mala vzorka 4 s použitím záhradníckeho substrátu a hnojiva NPK (6,43 %), ktoré sa aplikovalo vždy 1x za mesiac. Vysoké hodnoty boli dosiahnuté aj pri vzorkách 5 (5,62 %), 6 (5,5 %) a 7 (5,92 %). Jednalo sa o tuhé granulované hnojivo Cererit a maštalný hnoj. Pri vzorkách 2 (4,65 %) a 3 (4,49 %) sme dosiahli mierne nadpriemerné hodnoty, z čoho vyplýva, že pre odrodu *M. spicata* toto zloženie substrátu a hnojiva vyhovuje viac. Výsledky dosiahnuté pri vzorkách 1 (3,46 %) a 8 (3,11 %) boli priemerné, čo odráža dobre nastavené podmienky pestovania. Pri vzorkách 9 (2,65 %) a 10 (2,23 %) boli namerané najnižšie hodnoty polyfenolov.

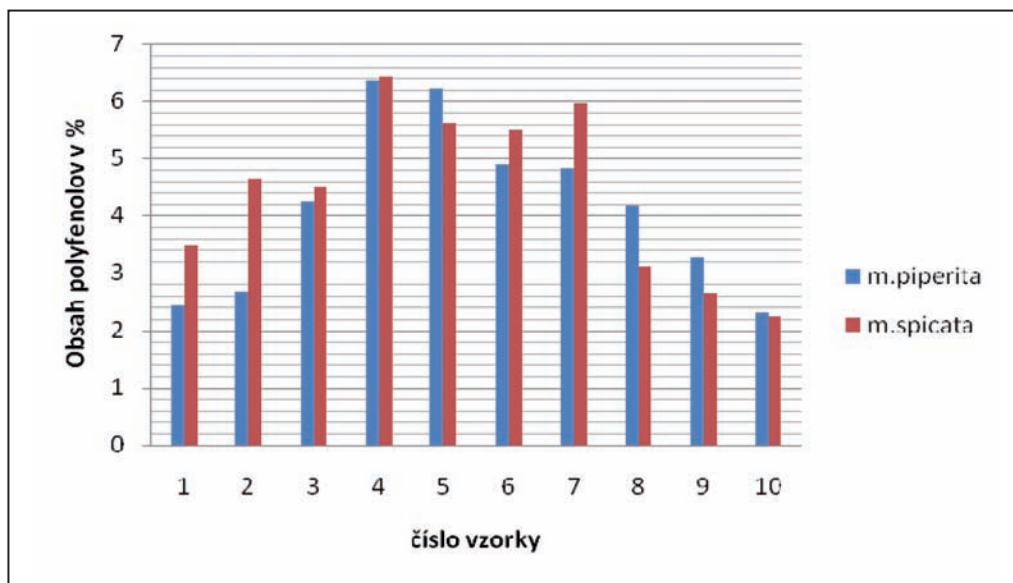
Z nameraných údajov vyplýva, že z hľadiska polyfenolov je najvhodnejšia kombinácia záhradníckeho substrátu a granulovaného hnojiva NPK. Prehnojenie, resp. nadmerné používanie hnojív môže mať za následok aj zníženú tvorbu požadovaných obsahových látok a môže výrazne ovplyvniť kvalitu a toxicitu drogy.

Obsah fenolických látok je tiež závislý na type extraktu, ako uvádzajú Iqbal a kol. (2013). Najvyšší obsah fenolických látok bol nameraný v metanolových extraktoch *M. longifolia* (74,43 mg GAE/g DM) a najmenší v hexánových extraktoch, konkrétne 1,7 mg GAE/g DM. Benedec a kol. (2013) uvádzajú pre *M. longifolia* 219,2 mg GAE/g DM. Obsah fenolov v našich vodných extraktoch sa pohyboval na úrovni tesne pod metanolovými extraktmi (viď obr. 1).

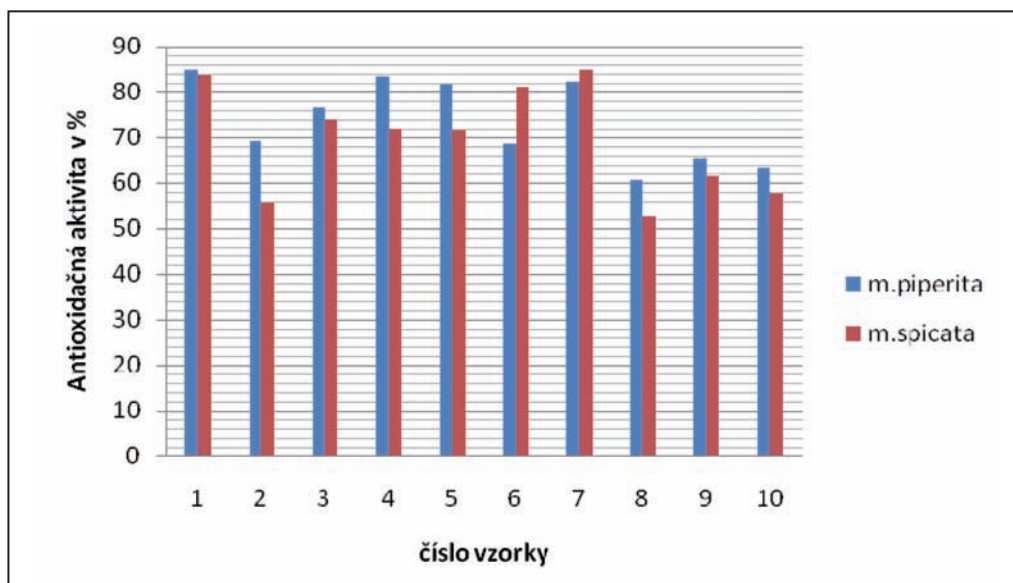
Na stanovenie antioxidačnej aktivity sme zvolili metódu DPPH. Na základe dosiahnutých parametrov sme vyjadrili antioxidačnú aktivitu ako percento redukcie DPPH radikálu (viď obr. 2).

Antioxidačná aktivita sa v pozorovanom taxóne *M. x piperita* pohybovala v rozmedzí 84,81 % pri vzorke 1 až po 60,59 % pri vzorke 8. Pri vzorke 1 bol použitý Profimix substrát bez použitia ďalšieho prihnojovania, keďže vo vzťahu k zloženiu má výborne navrhnutú skladbu látok, ktorá dostatočne stimuluje rastlinu k produkcii metabolitov a zároveň má vysokú antioxidačnú aktivitu. Pri vzorke 8 bolo použité hnojivo s dlhodobým účinkom, ktoré sa pri výsadbe zapracovalo do pôdy a počas 6 mesiacov

Obr. 1: Fytochemická analýza vodných extraktov na obsah celkových polyfenolov u mäty pestovaných na odlišných substrátoch s použitím rôznych hnojív



Obr. 2: Antioxidačná aktivita vodných extraktov rastlín pestovaných v odlišných substrátoch s použitím rôznych hnojív stanovená metódou DPPH



sa pomaly uvoľňovalo a vyživovalo rastliny. Táto kombinácia mala negatívny vplyv na antioxidačnú aktivitu rastliny, avšak pozitívne vplývala na obsah polyfenolov, kde výsledky svedčia o nadpriemernej produkcii. Pri ďalších vzorkách boli namerané o niečo nižšie hodnoty, no stále s vysokým antioxidačným potenciálom. Vzorka 4 (83,39 %) vykázala druhú najvyššiu antioxidačnú aktivitu, z čoho vyplýva, že kombinácia záhradného substrátu a NPK sa javí

ako vhodná. Vzorka 5 (81,82 %) dosiahla vysokú antioxidačnú aktivitu pri použití hnojiva Cererit s mesačnou frekvenciou aplikácie. Vzorka 7 (82,29 %) pri použití maštalného hnoja takisto vykázala vysokú antioxidačnú aktivitu a zároveň nadpriemerný obsah polyfenolov.

Hodnoty antioxidačnej aktivity v rode *M. spicata* sa pohybovali v rozmedzí 84,8 % pri vzorke 7 až 52,66 % pri vzorke 8. Táto odroda na rozdiel od

M. x piperita lepšie znášala pridané hnojivo počas rastu a zároveň si zachovala vysokú antioxidačnú aktivitu. Hnojivo Multicote malo negatívny vplyv na antioxidačnú aktivitu *M. spicata*. Zaujímavé hodnoty antioxidačnej aktivity boli namerané pri vzorkách 1, 3, 4, 5 a 6. Prvá vzorka bola pestovaná bez pridaného hnojiva (len za použitia Profimixu), čo nám opäť potvrdilo vhodnosť tohto substrátu pre rod *Mentha* L. Pri tretej vzorke sme použili len čistý záhradnícky substrát bez pridania hnojiva. Pri vzorkách 4 (71,89 %) a 5 (71,33 %) boli použité granulované hnojivá NPK a Cererit. Ich vplyv na antioxidačnú aktivitu bol výborný. Pri vzorke 6 (81,19 %) bola použitá kombinácia záhradníckeho substrátu a maštalného hnoja zapracovaného do pôdy.

Z našich výsledkov vyplýva, že vhodne navrhnuté hnojivá majú pozitívny vplyv na kvantitu a kvalitu drogy (vizuálna stránka, počet listov, výška rastliny, hmotnosť, obsahové látky), ako aj antioxidačnú aktivitu. Rozdiely, ktoré sme zaznamenali u sledovaných druhov *Mentha* L. sa nedajú zovšeobecniť na iné druhy rodu *Mentha* L., ako aj na iné druhy liečivých rastlín.

Rozdiely v antioxidačnej aktivite je možné pozorovať aj v rámci taxónov rodu *Mentha*. Neugebauerová a kol. (2011) uvádzajú najnižšiu antioxidačnú aktivitu u *M. longifolia* (12,97 mM Trolox/100 g) a najvyššiu u *M. x piperita* var. *piperita* „Agnes“ (35,31 mM Trolox/100 g). Ahmad a kol. (2012) uviedli, že metanolové extrakty mali preukázateľne vyššiu antioxidačnú aktivitu, pričom najvyššia hodnota bola pozorovaná u *M. suaveolens*, nasledovaná *M. longifolia*, *M. x piperita*, *M. pulegium*, *M. roleyana*, *M. arvensis*, *M. spicata* a *M. citrata*. V uvedenej štúdii mala najvyššiu antioxidačnú aktivitu *M. x piperita* „Danica“ a najnižšiu *M. cervina*, pričom u *M. suaveolens* bola antioxidačná aktivita stredná alebo nižšia v závislosti od kultivaru „Jablečná“ (43,64 mM Trolox/100 g) a „Variegata“ (35,01 mM Trolox/100 g).

ZÁVER

V dnešnej dobe je pri pestovaní liečivých rastlín kladený dôraz na čo najvyššiu kvalitu, čistotu a čo možno najvyšší obsah účinných látok. Preto je výskum v tejto oblasti vysoko rozšírený a je tu priestor stále objavovať a zlepšovať podmienky, v ktorých sa pestujú farmaceuticky významné rastliny.

V tejto štúdii sme sa venovali stanoveniu obsahových látok v *Mentha x piperita* a *Mentha spicata* pri súčasnej identifikácii antioxidačnej aktivity. Antioxidačnými vlastnosťami v *Mentha x piperita* a *Mentha spicata* sa vyznačujú vo vode rozpustné polyfenoly (kyselina rozmarínová, kyselina kávová) a flavonoidy (luteolín, apigenín, eriodiktyol, hesperetín), na druhej strane sú antioxidačnou aktivitou známe najmä silice (mentol, menton, jasmón, karvón, pulegón).

Obsah účinných látok je závislý od viacerých faktorov a podmienok pestovania liečivých rastlín, preto bolo našim cieľom zistiť, do akej miery sa dajú ovplyvniť obsahové látky použitím rôznych substrátov a hnojív počas vegetačnej doby u *Mentha x piperita* a *Mentha spicata*. Použili sme 3 rôzne substráty (záhradnícky, Profimix a Bylinková Záhradku), okrem klasickej pôdy, ktorá sa nachádza v areáli bylinkovej záhrady UVLF. K nim sme zaradili ako kombináciu jedno zo siedmich hnojív (Kvapalné hnojivo Bylinková Záhradka, NPK, Cererit, maštalný hnoj, Multicote, Kristalon Gold a Vitaly Komplex Univerzal), avšak niektoré vzorky políčok ostali bez pridania hnojiva. Už pri vysádzaní taxónov sme do pôdy zapracovali maštalný hnoj a Multicote. Kvapalné a tuhé hnojivá sme začali používať až po 2, resp. 4 týždňoch od výsadby podľa rozpisu.

Pri stanovení celkových polyfenolov sme prepočítali ich obsah na sušenú drogu vo vzorkách a vyjadrili ich percentuálny obsah. Najvyššie množstvo celkových polyfenolov u *Mentha x piperita* sme stanovili vo vzorke 4, a to 6,35 % s použitím záhradníckeho substrátu a hnojiva NPK. Najvyššie množstvo polyfenolov u *Mentha spicata* sme takisto stanovili vo vzorke 4 (6,43 %) s použitím

záhradníckeho substrátu a hnojiva NPK.

Antioxidačnú aktivitu sme stanovovali pomocou DPPH. Celková antioxidačná aktivita rodu *Mentha* L. je vysoká, čo nám potvrdili aj naše výsledky. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu u *M. x piperita* sme namerali pri vzorke 1 (84,81 %) za použitia substrátu Profimix bez ďalšieho prihnojovania. Jedná sa o nový typ substrátu s ideálnym zložením, avšak obsah polyfenolov je nízky. Veľmi blízke hodnoty antioxidačnej aktivity sme zistili aj pri použití kombinácie záhradníckeho substrátu s NPK či maštaľným hnojom. Ich antioxidačná aktivita bola v rozpätí 82,3 % až 83,4 %. Táto kombinácia je pre použitie v praxi vhodnejšia, pretože okrem vysokej antioxidačnej aktivity je zachované aj relatívne nadpriemerné množstvo polyfenolov.

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme pre prax odporúčať pestovanie *Mentha x piperita* na pôde s aplikáciou Profimixu, kde sme namerali najvyššiu antioxidačnú aktivitu (84,81 %). Ako vhodnú kombináciu odporúčame pestovanie na záhradníckom substráte s aplikáciou NPK (60g/m²), kde sme namerali antioxidačnú aktivitu 83,39 %. Ďalšou vhodnou kombináciou je pestovanie v pôde s aplikáciou maštaľného hnoja, kde sme namerali antioxidačnú aktivitu 82,30 %.

Pre pestovanie *Mentha spicata* podľa našich výsledkov odporúčame pestovať rastlinu v pôde s aplikáciou maštaľného hnoja (3kg/m²), kde sme namerali najvyššiu antioxidačnú aktivitu (84,80 %). Ako vhodnú kombináciu na pestovanie odporúčame ešte pestovanie na Profimixe, kde sme namerali antioxidačnú aktivitu 83,64 %.

Dosiahnuté výsledky poukazujú na to, že je možné cielene optimalizovať produkčnú schopnosť porastov liečivých rastlín, ovplyvniť množstvo obsahových látok a bezpečnosť drog.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia vznikla s finančnou podporou firmy AGRO CS Slovakia, a. s.

ZOZNAM LITERATÚRY

Ahmad, N., Fazal, H., Ahmad, I., Abbasi, B. H.: Free radical scavenging (DPPH) potential in nine *Mentha* species. *Toxicology and Industrial Health*, 2012, 28, 83 – 89.

Benedec, L., Vlase, I., Oniga, A. G., Mot, R., Silaghi-Dumitrescu, D., Hanganu, B., Tiperciuc, B., Crișan, C.: LC-MS analysis and antioxidant activity of phenolic compounds from two indigenous species of *Mentha*. Note 1. *Farmacia*, 2013, 61, 262 – 267.

Fialová, S., Tekel'ová, D., Švajdlenka, E., Potúček, P., Jakubová, K., Grančai, D.: The variability of secondary metabolites in *Mentha x piperita* cv. 'Perpeta' during the development of inflorescence. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*, 2014, 61, 21 – 25.

Iqbal, T., Hussain, A. I., Chatha, S. A. S., Naqvi, S. A. R., Bokhari, T. H.: Antioxidant activity and volatile and phenolic profiles of essential oil and different extracts of wild mint (*Mentha longifolia*) from the Pakistani Flora. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013, 1 – 6.

Neugebauerová, J. a Vábková, J.: Antioxidační aktivita a látky fenolické povahy v rodu máta (*Mentha* L.). In Salaš, P. (ed.): *Rostliny v podmínkách měnícího se klimatu*. Lednice, Česká Republika, Október 20 – 21, 2011, 395 – 401.

Singleton, V. L. a Rossi, J. A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965, 16, 144 – 158.

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**. 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 sa vyhnúť 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), adrenalin/liekopis (nie epinefrín/INN), hydroxykarbamin (nie hydroxyurea), kromoglykán (nie chromoglykán), cholestyramín (nie colestyramín, kolestyramín), lítium (lithium), manitol (nie mannitol).

Latinské termíny sa píše kurzívou.

Fotografie, obrázky, grafy. Aby sa vyhlo prípadným nepresnostiam či chybám, odporúčame pripojiť fotografie, obrázky a grafy ako osobitný súbor a v texte uviesť odkaz na príslušnú fotografiu, obrázok a graf. 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 čierno-bielej 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. Obrázky, fotografie a grafy majú byť priebežne očíslované a má byť k nim 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 majú byť priebežne číslované a majú obsahovať podstatné a dôležité údaje, ktoré sa nenachádzajú v texte. Číslo a príslušný opis (názov) sa uvádza nad tabuľkou. Tabuľky obsahujú vodorovné a zvislé čiary, ktoré podporujú prehľadnosť zverejnených údajov. Pod tabuľkou sa uvádza vysvetlenie symbolov/skratiek použitých v tabuľke vrátane štatistiky (legenda).

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 názov v jazyku anglickom, ktorý má byť stručný a výstižný (veľké tučné písmená, veľkosť písma 14, zarovnanie na stred). Pod názvom sa uvádzajú mená autorov (priezvisko, iniciála/y), 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 vyvedené 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. Oddelujú sa bodkočiarkou.

ÚVOD

Uvádza sa stručný prehľad problematiky. Namiesto podrobného literárneho prehľadu je vhodnejšie sústrediť sa na striktné 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 sa vyhnúť 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.

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., Miřkina, L. I.: Determination of Tartrazine in drugs. *Pharm. Chem. J.*, 2003, 37, 558 – 559.

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.

Podczek, 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 *Paenibacillus larvae* and *Paenibacillus alvei*. In *Proceedings of the International Probiotic Conference: Probiotics for the 3rd Millennium*, 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.

Online website:

King, M. W.: *The Medical Biochemistry Page*. <http://themedicalbiochemistrypage.org>. Updated July 14, 2009. Accessed July 14, 2009.

PREHLADOVÉ 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 – Potvrďuje práce iných vedcov – zabráňuje 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 rozborové 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