

FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis
UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609



4

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 štvrťročne s príspevkami v slovenskom, českom alebo anglickom jazyku s abstraktom v angličtine.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA is a scientific journal issued by the University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, the Slovak Republic. The journal is published quarterly with articles in English, or Slovak or Czech with English abstracts.

Šéfredaktorka/Editor-in-Chief:

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/univerzitne-casopisy/folia-pharmaceutica-cassoviensia-vytlačky>.

December 2019

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

VYDÁVA
UNIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE V KOŠICIACH
SLOVAKIA



FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA
I., 4, 2019

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



EDITORIÁL

Milé čitateľky a čitatelia,

už je to rok, od kedy predstava vydávania nového časopisu znamenala pre celý redakčný tím veľkú, avšak nie nesplniteľnú výzvu. *Omne initium est difficile* (každý začiatok je neľahký), avšak o to viac je pre nás prípadný triumf vzácnejší.

Koniec roka je ako stvorený pre rekapituláciu úspechov i neúspechov. Vydávanie časopisu *Folia Pharmaceutica Cassoviensia* zaraďujeme jednoznačne medzi úspechy uplynulých mesiacov. Podarilo sa nám zaviesť do akademickej obce nový, kvalitný časopis, ktorého každé číslo obsahuje množstvo zaujímavých článkov. Mám radosť, že *Folia Pharmaceutica Cassoviensia* sa teší veľkej obľube nielen u čitateľov, ale aj u autorov príspevkov, ktorých každým číslom pribúda.

V poslednom tohtoročnom čísle sa bližšie dočítate o vplyve pH kultivačného média na stabilitu skvalénových adjuvantných emulzií používaných k príprave inaktivovaných vakcín a o matricových náplastiach používaných na liečbu schizofrénie u pacientov. Biologickej liečbe sa venujú dva články – jeden pri terapii ulceróznej kolitídy a druhý pri reumatoidnej artritíde. Posledná časť časopisu sa zaoberá naturálnymi látkami, ktoré sú v modernej terapii chorôb veľmi žiadané. Oboznámte sa bližšie s hodnotením účinku extraktu púpavy lekárskej v kombinácii s antimikrobiálnou látkou na bunkovú odpoveď *in vitro*, o synergickom pôsobení bergamotovej, pamajoránovej a levandulej silice voči izolátom *Candida albicans* a o gastrointestinálnych infekciách bakteriálneho pôvodu, možnostiach ich terapie a protektívnom účinku probiotík.

V posledných článkoch nájdete bližšie informácie o fytoalexíne a jeho protinádorovom potenciáli a o účinkoch azatioprínu a humánneho dialyzovateľného leukocytárneho extraktu na mononukleárne leukocyty krvi morčiat.

Verím, že predvianočné číslo prečítate s radosťou aby ste sa niečo nové sa naučili, lebo vzdelanie je najväčším bohatstvom človeka.

Prajem Vám príjemné čítanie a pokojné prežitie vianočných sviatkov.

prof. MVDr. Zita Faixová, PhD.
výkonná redaktorka



EDITORIAL

Ladies and gentlemen,

It's already been a year since a vision of publishing a new pharmaceutical journal for the whole editorial team meant a big, but not unreachable challenge. *Omne initium est difficile* (each beginning is difficult), but then the more a potential triumph is worthwhile.

End of the year is made for summarizations of successes or failures. Publishing *Folia Pharmaceutica Cassoviensia* was definitively a success of the last couple of months. We managed to offer the academic community a new, high quality journal, with each number containing many interesting articles to read. I am glad that *Folia Pharmaceutica Cassoviensia* gained great popularity not only among its readers, but also authors of manuscripts, whose number increases with each following issue.

In the last issue this year you can have a closer look at the effect of a tissue culture medium pH on stability of squalene adjuvant emulsions used in the preparation of inactivated vaccines or a matrix patch used for the treatment of schizophrenic patients. Two articles are dedicated to biological treatment – the first focusing on ulcerative colitis and the second on rheumatoid arthritis. The last pages of the issue are focused on natural substances, which are very popular in the modern therapy of many diseases. You can learn details about the evaluation of the impact of a dandelion extract in combination with antimicrobial agent on an *in vitro* cell response, a synergistic effect of bergamot, oregano and lavender essential oils against *Candida albicans* isolates or gastrointestinal infections of a bacterial origin, possibilities of their therapy and a protective effect of probiotics.

The last pieces of articles contain closer information about phytoalexin and its antitumor potential or the effects of azathioprine and a human dialyzable leukocyte extract on the mononuclear leukocytes in the blood of guinea pigs.

I believe that you will read this pre-Christmas issue with the pleasure of learning some new information, because education is the greatest wealth of the man.

I wish you a pleasant reading and a peaceful spending of Christmas time.

Prof. Zita FAIXOVÁ, DVM, PhD.
Managing Editor

O B S A H

Sabolík J., Süli J., Harvanová J.:

VPLYV pH KULTIVAČNÉHO MÉDIA NA STABILITU SKVALÉNOVÝCH ADJUVANTNÝCH EMULZIÍ POUŽÍVANÝCH K PRÍPRAVE INAKTIVOVANÝCH VAKCÍN INFLUENCE OF pH OF TISSUE CULTURE MEDIUM ON THE STABILITY OF SQUALENE ADJUVANT EMULSIONS USED TO PREPARATION OF INACTIVATED VACCINES.....	7
--	---

Rohaľová, S., Wolaschka, T.:

MATRICOVÁ NÁPLAŠŤ AKO LIEKOVÁ FORMA VEDÚCA K ZVÝŠENIU KOMPLIANCIE SCHIZOFRENICKÝCH PACIENTOV MATRIX PATCH AS A DOSAGE FORM LEADING TO IMPROVEMENT OF PATIENTS' COMPLIANCE	17
--	----

Kolesárová M., Mitrušková D., Rozman Antolíková N.:

BIOLOGICKÁ LIEČBA U PACIENTKY S ULCERÓZNOU KOLITÍDOU (KAZUISTIKA) BIOLOGICAL THERAPY IN THE PATIENT WITH ULCERATIVE COLITIS (CASE STUDY)	29
--	----

Benkeová, K., Fedorová, M., Macejová, Ž., Jochmanová, I.:

BIOLOGICKÁ LIEČBA REUMATODNEJ ARTRITÍDY V KLINICKEJ PRAXI BIOLOGIC THERAPY OF RHEUMATOID ARTHRITIS IN CLINICAL PRACTICE	39
--	----

Czechová, S., Marcinčáková, D.:

HODNOTENIE ÚČINKU EXTRAKTU PÚPAVY LEKÁRSKE (<i>TARAXACUM OFFICINALE</i>) V KOMBINÁCII S ANTIMIKROBIÁLNOU LÁTKOU NA BUNKOVÚ ODPOVEĎ <i>IN VITRO</i> EVALUATION OF THE IMPACT OF DANDELION (<i>TARAXACUM OFFICINALE</i>) EXTRACTS IN COMBINATION WITH ANTIMICROBIAL AGENT ON <i>IN VITRO</i> CELL RESPONSE	50
---	----

Fehér, M., Váci, P.:

SYNERGICKÉ PÔSOBNIE BERGAMOTOVEJ, PAMAJORÁNOVEJ A LEVANDULEOVEJ SILICE VOČI IZOLÁTOM <i>CANDIDA ALBICANS</i> SYNERGISTIC EFFECT OF BERGAMOT, OREGANO AND LAVENDER ESSENTIAL OIL AGAINST <i>CANDIDA ALBICANS</i> ISOLATES.....	57
--	----

Ujjobbágyová, J., Koščová, J.:

GASTROINTESTINÁLNE INFEKCIE BAKTERIÁLNEHO PÔVODU, MOŽNOSTI ICH TERAPIE A PROTEKTÍVNY ÚČINOK PROBIOTÍK GASTROINTESTINAL INFECTIONS OF BACTERIAL ORIGIN, POSSIBILITIES OF THERAPY AND PROTECTIVE EFFECT OF PROBIOTICS	63
--	----

Haburajová, D., Balážová, L., Eftimová, J.:

FYTOALEXÍN Z ČELADE <i>BRASSICACEAE</i> A JEHO PROTINÁDOROVÝ POTENCIÁL PHYTOALEXIN FROM THE <i>BRASSICACEAE</i> FAMILY AND ITS ANTITUMOR POTENTIAL	71
--	----

Revajová, V., Beslerová, M., Levkutová, M., Levkut, M. Sr.:

VPLYV PROBIOTICKEJ BAKTÉRIE A KAMPYLOBAKTÉRIOVEJ INFEKCIE NA IMUNOLOGICKÉ UKAZOVATELE U MODELOVÉHO ZVIERAŤA INFLUENCE OF PROBIOTIC BACTERIA AND CAMPYLOBACTERIAL INFECTION ON IMMUNE PARAMETERS IN A MODEL ANIMAL	79
--	----

Hrčková, G., Ryzner, M., Mačák Kubašková, T.:

ÚČINKY AZATIOPRINU A HUMÁNNEHO DIALYZOVATELNÉHO LEUKOCYTÁRNEHO EXTRAKTU NA MONONUKLEÁRNE LEUKOCYTY KRVÍ MORČIAT EFFECTS OF AZATHIOPRINE AND HUMAN DIALYZABLE LEUKOCYTE EXTRACT ON GUINEA PIG BLOOD MONONUCLEAR LEUKOCYTES.....	89
---	----

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



VPLYV pH KULTIVAČNÉHO MÉDIA NA STABILITU SKVALÉNOVÝCH ADJUVANTNÝCH EMULZIÍ POUŽÍVANÝCH K PRÍPRAVE INAKTIVOVANÝCH VAKCÍN

INFLUENCE OF pH OF TISSUE CULTURE MEDIUM ON THE STABILITY OF SQUALENE ADJUVANT EMULSIONS USED TO PREPARATION OF INACTIVATED VACCINES

Sabolík J., Süli J., Harvanová J.

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

judit.suli@uvlf.sk

ABSTRAKT

Skvalénové emulzie typu olej-vo-vode (O/W) sa vo vakcinológii využívajú ako adjuvans na potencovanie účinnosti inaktivovaných vakcín. Pre uľahčenie práce veterinárneho lekára je vhodné pripraviť vakcínu spolu s adjuvansom v jednom kroku. Naše adjuvantné emulzie obsahovali 2,5 % w/w skvalénu; 2 % w/w detergentu Abil-Care-85 + 0,2 % w/w Tween 80 a 95,3 % w/w vodnej fázy (bunkové kultivačné médium) a boli pripravované 8-minútovou homogenizáciou pomocou ultrazvuku pri teplote 37 °C. Keďže suspenzie s patogénom používané v praxi na výrobu vakcín majú pH v rozmedzí 6,7 – 7,4; pred prípravou emulzií boli hodnoty pH kultivačného média upravené na tieto krajné hodnoty. Bol sledovaný

vplyv zmeneného pH na stabilitu pripravených adjuvantných emulzií.

Skvalénové emulzie typu O/W sú pri voľbe vhodnej kombinácie detergentov dostatočne stabilné. Detergent Abil-Care-85 v kombinácii s Tween 80 poskytuje stabilné emulzie aj pri príprave za zníženej teploty (37 °C). Emulzie získané pomocou nich mali rozmer olejových častíc 154 – 198 nm. Táto kombinácia je vhodná aj pre prípravu adjuvantných inaktivovaných vakcín v jednom kroku, kde vodnú fázu emulzie tvorí kultivačné médium. V našej štúdii sa potvrdilo, že pH používaných kultivačných médií v rozmedzí 6,7 až 7,4 výrazne neovplyvňuje na stabilitu adjuvantných emulzií, preto v praxi nemá význam upravovať pH pred prípravou adjuvantných inaktivovaných vakcín. Stabilita pripravených

emulzií bola vyhovujúca aj počas 6-týždňového uchovávaní.

Kľúčové slová: pH kultivačného média; skvalénové adjuvantné emulzie; stabilita emulzií

ABSTRACT

Squalene emulsions are used in a vaccine as adjuvants to potentiate the efficacy of inactivated vaccines. To facilitate the work of the veterinarian, it is advisable to prepare the vaccine together with the adjuvant in one step. Our adjuvant emulsions contained squalene (2.5 % w/w), detergent Abil-Care-85 (2 % w/w) + Tween 80 (0.2 % w/w), aqueous phase – cell culture medium (95.3 % w/w). They were prepared by ultrasound homogenization (8 minutes, 37 °C). Since the pathogen suspensions used in the vaccine production practice have a pH in the range from 6.7 – 7.4, the pH of the culture medium was adjusted to these extreme values before emulsion preparation. The effect of the altered pH on the stability of the prepared adjuvant emulsions was examined.

Squalene emulsions of O/W type are sufficiently stable when a suitable detergent combination is selected. Detergent Abil-Care-85 in combination with Tween 80 provides stable emulsions even at a reduced preparing temperature of 37 °C. The emulsions obtained therefrom had an oil particle size in the space of 154 – 198 nm. This combination is suitable also for the preparation of adjuvant inactivated vaccines in one step, wherein the aqueous phase of the emulsion forms a culture medium. It was confirmed that the pH of the culture media in the range from 6.7 to 7.4 does not significantly influence the stability of the adjuvant emulsions, therefore in practice it is not important to adjust the pH before preparing the adjuvanted inactivated vaccines. The stability of the prepared emulsions was also satisfactory for 6 weeks of storage.

Key words: pH of cell culture medium; squalene adjuvant emulsions; stability of emulsions

ÚVOD

Skvalén je lineárna triterpenoidná zlúčenina, ktorá sa v širokej miere využíva v medicíne, ale aj v kozmetickom a farmaceutickom priemysle (Fox, 2009). Skvalénové emulzie typu olej-vo-vode (O/W) našli uplatnenie ako adjuvantné formulácie využívajúce ich depotný a imunomodulačný efekt na skvalitnenie imunitnej odpovede (Allison, 1998). Používanie adjuvansov s obsahom skvalénu na potencovanie veterinárnych inaktivovaných vakcín je v súčasnosti bežné, v humánnej medicíne sa využívajú vo viac ako 20 krajinách sveta (Fox, 2009). Na humánne použitie sa komerčne vyrábajú iba adjuvantné formulácie MF59® (Novartis, Švajčiarsko) a AS03 (GlaxoSmithKline Biologicals, Belgicko) (O'Hagan a Singh, 2007; Reed a kol., 2009), ktoré našli uplatnenie pri potencovaní inaktivovaných vakcín proti viacerým chorobám (napr. antrax, chrípka, horúčka Dengue).

Okrem imunologickej účinnosti adjuvantnej vakcíny je dôležitým aspektom aj stabilita vznikajúcej emulzie (Roland, 2003), ktorá je pre výrobcov prvoradým ukazovateľom (Fox, 2009). Dôležité vlastnosti emulzných častíc zahŕňajú ich koncentráciu, veľkosť, náboj, interakcie a reologické správanie (Particle Sciences, 2011). Hlavným parametrom stability emulzie je rozmer olejových častíc, ale aj iné faktory, ako napr. hodnota pH vodnej fázy, môžu ovplyvniť stabilitu adjuvantnej formulácie (Roland, 2003). V tejto štúdii sa sledoval práve vplyv tohto ukazovateľa, pretože pri výrobe inaktivovaných adjuvantných vakcín v jednom kroku sa ako vodná fáza používajú rôzne vírusové suspenzie s hodnotou pH v rozmedzí 6,7 až 7,4. pH vírusovej suspenzie je sledované farbivom fenolová červeň, ktoré sa štandardne pridáva do kultivačných médií používaných k namnoženiu infekčného patogénu (Biowest, 2013).

Príprava inaktivovanej adjuvantnej vakcíny v

jednom kroku značne uľahčí prácu lekára, preto je dôležité vyvinúť také adjuvansy, ktoré sú vhodné na splnenie tohto cieľa. Pre také adjuvantné formulácie je obzvlášť dôležitý výber vhodných emulgátorov. Vakcína spolu s adjuvansom musí byť pripravená za zníženej teploty (do 37 °C), aby nedošlo k denaturácii vakcinačného antigénu. Preto sme ako základný emulgátor zvolili Abil-Care-85, ktorý je vhodný na prípravu emulzií za studena. Sledovali sme možnosť kombinácie s ďalším detergentom (Poloxamer 105, resp. Tween 80) a vplyv pH na stabilitu emulzií typu olej-vo-vode.

MATERIÁL A METÓDY

Zloženie emulzií

Olejevá fáza

Skvalén (2, 6, 10, 15, 19, 23-hexametyltetrakoza-2, 6, 10, 14, 18, 22-hexaén), sumárny vzorec $C_{30}H_{50}$ (Merck, Nemecko).

Detergenty

1. detergent Abil-Care-85 (zmes polydimethylsiloxánu a kaprylového/kaprínového triglyceridu); výrobca Merck, Nemecko; HLB $\approx$ 10
2. detergent Tween 80 (neiónový detergent Polysorbát 80; polyoxyetylénsorbitanmonooleát); výrobca Sigma-Aldrich, USA; HLB = 15
3. detergent Poloxamer 105 (polyetylén-polypropylénglykol); výrobca ICI, Veľká Británia; HLB = 18,5.

Vodná fáza

Na výber vhodnej kombinácie detergentov a stanovenie ich optimálnej koncentrácie bola použitá deionizovaná voda (emulzie typu I). Po stanovení optimálnej kombinácie detergentov sa v ďalšej časti pokusov používali ako vodná fáza nasledujúce kultivačné médiá (emulzie typu II) obsahujúce fenolovú červen na detekciu pH:

1. kultivačné médium (K.M.) RPMI-1640

obsahujúce L-glutamín a $NaHCO_3$; výrobca Sigma-Aldrich, USA

2. K. M. HANK'S BSS bez obsahu vápnika a horčíka, výrobca PAA Laboratories Inc., Kanada
3. K. M. RPMI-1640 s modifikáciou HEPES (25 mM) a $NaHCO_3$; výrobca Sigma-Aldrich, USA
4. K. M. modifikované orlovým médiom obsahujúce glukózu (4500 mg.l^{-1}), pyridoxín, HCl a $NaHCO_3$; výrobca Sigma-Aldrich, USA
5. K. M. L-15 MEDIUM sterilne filtrované bez obsahu L-glutamínu; výrobca Sigma-Aldrich, USA
6. K. M. modifikované orlovým médiom so zmesou živín, HEPES (25 mM), $NaHCO_3$, pyridoxín a L-glutamín; výrobca Sigma-Aldrich, USA
7. K. M. DMEM-F12 obsahujúce L-glutamín a HEPES (25 mM); výrobca Biowest, USA.

Pre dosiahnutie vyhovujúcej adjuvantnej účinnosti skvalénovej emulzie je vhodné používať skvalén (Merck, Nemecko) v koncentrácii 2,5 % w/w (Allison a Byars, 1986).

Optimálna koncentrácia kombinácie detergentov Abil-Care-85 a Poloxamer 105 bola zvolená na základe štúdie Süli a kol. (2004). Vhodná koncentrácia Tween-80 (0,2 % w/w) bola stanovená v predbežnom pokuse (neuvedené výsledky). Vodnou fázou emulzií bola v tejto časti pokusu deionizovaná voda (emulzie typu I). Na základe tohto pokusu bola určená vhodná kombinácia detergentov Abil-Care-85 a Tween 80, v ďalšej časti pokusov boli pripravované emulzie s rôznymi kultivačnými médiami (viď tab. 1).

Z dôvodu stanovenia vplyvu pH na stabilitu emulzií s kultivačnými médiami sa pripravili tri série emulzií: s použitím kultivačných médií bez upraveného pH, ďalej kultivačných médií s upraveným pH, a to na krajné hodnoty pH = 6,7 a pH = 7,4.

Príprava a uchovávanie emulzií

Pri emulziách II. typu (emulzie s kultivačným

Tab. 1: Zloženie emulzií

Emulzia	Olejová fáza				Vodná fáza	
	Skvalén [%]	Detergent			Dest. voda [%]	Kult. médium 95,3 [%]
		Abil-Care-85 [%]	Tween 80 [%]	Poloxamer [%]		
E_{v1}	2,5	2,0		4	91,5	
E_{v2}	2,5	1,0	0,2		96,3	
E_{v3}	2,5	1,5	0,2		95,8	
E_{v4}	2,5	2	0,2		95,3	
E_{km1}	2,5	2	0,2			K.M. 1
E_{km2}	2,5	2	0,2			K.M. 2
E_{km3}	2,5	2	0,2			K.M. 3
E_{km4}	2,5	2	0,2			K.M. 4
E_{km5}	2,5	2	0,2			K.M. 5
E_{km6}	2,5	2	0,2			K.M. 6
E_{km7}	2,5	2	0,2			K.M. 7

E_v – emulzia s vodou

E_{km} – emulzia s kultivačným médiom

K. M. – kultivačné médium

médiom) s modifikovanou hodnotou pH bolo pH kultivačných médií pred prípravou emulzie upravené pomocou 1 mol.dm⁻³ roztokov HCl a NaHCO₃. Predmiešané emulzie boli homogenizované ultrazvukom na prístroji Soniprep 150 MSE so sondou s priemerom 19 mm pri frekvencii 23 kHz počas 8 minút. Teplota 37 °C pri homogenizácii bola zabezpečená vodným kúpeľom.

Pripravené emulzie boli uchovávané v plastových nádobkách pri teplote 4 °C.

Sledovanie vlastností emulzií

U finálnych emulzií I. aj II. typu (emulzie s destilovanou vodou a emulzie s kultivačným médiom) sa sledovali zmeny hodnoty pH a zmena veľkosti častíc počas uchovávania. Hodnota pH jednotlivých emulzií sa stanovovala pomocou prístroja Acidimeter 333 (Druopta, Praha, ČR) pri teplote 25 °C počas 7 týždňov, vždy pred meraním veľkosti častíc.

Pri analýze veľkosti olejových častíc skvalénových emulzií sa použil analyzátor veľkosti častíc laserovej difrakcie Mastersizer 3000. Emulzie sa merali pri

24,5 °C a 3000 rpm. Zmeny sa zaznamenávali počas 6 týždňov.

Stabilita emulzií pri centrifugácii sa sledovala centrifugáciou počas 5, 10 a 15 minút pomocou mikrocentrifúgy Z216 MK pri 1500 rpm (RCF = 201x g) a teplote 4 °C.

Stabilita emulzií sa sledovala aj opakovaným zmrazovaním (– 24 °C, 16 hod) a rozmrazovaním emulzií (24 ± 2 °C, 8 hod) uchovávaných vo vertikálnej polohe. Zmrazovací a rozmrazovací cyklus bol opakovaný šesťkrát.

VÝSLEDKY

Hodnoty pH emulzií

Hodnoty pH boli u vodných emulzií v kyslej oblasti a počas 7-týždňového uchovávania sa väčšinou pomaly zvyšovali (viď tab. 2). Najnižšie hodnoty pH vykazovala emulzia pripravovaná s Poloxamerom a Abil-Care (E_{v1}), u ktorej sa hodnoty nemohli stanoviť do konca pokusu z dôvodu nedostatku vzorky.

Hodnoty pH emulzií s kultivačnými médiami

Tab. 2: Porovnanie pH vodných emulzií I. typu s rozdielnym zložením detergentov

Deň	E _{v1}	E _{v2}	E _{v3}	E _{v4}
7	2,815	4,363	3,857	3,856
14	2,892	4,394	3,499	3,505
21	2,655	4,743	4,150	3,972
28	–	4,883	4,096	4,033
35	–	4,975	4,292	4,147
42	–	4,980	4,225	4,183

E_{v1} – Emulzia s Poloxamer 105 (4 %) + Abil-Care (2 %)

E_{v2} – Emulzia s Tween 80 (0,2 %) + Abil-Care (1 %)

E_{v3} – Emulzia s Tween 80 (0,2 %) + Abil-Care (1,5 %)

E_{v4} – Emulzia s Tween 80 (0,2 %) + Abil-Care (2 %)

Tab. 3: Porovnanie pH emulzií II. typu pri použití kultivačných médií s neupraveným pH ako vodnej fázy

Deň	E _{km1}	E _{km2}	E _{km3}	E _{km4}	E _{km5}	E _{km6}	E _{km7}
0	8,256	7,933	7,626	8,359	6,896	7,475	8,394
7	8,252	7,772	7,629	8,354	6,833	7,482	8,356
14	8,084	8,039	7,855	8,684	7,099	7,984	8,054
21	6,205	7,250	7,644	8,430	7,117	7,827	7,527
28	6,920	5,465	7,417	7,977	6,838	7,583	7,117
35	7,020	5,110	7,337	7,750	6,713	7,503	7,013

E_{km} – emulzia s kultivačným médiom

boli výrazne vyššie ako u vodných emulzií. Hodnoty boli v neutrálnej, resp. slabo bázičkej oblasti. Počas doby uchovávaní pH pripravených emulzií postupne mierne klesalo (viď tab. 3).

Analýza veľkosti olejových častíc

Analýza veľkosti častíc vodných emulzií ukázala, že jednoznačne najmenšiu veľkosť častíc mala vodná emulzia s Tween 80 (0,2 %) a Abil-Care (2 %). Na základe týchto výsledkov sme v ďalších etapách pracovali s emulziami v takomto zložení detergentov.

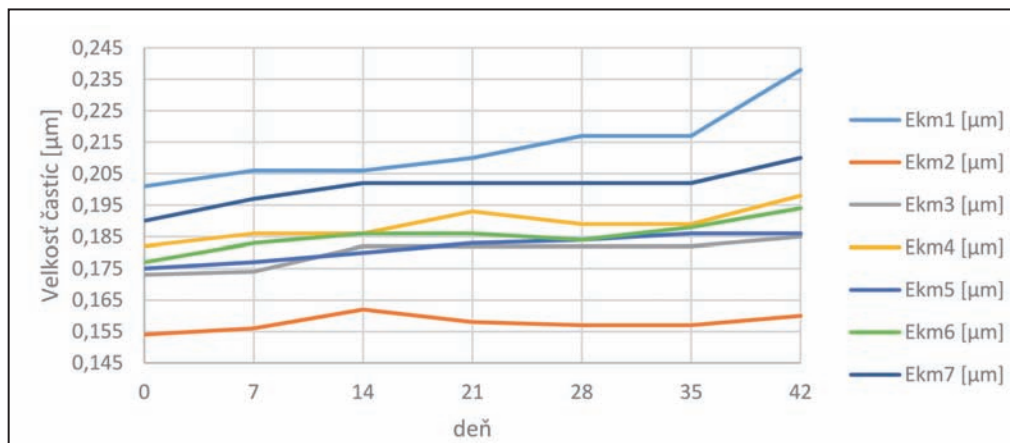
Pri každej emulzii s kultivačným médiom sa merala veľkosť častíc a porovnávala sa s výsledkami emulzií s upravenými hodnotami pH kultivačných médií. Priemerná veľkosť častíc vnútornej fázy a smerodajná odchýlka sa vypočítala zo 7 nameraných hodnôt. Emulzia E_{km1} RPMI-1640 obsahujúca L-glutamín a NaHCO₃ bola najstabilnejšia pri pH 7,4. Emulzia E_{km2} s HANK'S BSS, podobne aj

emulzia E_{km3} s kultivačným médiom RPMI-1640 s modifikáciou HEPES (25 mM) a NaHCO₃, mali najmenšie častice bez upravovaného pH kultivačného média. Zo všetkých emulzií jedine emulzia E_{km4} modifikovaná orlovým médiom s glukózou (4500 mg.l⁻¹), pyridoxínom, HCl a NaHCO₃ mala najmenšie častice pri pH = 6,7. Pri emulziách E_{km5}, E_{km6} a E_{km7} sa dosiahla najmenšia veľkosť olejových častíc pri nemodifikovanom pH. Celkovo však v rámci jednotlivých kultivačných médií rozdiely medzi veľkosťou častíc pri rôznych pH neboli významné.

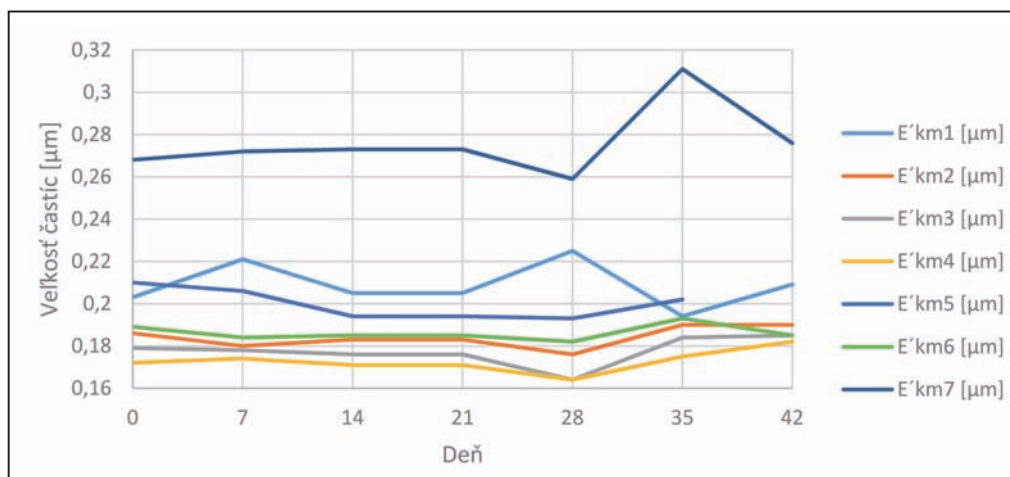
V závislosti od času sa veľkosť častíc vnútornej fázy mierne zvyšovala, čím sa stabilita emulzií môže trochu znížiť (viď graf 1). Najväčšie výkyvy boli zaznamenané pri emulziách typu II s pH zmeneným na 6,7 (viď graf 2). Zmena pH kultivačného média na 7,4 však nespôsobila výrazné zmeny vo veľkosti častíc počas 6-týždňového sledovania (viď graf 3).

Pri porovnaní veľkosti častíc jednotlivých emulzií

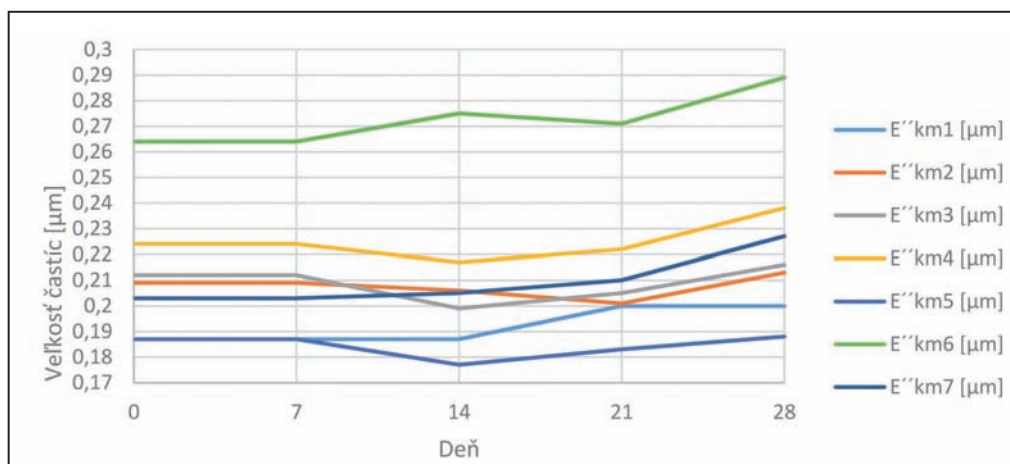
Graf 1: Závislosť veľkosti častíc emulzií II. typu pri nezmenenom pH od času



Graf 2: Závislosť veľkosti častíc emulzií II. typu s kultivačným médiom s pH = 6,7 od času



Graf 3: Závislosť veľkosti častíc emulzií II. typu s kultivačným médiom s pH = 7,4 od času



Tab. 4: Porovnanie veľkosti častíc emulzií s kultivačným médiom HANK'S BSS (č. 2) pri nezmenenom a zmenenom pH (výsledky zo 7 meraní)

Deň	E_{km2} [μm]	E'_{km2} [μm]	E''_{km2} [μm]
0	$0,154 \pm 0,000$	$0,186 \pm 0,000$	$0,209 \pm 0,005$
7	$0,156 \pm 0,000$	$0,180 \pm 0,000$	
14	$0,162 \pm 0,000$	$0,183 \pm 0,004$	$0,206 \pm 0,000$
21	$0,158 \pm 0,002$		$0,201 \pm 0,000$
28	$0,157 \pm 0,000$	$0,176 \pm 0,003$	$0,213 \pm 0,000$
35	$0,157 \pm 0,000$	$0,190 \pm 0,000$	
42	$0,160 \pm 0,000$	$0,190 \pm 0,000$	

E_{km2} – emulzia s neupraveným kultivačným médiom

E'_{km2} – emulzia s kultivačným médiom upraveným na pH = 6,7

E''_{km2} – emulzia s kultivačným médiom upraveným na pH = 7,4

Tab. 5: Porovnanie stability emulzií po opakovaných zmrazovacích a rozmrazovacích cykloch

Kultivačné médium	Stabilná emulzia po zmrazovací cyklus č. (uvedený v tabuľke)						
	E_{km1}	E_{km2}	E_{km3}	E_{km4}	E_{km5}	E_{km6}	E_{km7}
pH = 6,7	3	4	5	5	5	5	5
pH = 7,4	3	3	–	6	6	3	–

bez modifikácie pH a s modifikáciou pH na 7,4; resp. 6,7 sa ukázalo, že zmena pH v danom rozmedzí nemá významný vplyv na stabilitu emulzií. Napriek tomu sa zdá, že u väčšiny emulzií boli najlepšie výsledky dosiahnuté pri nezmenenom pH kultivačného média. Zo všetkých sledovaných kultivačných médií sa najlepším ukázalo byť nemodifikované médium č. 2 – HANK'S BSS (viď graf 1, tab. 4), ktorý vytvoril skutočne stabilnú emulziu odolnú voči časovým zmenám. Na druhej strane emulzia s kultivačným médiom č. 1 už na začiatku merania vykazovala vyššie hodnoty veľkosti častíc v porovnaní s ostatnými emulziami.

Stabilita pri centrifugácii a zmrazovaní

Žiadne príznaky nestability v emulznom systéme po 5 minútovej a 10 minútovej centrifugácii pri 4 °C a 1500 rpm neboli pozorované, avšak po 15 minútovej centrifugácii sa olejové a vodné fázy u všetkých emulzií začali oddeľovať.

Po opakovaných zmrazovacích a rozmrazovacích cykloch sme zaznamenali separáciu fáz. Pozoruhodné boli emulzie E_{km3} a E_{km7} , pretože u nich oddelenie jednotlivých fáz nebolo registrované ani po šiestom zmrazovacom cykle. Výsledky sú uvedené v tab. 5.

DISKUSIA

Jedinečné fyzikálne vlastnosti skvalénu umožňujú jeho využitie na výrobu stabilných a bezpečných nanoemulzií typu olej-vo-vode (Persson a kol., 2015). Emulzie typu O/W rýchlo uvoľňujú antigén a poskytujú dostatočnú krátkodobú imunitu (Šnirc a kol., 2007). Imunologická účinnosť skvalénových formulácií je známa už dlhšiu dobu (Allison a Byars, 1986). Vynikajúcu adjuvantnú účinnosť majú aj emulzie v inaktivovaných vakcínach pripravených za zníženej teploty s detergentmi Abil-Care-85 a Poloxamer 105 (Süli a kol., 2004). Práve výber vhodných emulgátorov je určujúcim faktorom pre

prípravu (výrobu) stabilného emulzného systému (Fox a kol., 2011; Kim a kol., 2017). Tvorba, stabilita a účinnosť emulzií typu olej-vo-vode sa môžu zlepšiť použitím kombinácií dvoch alebo viacerých rôznych emulgátorov namiesto jedného (Pichot, 2010). Farmaceutický priemysel aplikuje povrchovo aktívne látky s nízkou molekulovou hmotnosťou ako sú lecitíny, saponíny a najmä rôzne estery polyoxysorbitanu označené ako Tweens (McClements, 2018). V tejto štúdii boli určené vhodné detergenty pre prípravu stabilných skvalénových emulzií na základe veľkosti častíc vnútornej fázy. Pri výbere bolo potrebné zohľadniť to, že pri príprave adjuvantnej vakcíny v jednom kroku nemôže byť prekročená fyziologická teplota 37 °C, aby nedošlo k denaturácii antigénu. Na prípravu emulzií pri nízkych teplotách sa hodí detergent Abil-Care-85, ktorý vytvára bezpečné a areaktogénne adjuvantné formulácie (Beníšek a kol., 2004).

V štúdii bolo sledované použitie kombinácie Abil-Care-85 s detergentom Tween-80 alebo Poloxamerom 105. Jednoznačne najmenšie veľkosti častíc sa dosiahli pri kombinácii detergentov Abil-Care (2 %) a Tween 80 (0,2 %). Tween 80 je detergentom, ktorý sa využíva aj pri výrobe skvalénových adjuvantných formulácií pre komerčne vyrábané vakcíny (O'Hagan a Singh, 2007; Fox, 2009; Reed a kol., 2009).

Veľkosť kvapiek výrazne ovplyvňuje stabilitu emulzií (Iyer a kol., 2015). Emulzie s menšou veľkosťou kvapiek sú vo všeobecnosti stabilnejšie. Pri oddelovaní vody sa kvapky musia spájať – čím sú kvapky menšie, tým je čas separácie väčší (SPC JOIN, 2012). V našej štúdii mala najmenšie častice emulzia s neupraveným kultivačným médiom HANK'S BSS (– Ca, – Mg) s hodnotou 154 ± 0 nm, pričom po 7 týždňoch sa táto hodnota zväčšila iba o 3,9 %. Veľkosť častíc pri ostatných emulziách dosahovala v priemere hodnoty 172 – 198 nm (SD = 0,000 nm) a v priebehu skladovania sa hodnoty zmenili priemerne o 7,7 %.

Hodnota pH vodnej fázy má silný vplyv na stabilitu emulzie. Stabilita emulzie je silne závislá od pH počiatočnej vodnej fázy, pričom k rozkladu

emulzie dochádza pri pH medzi 10 – 13,5 (Oren a MacKay, 1977). Predpokladá sa, že zmena pH ovplyvní medzifázové vlastnosti emulzných kvapiek stabilizovaných rozdeliteľnými povrchovo aktívnymi činidlami, a tým ovplyvní veľkosť kvapiek a stabilitu emulzie (Chen a kol., 2000). Zmeny pH v emulziách môžu byť takisto prejavom nestability. Pripravené emulzie, kde vnútornou fázou boli rôzne bunkové médiá, obsahovali prídavok tlmivých roztokov na udržanie konštantných hodnôt pH. Zmena pH emulzie pripravenej s destilovanou vodou a uchováanej pri 4 °C bola výraznejšia. Táto časť pokusu však bola uskutočnená kvôli zisteniu vhodnej kombinácie detergentov, avšak pre výrobu adjuvantných inaktivovaných vakcín v jednom kroku sú výsledky zmeny pH vodných emulzií irelevantné.

Stabilita pripravených emulzií sa môže kontrolovať aj pomocou centrifugácie, pretože z centrifugácie vyplýva zrýchlená migrácia kvapiek a následná zmena stability (André a kol., 2009). Rýchlym a dostatočne účinným testom je okrem centrifugácie aj cyklické zmrazovanie a rozmrazovanie (Huggins, 2010). Našimi pokusmi bolo potvrdené, že skvalénové adjuvantné emulzie zloženia uvedeného v našom majú dostatočnú stabilitu aj v týchto testoch.

Rôzne formy skvalénových adjuvantov boli vyvinuté a použité experimentálne (Fox, 2009), ale doteraz iba dve formulácie obsahujúce skvalén (MF59 a AS03) boli schválené na humánne použitie (WHO, 2018). Ani jeden z používaných skvalénových adjuvantných formulácií však nie je súčasťou vakcíny, ale používa sa na resuscitáciu lyofylovaných vakcín, alebo sa s vakcínou zmiešava v pomere podľa predpisu.

Adjuvanty sa pridávajú do vakcín na stimuláciu tvorby protilátok proti vakcinačnému antigénu, aby inaktivované vakcíny dosiahli lepšiu účinnosť (FDA, 2018). V konvenčných vakcínach je pridanie pomocných látok do vakcínových prípravkov zamerané na zvýšenie, urýchlenie a predĺženie špecifickej imunitnej odpovede na vakcinačné antigény. Adjuvantná aktivita je výsledkom mnohých faktorov a zvýšenú imunitnú reakciu získanú s jedným

antigénom nemožno v zásade extrapolovať na iné antigény. Adjuvansy by mali byť preto vyberané v závislosti od požadovanej imunitnej reakcie a mali by byť formulované s antigénom tak, aby sa dosiahla optimálna reakcia s minimálnymi vedľajšími účinkami (Del Giudice a kol., 2001; EMA, 2005).

ZÁVER

Skvalénové emulzie typu O/W (2,5 % w/w) sú pri voľbe vhodnej kombinácie detergentov dostatočne stabilné. Detergent Abil-Care-85 (2 % w/w) v kombinácii s Tween 80 (0,2 % w/w) poskytuje stabilné emulzie aj pri príprave za zníženej teploty 37 °C. Emulzie získané pomocou nich mali rozmer olejových častíc 154 – 198 nm. Táto kombinácia je vhodná aj pre prípravu adjuvantných inaktivovaných vakcín v jednom kroku, kde vodnú fázu emulzie tvorí kultivačné médium (s inaktivovaným patogénom). V štúdiu sa potvrdilo, že pH používaných kultivačných médií v rozmedzí 6,7 až 7,4 nevplýva výrazne na stabilitu adjuvantných emulzií, preto v praxi nemá význam upravovať pH pred prípravou adjuvantných inaktivovaných vakcín. Stabilita pripravených emulzií bola vyhovujúca aj počas 6-týždňového uchovávaní.

POĎAKOVANIE

Práca bola financovaná grantovým projektom APVV-0605-12.

ZOZNAM LITERATÚRY

André, V., Willenbacher, N., Debus, H., Börger, L., Fernandez, P., Frechen, T., Rieger, J.: Prediction of emulsion stability: facts and myth. *Cosmetics and Toiletries Manufacture World-wide*. <http://www.mvm.kit.edu/download/AME-No-Wi-reviewed-21.pdf>. Updated 2009. Accessed March 25, 2018.

Allison, A. C.: The mode of action of immunological adjuvants. *Dev. Biol. Stand.*, 1998, 92, 3 – 11.

Allison, A. C. a Byars, N. E.: An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell mediated immunity. *J. Immunol. Meth.*, 1986, 95, 2, 157 – 158.

Anonym: Emulsion stability and Testing. *Particle Sci., Technical Brief*, 2 s. https://www.particlesciences.com/docs/technical_briefs/TB_2011_2.pdf. Updated 2011. Accessed April 11, 2019.

Beníšek, Z., Süli, J., Lenhardt, L., Eliáš, D., Ondřejková, A., Ondřejka, R., Švrček, Š., Bajová, V.: Experimental squalene adjuvant. II. Harmlessness and local reactogenicity. *Vaccine*, 2004, 22, 3470 – 3474.

Biowest: *Phenol Red solution 0.5 %*. Technical data. 1 s. http://www.biowest.net/media/10541t__086616900_1621_07012014.pdf. Updated 2013. Accessed March 31, 2019.

Del Giudice, G., Podda, A., Rappuoli, R.: What are the limits of adjuvanticity? *Vaccine*, 2001, 20, 1, 38 – 41.

EMA (European Medicine Agency). *Guideline on adjuvants in vaccines for human use*. 18 s. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003809.pdf. Updated 2005. Accessed March 7, 2011.

FDA. *Common Ingredients in U.S. Licensed Vaccines*. <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/Vaccine-Safety/ucm187810.htm>. Accessed September 5, 2018.

Fox, C. B.: Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery. *Molecules*, 2009, 14, 9, 3286 – 3312.

Fox, C. B., Baldwin, S. L., Duthie, M. S., Reed, S. G., Vedvick, T. S.: Immunomodulatory and physical effects of oil composition in vaccine adjuvant emulsions. *Vaccine*, 2011, 29, 51, 9563 – 9572.

Huggins, J.: *Temperature cycle testing of silicone emulsion stability*. <http://www.mmsconferencing.com/eod/pdf/posterabstracts/HugginsAbstract.pdf>. Updated 2011. Accessed

March 24, 2018.

Chen, C. M., Lu, C. H., Chang, C. H., Yang, Y. M., Maa, J. R.: Influence of pH on the stability of oil-in-water emulsions stabilized by a splittable surfactant. *Colloids Surf. A.*, 2000, 170, 2 – 3, 173 – 179.

Iyer, V., Cayatte, C., Guzman, B., Schneider-Ohrum, K., Matuszak, R., Snell, A., Rajani, G. M., McCarthy, M. P., Muralidhara, B.: Impact of formulation and particle size on stability and immunogenicity of oil-in-water emulsion adjuvants. *Hum. Vacc. Immunother.*, 2015, 11, 7, 1853 – 1864.

Kim, H., Kim, K. H., Lee, H. R., Jo, H. C., Jeong, D. W., Ryu, J., Gweon, D. G., Choi, S. Q.: Formation of stable adhesive water-in-oil emulsions using a phospholipid and cosurfactants. *J. Indust. Engin. Chem.*, 2017, 55, 198 – 203.

McClements, D. J.: Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2018, 251, 55 – 79.

O'Hagan, D. T. a Singh, M.: MF59: a safe and potent oil-in-water emulsion adjuvant. In Singh, M. (Ed.). *Vaccine Adjuvants and Delivery Systems*. USA: John Wiley & Sons, 2007. 115 – 129.

Oren, J. J. a Mackay, M.: Electrolyte and pH effect on emulsion stability of water-in-petroleum oils. *Fuel*, 1977, 56, 4, 382 – 384.

Persson, K. H., Blute, I. A., Mira, I. C.,

Gustafsson, J.: Creation of well-defined particle stabilized oil-in-water nanoemulsion. *Colloids Surf. A: Physiochemical and Engineering aspects*, 2014, 459, 48 – 57.

Pichot, R.: *Stability and characterisation of emulsions in the presence of colloidal particles and surfactants*. United Kingdom: The University of Birmingham, 2010. 204 s.

Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N., Friede, M.: New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.*, 2009, 30, 1, 23 – 32.

Roland, I., Piel, G., Delattre, L., Evrard, B.: Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. *Int. J. Pharm.*, 2003, 263, 1 – 2, 85 – 94.

Süli, J., Beníšek, Z., Eliáš, D., Švrček, Š., Ondřejková, A., Ondrejka, R., Bajová, V.: Experimental squalene adjuvant. I. Preparation and testing of its effectiveness. *Vaccine*, 2004, 22, 3464 – 3469.

SPC JOIN. *Stability of oil emulsions*. http://petrowiki.org/Stability_of_oil_emulsions. Updated 2012. Accessed March 30, 2018.

Šnirc, J., Sokol, J., Seginko, J., Hera, A. a kol.: *Klinická veterinárna farmakológia*. Martin: Neografia, 2007. 1184 s.

WHO. *Types of vaccine*. http://www.who.int/vaccine_safety/initiative/tech_support/Part-2.pdf. Updated 2018 Accessed August 29, 2018.



MATRICOVÁ NÁPLAŠŤ AKO LIEKOVÁ FORMA VEDÚCA K ZVÝŠENIU KOMPLIANCIE SCHIZOFRENICKÝCH PACIENTOV

MATRIX PATCH AS A DOSAGE FORM LEADING TO IMPROVEMENT OF PATIENTS' COMPLIANCE

Rohaľová, S., Wolaschka, T.

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

tomas.wolaschka@uvlf.sk

ABSTRAKT

Kompliancia je rozsah alebo miera, v rámci ktorej sa správanie pacienta zhoduje s lekárskou alebo zdravotníckou radou. Jej nedostatočnosť v priebehu liečby spôsobuje zlyhanie farmakologickej terapie a progresívne zhoršovanie zdravotného stavu pacientov. Predloženou štúdiou reagujeme na problematiku kompliance psychiatrických pacientov, ktorým bola predpísaná dlhodobá liečba antipsychotikami. Na zvýšenie kompliance pacientov a zároveň prevenciu toxických relapsov navrhujeme moderné liekové formy, konkrétne transdermálne náplasti. Cieľom štúdie bola príprava a hodnotenie matricových náplastí disolučnou skúškou a ďalšími testami na hodnotenie fyzikálno-chemických vlastností. Pripravená bola náplasť bez adhezíva pozostávajúca z haloperidolu, typického antipsychotika, a zmesi

rôznych pomerov hydroxypropylmetylcelulózy a polyvinylpyrolidónu. Ako plastifikátor bol zvolený glycerol, ktorý poskytoval náplasti najvýhodnejšie vlastnosti spomedzi skúšaných látok. Potvrdená bola modulácia uvoľňovania liečiva v závislosti od množstva a pomeru látok použitých na prípravu nosiča. Voľba vhodného plastifikátora a určenie času potrebného na ideálne vysušenie boli dôležitými premennými v príprave filmov.

Kľúčové slová: duševné poruchy; haloperidol; hydroxypropylmetylcelulóza; compliancia; liekové formy; polyvinylpyrolidón; transdermálne terapeutické systémy

ABSTRACT

Compliance is the extent or degree in which patient's behaviour coincides with the

advice provided by doctors or other healthcare professionals. Its deficiency during the treatment results in a failure of pharmacological therapy and a progressive deterioration of patients' health condition. The presented study addresses the issue of compliance of psychiatric patients with a prescribed long-term antipsychotic treatment. In order to improve patients' compliance and prevent toxic relapses we suggested modern dosage forms, specifically transdermal patches. The aim of our study was to prepare matrix patches and assess them by dissolution test and other examinations for the assessment of their physicochemical properties. The matrix patch without the adhesive consisting of haloperidol, a typical antipsychotic, and a mixture of different ratios of hydroxypropylmethylcellulose and polyvinylpyrrolidone was prepared. Glycerol was chosen as a plasticizer, because it had the most favourable characteristics for the patches out of all tested substances. Modulation of drug release according to the amount and ratio of the used vehicles was confirmed. The choice of a suitable plasticizer and determination of the time necessary for an ideal dryness were important variables in the preparation of films.

Key words: compliance; dosage forms; haloperidol; hydroxypropylmethylcellulose; mental disorders; polyvinylpyrrolidone; transdermal therapeutic systems

ÚVOD

Schizofrénia je závažné, obvykle celoživotne prebiehajúce duševné ochorenie. Dopad tejto choroby na pacienta a jeho okolie je spomedzi ostatných duševných porúch najväčší. Okrem toho schizofrenickí pacienti trpia vyššou komorbiditou somatických ochorení v porovnaní s ostatnou populáciou (Moťovský, 2010). Hlavnou súčasťou zvýšenia kvality života pacientov je dlhodobá antipsychotická farmakoterapia, ktorá je nevyhnutná

v akútnych stavoch, ale aj vo fázach remisie ako profylaxia relapsov (Racková, 2007). Fakt, že kontinuálne užívaná terapia antipsychotikami je pre pacientov prospešná, je dnes už takmer všeobecne akceptovaný. S cieľom profylaxie však musí byť antipsychotická liečba nielen správne indikovaná, ale aj správne užívaná. V súčasnosti je známe, že kompliance (K) schizofrenických pacientov je nízka a non-kompliance (N-K) stúpa s každým rokom užívania antipsychotík (Llorca, 2007), pričom:

- minimálne 50 % pacientov bude parciálne kompliantných (PK) s rizikom úplnej N-K v priebehu jedného roka od prepustenia z ústavného zariadenia a 75 % v priebehu dvoch rokov (Llorca, 2007),
- v prvom mesiaci K pacientov klesá zo 60 – 85 % na necelých 50 % v šiestom mesiaci liečby (Díaz a kol., 2001),
- schizofrénia sa v náročnosti dosiahnuť K dostatočnú k terapeutickému benefitu radí na druhé miesto za terapiu obezity (Keith, 2003).

Je potvrdené, že znížená K pacientov negatívne ovplyvňuje výsledky terapie (Kane, 1985) a je vysoko rizikovým faktorom pre recidívu ochorenia a následnú rehospitalizáciu (Weiden, 1995). Uspokojivú spoluprácu pacienta je ťažké dosiahnuť pri väčšine chronických ochorení, kde je dôvodom najmä potreba dlhodobej alebo celoživotnej farmakoterapie. Závažnosť situácie u schizofrenických pacientov umocňuje špecifický charakter ochorenia, ktorý často vyústi v úplné odmietanie liečby, nepravidelné užívanie liekov, prerušenie liečby alebo nedodržiavanie predpísanej dávky a frekvencie užívania (Llorca, 2007).

Ohľadom zvýšenia K pacientov bolo popísaných viacero stratégií. Jedným z efektívnych riešení by mohlo byť použitie iných liekových foriem, konkrétne transdermálnych terapeutických systémov, ktoré majú oproti perorálnej liečbe tabletami mnoho výhod. Paliatívna medicína, endokrinológia a neurológia sú oblasti medicíny, ktoré v liečbe bežne využívajú transdermálne náplasti a pacienti profitujú z

Tab. 1: Zloženie filmov

Film	HPMC (mg)	PVP (mg)	G (μl)	Voda (g)	haloperidol (mg)
1gh*	224	96	77	8	15
2gh*	160	160	77	8	15
3gh*	96	224	77	8	15
0_H	320	0	0	8	0
0_P	0	320	0	8	0
1	224	96	0	8	0
2	160	160	0	8	0
3	96	224	0	8	0
0g_H	320	0	77	8	0
0g_P	0	320	77	8	0
1g	224	96	77	8	0
2g	160	160	77	8	0
3g	96	224	77	8	0

H – HPMC, P – PVP, g – glycerol, h – haloperidol, * – filmy použité v skúške disolúcie

kontinuálneho riadeného prívodu liečiva bez výkyvov v jeho plazmatických hladinách. Touto štúdiou sme chceli poukázať na problematiku K pacientov užívajúcich antipsychotickú terapiu a závažnosť následkov N-K. Cieľom štúdie bolo navrhnúť, pripraviť a farmaceuticky vyhodnotiť matricovú náplast obsahujúcu haloperidol ako liekovú formu, ktorá by mohla viesť k posilneniu K pacientov a zlepšeniu kvality ich života vďaka širokému spektru výhod.

MATERIÁL A METÓDY

Na prípravu filmov sme použili: haloperidol prášok Haloperidol Alfa Aesar (LOT W28D013), hydroxypropylmetylcelulózu (HPMC) Hypromellose 3550 Dr. Kulich Pharma (Š: DT250261R, A: 0526/1013/538), polyvinylpyrolidón (PVP) Polyvinylpyrrolidon 3600, Lachema n.p. Brno (Š: 473360675) a glycerín (G) Glycerín Centralchem (Š: 22.03.2017, EXP: 03.2020).

Príprava filmov

Filmy pre hodnotenie fyzikálno-chemických

vlastností a skúšku disolúcie boli pripravované osobitne. Pri príprave boli použité zásobné 3,85 % (m/m) roztoky HPMC a PVP. Roztok PVP sme pripravili rozpustením PVP v čistenej vode pri laboratórnej teplote. Roztok HPMC sme pripravili podľa postupu, ktorý uvádzajú Kumar a Himmelstein (1995). HPMC sme pridávali v malých množstvách za stáleho intenzívneho miešania do 2/3 potrebného objemu čistenej vody zohriatej na 90 °C. Po pridaní celého množstva HPMC sme doplnili chýbajúci objem vody s teplotou 5 °C. Zmes sme následne umiestnili na 1 h do chladničky. Pre každú formuláciu sme potrebné množstvo HPMC, PVP a príslušného plastifikátoru rozotreli v roztieračke. Do formulácií určených k disolučnej skúške, ktoré sme dôkladne dispergovali, sme pridali 15 mg haloperidolu. Zmes potrebnú na jednu Petriho miskú (PM) s priemerom 5 cm sme navážili do uzatvárateľných skúmaviek a centrifugovali 5 min pri 3000 ot/min. Po odstránení vzduchových bublín sme navážili 8,32 g ± 0,01 g zmesi do PM a vzorky sme nechali sušiť 8 h (filmy z HPMC) alebo 16 h (filmy z HPMC a PVP) pri teplote 50 °C v sušičke bez nútenej cirkulácie vzduchu s otvorenou klapkou. Po usušení boli

vzorky skladované pri laboratórnych podmienkach s obmedzeným prístupom svetla a vzduchu. Zloženie jednotlivých vzoriek filmov uvádza tabuľka 1.

Hodnotenie vzhľadu

Po príprave boli filmy vyhodnotené najmä z hľadiska priehľadnosti, homogenity a lepivosti.

Hodnotenie fyzikálno-chemických vlastností

Na určenie vlastností pripravených filmov sme uskutočnili nasledovné testy: obsah vlhkosti, pohlcovanie vlhkosti, skladacia sila (odpor) a plochosť (percento stiahnutia). Pre potreby skúšky skladacej sily a plochosti sme pripravené filmy nastrihali na štvorce s veľkosťou 1 cm². Výslednou hodnotou každého merania bol priemer troch nameraných hodnôt.

Obsah vlhkosti

Film sme odvážili na analytických váhach (m_1) a následne sme ho umiestnili do desikátora so silikagélom na 24 h pri laboratórnej teplote 24 °C. Po 24 h sme film opäť odvážili (m_2). Obsah vlhkosti sme vypočítali podľa vzorca:

$$\% = \frac{m_1 - m_2}{m_2} * 100$$

Pohlcovanie vlhkosti

Film sme odvážili na analytických váhach (m_1) a následne sme ho umiestnili do desikátora s nasýteným roztokom KCl na 24 h pri laboratórnej teplote 24 °C. Po 24 h sme film opäť odvážili (m_2). Obsah vlhkosti sme vypočítali podľa vzorca:

$$\% = \frac{m_2 - m_1}{m_1} * 100$$

Skladacia sila (odpor)

Film sme diagonálne prekladali v tom istom smere a zlome, kým nedošlo k zjavnému poškodeniu (prasklina, pretrhnutie). Skladacia sila je vyjadrená počtom prehnutí, pri ktorom nedošlo k poškodeniu náplasti. Za náplast' dostatočne odolnú sme považovali

tú, u ktorej nedošlo k viditeľnému poškodeniu po stonásobnom prehnutí.

Plochosť (percento stiahnutia)

Z filmu dlhého 1 cm sme odrezali prúžky po bokoch a zo stredu filmu (l_1). Po odrezaní sme zmerali dĺžku prúžkov po nožnej zmene (l_2), vzniknutej v dôsledku nejednotnosti v hrúbke plochy, pričom 0 % stiahnutie znamená 100 % plochosť povrchu. Percento stiahnutia sme vypočítali podľa vzorca:

$$\% = \frac{l_1 - l_2}{l_2} * 100$$

Skúška disolúcie

Na zistenie disolučného profilu haloperidolu sme uskutočnili disolučnú skúšku, na ktorú sme použili disolučnú stanicu Hanson Research SR8 Plus (Teledyne Hanson Research, 9810 Variel Avenue, Chatsworth, CA 91311, USA). Ako miešaciu jednotku sme použili miešadlo pozostávajúce z hriadeľa a miešacích lopatiek. Jednotlivé vzorky boli umiestnené do sklenených nádob a upevnené sítom s priemerom PM, ktoré bolo zabezpečené plastovými úchytkami po bokoch PM. Toto sito zabezpečovalo umiestnenie náplasti v polohe rovnobežnej s dnom sklenenej nádoby a dolnou hranou miešadla tak, aby vrstva uvoľňujúca liečivo smerovala vždy nahor. Pre kontrolu interakcie materiálov sme uskutočnili disolučný test s čistou PM, PM s úchytkami a PM s úchytkami a sítom v disolučnom médiu s prídavkom haloperidolu trvajúcu 12 h. Pre disolúciu vzoriek sme zvolili rýchlosť otáčania miešadla 50 ot/min. Vodný kúpeľ bol udržiavaný pri teplote 32 °C ± 0,5 °C. Ako disolučné médium sme použili acetátový pufor s pH 4,5; pozostávajúci z 2,99 g octanu sodného a 14 ml kyseliny octovej (2 mol.l⁻¹) na 1 liter vody. Pre jednotlivé vzorky sme používali 500 ml disolučného média, ktoré sme vždy po odbere 2 ml dopĺňali 2 ml čistého média. Vzorky sme odoberali v ôsmich časoch: 15, 30, 60 min, 2, 4, 6, 8 a 24 h pomocou injekčných striekačiek s ihlou. Absorbancia odobratých vzoriek bola meraná pri vlnovej dĺžke

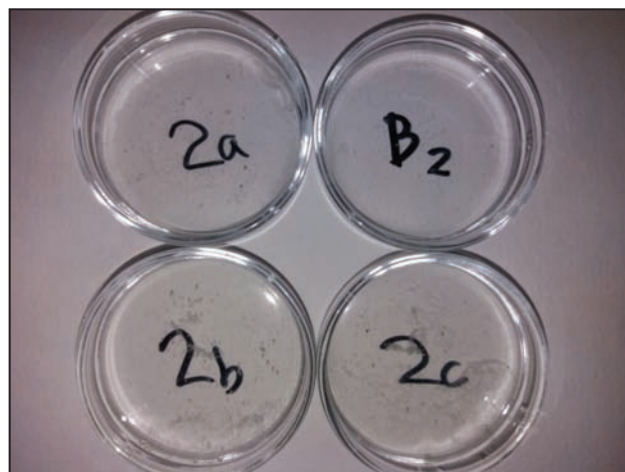
Obr. 1: Film 3g s priemerom 5 cm



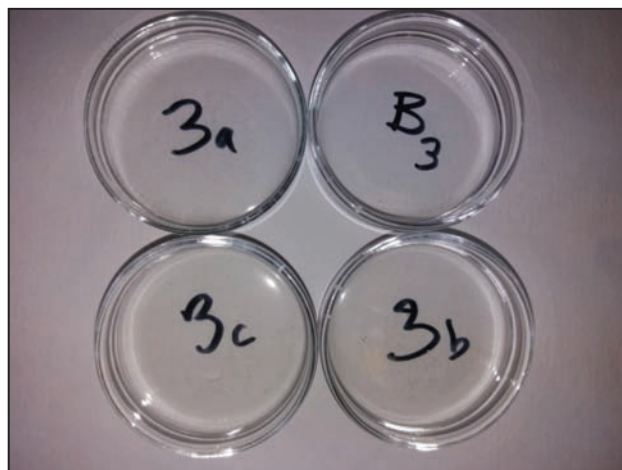
Obr. 2: Formulácia 1gh



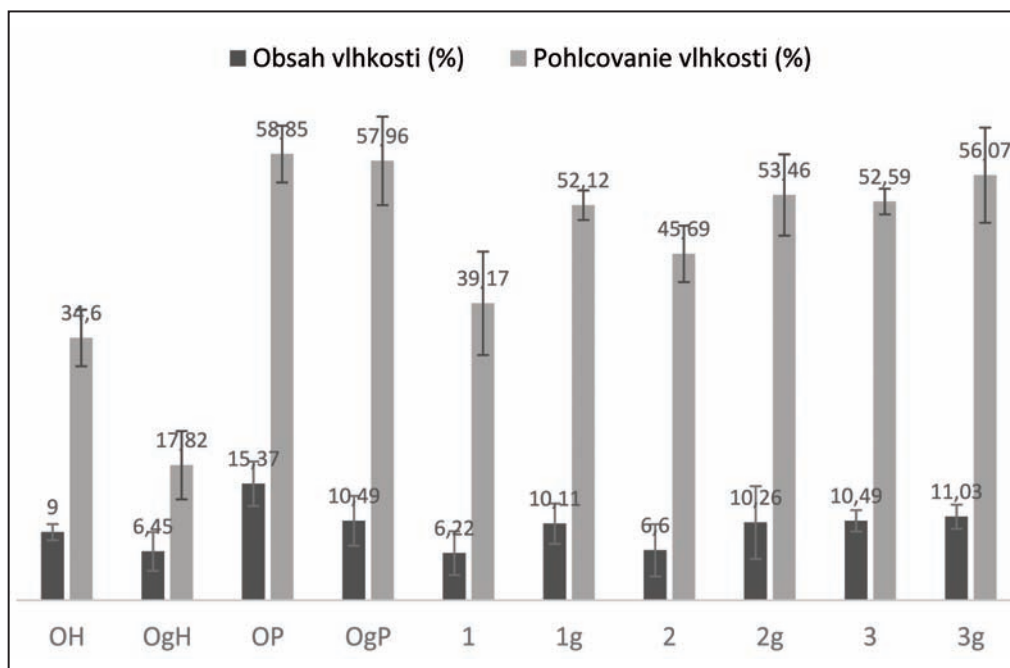
Obr. 3: Formulácia 2gh



Obr. 4: Formulácia 3gh



Graf 1: Obsah a pohlcovanie vlhkosti filmov



245 nm, vždy po získaní posledného odberu po 24 h. Disolúcia prebiehala postupne s každým z troch pomerov HPMC:PVP.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

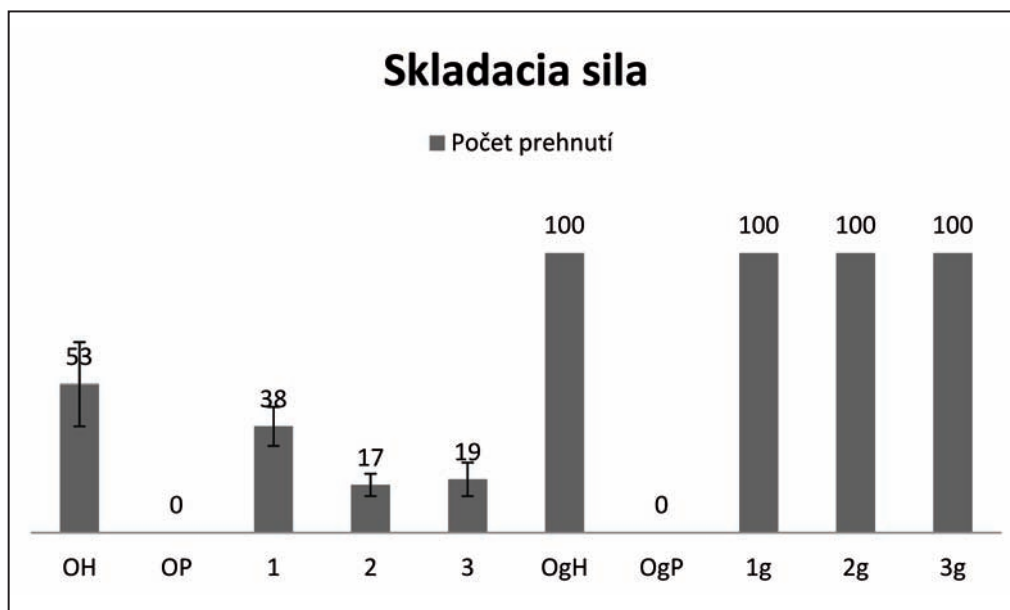
K je dôležitým faktorom pri liečbe všetkých chronických ochorení a duševné poruchy nie sú výnimkou. Charakter samotných symptómov schizofrénie, častá komorbidita pacientov, nežiaduce účinky a hroziace interakcie antipsychotickej liečby výrazne sťažujú schopnosť pacientov spolupracovať s lekármi a užívať liečbu podľa pokynov lekára. Z analýzy odbornej literatúry vyplýva, že aj keď je účinnosť antipsychotík považovaná pri všetkých liečivách za rovnakú, ich spektrum účinkov a nežiaducich účinkov sa výrazne líši. Preferovaná je kontinuálna monoterapia najnižšou možnou dávkou neuroleptika 2. generácie, pričom je čím ďalej tým viac preferovaná injekčná depotná forma s cieľom zabezpečenia dlhodobého riadeného prívodu liečiva. Naša štúdia navrhuje ako riešenie nízkej K pacientov

a zabezpečenie dlhodobej kontinuálnej liečby transdermálne terapeutické systémy, ktorých výhody (jednoduchý spôsob podania, znížená terapeutická dávka, menšie riziko nežiaducich účinkov a interakcií, nižšia frekvencia dávkovania a i.) môžu posilniť K pacientov. Navrhnuté a pripravené boli matricové systémy bez adhezíva. Z hľadiska rozpustnosti haloperidolu sme na prípravu zvolili hydrofilné polyméry HPMC a PVP, a zmäkčovadlo G. Použité bolo modelové liečivo haloperidol, ktoré je antipsychotikom 1. generácie. Liečivo bolo vo formulácii suspendované, keďže sa vo vode prakticky nerozpúšťa.

Hodnotenie vzhľadu

Pripravené formulácie boli priehľadné a flexibilné (viď obr. 1), s výnimkou filmu tvoreného čistým PVP, ktorý bol krehký a pri manipulácii praskal. So stúpajúcim obsahom HPMC sa vo vzorkách vyskytovalo väčšie množstvo vzduchových bublín. Naopak, so stúpajúcim množstvom PVP boli vzorky viac uniformné (viď obr. 2, 3 a 4). Pomer HPMC:PVP

Graf 2: Skladacia sila filmov



30:70 bol takmer úplne homogénny bez vzduchových bublín. Vznik a pretrvávanie bublín vo filmoch HPMC:PVP 70:30 môžeme pripísať vysokej viskozite HPMC v týchto formuláciách, s ktorou sme sa stretli pri vylievaní disperzií na PM pred ich sušením. Filmy 1, 1g, 2, 2g, 3, 3g, O_H, O_G boli matné a nelepivé a filmy O_P a O_G boli lesklé a lepkavé. Najviac lepkavý bol film O_G.

Hodnotenie fyzikálno-chemických vlastností

S cieľom hodnotenia fyzikálno-chemických vlastností pripravených filmov s obsahom rôznych pomerov polymérov a odlišných množstiev a druhov plastifikátorov boli jednotlivé testy uskutočnené vo všetkých kombináciách. Keďže sme na prípravu filmov použitých v disolučnej skúške zvolili formuláciu s najvyšším obsahom G, výsledky uvádzame len pre toto zloženie filmov.

Obsah vlhkosti a pohlcovanie vlhkosti

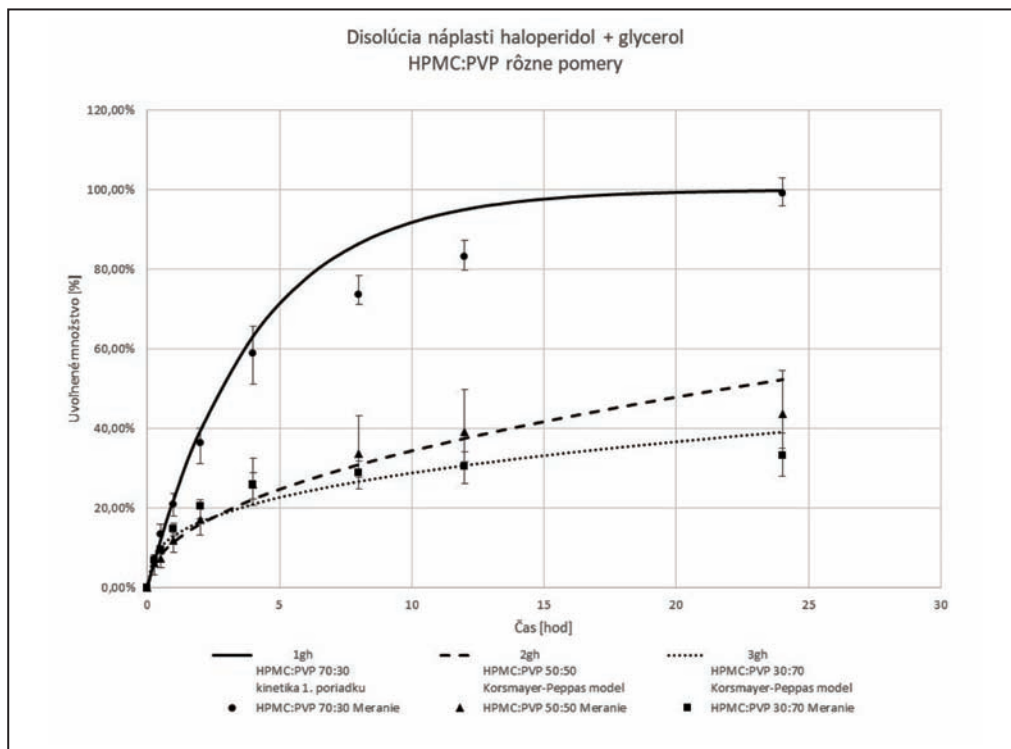
HPMC aj PVP sú hygroskopické. Z grafu 1 je zrejmé, že schopnosť viazať vzdušnú vlhkosť

prevažuje pri PVP samotnom, ale aj vo formuláciách s HPMC, kde so stúpajúcim obsahom PVP stúpa obsah aj pohlcovanie vlhkosti. Vo filmoch 1g, 2g a 3g spôsobil prídavok hygroskopického G zvýšenie už obsiahnutej aj pohltenej vlhkosti, no rozdiel v nameraných hodnotách medzi formuláciami nebol taký výrazný ako v prípade formulácií bez G. Vo filmoch O_H a O_P spôsobil prídavok G naopak pokles v meraných hodnotách, ktorý bol miernejší pre filmy z PVP.

Skladacia sila (odpor)

Skúška skladacej sily jednoznačne ukázala nevyhnutnosť prídavku zmäčkovadla do formulácií. Film pripravený len z HPMC bol viditeľne poškodený po 53 prehnutiach a formulácie so zmesou HPMC a PVP praskali v priemere už po 25 prehnutiach filmu (viď graf 2). G zabezpečil dostatočnú ohybnosť pripravených filmov, pričom rozdiel vo výsledkoch pri použití rôzneho množstva G nebol pozorovaný. Každý film s prídavkom G odolal viac ako 100 prehnutiach v rovnakom smere a ani po takomto

Graf 3: Disolučný profil haloperidolu v jednotlivých formuláciách



Formulácie: 1gh, 2gh, 3gh

namáhání neboli na filmoch viditeľné žiadne známky opotrebovania alebo zhoršenia kvality. Takéto účinky G po pridaní do filmov z HPMC popísali aj Aulton a kol. (1981). Filmy z PVP boli krehké a praskali už pri snahe oddeliť film od PM, resp. sa oddeliť vôbec nedali. Prídavok G vo filme z PVP znížil jeho krehkosť a tvrdosť, no spôsobil výraznú lepkosť a film tiež nebolo možné od PM oddeliť.

G vystupoval vo formulácii ako zmäkčovadlo. Plastifikátory znižujú tuhosť polymérov tak, že pri vysychaní polymérnych gélov bránia agregácii polymérnych molekúl pri odparovaní rozpúšťadla väzbou na tieto molekuly. Tým sa počet kontaktov polymér – polymér zníži a flexibilita systému sa zvýši. Rovnakým zmäkčovacím efektom pôsobí aj zvyšková voda v polyméroch (Aulton a kol., 1981). Pri výrobe je teda dôležité stanovenie vhodného času sušenia, keďže úplné vysušenie filmov nemusí byť žiaduce. Prítomná zvyšková vlhkosť vo formuláciách a hygroskopická vlastnosť G je často žiaduca.

Prílišný obsah vlhkosti a schopnosť pohlcovať vlhkosť však môže negatívne ovplyvňovať stabilitu liečiva a mikrobiologické riziko a prispievať k mohutnosti náplasti. Obsah a pohlcovanie vlhkosti vo formuláciách stúpali s obsahom PVP a najvyšší obsah vlhkosti bol zistený vo filme zo samotného PVP. Prídavok G spôsobil len mierne zvýšenie obsahu a pohlcovania vlhkosti, ktoré z dlhodobého hľadiska znižuje vysychavosť a chráni filmy pred fragilitou.

Vhodný čas sušenia sme chceli určiť sušením do konštantnej hmotnosti filmov, no takéto vysušenie nebolo vhodné. Vo filmoch neostala dostatočná vlhkosť, boli príliš krehké a ich odstránenie z PM bez poškodenia bolo nemožné. Dobu sušenia sme preto určili na základe vlastností výsledného produktu v závislosti od času sušenia.

Plochosť (percento stiahnutia)

Percento stiahnutia sme skúšali u náhodne zvolených troch filmov z HPMC aj z pomeru HPMC a PVP. Pri všetkých vzorkách bolo percento rovné 0,

a teda filmy môžeme považovať za 100 % ploché. Pri vzorke PVP sme tento test neuskutočnili, keďže nebolo možné film z PM vybrať bez poškodenia.

Skúška disolúcie

Uvoľňovanie liečiva z filmu s najvyšším obsahom HPMC (formulácia 1gh) má najbližšie ku kinetike prvého poriadku. Exponent n má hodnotu 0,5866, čo znamená, že uvoľňovanie je zabezpečené do určitej miery prvotným napučiavaním polyméru a následnou difúziou liečiva. So znižujúcim sa množstvom HPMC vo formulácii 2 gh sa kinetika uvoľňovania liečiva mení, najviac ju vystihuje model Korsmayer-Peppas. Hodnota exponentu n 0,4783 sa približuje k hodnote, ktorá popisuje uvoľňovanie liečiva riadené difúziou podľa Fickovho zákona. K ďalšiemu spomaleniu uvoľňovania liečiva dochádza so zvýšeným obsahom PVP vo formulácii 3 gh. Výsledky viac korelujú s modelom Kosmayer-Peppas. Hodnota exponentu n 0,3478 sa približuje k hodnote vyjadrujúcej riadenie liberácie liečiva difúziou, no menej než predošlá formulácia (viď graf 3).

Pomocou Študent t-testu sme vypočítali štatistickú významnosť medzi množstvami uvoľneného haloperidolu po 24 h medzi jednotlivými tromi formuláciami. Pri hladine významnosti $P < 0,005$ sme rozdiel v uvoľňovaní medzi formuláciami 1 gh a 2 gh, a 1 gh a 3 gh vyhodnotili ako štatisticky signifikantný. Rozdiel medzi formuláciami 2 gh a 3 gh nebol štatisticky významný ($P = 0,0741$).

HPMC bola použitá ako konštitutívna látka. Je významným hydrofilným polymérom, ktorý sa používa pri formulácii liekových foriem s riadeným uvoľňovaním (Colombo, 1993). Jednou z najdôležitejších vlastností HPMC je schopnosť napučiavať, ktorá výrazne ovplyvňuje spôsob, akým sa liečivo uvoľňuje z pevnej fázy. Voda alebo telesná tekutina v styku s HPMC difunduje do polyméru a dochádza k rozrušeniu polymérneho reťazca s následným zväčšením jeho objemu. Liečivo potom môže difundovať zo systému do fyziologického prostredia (Brannon-Peppas, 1990). Pre HPMC

neexistuje presné vysvetlenie uvoľňovania liečiva konkrétnym kinetickým modelom a výrazne závisí od zloženia systému a jeho geometrie. HPMC sa vo formuláciách zvykne používať aj kvôli schopnosti inhibovať kryštalizáciu liečiv a predlžovať ich stav supersaturácie v liekovej forme, čím môže zvyšovať rýchlosť difúzie liečiva a dlhšie udržiavať uvoľňovanie liečiva konštantné (Sun a kol., 2018).

PVP je vo vode rozpustný, hydrofilný polymér, ktorý bol použitý ako ďalšia konštitutívna pomocná látka. PVP má schopnosť inhibovať kryštalizáciu liečiva pri skladovaní jeho nukleáciou po odparení rozpúšťadla z roztoku a zvyšuje rozpustnosť liečiva v matrici tým, že ho udržiava v amorfnom stave (Sadashivaiah, 2008). Jeho vplyv na uvoľňovanie liečiva z pevnej fázy závisí od jeho molekulovej hmotnosti. Čím je vyššia, tým difúzia dispergovaného liečiva prebieha pomalšie. Táto vlastnosť je vysvetlená jeho rozpustnosťou vo vode, pretože s predĺžením reťazca PVP sa jeho rozpustnosť znižuje, predlžuje sa proces napučiavania a viskozita sa zvyšuje (Leuner, 2000).

Rozpustnosť liečiva v polymére a s ňou spojená rýchlosť jeho disolúcie závisí od schopnosti konštitutívnych pomocných látok stabilizovať liečivo v amorfnom stave a zabrániť jeho kryštalizácii (Sun a kol., 2018), ďalej od molekulovej hmotnosti, rozpustnosti, hygroskopickosti a množstva použitého nosiča (pomer vehikulum:liečivo) a jeho schopnosti udržiavať liečivo v stave supersaturácie (Duong, 2016). V matriciach tvorených dvomi a viacerými polymérmi je difúzia ovplyvnená morfológiou polymérnej zmesi (Langer a Peppas, 1983). Experimentálne bolo potvrdené, že HPMC zvyšuje rozpustnosť a urýchľuje disolúciu ťažko rozpustných slabých kyselín. Haloperidol tieto kritériá spĺňa, keďže je vo vode prakticky nerozpustný a jeho pK_a je 8,66. Rýchlosť disolúcie bola zvýšená vo formuláciách pozostávajúcich z HPMC uvoľňujúcich napr. benidipín (Suzuki a kol., 1996) a kaptopril (Jain, 2007). Rovnako ako v našom prípade, rýchlosť uvoľňovania liečiva z náplastí stúpala so stúpajúcim obsahom HPMC. V pripravených formuláciách

bol použitý PVP s molekulovou hmotnosťou 3600, čo je z dostupných typov takmer najnižšia molekulová hmotnosť. Napriek jeho relatívne nižšej molekulovej hmotnosti spôsoboval jeho stúpajúci obsah vo formulách spomalenie uvoľňovania liečiva. Tento efekt môže byť vysvetlený vznikajúcimi a zanikajúcimi intermolekulárnymi väzbami. Saluja a kol. (2016) vo svojej štúdii röntgenovou difrakciou analyzujú prítomnosť amorfnej formy haloperidolu po vytvorení tuhej disperzie haloperidolu v PVP. Vodíková väzba pritom môže zohrávať vzájomné protichodné úlohy. Na jednej strane môže stabilizovať čistú kryštalovú štruktúru liečiva a tým bráni rozpúšťaniu liečiva, na druhej stabilizuje disperziu liečiva–polyméru v tuhej fáze a tým zlepšuje disolúciu liečiva. Medzimolekulové vodíkové väzby zanikajú a môžu vznikať vodíkové väzby spájajúce hydroxylovú skupinu haloperidolu a karbonylovú skupinu PVP. Tieto väzby potencujú disolúciu udržiavaním liečiva v amorfnom stave, ktorý je energeticky nestabilný a bez stabilizácie by prechádzal do kryštalickej formy. Zabezpečujú disperzitu liečiva na molekulárnej úrovni a bránia tak tvorbe kryštalickej mriežky medzi susediacimi molekulami liečiva. Týmto efektom ovplyvňujú distribúciu veľkosti častíc v disperzii a môžu zvyšovať rozpustnosť liečiv (Karavas a kol. 2006). Fornells a kol. (2018) však vo svojej štúdii potvrdili, že medzi haloperidolom a PVP tieto väzby nevznikajú, a síce PVP nemá účinok na rýchlosť disolúcie haloperidolu. Predmetom ich práce bol vplyv PVP na rozpustnosť a uvoľňovanie 17 liečiv z formulácií s PVP s rôznou molekulovou hmotnosťou a v rôznych pomeroch s liečivom, pričom rozpustnosť haloperidolu sa po prídavku 50 % PVP o molekulovej hmotnosti 4000 nezmenila. Popísané boli rôzne účinky: PVP u niektorých liečiv predlžoval stav supersaturácie, u iných zvyšoval maximálnu koncentráciu liečiva dostupnú k absorpcii oproti koncentrácii bez polyméru, ale nepredlžoval tento stav a v poslednej skupine liečiv nevykazoval žiadny účinok na ich rozpustnosť a dostupnosť. HPMC pravdepodobne zvyšovala rozpustnosť a rýchlosť rozpúšťania haloperidolu, naproti tomu

PVP na uvedené fyzikálne parametre haloperidolu nemal zásadný vplyv. Môžeme sa preto domnievať, že spomalenie, resp. urýchlenie disolúcie v našich formuláciách mohlo byť spojené najmä so zmenou koncentrácie HPMC vo formuláciách.

ZÁVER

Oproti veľkému množstvu perorálne podávaných foriem antipsychotík stojí nedostatok komerčne dostupných liekov, ktoré by sprístupňovali neuroleptiká v alternatívnych moderných liekových formách a zvyšovali by komfort psychiatrických pacientov. Možnosť poskytnúť pacientom liečivá v iných liekových formách, ktorých výhody sú potvrdené štúdiami alebo samotnou praxou, by mohla schizofrenickým pacientom nielen uľahčiť život, čo by viedlo k posilneniu K, ale takisto ich chrániť pred progresívnym zhoršovaním ich stavu, toxickými účinkami antipsychotík, ich postupnou stratou účinku alebo vznikom tolerancie a receptorovej supersenzitivity.

Prezentovaná štúdia spracováva návrh a postup prípravy matricových transdermálnych filmov s obsahom haloperidolu, konštitutívnych látok HPMC a PVP a zmäkčovadla G. Disolučné profily pripravených filmov boli nasledovné: formulácia s vyšším obsahom HPMC uvoľnila obsah liečiva po cca 17 hodinách, pričom približne prvých 5 hodín uvoľňovala takmer konštantné množstvo liečiva za určitý čas; ďalšie dve formulácie uvoľňovali liečivo výrazne pomalšie a po 24 hodinách došlo k liberácii 50 % (polyméry v pomere 1:1) a 40 % liečiva (nižší obsah HPMC). Obsah liečiva uvoľnený z nami pripravených filmov s povrchom 19,625 cm² tvorenými HPMC:PVP 70:30 teoreticky zodpovedá maximálnej dennej dávke pri závažnej symptomatológii u dospelých rovnej 15 mg – v tomto prípade by boli náplasti vymieňané každý deň. Obsah náplastí s nižším obsahom HPMC, ktoré uvoľňujú liečivo pomalšie, zodpovedá dennej dávke 8 alebo 5 mg, čo je bežné dávkovanie pre dospelých so stredne závažnými symptómami. V tomto prípade by bola náplast vymieňaná každých 48 h. Obidve

využitia by fungovali len v prípade, že sa z náplasti uvoľní celé množstvo liečiva, resp. náplasti by museli obsahovať ešte vyššiu dávku, pretože v konečných fázach uvoľňovania liečiva z matrice by sa proces mohol pri veľmi nízkej koncentrácii liečiva výrazne spomaliť až zastaviť. Zároveň proces penetrácie liečiva do pokožky, ktorý podmieňuje úspešnosť transdermálneho podania liečiva nebol hodnotený, a preto by bolo potrebné overiť prestup liečiva pokožkou *in vitro* metódou s požitím Franzovej difúznej cely alebo pomocou zvieracích modelov.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla za podpory projektu zo štrukturálnych fondov „Obnova výskumnej a vývojovej infraštruktúry a prístrojového vybavenia na UVLF, ITMS 26210120028“.

ZOZNAM LITERATÚRY

Aulton, M. E., Abdul-Razzak, M. H., Hogan, J. E.: The mechanical properties of hydroxypropylmethylcellulose films derived from aqueous systems part 1: the influence of plasticisers. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1981, 7, 649 – 668.

Brannon-Peppas, L.: Preparation and characterization of crosslinked hydrophilic networks. *Studies in Polymer Science*, 1990, 8, 45 – 66. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044488654550008X>. Accessed November 3, 2018.

Colombo, P.: Swelling-controlled release in hydrogel matrices for oral route. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1993, 11, 37 – 57.

Diaz, E., Levine, H. B., Sullivan, M. C., Sernyak, M. J., Hawkins, K. A., Cramer, J. A., Woods, S. W.: Use of the Medication Event Monitoring System to estimate medication compliance in patients with schizophrenia. *J. Psychiatry Neurosci.*, 2001, 26, 4, 325 – 329.

Duong, T. V. a Van Den Mooter, G.: The role of the carrier in the formulation of pharmaceutical

solid dispersions. Part II: amorphous carriers. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2016, 13, 12, 1681 – 1694.

Fornells, E., Fuguet, E., Mañé, M., Ruiz, R., Box, K., Bosch, E., Ráfols, C.: Effect of vinylpyrrolidone polymers on the solubility and supersaturation of drugs; a study using the Cheqsol method. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2018, 117, 227 – 235.

Jain, S. a Joshi, S. C.: Development of transdermal matrix system of captopril based on cellulose derivative. *Pharmacologyonline*, 2007, 1, 379 – 390. https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2007/vol1/41_Jain.pdf. Accessed November 3, 2018.

Kane, J. M.: Compliance issues in outpatient treatment. *J. Clin. Psychiatry*, 1985, 5, 22 – 27.

Karavas, E., Ktistis, G., Xnakis, A., Georgarakis, E.: Effect of hydrogen bonding interactions on the release mechanism of felodipine from nanodispersions with polyvinylpyrrolidone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2006, 63, 2, 103 – 114.

Keith, S. J. a Kane, J. M.: Partial compliance and patient consequences in schizophrenia: our patients can do better. *J. Clin. Psychiatry*, 2003, 64, 11, 1308 – 1315.

Kumar, S. a Himmelstein, K. J.: Modification of in situ gelling Behavior of carbopol solutions by hydroxypropyl methylcellulose. *J. Pharm. Sci.*, 1995, 84, 3, 344 – 348.

Langer, R. a Peppas, N.: Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: a review. *Journal of macromolecular science. Polymer reviews*, 1983, 23, 1, 61 – 126.

Leuner, C. a Dressman, J.: Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2000, 50, 1, 47 – 60.

Llorca, P. M.: Partial compliance in schizophrenia and the impact on patient outcomes. *Psychiatry Res.*, 2007, 161, 2, 235 – 247.

Moťovksý, B.: Manažment liečby pacienta so schizofréniou. *Via practica*, 2010, 7, 4, 174 – 179.

Racková, S. a Janú, L.: Proč také pacienti nechtějí antipsychotika? *Psychiatria pre prax*, 2007,

4, 166 – 168.

Sadashivaiah, R., Dinesh, B. M., Patil, U. A., Desai, B. G., Raghu, K. S.: Design and in vitro evaluation of haloperidol lactate transdermal patches containing ethyl cellulose-povidone as film formers. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 2008, 2, 43 – 49.

Saluja, H., Mehanna, A., Panicucci, R., Atef, E.: Hydrogen Bonding: between strengthening the crystal packing and improving solubility of three haloperidol derivatives. *Molecules*, 2016, 21, 6, 719.

Sun, Z., Huicong, Z., Huiyang, H., Xiaorui, Z., Qun, W., Kexin, L., Zhonggui, H.: Cooperative effect of polyvinylpyrrolidone and HPMC E5 on dissolution

and bioavailability of nimodipine solid dispersions and tablets. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1818087618302885>. Accessed November 3, 2018.

Suzuki, H., Miyamoto, N., Masada, T., Hayakawa, E., Ito, K.: Solid dispersions of benidipine hydrochloride. 1. Preparations using different solvent systems and dissolution properties. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1996, 44, 2, 364 – 371.

Weiden, P. J. a Olfson, M.: Cost of relapse in schizophrenia. *Schizophr. Bull.*, 1995, 21, 3, 419 – 429.



BIOLOGICKÁ LIEČBA U PACIENTKY S ULCERÓZNOU KOLITÍDOU (KAZUISTIKA)

BIOLOGICAL THERAPY IN THE PATIENT WITH ULCERATIVE COLITIS (CASE STUDY)

Kolesárová M., Mitrušková D., Rozman Antoliová N.

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

maria.kolesarova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Ulcerózna kolitída (UC) predstavuje celoživotné zápalové ochorenie postihujúce hrubé črevo a konečník. Terapia pacientov je v dôsledku nie úplne objasnenej etiopatogenézy nešpecifická a empirická. Zameriava sa na supresiu zápalových a imunologických procesov. Kritickými činiteľmi pri určení stratégie sú lokalizácia, rozsah, komplikácie, ako aj odpoveď na doterajšiu liečbu. V konvenčnej terapii sa využívajú aminosalicyláty, kortikosteroidy a imunosupresíva. V posledných rokoch bolo spektrum medikamentózneho terapie obohatené o biologickú liečbu. Cieľom štúdie bola analýza a vyhodnotenie kazuistiky u pacientky s ťažkým priebehom UC s extraintestinálnymi manifestáciami, ktorej bola po zlyhaní konvenčnej terapie indikovaná biologická liečba. Z výsledkov vyplýva, že liečba infliximabom výrazne zlepšovala

kvalitu života pacientky. Avšak zmena biologickej liečby z infliximabu na adalimumab v rámci kombinovanej terapie síce bola nad'alej účinná v terapii UC, ale v terapii enteropatickej artropatie nebola zaznamenaná dostatočná terapeutická odpoveď, čo môže súvisieť aj s progresiou ochorenia.

Kľúčové slová: biologická liečba; klinické prejavy; ulcerózna kolitída

ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) is a lifelong inflammatory disease affecting the colon and the rectum. Patient's therapy is unspecific and empirical due to etiopathogenesis which is not fully clarified. It focuses on suppressing inflammatory and immunological processes.

Critical factors in determining the strategy are localization, extent, complications, as well as response to the previous treatment. In conventional therapy, aminosalicylates, corticosteroids or immunosuppressants are used. In recent years, the spectrum of medical therapy has been enriched with biological treatment. The aim of the study was to analyze and evaluate a case report of a patient with severe UC and numerous extraintestinal manifestations indicated by biological therapy after failure of conventional therapy. The results indicate that treatment with infliximab significantly improved patient's quality of life. Following an allergic reaction to infliximab, adalimumab was administered. Adalimumab within a combined therapy was effective in the therapy of UC, however, this change did not provide sufficient therapeutic response in the therapy of enteropathic arthropathy. It might be connected with progression of disease.

Key words: biological therapy; clinical manifestations; ulcerative colitis

ÚVOD

Ulcerózna kolitída predstavuje celoživotné zápalové ochorenie postihujúce hrubé črevo alebo konečník. Asi u 95 % pacientov zápal postihuje rektum, odkiaľ sa môže šíriť proximálne, symetricky a bez prerušenia postihuje časti hrubého čreva (Kužela a Zakuciová, 2012). Medzi hlavné príznaky patrí krvavá hnačka, defekácia hlienu a tenezmy (nutkavé bolestivé pocity na stolicu s defekáciou malého množstva stolice alebo iba hlienu a pocitom neúplného vyprázdnenia). Kolitída väčšieho rozsahu býva spojená s horšími príznakmi, profúznou krvavou hnačkou a celkovými prejavmi ako váhový úbytok, horúčka s tachykardiou (Gabalec, 2009). Asi v 6 – 47 % prípadov sa vyskytujú extraintestinálne príznaky (Rothfuss a kol., 2006). Medzi extraintestinálne manifestácie závislé od aktivity ochorenia patria episkleritída, uveitída, periférne artropatie, erythema

nodosum a i. Medzi extraintestinálne manifestácie nezávislé od aktivity ochorenia patria ankylozujúca spondylitída, axiálne artropatie, sakroileitída a i. Pacienti s UC majú zvýšené riziko kolorektálneho karcinómu (Kužela a Zakuciová, 2012). Etiológia UC je neznáma a patogenéza je len čiastočne preskúmaná. Klinické a experimentálne štúdie poukazujú na vplyv vonkajších faktorov a defektov v regulácii slizničnej imunity pre vznik zápalu u geneticky predisponovaných jedincov. Avšak vplyv genetických faktorov je slabší v porovnaní s Crohnovou chorobou (Gabalec, 2009). Ochorenie postihuje približne 0,3 – 0,5 % našej populácie (Douda, 2017). Najvyššia incidencia ochorenia je v Izraeli, Veľkej Británii a Severnej Amerike (Greguš a kol., 2007). Stúpajúci trend UC bol zaznamenaný aj v postkomunistických krajinách (Stange a kol., 2006). Príčiny sú pripísané zmene životného štýlu, stravovacím návykom, zníženej pohybovej aktivite alebo industrializácii.

Nesmierne dôležitým krokom na dosiahnutie účinnej terapie je včasná diagnostika a následné zahájenie liečby. Diagnostika je založená na klinickom, endoskopickom a histologickom obraze. V diferenciálnej diagnostike UC sa využíva pozitivita protilátok proti cytoplazme neutrofilov s perinukleárnou fluorescenciou (pANCA), ktorá sa vyskytuje asi u 50 – 60 % pacientov. Z laboratórnych vyšetrení sa sledujú markery systémového zápalu ako zvýšená koncentrácia C-reaktívneho proteínu (CRP) a zvýšená sedimentácia erytrocytov. Biochemické vyšetrenie môže tiež preukazovať zmeny v elektrolytoch, napr. hypokalémiu v dôsledku hnačkovitých stavov. Vyšetrenie krvného obrazu môže odhaliť anémiu spôsobenú chronickými krvnými stratami (Gabalec, 2009).

Medikamentózna liečba UC, t. j. forma lieku, dávkovanie a jednotlivé kombinácie sa riadia anatomickým rozsahom ochorenia (proktitída, proktosigmoitída a ľavostranná kolitída, extenzívna kolitída a pankolitída), stupňom postihnutia (mierny, stredný a ťažký) a prítomnosťou komplikácií (Gabalec, 2009). Základ konvenčnej liečby tvoria aminosalicyláty (5-aminosalicylová kyselina (5-

ASA) – mesalazín, sulfasalazín), kortikoidy a imunosupresíva. Aminosalicyláty sú základným kameňom liečby u miernej a stredne aktívnej UC. Perorálne aplikovaný sulfasalazín, ktorý sa metabolizuje v hrubom čreve na mesalazín a sulfapyridín, je účinný u 80 % pacientov. Je indikovaný iba u pacientov, ktorí majú súčasne aj extraintestinálne prejavy ochorenia, napr. problémy s kĺbami (Douda, 2017; Gabalec, 2009). Inak je sulfasalazín nahradzovaný mesalazínom v dennej dávke 2 – 2,4 g až 4 – 4,8 g kvôli jeho účinnosti a menším nežiaducim účinkom (NÚ). Lokálne formy mesalazínu (čípky) sú účinné v terapii distálnej formy UC (Hlavatý a kol., 2017). U pacientov so stredne ťažkou až ťažkou kolitídou, u ktorých sa stav nezlepšuje ani pri maximálnych dávkach 5-ASA, sa indikuje liečba kortikoidmi. Podáva sa prednizón v dávke 40 až 60 mg až do zvládnutia príznakov (10 – 14 dní), ktorá sa potom znižuje o 5 mg týždenne. Účinnosť liečby bola zaznamenaná u viac ako 70 % pacientov, avšak po jednom roku sledovania bolo zaznamenaných 22 % kortikoid-dependentných pacientov (Gabalec, 2009). Imunosupresívna liečba je indikovaná u pacientov s opakovanými relapsami a u kortikoid-dependentných pacientov, alebo u pacientov, ktorí netolerujú liečbu 5-ASA (Kučela a Zakuciová, 2012). V klinickej praxi sa využívajú tiopuríny (azatioprin, merkaptopurín), prípadne cyklosporín A (Lukáš, 2011). Terapia imunosupresívami udržiava dlhodobú stabilnú remisiu. Novou možnosťou v terapii UC je biologická liečba, ktorá je vhodná u pacientov, ktorí nereagujú na konvenčnú terapiu, alebo u ktorých je konvenčná liečba spojená s intoleranciou alebo výskytom NÚ. Cieľom zásahu biologickej liečby sú molekuly s kľúčovým postavením v patogenéze ochorenia. Ide o látky inhibujúce prozápalové cytokíny ako tumor nekrotizujúci faktor α (TNF α), infliximab (IFX), adalimumab (ADA), golimumab (GLM), inhibítory adhezívnych molekúl (vedolizumab, etrolizumab), inhibítory interleukínu 12/23 (ustekinumab), a inhibítory Janus kináz (tofacitinib) (Douda, 2017). Biologiká zo skupiny protilátok anti-TNF α (IFX, ADA, GLM) sú určené na terapiu stredne a vysoko

aktívnych foriem črevných zápalových ochorení. Zavedenie IFX v roku 1993 do liečby znamenalo pokrok vo vedení terapie u pacientov s ťažkým priebehom Crohnovej choroby a UC (Bortlík a kol., 2016). IFX je chimerická (75 % ľudská a 25 % myšia) monoklonálna protilátka anti-TNF α , ktorá sa podáva formou intravenózných infúzií v dávke 5 mg/kg. ADA bol schválený na terapiu UC v roku 2012. ADA je rekombinantná ľudská monoklonálna protilátka IgG1, ktorá sa podáva subkutánne v dávke 40 mg 1-krát za 14 dní (Gabalec, 2009). Medzi najdôležitejšie potenciálne riziká, ktoré sú spojené s anti-TNF α terapiou, patria infúzne reakcie alebo reakcie v mieste vpichu, autoimunitné prejavy, neurologické prejavy, hlavne demyelinizačné ochorenia, malignity, hematologické komplikácie, srdcové zlyhanie a infekcie. Medzi časté infekčné komplikácie patria infekcie horných dýchacích ciest a sinusitída. Avšak najzávažnejšou infekčnou komplikáciou anti-TNF α liečby je vznik tuberkulózy (TBC), ktorý je asi 20-krát častejší ako u pacientov bez tejto liečby. Ide o reaktiváciu latentnej TBC, preto pred nasadením tejto liečby je potrebné screeningové vyšetrenie pacienta k vylúčeniu latentnej TBC pneumológom (Marek a kol., 2010).

Cieľom štúdie bola analýza a vyhodnotenie terapeutických postupov u pacientky s ťažkou formou UC komplikovanou extraintestinálnymi manifestáciami, u ktorej bola po zlyhaní konvenčnej terapie indikovaná biologická liečba.

Kazuistika pacientky s Ulceróznou kolitídou

33-ročná pacientka sa lieči na K51.0 ulceróznou kolitídu od roku 2008. Pracuje ako pomocná sila v kuchyni. Antropometrické údaje: telesná hmotnosť má kolísavú tendenciu s veľkým rozmedzím od 69 kg až po 52 kg v priebehu liečby, výška 165 cm. Osobná anamnéza: pacientka žije v manželstve bez detí. Fajčí pravidelne a alkohol pije príležitostne. Neuvádza žiadne alergie na lieky ani potraviny. V minulosti podstúpila operáciu hlasiviek. Rodinná anamnéza: uvádza výskyt UC v rodine.

Ochorenie sa prejavovalo častými riedkymi

stolicami s prímiesou krvi a bolesťami brucha. Zároveň pacientka trpí enteropatickou artropatiou sprevádzanou bolesťami kĺbov a kostí. Pacientka bola hospitalizovaná s ťažkou artralgiou od 12. 9. – 23. 9. 2011. Po stave *erythrema nodosum* (EN) bola pacientka od 17. 10. 2013 zaradená do starostlivosti nového gastroenterológa so stabilizovaným ťažkým malasimilačným syndrómom po enterálnej liečbe. Pacientka je zaraďovaná medzi kortikodependentných pacientov a na konvenčnú terapiu neodpovedá. V lekárskych záznamoch sa dôvod neúspechu terapie neuvádza. Pri prestupe k novému gastroenterológovi v roku 2013 bola už pacientka na biologickej liečbe, ktorá jej bola indikovaná v roku 2010. Pred zahájením biologickej liečby ako aj pri zmene účinnej látky podstúpila pacientka screeningové vyšetrenie latentnej TBC pľúc. Pacientka bola po vyšetrení pneumológom zhodnotená ako pacient vhodný na zahájenie biologickej liečby s odporúčaním na kontrolné na vyšetrenia 1x ročne.

Kolonoskopický nález z roku 2013 poukazuje na ľavostrannú kolitídu s vysokým stupňom klinickej aktivity. Odporúčanou medikáciou gastroenterológa v roku 2013 bol IFX 400 mg intravenózne v 7 – 8 týždňovom intervale. Pred aplikáciou IFX bol vždy intravenózne aplikovaný hydrokortizón v dávke 200 mg. Ďalej pacientka užívala mesalazín perorálne 2 x 2 g denne, metylprednizolón perorálne 1 x 6 mg denne rozdelený do dávok 4 – 2 – 0 mg. V roku 2013 boli 2-krát zaznamenané zvýšené hodnoty zápalového markera CRP v niekoľko mesačných odstupoch: 16 mg.l⁻¹ a 25,77 mg.l⁻¹ (norma < 5,0 mg.l⁻¹).

V roku 2014 pacientka uvádza neustále bolesti v kĺboch. Cíti sa striedavo dobre aj zle. Stolica je pravidelná 1 – 2 x denne bez prímiesy krvi. V takomto prípade reumatológ pridal do medikácie metotrexát (MTX) v tabletovej forme a odporučil užívanie nesteroidného antiflogistika nimesulidu podľa potreby. Kontrolná sigmoidoskopia, čo je optické vyšetrenie esovitej kľučky hrubého čreva a konečníka pomocou pružnej alebo pevnej trubice tzv. sigmoidoskopu, preukázala známky proktitídy, teda zápal výstelky konečníka s miernou aktivitou

a erozívnymi zmenami. Pacientke boli odobraté vzorky na histologické vyšetrenie a na základe toho gastroenterológ zamenil perorálny mesalazín za sulfasalazín, a to 2 x 1 g denne a následne pridal 1 g mesalazín čípky, a to 1 x večer.

Po 4 rokoch biologickej liečby IFX dostala pacientka počas infúzie alergickú reakciu. Po prerušení infúzie bol sledovanej žene aplikovaný hydrokortizón v dávke 100 mg intravenózne a nastalo okamžité zlepšenie stavu. Gastroenterológ zamenil IFX za ADA a pacientka musela podstúpiť diagnostické vyšetrenie dýchacieho ústrojenstva pri biologickej liečbe. Záverom vyšetrenia bolo, že pacientka je bez kontraindikácií podania ADA. Iniciálna dávka ADA bola 80 mg subkutánne, pri ďalšej aplikácii 40 mg subkutánne v 14 dňových intervaloch.

V máji 2015 pri gastroenterologickej kontrole pacientka udáva krv pri tvrdšej stolici a pretrvávajúce bolesti kĺbov. Pokračuje v užívaní ADA v dávke 40 mg subkutánne každých 14 dní. Lekárska správa uvádza nepriaznivú prognózu pre pretrvávanie bolesti kĺbov a sústavne mierne zvýšené laboratórne parametre zápalu CRP (11,04 mg.l⁻¹; 6,97 mg.l⁻¹ a 7,85 mg.l⁻¹). Pacientka popisovala tvrdšiu stolicu s prímiesou krvi 1 – 2 x denne a zhoršenie bolesti kĺbov. Gastroenterológ postupoval nasadením intenzifikovaného režimu ADA v dávke 40 mg subkutánne každých 7 dní. Zároveň pacientka užívala sulfasalazín perorálne 2 x 1 g denne, 1 g mesalazín vo forme čípku 1 x večer, metylprednizolón perorálne 1 x 6 mg denne rozdelený do dávok 4 – 2 – 0 mg. V terapii enteropatickej artritídy sa pokračovalo terapiou metotrexátom.

V júni 2016 lekár zhodnotil stav pacientky ako nemenný, pretrvávanie zápalu a bolesti kĺbov preukázali, že zmena dávkovacieho režimu nepriniesla žiaden terapeutický efekt. Dávkovanie ADA zmenil na 40 mg subkutánne každých 14 dní. Priložená správa z reumatologickej kontroly z augusta 2016 popisuje zhoršenie bolesti kĺbov, konkrétne na ramene a lakti pravej hornej končatiny a kolene a členku ľavej dolnej končatiny. Reumatológ pozmenil tabletovú formu metotrexátu na formu injekčnú v dávke 15 mg 1 x týždenne a pridal perorálnu suplementáciu kyseliny

Tab.1: Prehľad farmakoterapie pacientky od roku 2013 do 2018

2013	infiximab hydrokortizón mesalazín tbl. metylprednizolón	400 mg i. v. (7 – 8 týždňový interval) 200 mg 2 x 2 g denne 4 – 2 – 0 mg denne
3/2014	infiximab hydrokortizón mesalazín tbl. metylprednizolón	400 mg i. v. (7 – 8 týždňový interval) 200 mg 2 x 2 g denne 4 – 2 – 0 mg denne
8/2014	adalimumab mesalazín supp. sulfasalazín tbl. metylprednizolón metotrexát tbl.	400 mg i. v. (7 – 8 týždňový interval) 200 mg 2 x 2 g denne 4 – 2 – 0 mg denne
2015	adalimumab mesalazín supp. sulfasalazín tbl. metylprednizolón metotrexát tbl.	40 mg s. c. (7 dňové interval – intenzifikovaný režim) 1 g/D 2 x 1 g 4 – 2 – 0 mg neuvadené
2016	adalimumab mesalazín supp. sulfasalazín tbl. metylprednizolón metotrexát inj. <i>acidum folicum</i>	40 mg s. c. (7 dňové intervaly – intenzifikovaný režim) 1 g/D 2 x 1 g 4 – 2 – 0 mg 15 mg týždenne 2 x 10 mg týždenne
2017 – 2018	bez zmeny medikácie	

listovej, a to 2 x 10 mg za týždeň. Ostatná medikácia od gastroenterológa ostáva nezmenená počas celého roka. Hodnoty CRP mali klesajúcu tendenciu v druhej polovici roka, keď hodnota CRP klesla zo 14,16 mg.l⁻¹ na hodnotu 2,24 mg.l⁻¹.

V roku 2017 pacientka podstúpila 2-krát gastroenterologickú kontrolu, a to v marci a decembri. Parametre zápalu klesli (CRP 6,53 mg.l⁻¹ a 3,54 mg.l⁻¹), avšak bolesti kĺbov ostávajú v popredí klinického obrazu sledovanej ženy.

Posledná kontrola počas sledovaného obdobia bola vykonaná v máji 2018. Pacientka neudáva hnačky, stolica je pravidelná 1 – 2 x denne bez prímеси krvi. Bolesti kĺbov pretrvávajú a cíti sa unavená. Laboratórne vyšetrenie preukázalo zvýšenie hodnoty CRP (10,03 mg.l⁻¹). Medikácia ostáva nezmenená, sledovanej žene je odporúčané fyzické šetrenie

a pravidelné kontroly u reumatológa. Prehľad farmakoterapie pacientky od roku 2013 do roku 2018 uvádza tabuľka 1.

Hodnoty CRP počas liečby pacientky sú uvedené v tabuľke 2.

DISKUSIA

Kazuistika zobrazuje prípad mladej 33-ročnej pacientky s UC komplikovanou extraintestinálnymi manifestáciami, u ktorej bola po neúspešnej konvenčnej terapii indikovaná biologická liečba anti-TNF α protilátkami. Incidencia a prevalencia idiopatických črevných ochorení sa zvyšuje a postihuje prevažne mladých ľudí v reprodukčnom veku. UC vzniká a reaktivuje sa u geneticky predisponovaných jedincov, kedy faktory vonkajšieho

Tab. 2: Hodnoty CRP pacientky počas sledovanej doby liečby

Rok	Hodnota CRP v jednotkách mg.l ⁻¹ (norma < 5,0 mg.l ⁻¹)
liečba infliximabom	
2013	16
	25,77
2014	13,78
	16,99
liečba adalimumabom	
2014	6,05
	3,98
2015	11,04
	6,97
	7,85
2016	14,16
	2,24
2017	6,53
	3,54
2018	10,03

CRP – C-reaktívny proteín

prostredia poškodzujú slizničnú bariéru (Douda, 2017). To môže súvisieť aj s prípadom pacientky v tejto kazuistike, ktorá uvádza výskyt UC v rodine. Telesná hmotnosť pacientky bola na začiatku sledovaného obdobia 69 kg a na konci 52 kg, čo predstavuje úbytok 17 kg. Hodnota BMI na začiatku sledovaného obdobia bola 25,3 a v roku 2018 19,1; čo poukazuje na podváhu. Úbytok hmotnosti je jedným z klinických príznakov UC (Gabalec, 2009).

Keďže pacientka nedopovedala na konvenčnú liečbu a zároveň patrí medzi kortikodependentných pacientov, v roku 2010 jej bola indikovaná biologická liečba IFX. Za kortikodependentných pacientov sa považujú pacienti s UC podstupujúci terapiu systémovými glukokortikoidmi dlhšie ako 16 týždňov, a u ktorých sa nepodarilo pre trvalé známky zápalu terapiu ukončiť, alebo u nich po ukončení terapie dochádza v ďalších 12 týždňoch k opakovaným klinickým prejavom aktivity ochorenia (Kohout, 2011). Dôvody kortikodependencie sledovanej ženy zdravotná dokumentácia neuvádza. U týchto osôb sa terapia zahajuje imunosupresívami a v prípade, že liečba nemá účinok, alebo sa vyskytnú prejavy

neznášanlivosti alebo vedľajšie účinky, je indikovaná terapia IFX (Kohout, 2011). Biologická liečba a predovšetkým anti-TNF protilátky sú účinné aj v liečbe niektorých extraintestinálnych komplikácií u pacientov s UC (Bortlík a kol., 2016). To bol ďalší dôvod indikácie biologickej liečby IFX u pacientky, ktorá trpí aj extraintestinálnou manifestáciou UC v podobe enteropatickej artropatie.

Pred zahájením biologickej liečby ako aj pri zmene účinnej látky podstúpila pacientka screeningové vyšetrenie pľúc. Pred začatím terapie je nutné vykonať screening latentnej TBC, zahŕňajúci röntgen pľúc v dvoch projekciách, Quantiferon test a/alebo TBSpot test a/alebo kožný test Mantoux II (Bortlík a kol., 2016). Pacientka bola po vyšetrení pneumológom zhodnotená ako pacient vhodný na zahájenie biologickej liečby s odporúčaním na kontrolné vyšetrenia 1 x ročne.

Biologická liečba IFX bola u pacientky nastavená na udržiavaciu dávku 400 mg v 7 – 8 týždňových intervaloch. Liečebná schéma u pacientov so zápalovým ochorením čreva v indukčnej fáze začína intravenóznym podaním IFX v dávke 5 mg/kg v 0., 2. a

6. týždni a udržiavacia dávka spočíva v intravenóznom podaní 5 – 10 mg/kg každých 4 – 8 týždňov (Schenkova a Hlavatý, 2016). Indukčná terapia má za cieľ čo najrýchlejšie znížiť zápalovú aktivitu a zaistiť ústup klinických, laboratórných a endoskopických známk ochorenia. Dlhodobá udržiavacia terapia sa zameriava na zabránenie návratnosti subjektívnych a objektívnych ťažkostí (Lukáš, 2009). Pred každým podaním IFX je pacientom intravenózne aplikovaný hydrokortizón, ktorý bol v prípade pacientky podaný v dávke 200 mg. Pacientka po aplikácii IFX infúzie popisuje vždy obdobie bez artralgií. V roku 2013 gastroenterológ doplnil medikáciu IFX perorálnym mesalazínom v dávke 2 x 2 g denne. Efekt liečby závisí od celkovej dennej dávky, pričom najlepšie výsledky sa pozorovali v štúdiách s udržiavacou dennou dávkou nad 2 g (Hlavatý a kol., 2017).

Extraintestinálnou manifestáciou prejavujúcou sa u sledovanej ženy sú ťažko zvládnuteľné muskuloskeletárne príznaky vo forme enteropatickej artropatie s ťažkými artralgiami, ktoré znižujú kvalitu života pacientky o viac ako 75 %. V roku 2011 bola pacientka hospitalizovaná v nemocničnom zariadení na viac ako 11 dní pre bolesti kĺbov a kostí. Muskuloskeletárne komplikácie sú najčastejšou extraintestinálnou komplikáciou UC s popisovanou frekvenciou 23 % (Bourikas a Papadakis, 2009). Periférna artropatia je rozdelená na typ I a II, pričom len typ I závisí od aktivity idiopatických črevných zápalových ochorení (Caprilli a kol., 2006). Enteropatická artritída I. typu sa prejavuje ako migrujúca artritída kolien, bedrových kĺbov, zápästí, členkov a lakt'ov, obvykle trvajúca niekoľko týždňov a vzácne tvoriaca kĺbne deformity (Zádorová, 2012). V priemere u 50 % pacientov trvá vzplanutie menej ako 1 mesiac a menej ako 5 % chorých má chronické príznaky. Úspešná liečba UC často vedie k zlepšeniu periférnej artropatie. Liečebná stratégia zahŕňa lokálne injekčne aplikované kortikoidy, nesteroidné antiflogistiká (NSA) a fyzioterapiu s pohybovým režimom, prípadne imunosupresíva a biologickú terapiu (Forcione a Frieman, 2003). Preto okrem vyššie uvedenej liečby bol v roku 2013

pacientke indikovaný metylprednizolón v dávke 6 mg denne na dlhodobé užívanie. V tom istom roku pacientka prekonala aj extraintestinálnu manifestáciu závislú od aktivity ochorenia *erythema nodosum*, čo je nešpecifická kožná reakcia prejavujúca sa náhlou tvorbou erytematóznych bolestivých uzlov v podkoží so symetrickou distribúciou, najčastejšie lokalizovanou na extenzorových stranách predkolení a v oblasti kolien. EN sa môže vyskytovať izolovane alebo môže byť súčasťou širokej škály ochorení, medzi ktoré patria okrem iného aj idiopatické zápaly čreva (Hradiská, 2009). Prejavuje sa asi u 15 – 40 % pacientov, častejšie u žien. EN veľmi dobre reaguje na kortikoidnú a biologickú liečbu. Po preliečení môžu na koži ostať hyperpigmentové zmeny (Harbord a kol., 2016). Na neustále prebiehajúci zápalový proces v tele pacientky poukazujú aj zvýšené hodnoty nešpecifického zápalového markera CRP, ktoré v roku 2013 mali hodnotu 16 mg.l⁻¹ a 25,77 mg.l⁻¹.

Po akútnej kontrole v roku 2014 pacientka popisuje neustále bolesti kĺbov. V tomto roku boli hodnoty CRP pri súčasnej liečbe IFX stále mierne zvýšené (13,78 mg.l⁻¹; 16,99 mg.l⁻¹). Reumatológ pridal do medikácie pacientky MTX na perorálne užívanie a NSA nimesulid na tlmenie bolesti podľa potreby. Gastroenterológ popisuje známky proktitídy a aj z dôvodu stále pretrvávajúcich bolestí mení medikáciu systémovým mesalazínom na sulfasalazín s pridaním topického mesalazínu vo forme čípkov. V terapii ľavostrannej kolitídy, ktorou trpí pacientka, je kombinovaná liečba perorálnym mesalazínom v dávke najmenej 2 g denne s lokálnym mesalazínom pri dávke 1 g denne účinnejšia ako monoterapia. Topický mesalazín je prvolíniovou liečbou pri proktitíde. Dosahuje vyššiu koncentráciu účinnej látky na sliznici rekta ako perorálne podávaný mesalazín (Hlavatý a kol., 2017; Dujsíková, 2018). V prípade pacientky, ktorá trpí aj extraintestinálnymi manifestáciami, teda artralgiou, je doporučená indikácia sulfasalazínu namiesto mesalazínu, ktorý sa v hrubom čreve účinkom baktérií štiepi na mesalazín a sulfapyridín, ktorý sa vstrebáva a má antireumatický účinok (Macejová a Rybár, 2010; Doda, 2017).

Približne po štyroch rokoch liečby IFX sa u pacientky počas podávania infúzie vyskytla alergická reakcia, ktorá sa prejavila ako náhly nával tepla a červene po celom tele a sťažené dýchanie. Po podaní 100 mg hydrokortizónu nastalo zlepšenie. V prípade náhle vzniknutej alergickej reakcie sa postupuje okamžitým prerušením infúzie, intravenóznym podaním hydrokortizónu, prípadne antihistaminika alebo sa aplikuje kalcium. Nutné je zaistiť oxygenoterapiu a monitorovať vitálne funkcie (Vlček a kol., 2014). Najčastejším NÚ liečby IFX sú práve alergické reakcie spojené s podaním infúzie, ktoré sa vyskytli v klinických štúdiách v rôznej intenzite až u 20 % pacientov. Väčšinou ide o menej závažné reakcie, spontánne odoznievajúce po prerušení infúzie alebo po liečbe antihistaminikami (Fusek a kol., 2012). Avšak vznik alergie alebo anafylaktického šoku sa považuje za indikáciu na ukončenie terapie daným biologickým preparátom. V takom prípade sa u pacienta indikuje iný anti-TNF preparát, napr. ADA (Bortlík a kol., 2016; Vlček a kol., 2014). To sa uskutočnilo aj v prípade pacientky, keď gastroenterológ zmenil terapiu IFX za ADA, ktorý sa v indukčnom režime podáva v dávke 160 mg subkutánne v 0. týždni, s následným podaním 80 mg v 2. týždni. V prípade pozitívnej odpovede sa udržiavacia terapia indikuje v dávke 40 mg subkutánne v 2 týždňovom intervale (Lukáš, 2013). V prípade pacientky bola iniciálna dávka ADA 80 mg subkutánne. Neskôr pacientka užívala 40 mg subkutánne každých 14 dní dlhodobo. Dávkovanie ostatných liečiv bolo nezmenené. Hodnoty CRP pri súčasnej liečbe ADA boli znížené (6,05 mg.l⁻¹; 3,98 mg.l⁻¹).

V roku 2015 pre neustále pretrvávajúci zápal, bolesti kĺbov a opäť mierne zvýšené CRP hodnoty (11,04; 6,97; 7,85 mg.l⁻¹), lekár skrátil 14 dňový interval aplikácie ADA na 7 dňový. Podanie ADA v tzv. intenzifikovanom režime významne zvyšuje účinnosť terapie (Bortlík a kol., 2016). V danom prípade skrátenie intervalu na približne 7 mesiacov neprinieslo žiaden terapeutický efekt.

V roku 2016 bol lekárom interval podania

ADA opäť predĺžený na 14 dňový, zároveň bol zaznamenaný aj pokles CRP hodnôt zo 14,16 mg.l⁻¹ na 2,24 mg.l⁻¹. Priložená správa z reumatologickej kontroly z augusta 2016 popisuje zhoršenie bolesti kĺbov, konkrétne na ramene a lakti pravej hornej končatiny a kolene a členku ľavej dolnej končatiny. Na odporúčanie reumatológa bola tabletová forma MTX pozmenená na injekčnú formu, a to v dávke 15 mg 1 x týždenne. MTX je antagonist kyseliny listovej, inhibuje enzým dihydrofolátreduktázu a v konečnom dôsledku inhibuje syntézu DNA a následnú proliferáciu buniek. Zároveň znižuje syntézu reumatoidných faktorov, ovplyvňuje chemotaxiu polymorfonukleárných buniek, znižuje sekréciu prozápalových cytokínov (interleukíny IL-1, IL-2, IL-6) (Macejová a Rybár, 2010; Marek a kol., 2010). MTX sa podáva v dávkach 7,5 mg až 25 mg 1x týždenne. Súčasne sa podáva kyselina listová v dávke 10 – 30 mg týždenne, ale v iný deň ako MTX (Rovenský a kol., 2005). Pacientke bola indikovaná kyselina listová v dávke 2 x 10 mg týždenne. Zároveň súčasná aplikácia MTX a IFX znižuje imunogenicitu a zvyšuje hladiny IFX v sére. Avšak účinnosť MTX v indukčnej či udržiavacej liečbe UC nebola preukázaná (Feagan a kol., 2014).

V roku 2017 pacientka podstúpila gastroenterologickú kontrolu 2 x, a to v marci a decembri. Parametre zápalu klesli, avšak bolesti kĺbov ostávajú v popredí klinického obrazu sledovanej ženy. Pri poslednej kontrole v máji 2018 bol stav pacientky stabilizovaný, stolica je pravidelná 1 – 2 x denne bez prímеси krvi, avšak bolesti kĺbov pretrvávajú a cíti sa unavená, o čom svedčia aj zvýšené hodnoty CRP (10,03 mg.l⁻¹). Napriek tomu medikácia ostáva nezmenená a pacientke je odporúčané fyzické šetrenie a pravidelné kontroly u reumatológa.

Z celkového pohľadu bola klinická odpoveď u pacientky v terapii UC, ale aj enteropatickej artropatie na liečbu IFX, lepšia. Pacientka sa cítila dobre a popisovala aj obdobie niekoľkých týždňov bez bolesti po aplikácii IFX. Sledované hodnoty CRP pri liečbe IFX však boli vyššie v porovnaní s liečbou

ADA. Ten však nepriniesol až také dobré subjektívne zlepšenie stavu pacientky, hlavne z hľadiska RA, čo ale môže súvisieť aj s celkovou progresiou ochorenia. Monitorovanie CRP sa používa na hodnotenie liečby, aj keď hodnota vždy nekoreluje s klinickým stavom. V týchto prípadoch je klinický stav pacienta lepším ukazovateľom zápalovej aktivity ako nešpecifické biochemické markery, medzi ktoré patrí aj CRP (Šteňová, 2012).

ZÁVER

Z výsledkov predkladanej štúdie vyplýva, že po neúspechu konvenčnej terapie bola pacientke indikovaná biologická liečba. Užívanie IFX prinieslo pacientke zlepšenie kvality života, a to udržaním ochorenia v remisii a ústupom bolestí kĺbov, ktorými trpela. Po neskoršej alergickej reakcii na IFX bola pacientka nastavená na užívanie ADA, ktorý bol v rámci kombinovanej terapie naďalej účinný v terapii UC, ale dostatočná terapeutická odpoveď nebola zaznamenaná v terapii enteropatickej artropatie, čo však môže súvisieť aj s progresiou ochorenia.

ZOZNAM LITERATÚRY

Bortlík, M., Ďuričová, D., Kohout, P., Konečný, M., Koželuhová, J., Novotný, A., Zbořil, V., Prokopová, L., Douda, T., Stehlík, J., Shonová, O., Mareš, K., Hrdlička, L., Matějková, P., Šerclová, Z., Nedbalová, L., Tomanová, M., Liberda, M., Bronský, J., Mitrová, K., Drastich, P., Ryska, O., Falt, P., Březina, J., Vaňásek, T., Kalvach, J., Kolář, M., Lukáš, M.: Doporučení pro podávání biologické terapie u idiopatických střevních zánětů: třetí, aktualizované vydání. *Gastroenterologie a hepatologie*, 2016, 70, 1, 11 – 27.

Bourikas, L. A. a Papadakis, K. A.: Musculoskeletal manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2009, 15, 12, 1915 – 1924.

Caprilli, R., Gassull, M. A., Escher, J. C., Moser, G., Munkholm, P., Forbes, A., Hommes, D.

W., Lochs, H., Angelucci, E., Cocco, A., Vucelic, B., Hildebrand, H., Kolacek, S., Riis, L., Lukas, M., de Franchis, R., Hamilton, M., Jantschek, G., Michetti, P., O'Morain, C., Anwar, M. M., Freitas, J. L., Mouzas, I. A., Baert, F., Mitchell, R., Hawkey, C. J.: European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations. *Gut*, 2006, 55, 1, 36 – 58.

Douda, T.: Pokroky v terapii idiopatických střevních zánětů. *Interní medicína pro praxi*, 2017, 19, 3, 110 – 115.

Dujsíková, H.: Farmakoterapie idiopatických střevních zánětů. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2018, 32, 3, 7 – 10.

Forcione, D. G. a Frieman, L. S.: Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. In: Lichtenstein G. R.: The clinician's guide to inflammatory bowel disease. *Slak Thorofare*, 2003, 76 – 112.

Fusek, M., Vítek, L., Blahoš, J., Hajdúch, M.: *Biologická léčiva: Teoretické základy a klinická praxe*. Praha: Grada Publishing a.s., 2012, 228 s.

Feagan, B. G., McDonald, J. W. D., Panaccione, R., Enns, R. A., Bernstein, C. N., Ponich, T. P., Bourdages, R., Macintosh, D. G., Dallaire, C., Cohen, A., Fedorak, R. N., Paré, P., Bitton, A., Saibil, F., Anderson, F., Donner, A., Wong, C. J., Zou, G., Vandervoort, M. K., Hopkins, M., Greenberg, G. R.: Methotrexate in combination with infliximab is no more effective than infliximab alone in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2014, 146, 3, 681 – 688.

Gabalec, L.: Ulcerózní kolitida – klasifikace, diagnostika, léčba a kvalita života. *Interní medicína pro praxi*, 2009, 11, 6, 276 – 281.

Greguš, M., Huorka, M., Lukáč, Ľ.: Metodický list racionálnej farmakoterapie 43. *Racionálna liečba chronických nešpecifických zápalov čreva*. 2007, 11.

Harbord, M., Annesse, V., Vavricka, S. R., Allez, M., Acosta, M. B., Boberg, K. M., Burisch, J., De Vos, M., De Vries, A., Dick, A. D., Juillerat, P., Karlsen, T. H., Koutrobakis, I., Lakatos, P. L., Orchard,

T., Papay, P., Raine, T., Reinshagen, M., Thaci, D., Tilg, H., Carbonnel, F.: The first European evidence-based consensus on extra-intestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis*, 2016, 10, 239 – 254.

Hlavatý, T., Krajčovičová, A., Zakuciová, M., Greguš, M., Šturdík, I., Koller, T., Baláž, J., Huorka, M.: Odporúčania pracovnej skupiny pre IBD Slovenskej gastroenterologickej spoločnosti pre liečbu ulceróznej kolitídy. *Gastroenterologie a hepatologie*, 2017, 71, 3, 229 – 240.

Hradiská, A. Erythema nodosum. *Medicina pro praxi*, 2009, 6, 2, 85 – 89.

Kohout, P.: Výživa u pacientů s idiopatickými střevními záněty. *Postgraduální medicína*, 2011. <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/vyziva-u-pacientu-s-idiopatickymi-strevnimi-zanety-457915>. [cit. 2018-11-18].

Kužela, L. a Zakuciová, M.: Štandardný diagnostický a terapeutický postup. 53. metodický list racionálnej farmakoterapie. Racionálna liečba chronických nešpecifických zápalov čreva. *Metodický list racionálnej farmakoterapie a liekovej politiky MZ SR Edícia: Odborné odporúčania pre klinickú prax*, 2012, 15, 1 – 12.

Lukáš, M.: Doporučení pro podávání biologické léčby u idiopatických střevních zánětů-dodatek ke druhému vydání. *Gastroenterologie a hepatologie*, 2013, 67, 4, 303 – 305.

Lukáš, M.: Možnosti medikamentózne liečby u Crohnovy nemoci a ulcerózní kolitídy. *Medicina pro praxi*, 2011, 8, 9, 360 – 363.

Lukáš, M.: Idiopatické střevní záněty a biologická léčba. *Postgraduální medicína*, 2009. <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/idiopaticke-strevni-zanety-447153>. [cit. 2018-11-18].

Novák, V.: Biologická léčba u nemocných s ulcerózní kolitidou. *Postgraduální medicína*, 2011. <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/biologicka-lecba-u-nemocnych-s-ulcerozni-kolitidou-462095>. [cit. 2018-11-16].

Macejová, Ž. a Rybár, I.: Farmakoterapia reumatoidnej artritídy I. – nesteroidové antireumatiká, DMARDs. *Via practica*, 2010, 7, 1, 30 – 33.

Meisnerová, E.: Nutriční podpora střevních zánětů. *Interní medicína*, 2011, 13, 1, 35 – 37.

Marek, J., Bartůnková, J., Broulík, P., Česka, R., Dítě, P., Dostál, C., Hradec, J., Holmerová, I., Husa, P., Jindrák, V., Kalvach, P., Kalvach, Z., Kašák, V., Kvasnička, J., Marešová, V., Marková, M., Nyč, O., Pavelka, K., Pelclová, D., Petruželka, L., Spáčil, J., Skříčková, J., Svačina, Š., Škrha, J., Urbášková, P., Tesař, V., Vinař, O., Widimský, J., Zadák, Z.: *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. Praha: Grada Publishing a.s., 2010, 317 – 318.

Schenková, K. a Hlavatý, T.: Monitorovanie biologickej liečby u pacientov s chronickými zápalovými ochoreniami. *Metodický list*, 2016, 1 – 3.

Šteňová, E.: *Základy vyšetřování v reumatologii*. Univerzita Komenského v Bratislave, 2012, 70 s.

Rothfuss, K. S., Stange, E. F., Herrlinger, K. R.: Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *J. Gastroenterol.*, 2006, 12, 30, 4819 – 4831.

Rovenský, J., Rybár, I., Mičková, D., Žlnay, D., Lukáč, J., Poprac, P.: Farmakoterapeutické postupy pri reumatoidnej artritíde. *Via practica*, 2005, 2, 2, 66 – 74.

Stange, E. F., Travis, S. P., Vermeire, S., Beglinger, C., Kupcinkas, L., Geboes, K., Barakauskiene, A., Villanacci, V., Von Herbay, A., Warren, B. F., Gasche, C., Tilg, H., Schreiber, S. W., Schölmerich, J., Reinisch, W.: European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut*, 2006, 55 Suppl 1, 1 – 15.

Vlček, J.: *Klinická farmacie II*. Praha: Grada Publishing a.s., 2014, 256 s.

Zádorová, Z.: Léčba extraintestinálních manifestací idiopatických střevních zánětů. *Interní medicína pro praxi*, 2012, 14, 1, 8 – 11.



BIOLOGICKÁ LIEČBA REUMATOIDNEJ ARTRITÍDY V KLINICKEJ PRAXI

BIOLOGIC THERAPY OF RHEUMATOID ARTHRITIS IN CLINICAL PRACTICE

Benkeová, K., Fedorová, M.¹, Macejová, Ž.², Jochmanová, I.²

¹Katedra lekárenstva a sociálnej farmácie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

²I. Interná klinika UNLP a LF UPJŠ, Trieda SNP 1, Košice
Slovenská republika

monika.fedorova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Najčastejším zápalovým reumatickým ochorením je reumatoidná artritída. Je to chronické zápalové ochorenie, ktoré vedie k rozvoju kĺbových deštrukcií a deformít. Poškodené sú predovšetkým drobné synoviálne kĺby rúk, zápästí, chodidiel a členkov. Postihnutie kĺbov spôsobuje obmedzenie pohyblivosti a poruchy funkcie pohybového systému. Dominantné býva postihnutie kĺbov, avšak často bývajú postihnuté aj vitálne dôležité orgány. Na vzniku ochorenia sa podieľajú autoimunitné mechanizmy, dôležitú úlohu zohráva aj genetická predispozícia. Včasná diagnostika a správna liečba sú veľmi dôležité, pretože môžu zastaviť zápalový proces, zabrániť trvalým poškodeniam a zlepšiť kvalitu života pacientov. Vývoj biologických preparátov predstavuje významný pokrok v terapii autoimunitných ochorení. Cieľom štúdie

bolo sledovanie aktivity ochorenia a kvality života u pacientov s reumatoidnou artritídou liečených biologikami a analýza odborných informácií o biologickej liečbe a reumatických autoimunitných zápalových ochoreniach. Práca retrospektívne analyzuje subjektívne a objektívne ukazovatele kvality života v skupine 100 pacientov s reumatoidnou artritídou liečených biologickými liekmi. Výsledky ukazujú štatisticky významné zlepšenie kvality života pacientov s reumatoidnou artritídou po nasadení biologickej liečby.

Kľúčové slová: biologická liečba; biologické liečivá; kvalita života; reumatoidná artritída; reumatológia; terapia

ABSTRACT

The most frequent inflammatory rheumatic disease is a rheumatoid arthritis. It is a chronic

inflammatory disease that leads to the development of joint destruction and deformities. Especially minor synovial joints of hands, wrists, feet and ankles are damaged. Affection of joints causes a reduction in mobility and impaired musculoskeletal function. Besides joints these diseases can affect other, even vital organs. Its development is mediated by various autoimmune mechanisms. Genetic predisposition plays also an important role in the pathogenesis of autoimmune diseases. Early diagnosis and proper treatment are, thus, very important – they can stop inflammation, prevent permanent damage, and improve quality of life of the patients. Development of biologic compounds poses a significant progress in the therapy of autoimmune diseases. The present aims of the study were to observe and analyze activity of the disease and quality of life in rheumatoid arthritis patients treated with biologics. Moreover, it analyzes information about biological therapy and other rheumatic autoimmune inflammatory diseases. The study retrospectively analyzes both subjective and objective markers of quality of life in the cohort of 100 rheumatoid arthritis patients treated with biological remedies. The results showed statistically significant improvement of quality of life in patients with rheumatoid arthritis after initiation of the biological treatment.

Key words: biological drugs; biological therapy; rheumatoid arthritis; rheumatology; therapy; quality of life

ÚVOD

Biologická liečba (BL) je cielená liečba proti zápalovým procesom a predstavuje významný pokrok v liečbe zápalových autoimunitných reumatických ochorení. Má aj svoje riziká a preto je dôležité zvážiť pomer rizika a prospechu u každého pacienta. Spoločným znakom týchto ochorení je bolesť pohybového aparátu a zníženie funkčnej schopnosti. Niektoré druhy ochorení postihujú aj

vnútorné orgány, ako sú srdce, pľúca, obličky, často sú postihnuté aj oči a koža. Zápalové reumatické ochorenia sú častou príčinou práceneschopnosti a invalidity a vďaka BL sa v poslednej dobe zlepšila kvalita života reumatického pacienta, ktorý sa mohol opäť vrátiť k plnohodnotnému pracovnému životu.

Hlavným cieľom našej štúdie bolo sledovanie zlepšovania kvality života pacientov trpiacich reumatoidnou artritídou (RA) liečených biologickými liekmi.

MATERIÁL A METÓDY

Výskumný súbor tvorili pacienti s diagnostikovanou RA liečení biologickými liekmi v Centre pre BL I. Internej kliniky UNLP a LF UPJŠ v Košiciach. Demografické údaje (vek, pohlavie) a údaje týkajúce sa kvality života (dotazníky, dĺžka trvania liečby) sme zisťovali retrospektívne zo zdravotných záznamov pacientov a v čase realizácie nášho prieskumu sme pacientom dali vyplniť ďalší, aktuálny dotazník.

Hodnotenie kvality života pacientov s RA užívajúcich biologické lieky zahŕňalo výsledok dotazníka HAQ (Health Assessment Questionnaire) a indexu DAS28 (Disease activity score). Okrem toho sme na základe údajov dostupných na webovej stránke MZ SR (Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky) vypracovali prehľad na Slovensku kategorizovaných biologických liečiv používaných na liečbu reumatoidnej artritídy. Údaje o kategorizácii liekov boli spracované k dátumu 1. 3. 2019.

Dotazník HAQ

Na získanie informácií o kvalite života pacientov s RA užívajúcich niektorý z biologických liekov sme použili dotazníkový prieskum pomocou Standfordského dotazníka na hodnotenie zdravia HAQ, ktorý pozostáva z ôsmich hlavných kategórií. Jednotlivé kategórie spolu obsahovali 20 otázok na zistenie úrovne schopnosti pacienta vykonávať denné aktivity bežného života (chôdza, dosahovanie vecí...).

Tab. 1: Charakteristika skúmaného súboru

	Spolu	M	Ž	p (M vs. Ž)
n	100	21	79	< 0,05
Vek*	58 (59; 36 – 84)	58 (59; 45 – 72)	58 (58; 36 – 84)	0,95
Vek pri začiatku BL*	52 (51; 31 – 75)	52 (52; 39 – 67)	52 (51; 31 – 75)	0,44
Dĺžka BL*	6,59 (7; 2 – 11)	6,19 (7; 2 – 11)	6,7 (7; 2 – 11)	0,44
HAQ skóre*	1,35 (1,37; 0 – 3)	1,18 (1,13; 0 – 2,5)	1,4 (1,38; 0 – 3)	–
DAS28 skóre*	2,88 (2,80; 0,7 – 5,2)	2,37 (2; 0,7 – 5,2)	3,02 (3; 0,9 – 5,2)	–

*priemer (medián, rozpätie), BL – biologická liečba, n – počet, M – muži, Ž – ženy

Odpovede na otázky vyjadrili pacienti na škále od 0 do 3 (0 – bez problémov, 1 – s malými ťažkosťami, 2 – s väčšími ťažkosťami, 3 – úplná neschopnosť vykonať činnosť). Ďalšia časť dotazníka obsahovala otázky zamerané na zistenie potreby pacienta využívať rozličné pomôcky (napr. vychádzková palička, držadlo vo vani a pod.) a pomoc druhej osoby. Celkové dotazníkové skóre sme vypočítali ako podiel súčtu všetkých hodnôt uvedených pacientmi pri jednotlivých otázkach a počtu kategórií. Dotazník vyplňali pacienti samostatne v Reumatologickej ambulancii I. Internej kliniky Univerzitnej nemocnice Louisa Pasteura v Košiciach.

Index DAS28

Skóre DAS28 bolo vypočítané reumatológom na základe laboratórnych a klinických ukazovateľov aktivity ochorenia (CRP, sedimentácia erytrocytov, počet opuchnutých a bolestivých kĺbov, hodnotenie bolesti pacientom na vizuálnej analógovej škále).

Štatistická analýza

Pri štatistickom spracovaní výsledkov sme použili podľa vhodnosti párový t-test, Wilcoxonov párový test, jednovýchodnú a dvojevýchodnú ANOVA (Analýza rozptylu – Analysis of Variance), korelačnú analýzu a chí kvadrátový test. Štatistická významnosť bola definovaná ako $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

Charakteristika skúmaného súboru

Skúmaný súbor tvorilo 100 pacientov (21 mužov a 79 žien) s RA liečených biologickými liekmi v Centre pre BL I. Internej kliniky UNLP a LF UPJŠ v Košiciach. Priemerný vek pacientov bol 58 rokov (medián 59, vekové rozpätie 36 – 84 rokov). Priemerný vek v čase, keď začali užívať BL bol 52 rokov (medián 51, rozpätie 31 – 75 rokov) a priemerná dĺžka užívania BL v čase ukončenia výskumu bola 6,59 rokov (medián 7, rozpätie 2 – 11 rokov; vid' tab. 1).

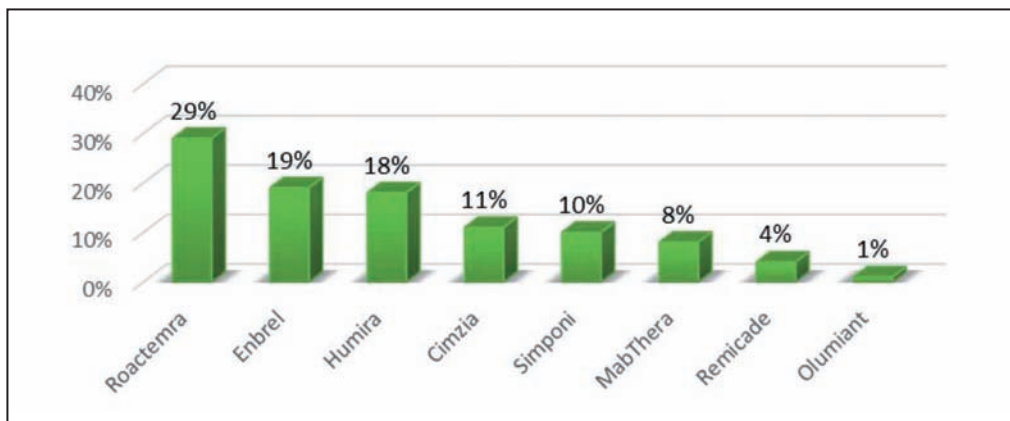
Prehľad biologických liečiv kategorizovaných liekov používaných v reumatológii

Uvedený prehľad biologík používaných v liečbe reumatoidnej artritídy pozostáva z informácií o ich indikáciách, preskripčnom obmedzení a obmedzení úhrady zdravotnej poisťovne (vid' tab. 2).

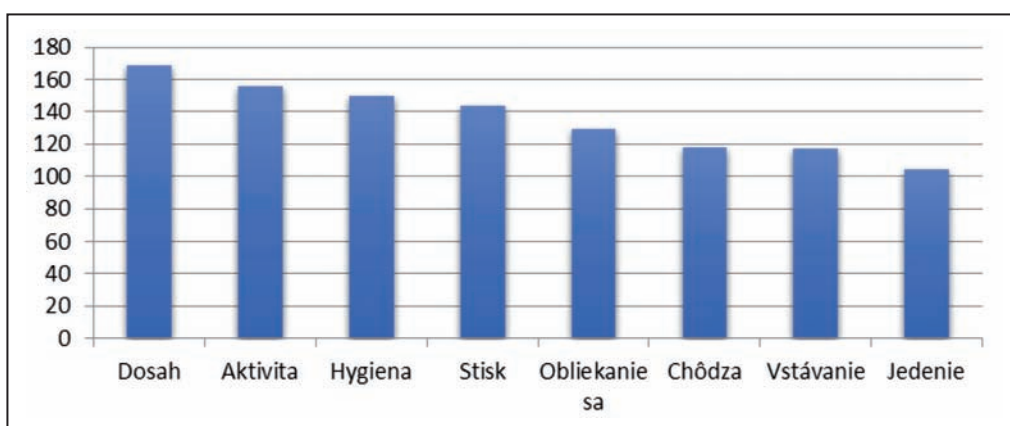
Najčastejšie používané biologické lieky na liečbu RA

V liečbe pacientov s RA zaradených do nášho výskumu bolo použitých osem rôznych biologických liekov. 29 (29 %) pacientov bolo liečených liekom Roactemra (tocilizumab), 19 pacientov (19 %) užívalo Enbrel (etanercept), 18 pacientov (18 %) sa liečilo

Graf č. 1: Užívanie jednotlivých liekov u všetkých pacientov



Graf 2: Hodnotenie funkčnej schopnosti pacientov



Humirou (adalimumab), 11 pacientov (11 %) užívalo Cimziu (certolizumab), desať pacientov (10 %) malo v liečbe Simponi (golimumab), osem pacientov (8 %) sa liečilo MabTherou (rituximab), štyria pacienti (4 %) užívali Remicade (infliximab) a jeden pacient (1 %) bol liečený biologickým liekom Olumiant (baricitinib). Zastúpenie jednotlivých biologických liekov u našich pacientov je graficky znázornené v grafe 1.

Kvalita života pacientov s RA liečených biologickými liekmi

Z odpovedí na otázky zamerané na zhodnotenie funkčnej schopnosti pacientov, ktoré boli rozdelené do ôsmich kategórií podľa charakteru činnosti vyplýva, že najväčšie problémy pacientom spôsobuje

vykonávanie činností súvisiacich s dosahovaním predmetov. Najmenej problémovou oblasťou sú činnosti, ktoré súvisia s jedným (viď graf 2).

Zaznamenali sme a graficky znázornili výsledky z dotazníkového prieskumu HAQ vykonaného pred užívaním BL, po troch mesiacoch liečby a v súčasnosti (viď graf 3 a tab. 3). Skóre kompozitného indexu DAS28, ktorý sme sledovali súčasne s výsledkami dotazníka HAQ, sme zaznamenali v rovnakých časových intervaloch (viď graf 4 a tab. 3).

Priemerná hodnota HAQ v období úvodného začatia BL bola 1,65; pričom hodnota HAQ > 1,5 je interpretovaná ako ťažké postihnutie funkcie. Už po troch mesiacoch liečby došlo k signifikantnému poklesu priemernej hodnoty HAQ na 1,47 ($p < 0,05$), čo predstavuje stredne ťažké postihnutie funkcie

Tab. 2: Zoznam kategorizovaných biologických liečiv

Zoznam kategorizovaných biologických liečiv (k 1.3.2019)				
Liečivo	Indikácia	PO	IO	ZP
infiximab	reumatoidná artritída, ankylozujúca spondylitída, psoriatická artritída, psoriáza, crohnova choroba, ulcerózna kolitída	DER, GIT, REU	áno	áno
adalimumab	reumatoidná artritída, ankylozujúca spondylitída, psoriatická artritída, spondylartritída, juvenilná idiopatická artritída, psoriáza, crohnova choroba, ulcerózna kolitída	DER, GIT, REU	áno	áno
etanercept	reumatoidná artritída, ankylozujúca spondylitída, psoriatická artritída, juvenilná idiopatická artritída, psoriáza, pediatická psoriáza	REU, DER	áno	áno
golimumab	reumatoidná artritída, ankylozujúca spondylitída, psoriatická artritída, ulcerózna kolitída	REU	áno	áno
certolizumab	reumatoidná artritída, ankylozujúca spondylitída, psoriatická artritída, spondylartritída	REU	áno	áno
tocilizumab	reumatoidná artritída, juvenilná idiopatická artritída	REU	áno	áno
rituximab	reumatoidná artritída, non-Hodgkinov lymfóm, chronická lymfocytová leukémia, granulomatóza s polyangiitídou	HEM, ONK, REU	áno	áno
abatacept	reumatoidná artritída, juvenilná idiopatická artritída	REU	áno	áno
tofacitinib	reumatoidná artritída	REU	áno	áno
baricitinib	reumatoidná artritída	REU	áno	áno

PO – preskripčné obmedzenie, IO – indikačné obmedzenie, ZP – hraená liečba podlieha predchádzajúcemu súhlasu zdravotnej poisťovne

Zdroj: Vlastná tabuľka (podľa MZ SR)

(hodnota HAQ 1,0 – 1,5). V čase realizácie nášho dotazníkového prieskumu bola priemerná hodnota HAQ 1,35 ($p < 0,05$) (viď tab. 3). V dotazníku HAQ udávalo na konci výskumu normálnu funkciu 10 (10 %; 7 žien, 3 muži) pacientov.

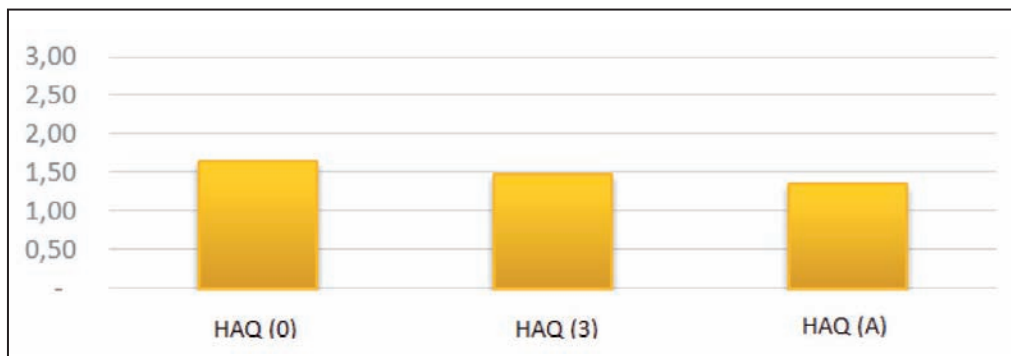
Priemerné skóre kompozitného indexu DAS28 v celom súbore pacientov pri začatí BL bolo 6,53 ($\text{DAS28} \geq 5,1$ predstavuje vysokú aktivitu RA). Po troch mesiacoch liečby došlo k signifikantnému poklesu skóre na hodnotu 4,25, pričom hodnota

Tab. 3: Rozdiely v hodnotách HAQ a DAS28 počas trvania liečby

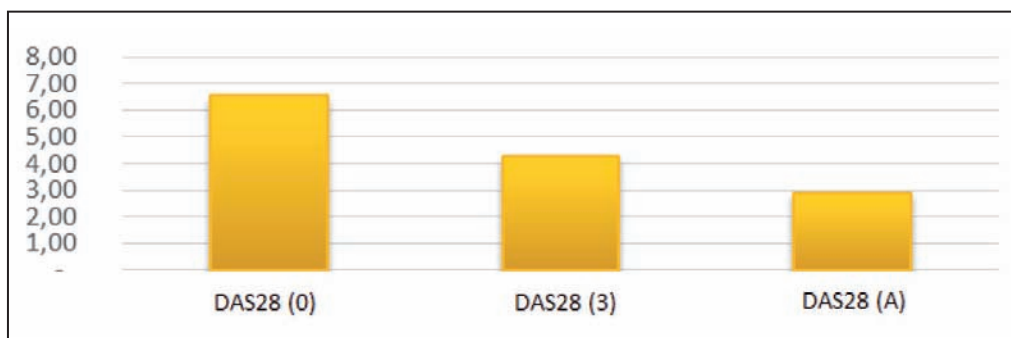
	HAQ (0)	HAQ (3)	HAQ (A)	p HAQ (0) vs. HAQ (A)
Spolu	1,65	1,47	1,35	< 0,05
M	1,49	1,31	1,18	< 0,05
Ž	1,69	1,51	1,40	< 0,05
	DAS28 (0)	DAS28 (3)	DAS28 (A)	p DAS28 (0) vs. DAS28 (A)
Spolu	6,53	4,25	2,88	< 0,05
M	6,28	3,72	2,37	< 0,05
Ž	7,80	4,30	2,50	< 0,05

HAQ (0), DAS28 (0) – pri začatí liečby, HAQ (3), DAS28 (3) – 3 mesiace liečby, HAQ (A), DAS28 (A) – v čase realizácie výskumu (≥ 6 mesiacov liečby), M – muži, Ž – ženy, NS – bez štatistickej významnosti, p – štatistická významnosť

Graf 3: Priemerný vývoj HAQ u všetkých pacientov



Graf 4: Priemerný vývoj DAS28 u všetkých pacientov



DAS28 v rozmedzí 3,2 – 5,1 sa interpretuje ako stredná aktivita RA. Hodnota skóre DAS28, ktorú sme zisťovali súbežne s dotazníkovým prieskumom HAQ, bola 2,88; čo je hodnotené ako nízka aktivita RA (DAS28 < 3,2) (viď tab. 3). Na základe vyhodnotenia skóre DAS28 bolo v čase ukončenia našej štúdie 39

(39 %; 13 mužov, 26 žien) pacientov v remisii, teda ich DAS28 skóre bolo < 2,6.

Kvalita života pacientov s RA v závislosti od jednotlivých biologických liekov

Pacienti s RA v našej výskumnej vzorke boli

Tab. 4: Hodnotenie HAQ a DAS28 asociované s liečbou jednotlivými biologickými liekmi

	n	HAQ (0)	HAQ (3)	HAQ (A)	DAS28 (0)	DAS28 (3)	DAS28 (A)	Remisia n (%)
Humira	18	1,51	1,29	1,18	6,36	4,24	3,02	7 (38,89)
RoActemra	29	1,67	1,51	1,36	6,40	4,28	2,35	16 (55,17)
Enbrel	19	1,62	1,51	1,49	6,74	4,17	3,12	4 (21,05)
MabThera	8	1,54	1,19	1,01	6,34	3,89	3,15	2 (25,00)
Cimzia	11	1,95	1,66	1,48	6,62	3,98	2,75	7 (63,64)
Simponi	10	1,46	1,34	1,29	6,35	4,78	3,34	1 (10,00)
Remicade	4	2,31	2,19	2,13	7,50	4,63	3,83	0
Olumiant	1	1,125	1,125	0,55	7,8	4,3	2,5	1 (100,00)
p		0,2	0,18	0,14	0,03	0,42	0,02	0,02

liečení ôsmimi rôznymi biologickými liekmi. Preto sme sa rozhodli porovnať rozdiely v kvalite života pacientov hodnotených pomocou dotazníka HAQ a skóre DAS28 v závislosti od lieku, ktorým boli pacienti liečení (viď tab. 4). V hodnotení aktivity ochorenia v dotazníku HAQ sme nezaznamenali štatisticky významné rozdiely u pacientov liečených rôznymi biologickými liekmi. Signifikantný rozdiel však bol v hodnotení aktivity pomocou kompozitného skóre DAS28 – tu sme však zaznamenali významný rozdiel v aktivite ochorenia už pred začiatkom liečby.

V čase ukončenia štúdie bolo v remisii 38 pacientov, z toho 7/11 (63,64 %) bolo liečených Cimziou (certolizumab) a 16/29 (55,17 %) RoActemrou (tocilizumab). Liečba adalimumabom (Humira) viedla k signifikantnému poklesu aktivity ochorenia hodnotenej pacientmi (HAQ: 1,51 vs. 1,18; $p < 0,05$) aj na základe vyhodnotenia kompozitného skóre DAS28 (6,36 vs. 3,02; $p < 0,05$) pri porovnaní aktivity na začiatku liečby a na konci nášho výskumu. Pri užívaní biologického lieku RoActemra (tocilizumab) bol taktiež zaznamenaný subjektívny aj objektívny pokles aktivity ochorenia (HAQ: 1,67 vs. 1,36; $p < 0,05$ a DAS28: 6,4 vs. 2,35; $p < 0,05$). Podľa hodnotenia pacientov v dotazníku HAQ neviedla liečba Enbrelom (etanercept) k signifikantnému zníženiu aktivity ochorenia (1,62 vs. 1,49; $p = 0,06$),

avšak vyhodnotenie skóre DAS28 ukázalo štatisticky významné zlepšenie (6,74 vs. 3,12; $p < 0,05$). V súbore pacientov užívajúcich liek MabThera (rituximab) bol pokles aktivity v HAQ z 1,54 na začiatku liečby na 1,01 ($p < 0,05$) a v hodnotení DAS28 zo 6,34 na 3,15 ($p < 0,05$) v čase ukončenia výskumu. U 11 pacientov liečených Cimziou (certolizumab) došlo k štatisticky významnému poklesu aktivity ochorenia v oboch hodnoteniach – HAQ (1,95 vs. 1,48; $p < 0,05$) aj DAS28 (6,62 vs. 2,75; $p < 0,05$). Analýza dotazníkov HAQ nepreukázala štatisticky významný rozdiel v aktivite ochorenia na začiatku liečby a počas jej trvania u pacientov liečených liekom Simponi (golimumab; 1,46 vs. 1,29, $p = 0,45$). Pri hodnotení skóre DAS28 však bol pokles aktivity ochorenia štatisticky signifikantný (6,35 vs. 3,34; $p < 0,05$). Liekmi Remicade (infiximab) a Olumiant (baricitinib) bolo v našej vzorke pacientov s RA liečených málo pacientov, ich počty (štyria a jeden) neboli dostačujúce pre štatistickú analýzu. Napriek tomu na hodnotení aktivity ochorenia pomocou dotazníka HAQ a kompozitného skóre DAS28 je vidieť tendenciu k poklesu aktivity v priebehu liečby.

Kvalita života pacientov s RA v závislosti od dĺžky trvania biologickej liečby

Na základe dĺžky trvania liečby sme pacientov rozdelili do štyroch skupín (0 – 3 r.; 4 – 6 r.; 7 – 9 r.

Tab. 5: Aktivita ochorenia a kvalita života podľa dĺžky trvania BL

Dĺžka liečby (roky)	n	HAQ (0)	HAQ (3)	HAQ (A)	DAS28 (0)	DAS28 (3)	DAS28 (A)
0 – 3	19	1,42	1,26	1,13	6,33	4,14	2,50
4 – 6	27	1,70	1,54	1,36	6,61	4,19	3,01
7 – 9	39	1,74	1,50	1,41	6,58	4,28	2,88
> 9	15	1,62	1,51	1,47	6,49	4,43	3,14
p		0,36	0,51	0,44	0,53	0,82	0,28

a viac ako 9 r.), u ktorých sme porovnávali aktivitu ochorenia na začiatku BL s aktuálnou aktivitou RA. Pacienti v čase, keď vyplňali aktuálne dotazníky HAQ a vyhodnocovalo sa aktuálne skóre DAS28, užívali biologickú liečbu 6 mesiacov až 11 rokov. Nezistili sme štatisticky významné rozdiely v aktivite ochorenia v závislosti od dĺžky liečby (viď tab. 5).

Vzťah medzi HAQ a Indexom DAS28 u pacientov s RA užívajúcich biologickú liečbu

Korelačný koeficient vyjadrujúci intenzitu vzťahu medzi subjektívnym hodnotením kvality života pomocou dotazníka HAQ a objektívnym hodnotením zlepšenia DAS28 je 0,4.

DISKUSIA

V predkladanej štúdii sme sa zaoberali kvalitou života pacientov s RA liečených biologickými liekmi. Zlepšenie kvality života pacientov s RA patrí medzi hlavné ciele liečby (Jorgensen a kol., 2017, Boyadzieva a kol., 2018). Retrospektívne sme vyhodnotili údaje 100 pacientov získané z dotazníkov HAQ, ktoré odrážajú subjektívne hodnotenie kvality života pacientov, a z kompozitného skóre DAS28 objektivizujúce zlepšenie kvality života pri použitej liečbe. V našom súbore bolo výrazne vyššie zastúpenie ženskej populácie (79 % vs. 21 %), čo v

podstate odráža vyššiu incidencia ochorenia u žien, ktoré bývajú postihnuté 2 – 4-krát častejšie ako muži (Rovenský, 2008). U všetkých pacientov bola indikovaná liečba biologickými liekmi po zlyhaní prvolíniovej liečby RA a priemerný vek začiatku BL bol 52 rokov u mužov (rozpätie 39 – 67 rokov) i žien (rozpätie 31 – 75 rokov). Nezaznamenali sme štatisticky signifikantný rozdiel v dĺžke užívania BL u mužov a žien ($p > 0,05$).

Na základe dostupných údajov sme pred samotným spracovaním dát získaných od pacientov vytvorili prehľad kategorizovaných biologických liečiv na Slovensku, ktoré sa využívajú pri liečbe reumatoidnej artritídy. Na liečbu RA je k dispozícii 10 liečiv, čo umožňuje výber vhodného lieku pre takmer každého pacienta. Navyše, pri zlyhaní jedného typu biologika je tu vďaka viacerým liečivám s rôznymi cieľovými molekulami možnosť prechodu na iný liek.

Pacienti zaradení do našej štúdie boli liečení ôsmimi rôznymi biologickými liekmi, pričom najčastejšie používanými boli tocilizumab (RoActemra, 29 %), etanercept (Enbrel, 19 %) a adalimumab (Humira, 18 %). Ďalšie použité liečivá zahŕňali certolizumab (Cimzia, 11 %), golimumab (Simponi, 10 %) a rituximab (MabThera, 8 %). Len jeden pacient bol liečený baricitinibom (Olmiant, 1 %) a infliximab (Remicade) užívali 4 % pacientov. Z biologických liečiv (resp. liekov) určených na

liečbu RA neboli u pacientov v našej vzorke použité abatacept (Orencia) ani tofacitinib (Xeljanz).

Pri hodnotení kvality života pacientov tri mesiace po začatí liečby biologickými liekmi sme zaznamenali priemernú hodnotu HAQ 1,47 (stredne ťažké postihnutie funkcie), čo bolo signifikantné zlepšenie ($p < 0,05$) v porovnaní s hodnotami HAQ pred začiatkom BL (1,65; ťažké postihnutie funkcie). Rovnako sme pokles aktivity zaznamenali aj pri porovnaní skóre DAS28, kde došlo po troch mesiacoch k poklesu skóre zo 6,53 (vysoká aktivita RA) na 4,25 (stredná aktivita RA), $p < 0,05$. V čase realizácie nášho výskumu boli pacienti v našej kohorte liečení biologikami v priemere sedem rokov (rozpätie 2 – 11 rokov) a vyhodnotenie dotazníkov HAQ a skóre DAS28 ukázalo znova štatisticky významné zlepšenie kvality života a pokles aktivity ochorenia v porovnaní s výsledkami pred začiatkom BL a s výsledkami po troch mesiacoch liečby ($p < 0,05$). Naše výsledky súhlasia so závermi predchádzajúcich štúdií, podľa ktorých dochádza k výraznému zlepšeniu kvality života pacientov s RA krátko po začatí BL a ku koncu prvého roka liečby sa toto zlepšovanie pomaly spomaľuje (Pollard a kol., 2005, Pickard a kol., 2007, Aaltonen a kol., 2012, Kim a kol., 2015, Boyadzieva a kol., 2018). Štatisticky významné zlepšenie kvality života sme zaznamenali aj pri rozdelení pacientov do podskupín podľa pohlavia. Celkové zlepšenie kvality života pacientov a zníženie aktivity ochorenia je po prechode na BL vo všeobecnosti vždy signifikantné (Boyadzieva a kol., 2018). V našej kohorte pacientov sme nezaznamenali významné rozdiely v kvalite života s predlžujúcim sa časom liečby, avšak najkratšia doba liečby tu bola dva roky. Ako už bolo spomenuté vyššie, najvýraznejšie zlepšenie kvality života pacientov s RA liečených biologickými liekmi býva počas prvého roka života, čo nakoniec potvrdzuje aj naša analýza dát zozbieraných tri mesiace po začiatku liečby. Zdá sa teda, že po prvom roku liečby dochádza ku stabilizácii aktivity ochorenia na istej úrovni bez ďalšieho výrazného zlepšovania.

Hodnotenie kvality života pacientov s RA

rozdelených do podskupín podľa typu biologického preparátu, ktorým sa liečia, vo všeobecnosti neukázalo štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými liekmi. Zaznamenali sme síce signifikantný rozdiel v hodnotení aktivity pomocou kompozitného skóre DAS28, avšak tu boli štatisticky významné rozdiely v aktivite ochorenia už pred začiatkom liečby, preto tento výsledok nemôžeme považovať za validný. Vhodné by bolo pozrieť sa na skóre DAS28 u pacientov, u ktorých bolo ochorenie pred začatím BL na rovnakom stupni aktivity. Pri ďalšej analýze výsledkov sa zdá, že niektoré biologiká by mohli byť v liečbe RA účinnejšie v porovnaní s ostatnými. Kompletná remisia ochorenia bola podľa DAS28 dosiahnutá u 63,64 % pacientov liečených certolizumabom a u 55,17 % pacientov liečených tocilizumabom. Nemôžeme jednoznačne tvrdiť, že sú tieto lieky lepšie, ide pravdepodobne len o skreslenie dané malou veľkosťou skúmaného súboru. Rozdiely medzi jednotlivými biologickými liekmi nepreukázala napr. ani meta-analýza, ktorú publikovali Malotki a kol. (2011). Na potvrdenie vyššej účinnosti niektorých biologík by bolo potrebné analyzovať veľké kohorty pacientov.

Pri skúmaní korelácie medzi subjektívnym hodnotením zlepšenia kvality života HAQ a objektívnym hodnotením zlepšenia DAS28 sme zistili, že medzi sledovanými veličinami existuje stredne silná korelácia (korelačný koeficient 0,4). Môžeme teda konštatovať, že krivky objektívneho aj subjektívneho hodnotenia sa vyvíjali rovnakým smerom, t. j. potvrdila sa stredne silná závislosť medzi hodnotením nezávislým od pocitov pacientov a tým, ktoré ich pocity popisuje.

Samozrejme, naša štúdia má svoje limitácie, ktorými sú je predovšetkým nízky počet pacientov, predovšetkým mužov, a malé počty pacientov v podskupinách pacientov liečených jednotlivými biologickými liekmi. Ďalším problémom je, že ide o pacientov len jedného Centra pre biologickú liečbu. Prínosom by bola analýza dát z viacerých centier na Slovensku.

ZÁVER

Cieľom našej štúdie bolo sledovanie a zhodnotenie kvality života pacientov s RA liečených biologickými liekmi a vytvorenie prehľadu biologických liečiv kategorizovaných liekov používaných v reumatológii na Slovensku.

Zápalové autoimunitné reumatické ochorenia, medzi ktoré patrí aj RA, sa vyznačujú postihnutím kĺbov, ale aj vnútorných orgánov, ktoré vedú k závažnej morbidite a mortalite. Tieto ochorenia navyše výrazne ovplyvňujú kvalitu života pacientov, keďže sú často invalidizujúce a často znemožňujú pacientom vykonávanie aj bežných denných aktivít. Nevyhnutnosťou je preto včasná diagnostika a čo najskoršie začatie liečby. Prvou líniou liečby zápalových autoimunitných ochorení sú tzv. DMARDs, chorobu modifikujúce antireumatické lieky. Cieľom tejto liečby je potlačenie aktivity ochorenia, zabránenie vzniku ireverzibilných deštrukčných zmien v kĺboch a vnútorných orgánoch a prípadne aj navodenie remisie choroby. Donedávna boli syntetické DMARDs jedinou možnosťou liečby autoimunitných reumatických chorôb a nie vždy bola táto liečba úspešná. Výrazné zlepšenie úspešnosti liečby týchto ochorení prinieslo zavedenie biologickej liečby, ktorá je vysoko účinná, ukazuje sa ako relatívne bezpečná a dokáže udržať ochorenie dlhodobo v remisii.

V našej štúdii sme zistili signifikantné zlepšenie kvality života pacientov po začatí biologickej liečby. Priaznivý liečebný efekt bol zjavný už po troch mesiacoch liečby a pretrvával aj pri niekoľko rokov trvajúcej terapii biologickými liekmi. Zistili sme tiež, že subjektívne hodnotenie aktivity ochorenia pacientom v dotazníku HAQ bolo v súlade s objektivizovaným hodnotením pomocou skóre DAS28. Z našich výsledkov vyplýva, že biologická liečba výrazne prispieva k zlepšeniu kvality života pacientov s RA a tým napĺňa jeden z najdôležitejších cieľov liečby RA, ktorým je čo najdlhšie udržanie prijateľnej funkčnej schopnosti pacientov. Aj napriek občasnému výskytu niektorých nežiaducich účinkov

je biologická liečba hodnotená najpozitívnejšie zo všetkých DMARDs a v súčasnosti predstavuje najlepšiu možnú liečbu pre pacientov s refraktérnymi formami zápalových autoimunitných reumatických ochorení.

ZOZNAM LITERATÚRY

Aaltonen, K. J., Virkki, L. M., Malmivaara, A., Kontinen, Y. T., Nordström, D. C., Blom, M.: Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of existing TNF blocking agents in treatment of rheumatoid arthritis. *PLoS One*, 2012, 7, 1, e30275.

Boyardzieva, V. V., Stoilov, N., Stoilov, R. M., Tachkov, K., Kamusheva, M., Mitov, K., Petrova, G. I.: Quality of life and cost study of rheumatoid arthritis therapy with biological medicines. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9, 794.

Jorgensen, T. S., Turesson, C., Kapetanovic, M., Englund, M., Turkiewicz, A., Christensen, R., Bliddal, H., Geborek, P., Kristensen, L. E.: EQ-5D utility, response and drug survival in rheumatoid arthritis patients on biologic monotherapy: A prospective observational study of patients registered in the south Swedish SSATG registry. *PLoS One*, 2017, 12, 2, e0169946.

Kim, S. K., Kim, S. H., Jo, M. W., Lee, S. I.: Estimation of minimally important differences in the EQ-5D and SF-6D indices and their utility in stroke. *Health and Quality of Life Outcomes*, 2015, 13:32.

Malottki, K., Barton, P., Tsourapas, A., Uthman, A. O., Liu, Z., Routh, K., Connock, M., Jobanputra, P., Moore, D., Fry-Smith, A., Chen, Y. F.: Adalimumab, etanercept, infliximab, rituximab and abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis after the failure of a tumour necrosis factor inhibitor: a systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*, 2011, 15, 14, 1 – 278.

MZ SR: Zoznam kategorizovaných liekov, časť A – Zoznam liekov; časť B – Indikačné obmedzenia; časť H – Zoznam skratiek odbornosti lekárov. <https://www.mzsr.sk/Clanok?lieky201903>.

Accessed March 1, 2019.

Národné centrum zdravotníckych informácií – MKCH 10 (10. revízia), kapitola 13, M00 – M99. <http://www.nczisk.sk/Standardy-v-zdravotnictve/Pages/Medzinarodna-klasifikacia-chorob-MKCH-10.aspx>. Accessed March 1, 2019.

Pickard, A. S., Neary, M. P., Cella, D.: Estimation of minimally important differences in EQ-5D utility and VAS scores in cancer. *Health Qual. Life Outcomes*, 2007, 5:70.

Pollard, L., Choy, E. H., Scott, D. L.: The consequences of rheumatoid arthritis: quality of life measures in the individual patient. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2005, 23, 5 (Suppl 39), 43 – 52.

Rovenský, J.: Reumatoidná artritída – klinický obraz, diagnostika a liečba. *Via practica*, 2008, 5, 1, 6 – 13.

**HODNOTENIE ÚČINKU EXTRAKTOV PÚPAVY LEKÁRSKE
(*TARAXACUM OFFICINALE*) V KOMBINÁCII S ANTIMIKROBIÁLNOU LÁTKOU
NA BUNKOVÚ ODPOVEĎ *IN VITRO***

**EVALUATION OF THE IMPACT OF DANDELION (*TARAXACUM OFFICINALE*)
EXTRACTS IN COMBINATION WITH ANTIMICROBIAL AGENT ON *IN VITRO*
CELL RESPONSE**

Czechová, S., 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 hodnotenie účinku rastlinných extraktov listu, kvetu a koreňa púpavy (*Taraxacum officinale*, *Cichoriaceae*) a ich kombinácií s antimikrobiálnou látkou amfotericín B na modelovej bunkovej línii Hepa1c1c7 (myšacie pečenevé bunky). Bunky boli exponované extraktom púpavy v koncentrácii $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a amfotericínu B v koncentrácii $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ počas 48 hodín.

Pomocou systému xCELLigence (RTCA – Real time cell analysis) sme sledovali účinky extraktov, ktoré sa prejavili zmenou adherencie a proliferácie vyjadrenej ako hodnota bunkového indexu (CI).

Testované látky spôsobili signifikantný pokles CI oproti kontrolným bunkám. Extrakt listu púpavy ($0,97 \pm 0,03$), kvetu púpavy ($1,11 \pm 0,10$) a koreňa púpavy ($1,00 \pm 0,02$) majú hodnotu CI vyššiu oproti antimikrobiálnej látke amfotericín B ($0,90 \pm 0,02$). Extrakt kvetu púpavy mal pozitívny vplyv na bunky súčasne ošetrené amfotericínom B a hodnota CI sa mierne zvýšila ($1,05 \pm 0,10$) oproti expozícii buniek samotnému amfotericínu B ($P > 0,05$). U ostatných kombinácií sme nepotvrdili protektívne účinky, vzhľadom na znížené hodnoty CI oproti kontrolným bunkám ($P < 0,05$).

Metabolickú aktivitu sme hodnotili pomocou kolorimetrického MTT testu, po 48 hodinách expozície buniek testovaným látkam.

Životaschopnosť alebo metabolická aktivita bola mierne zvýšená u buniek exponovaných extraktom listu ($109 \pm 0,07 \%$) a koreňa púpavy ($106 \pm 0,01 \%$) oproti kontrolným bunkám (100%). Súčasné ošetrenie buniek rastlinnými extraktmi a amfotericínom B malo nepriaznivý vplyv na metabolickú aktivitu, došlo k výraznejšiemu poklesu viability oproti expozícii buniek samotnému amfotericínu B.

Kľúčové slová: antimikrobiálne látky; bunky; rastlinné extrakty; terapia; toxicita

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the impact of plant extract of dandelion leaf, flower and root (*Taraxacum officinale*, *Cichoriaceae*) and their combination with antimicrobial substance amphotericin B on a model cell line Hepa1c1c7 (murine hepatoma cells). The cells were exposed to dandelion extracts at concentration of $250 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ and amphotericin B at concentration of $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ for 48 hours.

Impacts of the extracts were observed by using of xCELLigence system (RTCA – Real time cell analyser), which demonstrated the change of adherence and proliferation expressed in cell index (CI). Plant extracts caused significant decrease in CI in comparison to the control cells. Dandelion leaf, flower and root extracts caused the increase in CI value compared to antimicrobial substance amphotericin B. Extract of dandelion flower had positive impact on cells that were treated with amphotericin B and CI value increased in comparison to the cells treated with amphotericin B ($P > 0,05$). Protective effects were not observed in any other combinations, considering decreased values in CI compared to control cells ($P < 0,05$).

Metabolic activity was evaluated by using colorimetric MTT test after 48-hour exposition to the tested cells. Viability or metabolic activity was slightly increased in the cells exposed to leaf extract

($109 \pm 0,07 \%$) and dandelion root ($106 \pm 0,01 \%$) compared to control cells (100%). Addition of amphotericin B and plant extract treatment of the cells didn't show positive impact on metabolic activity, but on the contrary it caused significant decrease of viability compared to cell exposition in combination with amphotericin B.

Key words: antimicrobial substances; cells; plant extract; therapy; toxicity

ÚVOD

Liečivé rastliny sú zdrojom širokej škály biologicky aktívnych zlúčenín, ktoré sú ešte stále nepreskúmané (Singh a kol., 2012). Rastlinné extrakty môžeme považovať za predchodcov liekov. Rastliny poskytujú zdroj pre prípravu zlúčenín liekov, ktoré prispeli k zdraviu ľudí. Môžu sa stať základom pre vývoj lieku alebo sa priamo použijú ako fytofarmakum, ktoré sa potom použije pri liečbe ochorenia (Iwu a kol., 1999). Množstvo pozitívnych účinkov na ľudský organizmus si vyžiadalo pozornosť a stále viac ľudí prejavuje záujem o tradičné lieky na primárnu zdravotnú starostlivosť. Púpava lekárska je výborné cholagogum, choleretikum, má význam pri prevencii obezity, využíva sa najmä pre jej významné hepatoprotektívne účinky (Colle a kol., 2012). Antimikrobiálna aktivita rastlinných extraktov tvorí základ mnohých aplikácií, vrátane konzervovania surových a spracovaných potravín, farmaceutických prípravkov, alternatívnej medicíny a prírodných terapií (Hammer a kol., 1999).

Širokospektrálne využitie rastlín má však nevýhodu v interakciách s ich chemickými náhradami. Medzi rastliny, ktoré preukazujú najviac interakcií patria ľubovník bodkovaný, ginkgo, ženšen, zelený čaj a mnoho ďalších (Angelo a kol., 2012). Jednotlivé interakcie môžu spôsobiť vážne následky na zdravotný stav organizmu, napr. zvýšenú krvácanosť, hepatálnu a renálnu toxicitu, zvýšenie nežiaducich účinkov liekov (Rouhi-Boroujeni a kol., 2015). Dôležité je zhodnotiť užívanie rastlín

pri kardiovaskulárnej terapii, hlavne pri súbežnom užívaní liekov ako je warfarín alebo digoxín (Izzo a kol., 2005). Interakcie liekov a rastlinných extraktov musia byť posúdené na začiatku každej liečby.

Cieľom štúdie bolo zhodnotiť účinok extraktu púpavy lekárskej a jeho kombinácie s antimikrobiálnou látkou amfotericín B, ktorý je známy svojimi cytotoxickými účinkami (Harmsen a kol., 2011). Ako modelový organizmus bola použitá bunková línia myšacích hepatocytov (Hepa 1c1c7). Hodnotili sme zmeny metabolickej aktivity buniek (MTT test) a bunkovú odpoveď sledovaním zmien buniek v reálnom čase pomocou systému xCELLigence.

MATERIÁL A METÓDY

V experimente sme použili etanolové extrakty púpavy lekárskej (*Taraxacum officinale*, *Cichoriaceae*), ktoré sme zakúpili od spoločnosti Calendula a.s. (Nová Ľubovňa, Slovensko). Extrakty boli testované v koncentrácii 250 µg.ml⁻¹ samotné a v kombinácii s antimikrobiálnou látkou amfotericín B (Sigma Aldrich, Nemecko) v koncentrácii 0,2 µg.ml⁻¹. Ako modelovú bunkovú líniu sme pre experiment zvolili myšacie pečenevé bunky Hepa 1c1c7 (murine hepatoma cells). Kultivácia prebehla v kultivačnom médiu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, Valais, Švajčiarsko) s pridaním 10 % fetálneho bovinného séra (Lonza, Valais, Švajčiarsko), 4,5 % glukózy a 10 µg gentamycínu (Sigma Aldrich, Nemecko).

Pridaním 1 ml kompletného kultivačného média ohriateho na teplotu 37 °C sme rýchlo rozmrazili bunky uchované v tekutom dusíku (– 196 °C). Následne sme obsah mikroskúmavky preniesli k 10 ml média do kultivačnej fľaše. Nasledovala kultivácia pri teplote 37 °C v atmosfére s 5 % CO₂ počas troch až štyroch dní.

xCELLigence systém (RTCA – real-time cell analysis)

Systém xCELLigence (Roche, Applied Science, Mannheim, Nemecko) zaznamenáva zmenu odporu

a adherencie buniek počas celej doby pokusu (70 hodín). Špeciálne navrhnuté mikrotitračné 16-jamkové E-platne (ACEA Biosciences, San Diego, Kalifornia) obsahujú interdigitované zlaté mikroelektrody a sú pripojené k notebooku so softvérom, ktorý meria impendancné rozdiely v elektrickom obvode (Ke a kol., 2011; Abassi a kol., 2009). Tieto rozdiely vyjadrené ako index buniek (CI), môžu byť ovplyvnené niekoľkými parametrami, ako je počet buniek, veľkosť buniek, bunkový substrát alebo prepojenie buniek navzájom (Martinez-Serra a kol., 2014). Najprv sme napipetovali 100 µl média do jamiek pre zmeranie backgroundu. Platničky s médiom boli vložené do stanice v inkubátore s konštantnou teplotou 37 °C a atmosférou s 5 % obsahom CO₂. Následne po odmeraní backgroundu sme pridali do každej jamky 15 000 buniek (50 µl suspenzie buniek). Systém xCELLigence (real-time cell analyser – RTCA) zachytával zmeny napätia na dne každej platničky počas celej doby experimentu. Po 21 hodinovej kultivácii sme bunky exponovali testovaným látkam. Softvér zaznamenal aderenčné zmeny buniek do grafov, kde jednotlivé krivky znázorňujú priebeh adherencie buniek v jednej jamke (bunkový index – CI).

MTT test metabolickej aktivity

Súbežne s predchádzajúcim pokusom bol vykonaný aj kolorimetrický MTT test (Mosmann, 1983) v 48. hodine expozície buniek, pri ktorom sme použili bunky z rovnakej pasáže. Bunky boli nasadené do 96-jamkovej platne (Greiner-bio-one, Kremsmünster, Rakúsko). Po 48 hodinách sme z jamiek odsali médium a následne sme do každej jamky pridali 100 µl PBS na premytie. Po odsatí PBS sme pridali 90 µl kompletného kultivačného média, 10 µl MTT (5 mg.ml⁻¹) a odložili na inkubáciu na štyri hodiny. Neskôr sme z každej jamky odsali médium spolu s MTT a pridali 100 µl dimethylsulfoxidu, z dôvodu rozpustenia vzniknutého formazánu. Nasledovalo pridanie 12,5 µl glycerínového pufru do každej jamky a meranie absorbancie za použitia Synergy HT spektrofotometra (Biotek, Winooski,

Tab. 1: Priemerné hodnoty bunkového indexu počas celej doby ošetrovania (48 hodín)

	48. hod	± sd
Kontrola	1,28	0,06
Amfotericín B	0,90*	0,02
List púpavy	0,97*	0,03
List púpavy + amfotericín B	0,89*	0,08
Kvet púpavy	1,11*	0,10
Kvet púpavy + amfotericín B	1,05*	0,10
Koreň púpavy	1,00*	0,02
Koreň púpavy + amfotericín B	0,83*	0,01

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

± sd – smerodajná odchýlka

VT, USA) pri absorbancii 570 nm. Namerané hodnoty absorbancie v konkrétnych jamkách boli prepočítané na hodnotu metabolickej aktivity (%).

Štatistické spracovanie výsledkov

Výsledky oboch meraní boli porovnané s kontrolou a vyhodnotené štatistickým programom GrafPad Prism 5.0 (2007) za pomoci jednocestného Anova testu Dunnetovým porovnávacím testom. Za štatisticky významný rozdiel sa považuje hodnota $P < 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

System xCELLigence umožňujúci dynamické monitorovanie relatívne životaschopných adhe-rovaných buniek bol porovnaný s najpoužívanejšou metódou relatívnej kvantifikácie počtu živo-taschopných buniek na základe stanovenia bunkového metabolizmu. MTT test hodnotí aktivitu dehydrogenáz a stanovenie množstva vytvoreného formazánu (Vistejnova a kol., 2009). Všetky testované látky aj ich vzájomné kombinácie spôsobili signifikantný pokles adherencie buniek oproti kontrolným bunkám bez ošetrovania ($P < 0,05$). Samotné extrakty spôsobili o niečo slabší pokles adherencie ako amfotericín B, ktorý bol však signifikantný oproti kontrole ($P < 0,05$). Pri aplikácii ich vzájomnej kombinácie

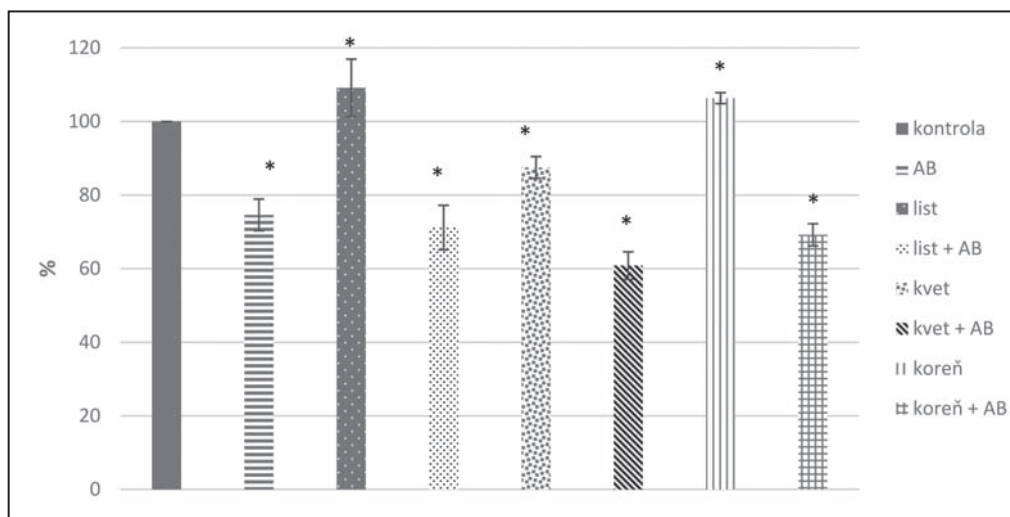
sme nezaznamenali ochranný účinok extraktu pred pôsobením liečiva. Mierny nárast adherencie buniek spôsobila len kombinácia extraktu kvetu púpavy lekárskej oproti adherencii buniek ošetrených samotným amfotericínom B ($P > 0,05$). Všetky hodnoty CI sú zaznamenané v tabuľke 1.

Najnižší pokles adherencie bol zaznamenaný u buniek ošetrených extraktom kvetu púpavy a najvyšší pokles spôsobil extrakt koreňa púpavy v kombinácii s amfotericínom B ($P < 0,05$).

Zmenu metabolickej aktivity znázorňuje graf 1. Metabolická aktivita bola mierne zvýšená u buniek ošetrených listom a koreňom púpavy oproti kontrolným bunkám ($P < 0,05$). Všetky kombinácie jednotlivých extraktov púpavy s amfotericínom B mali nižšie hodnoty metabolickej aktivity ako samotný amfotericín B ($P < 0,05$).

MTT test dokazuje dobrú koreláciu s inými *in vitro* proliferačnými testami (Meerloo a kol., 2011). Viabilita bola zvýšená u buniek ošetrených extraktom listu púpavy a kvetu púpavy oproti kontrolným bunkám. Výrazný pokles bol zaznamenaný pri sledovaní adherencie u všetkých ošetrených buniek oproti kontrole ($P < 0,05$). Zvýšená adherencia oproti aktivite buniek exponovaných samotnému amfotericínu B bola pozorovaná pri súčasnom ošetrovaní buniek amfotericínom B s kvetom púpavy. Púpava nepôsobila protektívne, práve naopak, ešte

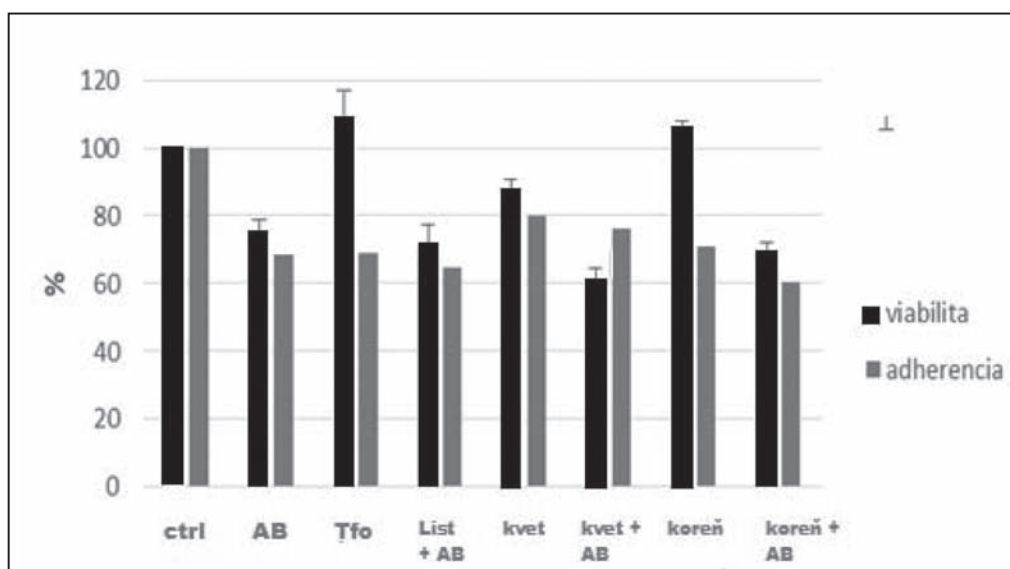
Graf 1: Metabolická aktivita ošetrovaných buniek



AB – amfotericín B

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

Graf 2: Porovnanie zmien ošetrovaných buniek



AB – amfotericín B

viac sa znížila adherencia. Prospešnou kombináciou bola expozícia buniek extraktom kvetu púpavy s amfotericínom B.

Percentuálne vyjadrenie výsledkov nameraných hodnôt pokusu uľahčuje porovnávanie navzájom. Výsledky bunkových zmien nameraných v čase systémom xCELLigence vyjadrené ako zmena CI (bezjednotková veličina) boli prepočítané na percentá

pomocou kontrolných buniek bez ošetrovania (100 %). Graf 2 porovnáva zmeny metabolickej aktivity a adherencie (CI) u extraktov samotných a pri kombinácii s amfotericínom B.

V našom experimente sa pri použití samotného extraktu púpavy lekárskej ani v kombinácii s antimikrobiálnou látkou amfotericín B protektívne účinky púpavy nepotvrdili.

ZÁVER

Toxický účinok extraktov rastlín a amfotericínu B sa prejavil odlišne pri sledovaní zmien adhérencie a metabolickej aktivity, čo je spôsobené odlišnosťou princípov jednotlivých meraní. Bunky reagovali na ošetrovanie extraktmi rastlín zmenou adhérencie, odlúpnutím, morfológickou zmenou, čo má za následok zníženie bunkového indexu, čo znamená, že sa nepotvrdili protektívne účinky extraktov. Metabolická aktivita bola signifikantne znížená pri kombinácii rastlinných extraktov spolu s amfotericínom B oproti kontrolným bunkám. Zvýšená metabolická aktivita bola sledovaná pri bunkových líniiach exponovaných extraktom koreňa a listu púpavy oproti kontrole. Môžeme to pripisovať aj vzájomnej interakcii medzi zložkami extraktu a amfotericínom B.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla s podporou Národného referenčného laboratória pre pesticídy Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach a projektu VEGA č. 1/0408/17.

ZOZNAM LITERATÚRY

- Abassi, Y. A., Xi, B., Zhang, W., Ye, P., Kirstein, S. L., Gaylord, M. R., Feinstein, S. C., Wang, X., Xu, X.: Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. *Chemistry and Biology*, 2009, 16, 712 – 723.
- Colle, D., Arantes, L. P., Gubert, P., Almeida da Luz, S. C., Athayde, M. L., Rocha, J. B. T., Soares, F. A. A.: Antioxidant properties of *Taraxacum officinale* leaf extract are involved in the protective effect against hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice. *Journal of Medicinal Food*, 2012, 15, 549 – 556.
- Harmsen, S., McLaren, A. C., Pauken, C., McLemore, R.: Amphotericin B is cytotoxic at locally delivered concentrations. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2011, 469, 3016 – 3021.
- Iwu, M. M., Duncan, A. R., Okunji, C. H. O.: New antimicrobials of plant origin. *Perspectives on new crops and new uses*, 1999, 457 – 462.
- Izzo, A. A., Di Carlo, G., Borrelli, F., Ernst, E.: Cardiovascular pharmacotherapy and herbal medicines: the risk of drug interaction. *International Journal of Cardiology*, 2005, 98, 1 – 14.
- Izzo, A. A. a Edzard, E.: Interactions between herbal medicines and prescribed drugs. *Drugs*, 2012, 69, 1777 – 1798.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V.: Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 1999, 86, 985 – 990.
- Ke, N., Wang, X., Xu, X., Abassi, Y. A.: The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Mammalian Cell Viability*, 2011, 33 – 43.
- Martinez-Serra, J., Gutierrez, A., Muñoz-Capó, S., Navarro-Palou, M., Ros, T., Amat, J. C., Lopez, B., Marcus, T. F., Fueyo, L., Suquia, A. G., Gines, J., Rubio, F., Ramos, R., Besalduch, J.: xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies. *Onco Targets and Therapy*, 2014, 7, 985 – 994.
- Meerlo, J., Kaspers, G. J. L., Cloos, J.: Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Cancer Cell Culture*, 2011, 237 – 245.
- Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65, 55 – 63.
- Rouhi-Boroujeni, H., Rouhi-Boroujeni, H., Ghaipour, M., Mohammadzadeh, F., Ahmadi, S., Rafieian-kopaei, M.: A systematic review on safety and drug interaction of herbal therapy in hyperlipidemia: a guide for internist. *Acta Bio Medica*, 2015, 86, 130 – 136.
- Singh, R., Dar, S. A., Sharma, P.: Antibacterial activity and toxicological evaluation of

semi purified hexane extract of *Urtica dioica* leaves. *Journal of Medicinal Plant*, 2012, 6, 123 – 135.

Vistejnova, L., Dvorakova, J., Hasova, M., Muthny, T., Velebny, V., Soucek, K., Kubala,

L.: The comparison of impedance-based method of cell proliferation monitoring with commonly used metabolic-based techniques. *Neuroendocrinology Letters*, 2009, 30, 121 – 127.

SYNERGICKÉ PÔSOBENIE BERGAMOTOVEJ, PAMAJORÁNOVEJ A LEVANDUĽOVEJ SILICE VOČI IZOLÁTOM *CANDIDA ALBICANS*

SYNERGISTIC EFFECT OF BERGAMOT, OREGANO AND LAVENDER ESSENTIAL OIL AGAINST *CANDIDA ALBICANS* ISOLATES

Fehér, M.¹, Váczi, P.²

¹Univerzitná lekáreň

²Katedra farmakológie a toxikológie, Ústav farmakológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

michal.feher@uvlf.sk

ABSTRAKT

V štúdií bola stanovená antifungálna aktivita dvojkombinácií vybraných rastlinných silíc voči izolátom kvasiniek *Candida albicans* (n = 13) použitím mikrodilučnej metódy M27-A3 a overenie ich aditívneho, prípadne synergického účinku. Izoláty *Candida albicans* boli získané od mužov a žien s potvrdenou kandidózou z rôznych miest (pošva, črevo, respiračný systém, spútum). Na overenie validity testovania bol použitý referenčný kmeň *Candida albicans* ATCC 10231. Testovaná bola antifungálna účinnosť bergamotovej, levanduľovej a pamajoránovej silice, a to v dvojkombinácii bergamot s pamajoránom a bergamot s levanduľou. Na vyhodnotenie synergického, aditívneho, resp. antagonistického

účinku bol použitý tzv. šachovnicový test, pri ktorom sa daný účinok vyjadruje na základe hodnoty indexu frakčnej inhibičnej koncentrácie (FICI).

Pri testovaní dvojkombinácie bergamotovej silice s pamajoránovou a bergamotovej silice s levanduľovou svedčia dosiahnuté hodnoty FICI (0,89, resp. 0,82) o aditívnom účinku.

Kľúčové slová: *Candida albicans*; mikrodilučná metóda; rastlinné silice

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the antifungal activity of dual-combined essential oils against the *Candida albicans* isolates (n =

13) by using the microdilution method M27-A3 and verification of their additive or synergistic effects. *Candida albicans* isolates were obtained from men and women with confirmed candidiasis from different body areas (vagina, intestine, respiratory system, sputum). The reference strain of *Candida albicans* ATCC 10231 was used to verify the validity of the test. Antifungal activity of bergamot, lavender and oregano essential oils was tested in the following combinations: bergamot with oregano and bergamot with lavender.

To evaluate the additive, synergistic and antagonistic effect respectively, the checkerboard test was used, in which the effect is expressed on the basis of Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) value. When testing a combination of bergamot essential oil with oregano and bergamot essential oil with lavender, the FICI (0.89 and 0.82, respectively) showed an additive effect.

Key words: *Candida albicans*; essential oils; microdilution broth method

ÚVOD

Candida albicans je jednou z klinicky významných mikromycét, ktorá spôsobuje vysokú mortalitu najmä u imunokompromitovaných pacientov a u vysokorizikových pacientov po transplantácii (Dixon a kol., 1996). *C. albicans* sa nachádza v ústnej dutine, zažívacom trakte a genitálnej oblasti ako komenzálny mikroorganizmus u viac ako polovice zdravého obyvateľstva. *C. albicans* je zodpovedná za viac ako 50 % ľudských kandidóz, vrátane 2 hlavných typov infekcií: povrchové infekcie (nepredstavujú nebezpečenstvo smrti pacienta), ako je orálna alebo vaginálna kandidóza; a systémové infekcie (s úmrtnosťou až 40 %) (Pfaller a Diekema, 2010).

Terapia kandidóz je založená najmä na aplikácii antimykotík (Fečíková a Čonková, 2009). Vývoj antifungálneho lieku je oproti antibiotikám pomalší a nárast rezistencie znižuje jeho účinnosť (Pierce a Lopez-Ribot, 2013). Fytoterapia predstavuje

účinnú a menej toxickú alternatívu k štandardným antifungálnym liekom (Alves a kol., 2014). Rastlinné výťažky a éterické oleje sa oddávna používajú ako účinné a bezpečné antifungálne látky (Fečíková a Čonková, 2009). Existuje široká škála zlúčenín, ako napríklad sekundárne metabolity zapojené do obranných mechanizmov rastlín (Khan a kol., 2012), najmä však esenciálne oleje (EO), ktoré majú silný antibakteriálny (Bakkali a kol., 2008), ako aj antimykotický (Kalemba a Kunicka, 2003) a antiparazitárny účinok (Essid a kol., 2015).

Hlavným zámerom tejto štúdie bolo otestovať účinok dvojkombinácie rastlinných silíc voči izolátom *Candida albicans*, vychádzajúc z predpokladu, že pri kombinovaní silíc môže dochádzať k aditívnemu až synergickému účinku.

MATERIÁL A METÓDY

Na testovanie citlivosti izolátov a referenčného kmeňa *C. albicans* voči vybraným siliciam bola použitá mikrodilučná metóda M27-A3 (CLSI, 2008).

Vzorky izolátov kvasiniek *C. albicans* nám poskytol Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie Univerzitnej nemocnice Louisa Pasteura v Košiciach. Vzorky boli odobraté od pacientov oboch pohlaví s potvrdenou kandidovou infekciou formou výteru z rôznych miest: vagína – 2 vzorky, črevo – 2 vzorky, respiračný systém – 4 vzorky; alebo ako spútum: 5 vzoriek. Do pokusu sme zaradili 3 silice, u ktorých bola na základe dostupných literárnych zdrojov potvrdená účinnosť voči *C. albicans*: bergamotová, levanduľová a pamajoránová (*Calendula*, Nová Lubovňa, SR).

Kontrola kvality testovania bola overovaná citlivosťou referenčného kmeňa *Candida albicans* ATCC 10231 (Česká sbírka mikroorganizmů, Brno, Česká republika) voči flukonazolu.

Na testovanie sme použili 96-jamkové sterilné mikrotitračné platničky (Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Nemecko). Pri testovaní jednotlivých silíc sme do všetkých jamiek aplikovali po 100 µl Sabouraudovho bujónu (HiMedia Laboratories

Pvt. Ltd., Bombaj, India). Do prvého stĺpca sme napipetovali 100 µl sterilného 40 % roztoku silice vo forme emulzie s arabskou gumou, ktorá predstavovala 30 % z objemu testovanej silice. Dvojkovým riedením sme získali nasledovné výsledné koncentrácie: 20 % (200 mg.ml⁻¹), 10 % (100 mg.ml⁻¹), 5 % (50 mg.ml⁻¹), 2,5 % (25 mg.ml⁻¹), 1,25 % (12,5 mg.ml⁻¹), 0,625 % (6,25 mg.ml⁻¹), 0,312 % (3,12 mg.ml⁻¹), 0,16 % (1,6 mg.ml⁻¹), 0,08 % (0,8 mg.ml⁻¹) a 0,04 % (0,4 mg.ml⁻¹). Do takto pripravených platničiek sme do stĺpcov 1 – 11 pridali 100 µl inokula. Referenčný kmeň *C. albicans* ATCC 10231 bol testovaný 3-krát. Jedenásty stĺpec predstavoval pozitívnu a 12. stĺpec negatívnu kontrolu. Po 24 hodinovej inkubácii pri teplote 35 °C sme odčítali hodnoty MIC.

Pri stanovení antifungálnej účinnosti kombinácií 2 silíc sme do všetkých jamiek platničky aplikovali po 50 µl Sabouraudovho bujónu (stĺpce 1 – 10). Dvojkové riedenie prvej silice z dvojkombinácie (50 µl) bolo vykonané v mikrotitračnej platničke s prispôbením metóde tzv. šachovnicového testu (Nikolić a kol., 2017). Tým sme získali nasledovné výsledné koncentrácie: pre pamajoránovú a levanduľovú silicu 0,64 % (6,4 mg.ml⁻¹), 0,32 % (3,2 mg.ml⁻¹), 0,16 % (1,6 mg.ml⁻¹), 0,08 % (0,8 mg.ml⁻¹), 0,04 % (0,4 mg.ml⁻¹), 0,02 % (0,2 mg.ml⁻¹) a 0,01 % (0,1 mg.ml⁻¹); pre bergamotovú silicu 2,5 % (25 mg.ml⁻¹), 1,25 % (12,5 mg.ml⁻¹), 0,64 % (6,4 mg.ml⁻¹), 0,32 % (3,2 mg.ml⁻¹), 0,16 % (1,6 mg.ml⁻¹), 0,08 % (0,8 mg.ml⁻¹), 0,04 % (0,4 mg.ml⁻¹).

Dvojkové riedenie druhej silice z dvojkombinácie sme pripravili v skúmavkách so zachovaním rovnakých koncentrácií ako pri riedení v mikrotitračných platniach. Tieto riedenia v množstve 50 µl boli prenesené do riadkov A – G s klesajúcou koncentráciou. Účinok dvojkombinácie silíc bergamot s pamajoránom a bergamot s levanduľou bol otestovaný na 13 izolátoch *C. albicans* a 1 referenčnom kmeni *C. albicans* ATCC 10231 (3-krát). Po 24 hodinovej inkubácii pri teplote 35 °C sme odčítali hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) a frakčnej inhibičnej koncentrácie (FIC).

Na vyjadrenie antifungálneho účinku kombinácie 2 silíc sa používa tzv. index čiastkovej inhibičnej koncentrácie FICI, ktorý sa vypočíta podľa vzťahu:

$$FICI = \frac{FIC1}{MIC1} + \frac{FIC2}{MIC2}$$

kde FIC1 a FIC2 predstavujú čiastkové inhibičné koncentrácie kombinovaných silíc, a MIC1 a MIC2 minimálnu inhibičnú koncentráciu jednotlivých silíc. Na základe veľkosti FICI sa hodnotí účinok dvojkombinácie silíc nasledovne: synergický (FICI ≤ 0,5), aditívny (FICI > 0,5 < 2), indifferentný (FICI ≥ 2 < 4) a antagonistický (FICI > 4) (Nikolić a kol., 2017).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V práci sme potvrdili *in vitro* antifungálnu aktivitu viacerých rastlinných silíc voči klinickým izolátom *C. albicans*. Priemerné hodnoty MIC, FIC a FICI testovaných dvojkombinácií silíc uvádza tabuľka 1. Pri testovaní účinnosti jednotlivých silíc sa najúčinnějšími javí pamajoránová silica (MIC = 0,20 mg.ml⁻¹). Významne efektívnejšia bola tiež silica levandule (MIC = 0,69 mg.ml⁻¹), pri bergamotovej silici boli zistené vyššie hodnoty MIC (2,29 mg.ml⁻¹).

Výrazný účinok pri pamajoráne môže byť spojený s vysokým obsahom karvakrolu (57 %). Podobné výsledky boli publikované aj v práci Cortés-Rojas a kol. (2014), ktorí testovali účinok eugenolu a karvakrolu voči kandidám v modeli vaginálnej kandidózy. Z ich výsledkov vyplýva, že eugenol a karvakrol môžu byť sľubným antifungálnym liečivom na terapiu a profylaxiu vaginálnej kandidózy.

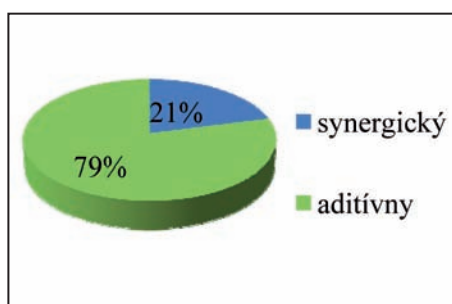
Serra a kol. (2018) testovali použitím mikrodilučnej metódy účinnosť bergamotovej, škoricovej, levanduľovej, mätovej a čajovníkovej silice voči kmeňom *C. albicans* 135BM2/94 a *C. albicans* NCYC 1363. Z ich výsledkov vyplýva, že najnižšia MIC bola zaznamenaná pri škoricovej a mätovej silici (MIC = 0,1 %), vyššia pri levanduľovej a čajovníkovej silici (MIC = 0,2 %) a najvyššia pri bergamotovej silici (MIC = 0,3 %).

Tab. 1: Priemerné hodnoty FIC, MIC a FICI sledovaných dvojkombinácií silíc

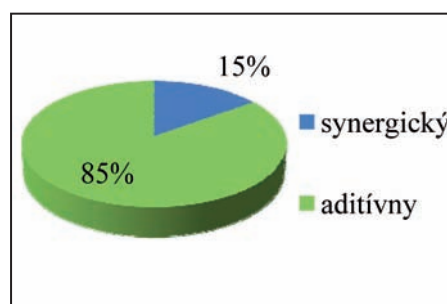
Kombinácia silíc	FIC 1	MIC 1	FIC 2	MIC 2	FICI
Bergamot + Levanduľa	9,74 ± 10,16	17,63 ± 9,14	3,55 ± 2,05	11,61 ± 4,81	0,82 ± 0,47
Bergamot + Pamajorán	5,11 ± 4,58	10,22 ± 5,80	0,16 ± 0,05	0,4 ± 0,00	0,89 ± 0,38

MIC 1 – minimálna inhibičná koncentrácia (mg.ml⁻¹) prvej silice, MIC 2 – minimálna inhibičná koncentrácia (mg.ml⁻¹) druhej silice, FIC 1 – čiastková inhibičná koncentrácia (mg.ml⁻¹) prvej silice, FIC 2 – čiastková inhibičná koncentrácia (mg.ml⁻¹) druhej silice, FICI – index čiastkovej inhibičnej koncentrácie

Graf 1: Vyhodnotenie účinku kombinácie bergamotovej a levanduľovej silice v %



Graf 2: Vyhodnotenie účinku kombinácie bergamotovej a pamajoránovej silice v %



Taktiež Devkatte a kol. (2005) pri testovaní účinnosti viacerých rastlinných silíc voči 4 referenčným kmeňom *C. albicans* ATCC10231 zistili, že hodnota MIC pre škoricovú silicu dosahovala 0,01 % (0,1mg.ml⁻¹), pre mäťovú silicu 0,25 – 0,3 % (2,5 – 3 mg.ml⁻¹), pre čajovníkovú silicu 0,12 – 0,25 % (1,2 – 2,5 mg.ml⁻¹) a pre bergamotovú silicu 1 % (10 mg.ml⁻¹).

Tieto výsledky korešpondujú aj s naším zistením o najnižšej účinnosti bergamotovej silice (MIC = 2,29 mg.ml⁻¹, čo zodpovedá hodnote 0,229 %).

Pri kombinácii silíc bergamotu a levandule sme pozorovali aditívny účinok (FICI = 0,82), zatiaľ čo pri samotnej bergamotovej silici bolo MIC = 17,63 mg.ml⁻¹, pri jej kombinácii s levanduľovou silicou táto hodnota klesla na FIC = 9,74 mg.ml⁻¹. Podobne aj samostatná levanduľová silica mala MIC = 11,61 mg.ml⁻¹ a v kombinácii FIC = 3,55 mg.ml⁻¹.

V štúdií de Rapper a kol. (2013) zistili, že aj keď samostatná levanduľová silica voči *C. albicans* ATCC 10231 nemala významný antifungálny účinok (MIC = 3,00 mg.ml⁻¹) vo viacerých kombináciách ho výrazne zosilňovala, a napríklad so škoricou (FICI =

0,4), eukalyptom (FICI = 0,38) a čajovníkovou silicou (FICI = 0,50) bol ich vzájomný účinok synergický. Aditívny účinok bol prítomný v kombinácii s klinčekovou (FICI = 0,58), mäťovou (FICI = 0,63) a tymianovou silicou (FICI = 0,67).

Pri kombinácii silíc bergamotu a pamajoránu sme zistili ich aditívny účinok (FICI = 0,89) voči izolátom *C. albicans*, pričom bergamot samotný mal MIC = 10,22 mg.ml⁻¹ a v kombinácii FIC = 5,11 mg.ml⁻¹, pamajorán samotný mal MIC = 0,40 mg.ml⁻¹ a v kombinácii FIC = 0,16 mg.ml⁻¹.

Lv a kol. (2011) zisťovali antimikrobiálnu účinnosť pamajoránovej silice kombinovanej s bazalkovou, bergamotovou a perilovou silicou voči *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, a *S. cerevisiae*. Pri kombinácii pamajorán + bazalka dosahovala hodnota MIC 0,313 – 0,313 µl.ml⁻¹ voči *E. coli*, pri kombinácii pamajorán + bergamot 0,313 – 0,313 µl.ml⁻¹ voči *B. subtilis* a pri kombinácii pamajorán + perila 0,313 – 0,156 µl.ml⁻¹ voči *S. cerevisiae*. Z ich zistení tiež vyplýva, že všetky použité kombinácie silíc vykazovali synergický účinok voči *S. aureus* (FICI = 0,375), kombinácie pamajoránu s bazalkou

alebo bergamotom pôsobili aditívne voči *B. subtilis* (FICI = 0,75) a kombinácie pamajoránu s bazalkou alebo parilou mali aditívny účinok voči *E. coli* a *S. cerevisiae* (FICI = 0,75).

Aditívny účinok silíc voči kvasinkám *Candida albicans* bol prítomný u 79 % izolátov pri kombinácii bergamotovej silice s levanduľovou (viď graf 1) a u 85 % izolátov pri kombinácii bergamotovej silice s pamajoránovou (viď graf 2). Pri žiadnej z testovaných kombinácií sme nepotvrdili antagonistický účinok.

ZÁVER

Na základe citlivosti *Candida albicans* bola hodnotená a porovnávaná účinnosť troch rastlinných silíc jednotlivo a v dvojkombinácii. Z výsledkov našej štúdie vyplýva, že pri kombinácii dvoch rastlinných silíc je pre ich synergický účinok dôležitá interakcia ich jednotlivých zložiek, resp. obsahových látok. Pri žiadnej z testovaných kombinácií sme nepotvrdili antagonistický ani indiferentný účinok. Najvýraznejší synergický účinok silíc sme pozorovali pri kombinácii bergamotovej a levanduľovej silice. Zmesi silice bergamotu a levandule, prípadne bergamotu a pamajoránu by sa mohli využiť v topickom prípravku proti kožnej mykóze, čo si však vyžaduje dermatologické vyšetrenie toxicity silíc. Výskum v budúcnosti by sa mal zamerať na štúdium mechanizmu účinku jednotlivých zložiek silíc spolu s iniciovaním systematického skúmania mechanizmov synergizmu medzi ich rôznymi zložkami.

POĎAKOVANIE

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

ZOZNAM LITERATÚRY

Alves, C. T., Ferreira, I. C., Barros, L., Silva, S., Azeredo, J., Henriques, M.: Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from north

eastern Portugal against *Candida* species. *Future Microbiology*, 2014, 9, 2, 139 – 146.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M.: Biological effects of essential oils – a review. *Food And Chemical Toxicology*, 2008, 46, 2, 446 – 475.

Clinical and Laboratory Standards Institute: M27-A3. *Reference method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard*. Third edn., 2008, 1 – 13.

Cortés-Rojas, D. F., De Souza, C. R. F., Oliveira, W. P.: Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2014, 4, 2, 90 – 96.

de Rapper, S., Kamatou, G., Viljoen, A., van Vuuren, S.: The in vitro antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2013. DOI: 10.1155/2013/852049.

Devkatte, A. N., Zore, G. B., Karuppayil, S. M.: Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth. *FEMS Yeast Research*, 2005, 5, 9, 867 – 873.

Dixon, D. M., McNeil, M. M., Cohen, M. L., Gellin, B. G., La Montagne, J. R.: Fungal infections: a growing threat. *Public Health Reports*, 1996, 111, 3, 226 – 235.

Essid, R., Rahali, F. Z., Msaada, K., Sghair, I., Hammami, M., Bouratbine, A., Aoun, K., Limam, F.: Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in northern Tunisia. *Industrial Crops Products*, 2015, 77, 795 – 802.

Fečíková, N., Čonková, E.: Antifungálny účinok vybraných rastlinných silíc na *Candida albicans* samostatne a v kombinácii s antimykotikami. *Folia Pharmaceutica Cassoviensia*, 2019, 1, 3, 59 – 65.

Kalemba, D. a Kunicka, A.: Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 2003, 10, 10, 813 – 829.

Khan, M. S., Malik, A., Ahmad, I.: Anti-

candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 2012, 50, 1, 33 – 42.

Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., Li, Ch.: In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 2011, 44, 9, 3057 – 3064.

Nikolić, M. M., Jovanović, K. K., Marković, T. L., Marković, D. L., Gligorijević, N. N., Radulović, S. S., Kostić, M., Glamočlija, J. M., Soković, M. D.: Antimicrobial synergism and cytotoxic properties of Citrus limon L., Piper nigrum L. and Melaleuca alternifolia (Maiden and Betche) Cheel essential oils.

The Journal of pharmacy and pharmacology, 2017, 69, 11, 1606 – 1614.

Pfaller, M. A. a Diekema, D. J.: Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical reviews in microbiology*, 2010, 36, 1, 1 – 53.

Pierce, C. G. a Lopez-Ribot, J. L.: Candidiasis drug discovery and development: new approaches targeting virulence for discovering and identifying new drugs. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2013, 8, 9, 1117 – 1126.

Serra, E., Hidalgo-Bastida, L. A., Verran, J., Williams, D., Malic, S.: Antifungal activity of commercial essential oils and biocides against *Candida Albicans*. *Pathogens*, 2018, 7, 1.



GASTROINTESTINÁLNE INFEKCIE BAKTERIÁLNEHO PÔVODU, MOŽNOSTI ICH TERAPIE A PROTEKTÍVNY ÚČINOK PROBIOTÍK

GASTROINTESTINAL INFECTIONS OF BACTERIAL ORIGIN, POSSIBILITIES OF THERAPY AND PROTECTIVE EFFECT OF PROBIOTICS

Ujjobbágyová, J., Koščová, J.

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

jana.koscova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Štúdia je zameraná na gastrointestinálne infekcie bakteriálneho pôvodu a možnosti využitia probiotík v tejto oblasti. Podľa výsledkov práce a použitej odbornej literatúry k probiotickým kmeňom so signifikantne potvrdeným účinkom pri gastrointestinálnych infekciách patria: *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 a *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103. Na základe farmaceutických databáz boli vybrané probiotické produkty s obsahom uvedených špecifických kmeňov. Tie sa následne hodnotili z hľadiska bezpečnosti, resp. informácií deklarovaných výrobcami na obale produktov. Do hodnotenia boli zahrnuté len prípravky s presne

identifikovaným kmeňom, označené zbierkovým číslom, ako najdôležitejším parametrom bezpečnosti. Napriek tomu ani jeden z produktov neobsahoval všetky potrebné údaje stanovené cieľom štúdie. Najkomplexnejšie informácie sme získali o humánnych liekoch Enterol, a to na základe súhrnu charakteristických vlastností lieku.

Predkladaná štúdia zároveň analyzovala vedomosti a názory farmaceutických pracovníkov v rámci využitia probiotík pri gastrointestinálnych infekciách prostredníctvom dotazníka. Z výsledkov prieskumu vyplýva, že je potrebné zvýšiť povedomie farmaceutických pracovníkov o základnej a doplnkovej terapii akútnych hnačkových infekcií a možných rizikách spojených s užívaním probiotík.

Kľúčové slová: gastrointestinálne infekcie; hnačka; probiotiká

ABSTRACT

This study deals with gastrointestinal infections of bacterial origin and the possibility of using probiotics in this area. According to the results of the study and the relevant references, the probiotic strains with confirmed significant effect on gastrointestinal infections include: *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103. Probiotic products containing these specific strains were selected on the basis of pharmaceutical databases. These were subsequently evaluated for safety or the information declared by the manufacturers on the packaging of the products. Only the preparations with an accurately identified strain, marked by the collection number as the most important safety parameter, were included in the evaluation. Nevertheless, none of these products contained all the data relevant to the purpose of this study. The most comprehensive information were obtained about Enterol, based on the summary of the product characteristics.

In addition, the presented study surveyed the knowledge and opinion of pharmaceutical workers about the use of probiotics in gastrointestinal infections by means of a questionnaire. The results of the survey showed that there is a need to raise the awareness of the workers about the essential and complementary treatment of acute diarrhoeal infections and potential risks associated with the use of probiotics.

Key words: gastrointestinal infections; diarrhoea; probiotics

ÚVOD

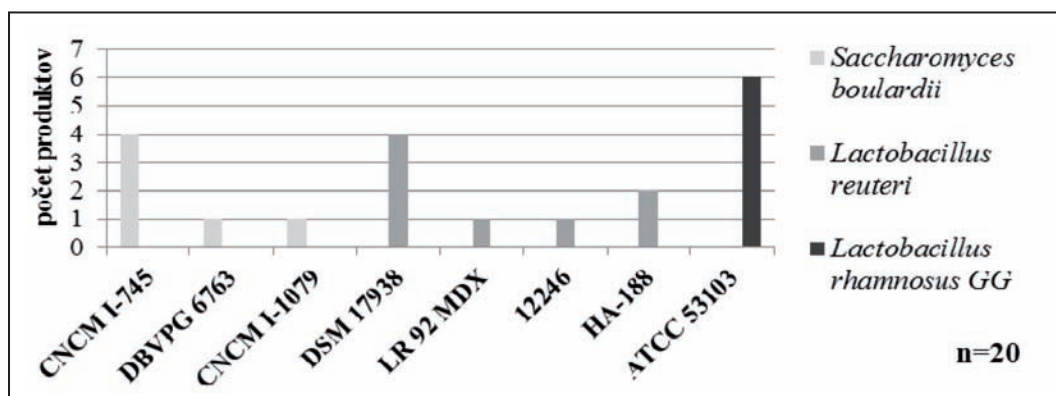
Gastrointestinálny trakt (GIT) tvorí významnú bariéru medzi vonkajším a vnútorným prostredím,

čím zohráva kľúčovú úlohu v rámci imunitnej ochrany ľudského organizmu. Imunoprotekciu zabezpečuje prostredníctvom slizničného lymfatického tkaniva čreva a črevného mikrobiómu (Minárik a Mináriková, 2017). Pred inváziou patogénnych mikroorganizmov nás prospešné baktérie chránia tromi základnými mechanizmami: vlastnou adherenciou na sliznicu GIT, produkciou látok nevýhodných pre prežitie patogénov (napr. bakteriocínov) a kompetitívnou inhibíciou o živiny (Hrubisko a kol., 2012). Bioaktívne produkty probiotických baktérií majú široké spektrum využitia (Nemcová a kol., 2019). V prípade dysbiózy dochádza k rýchlemu rozvoju infekčných, alergických či autoimunitných ochorení (Thon, 2011).

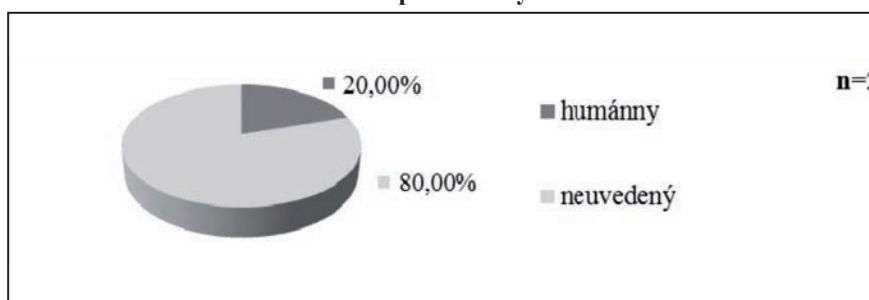
Veľmi široké spektrum patogénnych mikroorganizmov je schopných infikovať GIT fekálno-orálnou cestou (špinavými rukami) a alimentárnou cestou, pričom zdrojom infekcie sú najmä fekálne kontaminovaná potrava alebo voda. Najčastejším klinickým prejavom črevných infekcií je hnačka, ktorú môžeme definovať ako riedku až vodnatú stolicu vyplývajúcu z ochorenia tenkého čreva, spojenú s nadmernou stratou tekutín a elektrolytov (Goering a kol., 2012). K najzávažnejším komplikáciám hnačky patrí dehydratácia, nutričný deficit a elektrolytová dysbalancia, čo vedie k narušenému spätnému vstrebávaniu sodíka a zvýšenej sekrécii chloridových iónov. Taktiež dochádza k zvýšeniu množstva nevstrebanej vody v črevnom lúmene, výsledkom čoho je hypokaliémia a metabolická acidóza (Mináriková, 2018).

K najčastejším bakteriálnym pôvodcom črevných hnačkových infekcií na Slovensku patria zástupcovia rodov *Campylobacter*, *Salmonella* a *Clostridium*. K ďalším významným pôvodcom gastrointestinálnych infekcií patria tiež baktérie *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus*, *Clostridioides difficile*, *Staphylococcus aureus* a *Helicobacter pylori* (Antolová a kol., 2018). Liečba akútnej infekčnej hnačky zahŕňa včasnú náhradu stratených tekutín a minerálov, podanie tolerovaných potravín a doplnkovú terapiu, ku ktorej

Graf 1: Vyhodnotenie účinku kombinácie bergamotovej a levandul'ovej silice v %



Graf 2: Pôvod probiotických kmeňov



patria aj probiotiká (Seifert a kol., 2015).

Ciele štúdie sa sústredili na hodnotenie probiotických prípravkov z hľadiska informácií deklarovaných na obaloch produktov, a taktiež na vedomosti a názory farmaceutických pracovníkov na Slovensku v oblasti gastrointestinálnych infekcií a možnosťou využitia probiotík.

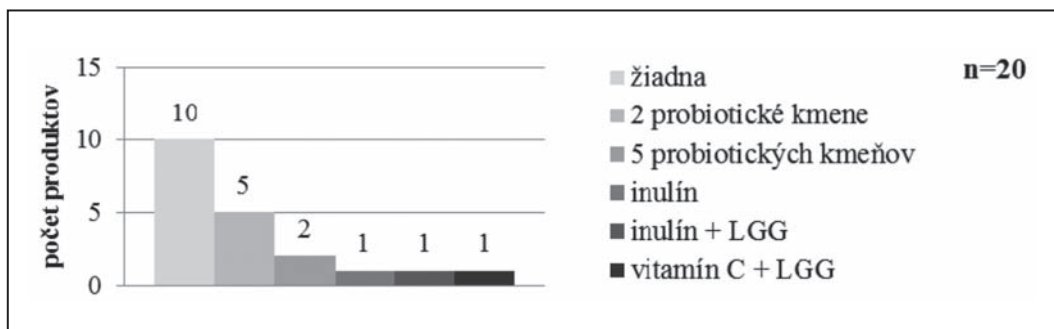
MATERIÁL A METÓDY

Probiotické mikroorganizmy *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus reuteri* a *Lactobacillus rhamnosus* sme vybrali na základe systematického prehľadu probiotickej účinnosti (McFarland a kol., 2018), v ktorom bolo preverených celkom 2 666 abstraktov (1970 – 2017) a zahrnutých 288 humánnych klinických štúdií probiotík s identifikovaným kmeňom. Výber konkrétnych probiotických produktov sme uskutočnili na základe

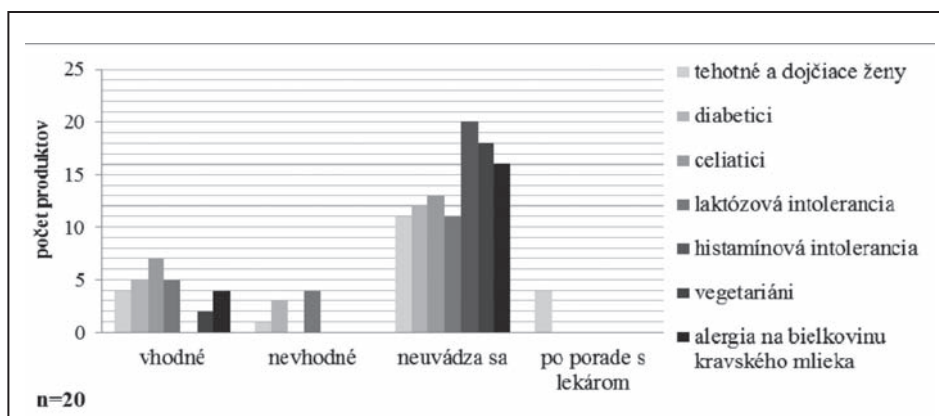
vylučovacej metódy pomocou elektronickej databázy farmaceutických a príbuzných produktov dostupných na Slovensku a k nej prislúchajúcich pomocných databáz (<https://www.adc.sk/>), a tiež pomocou webovej databázy Štátneho ústavu kontroly liečiv (<https://www.sukl.sk/>). Kritériom vyhľadávania boli vybrané probiotické mikroorganizmy prítomné v produkte ako špecifikované živé bakteriálne kultúry. Zo zisteného počtu prípravkov sme pre konkrétne hodnotenie vybrali produkty s jednoznačne definovaným kmeňom (označeným zbierkovým číslom) uvedeným na obale produktu. Sústredili sme sa najmä na prípravky s prioritnou indikáciou pri gastrointestinálnych infekciách, v databázach označených ako aktívne.

Na zistenie informovanosti farmaceutických pracovníkov o gastrointestinálnych infekciách a možnosti využitia probiotík v tejto oblasti sme využili dotazníkovú metódu. Dotazník pozostával z

Graf 3: Kombinácia kmeňov s inými probiotikami alebo látkami



Graf 4: Vhodnosť použitia probiotických produktov



20 otázok a bolo možné vyplniť ho v elektronickej podobe zverejnenej na webovej stránke, resp. v skupine, ktorej členmi sú farmaceuti, farmaceutickí laboranti a študenti farmácie v období od 01. 12. 2018 do 10. 01. 2019.

VÝSLEDKY

Hodnotenie probiotických produktov

Celkový počet produktov s obsahom vybraných probiotických mikroorganizmov bol podľa databáz 211, z toho bol presne špecifikovaný kmeň pri 96 prípravkoch. Kritériá pre hodnotenie spĺňalo 20 prípravkov. Na zastúpenie konkrétnych kmeňov v hodnotených produktoch poukazuje graf č. 1.

Menovite sme hodnotili nasledovné produkty: Enterol 250 mg cps dur (3)/plu por (1), ExHelico cps end (1), Dr. Max RebioMax ATB cps (1), BioGaia ProTectis gtt (2)/tbl (2), Livsane laktoaktívne tablety

pre deti (1), Dr. Max Probio Maxík gtt (1), Swiss Naturevia laktobacilky kids pastilky (2), Active flora baby gtt (1), Biopron Baby gtt (1), Probio-fix Imun gtt (1) a Probio-fix Inum cps (3). V zátvorke je uvedený počet veľkostí balení uvedených na slovenskom trhu. Väčšina produktov bola legislatívne zatriedená ako výživový doplnok, okrem humánnych liekov Enterol a BioGaia gtt, uvedených ako dietetické potraviny na osobitné medicínske účely.

Údaj o pôvode kmeňa, vid' graf č. 2, obsahovali produkty Swiss Naturevia laktobacilky a BioGaia Protectis kvapky.

Určenie vekovej skupiny užívateľov probiotík bolo uvedené na každom produkte. Na produkte Active flora baby bola navyše uvedená vhodnosť použitia u predčasne narodených detí a detí s nízkou pôrodnou hmotnosťou. Počet KTJ (kolóniu tvoriacich jednotiek) spĺňalo podľa všeobecnej schémy (108 až 1010 KTJ/mg) 80 % produktov. Kombinácia rôznych

probiotických kmeňov, znázornená v grafe č. 3, bola prítomná u 45 % produktov (RebioMax ATB, Livsane laktoaktívne tablety, Swiss Naturevia laktobacilky, Biopron Baby, Probio-fix Imun, Probio-fix Inum).

Spôsob uchovávanía produktov sa vo väčšine prípadov zhodoval, t. j. do 25 °C na suchom a tmavom mieste, chrániť pre vlhkosťou a priamym slnečným žiarením. Produkt Active flora baby bol jediný s uchovávaním pri 2 až 15 °C aj pred otvorením. Uchovávanie v chladničke po otvorení bolo uvedené v prípade Swiss Naturevia laktobacilky a Probio Maxík. Poznámka – najlepšie skladovať v chladničke – bola uvedená v prípade RebioMax ATB.

Vhodnosť použitia pre tehotné a dojčiace ženy bola vyznačená na obale produktov RebioMax ATB, BioGaia kvapky a Probio-fix Inum Trim, po porade s lekárom na produkte Enterol, ako nevhodný bol označený produkt ExHelico.

Vhodnosť pre diabetikov bola uvedená v prípade produktov RebioMax ATB, BioGaia žuvacie tablety, Livsane laktoaktívne tablety a Active flora baby. Obsah sacharózy bol uvedený v prípade Swiss Naturevia laktobacilky kids. Údaj o nevhodnosti použitia pre diabetikov chýbal na obale Probio-fix Imun s obsahom sacharózy.

Údaje o vhodnosti pre celiatikov boli prítomné na produktoch Livsane laktoaktívne tablety, Swiss Naturevia laktobacilky kids, Active flora baby a Probio-fix Inum. Informácie o obsahu laktózy sa nachádzali na produktoch Enterol. Naopak označenie „neobsahuje laktózu“ bolo uvedené v prípade Livsane laktoaktívne tablety, Active flora baby a Probio-fix Inum. Informácie o vhodnosti použitia pri histamínovej intolerancii sa nenachádzali ani na jednom produkte.

Informácia o vhodnosti použitia pri alergii na bielkovinu kravského mlieka bola uvedená na produktoch Active flora baby a Probio-fix Inum, vhodnosť pre vegetariánov bola vyznačená v prípade RebioMax ATB a Livsane laktoaktívne tablety. Všetky údaje o vhodnosti použitia vybraných probiotík sumarizuje graf č. 4.

Z doplnujúcich informácií boli uvedené: interakcie

a kontraindikácie (ExHelico), nežiaduce účinky (BioGaia), počet denných dávok (Probio Maxík), odkazy na klinické štúdie (Active flora baby), bez farbív a chemických látok (Swiss Naturevia laktobacilky kids), bez chuťových aditív (Probio-fix Inum). Pri kvapkách Biopron Baby chýbal údaj o spotrebe po otvorení.

Vyhodnotenie dotazníka

Prieskumu sa zúčastnilo spolu 100 respondentov: 74 farmaceutov, 16 farmaceutických laborantov a 10 študentov farmácie. Len 19 % opýtaných malo bližšie vedomosti o mechanizmoch, ktoré zohráva GIT pri imunitnej ochrane organizmu. Správnu odpoveď o spôsoboch prenosu a najčastejších pôvodcoch GIT infekcií na Slovensku uviedla správne takmer polovica opýtaných. O klinických prejavoch GIT infekcií malo prehľad 31 % respondentov. Hoci bol dotazník určený pre farmaceutickú skupinu respondentov, základnú terapiu GIT infekcií uviedlo správne len 36 % opýtaných. Z doplnkovej terapie uviedlo probiotickú suplementáciu až 74 % respondentov.

Vedomosti ohľadom mechanizmu účinku probiotík boli úplné len u 4 % farmaceutov. Polovica opýtaných označila za najvhodnejší kmeň pri GIT infekciách *Saccharomyces boulardii*. Väčšina respondentov bola názoru, že s užívaním probiotík nie sú spojené žiadne riziká. Až 98 % opýtaných si bolo vedomých, že na slovenskom trhu prevažujú probiotické produkty vo forme výživových doplnkov. Na obale probiotických produktov respondentom chýbali informácie o obsahu potravinových alergénov, indikácii kmeňov a optimálnej dĺžke užívania probiotík.

DISKUSIA

Podľa metaanalýzy má klinickými štúdiami signifikantne preukázaný účinok na zmiernenie prejavov akútnych hnačiek a prevenciu antibiotikami asociovaných hnačiek u detí a dospelých kmeň *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (Enterol) (McFarland a kol., 2018). Podľa nami vyhľadávaných zdrojov na ďalšie kmene prítomné v skúmaných

produktov, *S. boulardii* DBVPG 6763 (ExHelico) a *S. boulardii* CNCM I-1079 (RebioMax ATB) zatiaľ nebola aplikovaná, resp. zverejnená humánna klinická štúdia. Kmeň *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (BioGaia) má klinicky preukázaný účinok zníženia trvania hnačkových stavov v priemere o 24,8 hodín (McFarland a kol., 2018). Pre *L. reuteri* LR 92 MDX (ProbioMaxik) a *L. reuteri* HA-188 (Swiss Naturevia Laktobacilky) sme v nami vyhľadávaných databázach nenašli vypracované humánne klinické štúdie.

Naopak, pre kmeň *L. reuteri* 12246 (Livsane laktoaktívne tablety) boli dostupné dve klinické štúdie pre rôzne indikácie, podľa ktorých tento kmeň v spojení s *Lactobacillus rhamnosus* 19070-2 zmiernuje prejavy akútnej gastroenteritídy a znižuje dĺžku trvania hnačky (Rosenfeldt a kol., 2002). V jednej zo štúdií však chýbal počet pacientov, v druhej išlo o skupinu detských pacientov, a preto tieto výsledky nepostačujú na vyvodenie jednoznačného záveru účinku. Posledným kmeňom z hodnotených produktov bol *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (Active flora baby, Biopron baby, Probio-fix Imun/Inum), ktorý má klinicky overený a priaznivý účinok najmä pri akútnych gastroenteritídach a ATB asociovej hnačke u detských pacientov (McFarland a kol., 2018). Pre jednoznačný účinok u dospelých pacientov je potrebné vykonať viac klinických štúdií. Zaujímali nás aj klinické štúdie vykonané s hodnotenými prípravkami, tie sme však nezískali ani po kontaktovaní výrobcov. Referencie svojich prípravkov odkazovali na rôzne štúdie, často vykonané s nešpecifikovanými kmeňmi. Práve pre relevantnosť výsledkov pôsobenia probiotických kmeňov by bolo vhodné, aby metaanalýzy zhromažďovali výsledky štúdií špecifických kmeňov na konkrétnu indikáciu. Výsledky pôsobenia konkrétneho kmeňa totiž nemôžeme aplikovať na druh a rôzne indikácie.

Z celkového počtu produktov s obsahom vybraných kmeňov bol identifikovaný kmeň v 46 % prípadoch. Bez tejto informácie je náročné overiť vhodnosť použitia probiotického produktu na danú indikáciu. Počet KTJ uvedený na obale produktu

by mal zároveň odrážať reálny počet na konci doby trvanlivosti (Davidson, 2018). V našom výskume uviedol výrobca túto informáciu pri 6/20 produktov. Z praktického hľadiska by bolo vhodné, aby výrobcovia garantovali minimálny počet KTJ na konci doby expirácie za dodržania skladových podmienok, resp. očakávaný počet KTJ, ktorý sa reálne dostane do hrubého čreva.

Spôsob uchovávania probiotík by mal vychádzať z kriviek termostability pre daný kmeň, tie však nie sú bežnou súčasťou produktov. Podľa odborného článku v snahe o čo najvyššie zachovanie životaschopnosti probiotík je vhodnejšie ich uchovávanie pri chladničkej teplote (2 – 8 °C) (Kotlářová a kol., 2011). V našej analýze bolo uchovávanie v chladničke odporúčané v prípade 5/20 produktov. Keďže pre probiotické mikroorganizmy zatiaľ nebola stanovená referenčná výživová hodnota denného príjmu, každé dávkovanie by malo vychádzať z klinickej štúdie daného kmeňa. Okrem toho, v našej analýze v 9/20 produktov boli prítomné aj iné probiotické mikroorganizmy. Dokumentáciu o synergii sme získali iba v prípade produktov Probio-fix. Nezávisle od produktov však už bolo vykonaných množstvo klinických štúdií potvrdzujúcich synergiu niektorých probiotických kmeňov. Bolo by vhodné, aby výrobca disponoval týmito údajmi a boli by verejne dostupné. Názor respondentov na optimálnu dĺžku užívania probiotík v prípade GIT infekcií sa v 96 % zhodoval s odbornou literatúrou, a teda že v užívaní je potrebné pokračovať minimálne týždeň po vymiznutí klinických príznakov (Štefanovič a kol., 2007). Takmer polovica opýtaných uviedla, že denná dávka probiotík predstavuje 10 miliárd KTJ, čo je logické, keďže sa s týmto údajom respondenti často stretávajú v praxi na etiketách produktov. Podľa odborných článkov sa uznáva, že probiotický produkt má obsahovať minimálne počty zistené ako účinné v klinických štúdiách (Kechagia a kol., 2013). Z vhodných liekových foriem uviedlo 29 % opýtaných tablety, tie však z dôvodu vysokých teplôt pri výrobe vedú k usmrteniu probiotických mikroorganizmov, a preto nie sú vhodnou voľbou. K

faktorom ovplyvňujúcim vitalitu probiotík priradilo až 77 % opýtaných aj prebiotiká, ktoré sú síce zdrojom výživy pre probiotické mikroorganizmy, nie však limitujúcim faktorom ich životnosti, na čo poukazuje aj vedecký článok (Călinoiu a kol., 2016). Väčšia časť respondentov bola názoru, že probiotický výrobok sa nepovažuje za bezpečný, ak výrobca nemá zdokumentovanú synergii použitých kmeňov. S týmto názorom sa stotožňuje aj odborná literatúra. Výrobca by mal deklarovať synergii zvolených kmeňov, tak isto by sa mala zdokumentovať aj informácia, či môže konzumácia iných potravín alebo liekov zvýšiť alebo znížiť účinok výrobku (Kotlářová a kol., 2011).

ZÁVER

Z hľadiska bezpečnosti je dôležité, aby pre probiotiká existovala podrobnejšia dokumentácia na základe humánnych klinických štúdií. Je dôležité poznamenať, že účinnosť probiotík zistená v klinickej štúdii je špecifická pre daný kmeň alebo kombináciu kmeňov a pre konkrétnu indikáciu. Otázkou budúcich štúdií zostáva optimálna dávka probiotík, dĺžka liečby a bezpečnosť u imunokompromitovaných pacientov. Hoci sme do hodnotenia zahrnuli len prípravky s presne identifikovaným kmeňom, ani jeden z produktov neobsahoval všetky potrebné údaje stanovené cieľom štúdie. Výrobcovia by mali dbať na úplnosť informácií na obale produktov, aby bola dosiahnutá relevantná dispenzácia zo strany farmaceutických pracovníkov a spokojnosť zo strany pacientov. Z výsledkov prieskumu vyplýva, že je potrebné zvýšiť povedomie farmaceutických pracovníkov najmä o základnej terapii črevných infekcií, resp. o skutočnosti, akým látkam je potrebné sa v rámci terapie vyhnúť. Tak isto je potrebné zvýšiť informovanosť o možných rizikách spojených s užívaním probiotík.

POĎAKOVANIE

Predkladaná štúdia bola vypracovaná na Ústave mikrobiológie a gnotobiológie Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach a

podporená bola finančnými prostriedkami z projektu APVV-15-0377.

ZOZNAM LITERATÚRY

Antolová, D., Avdičová, M., Bedriová, M., Belay, G., Bizub, V., Csank, T., Výrostková, J.: *Správa o zoonózach, alimentárnych nákazách a nákazách z vody v Slovenskej republike za rok 2017: výročná správa*. Bratislava: Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR, 2018. 19 s.

Călinoiu, L. F., Vodnar, D. C., Precup, G.: The probiotic bacteria viability under different conditions. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 2016, roč. 73, 55 – 60. https://www.researchgate.net/publication/312429299_A_Review_The_Probiotic_Bacteria_Viability_under_Different_Conditions. Accessed February 15, 2019.

Davidson, J.: *Understanding probiotic potency: CFU, shelflife and label claims*. <https://www.deerland.com/chew/understanding-probiotic-potency-cfu-shelf-life-and-label-claims/>. Updated February 15, 2019. Accessed February 15, 2019.

Goering, R., Dockrell, H., Zuckerman, M., Roitt, I., Chiodini, P.: *Mims' Medical Microbiology*. 5th edn. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2012. 580 p.

Hrubiško, M., Kuchta, M., Huorka, M., Jarčuška, P., Paraličová, Z., Mučaji, P.: *Probiotiká ako súčasť imunitného systému človeka*. Bratislava: Vydavateľstvo Bonus, 2012. 215 s.

Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., Fakiri, E. M.: Health benefits of probiotics: A Review. *ISRN Nutrition*, 2013, roč. 2013, 1 – 8. <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/481651/>. Accessed January 10, 2019.

Kotlářová, L. Pravda a mýty o probiotikách. *Farmi NEWS*, 2011, 3, 26 – 28.

McFarland, L. V., Evans, Ch. T., Goldstein, E. J. C.: Strain-specificity and disease-specificity of probiotic efficacy: A systematic review and meta-Analysis. *Frontiers in Medicine*, 2018, 5, 1 – 14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>

PMC5949321/. Accessed February 2, 2019.

Minárik, P. a Mináriková, D.: Úloha probiotík pri udržiavaní zdravého tráviaceho a imunitného systému. *Praktické lekárnictvo*, 2017 7, 2, 66 – 70.

Mináriková, D.: *Hnačka a jej liečba*. <https://www.meditrend.sk/wp-content/uploads/2018/05/ADT-Studijny-material-1.pdf>. Updated December 20, 2018. Accessed December 20, 2018.

Nemcová, R., Styková, E., Englerová, K.: Využitie probiotických baktérií a ich bioaktívnych produktov pri kožných ochoreniach. *Folia Pharmaceutica Cassoviensia*, 2019, 1, 3, 43 – 58.

Rosenfeldt, V., Michaelsen, K. F., Jakobsen, M., Larsen, C. N., Møller, P. L., Pedersen, P., Tvede, M., Weyrehter, H., Valerius, N. H., Paerregaard, A.:

Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *The pediatric infectious disease journal*, 2002, 21, 5, 411 – 416. <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=12150178>. Accessed February 21, 2019.

Seifert, B., Beneš, J., Karen, I., Vojtíšková, J., Lukáš, K., Hep, A.: *Akutní průjem u dospělých: Suplementum*. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2015. 9 s.

Štefanovič, J., Kuchta, M., Pružinec, P.: Probiotiká, ich miesto a využitie v medicíne. *Medical practice*, 2007, 2, 2, 1, 8 – 9.

Thon, V.: Intestinální mikroflóra v raném dětství – úloha při rozvoji infekčních a alergických chorob. *Pediatrica pre prax*, 2011, 12, 4, 150 – 153.



FYTOALEXÍN Z ČELADE *BRASSICACEAE* A JEHO PROTINÁDOROVÝ POTENCIÁL

PHYTOALEXIN FROM THE *BRASSICACEAE* FAMILY AND ITS ANTITUMOR POTENTIAL

Haburajová, D., Balážová, L., 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

Vyšší príjem kapustovitej zeleniny bol v mnohých prípadoch v inverznom vzťahu s rizikom vzniku rakovinového ochorenia, pričom táto asociácia bola výraznejšia ako pri príjme zeleniny a ovocia vo všeobecnosti. Kapustovité rastliny sú bohatým zdrojom glukozinolátov a unikátnych, síru obsahujúcich fytoalexínov. Cieľom tejto štúdie bolo štúdium protinádorového potenciálu indolového fytoalexínu, homobrasinínu. Jedným zo základných rysov karcinogenézy je schopnosť rakovinových buniek metastázovať. Keďže vaskularizácia nádoru je rozhodujúca pre jeho progresiu z malého, presne lokalizovaného tumoru až k rozširujúcemu sa nádoru so schopnosťou

metastázovania, potlačenie rastu krvných ciev – angiogenézy je v súčasnosti kľúčovou stratégiou v boji proti rakovinovým ochoreniam. Vplyv fytoalexínu homobrasinínu na vazoaktivitu a angiogenezu bol skúmaný tzv. CAM metódou, ktorou sa sledujú iritačné vplyvy a angiogenéza na chorioalantoickej membráne kuracieho embrya. Homobrasinín v našom experimente nevykazoval antiangiogénny účinok, naopak, priemerný prírastok vetvenia ciev sa po 72 hodinách od jeho aplikácie v závislosti od koncentrácie mierne zvyšoval. Výsledná iritácia homobrasinínu na cievy CAM (chorioalantoická membrána) bola v súlade s klasifikáciou podľa Luepke (1985) vyhodnotená ako slabá. Výsledky štúdie naznačujú, že homobrasinín pravdepodobne nemá

schopnosť ovplyvňovať proces angiogenézy v prospech antikancerogénneho účinku a jeho ďalšie skúmanie v oblasti onkologickej problematiky by bolo vhodnejšie založiť na odlišnom mechanizme účinku.

Kľúčové slová: angiogenéza; indolové fytoalexíny; izotiokyanáty; kapustovité rastliny; karcinogenéza

ABSTRACT

In many cases, an inverse relationship between the intake of Brassica vegetable and the cancer risk was confirmed and this association was found to be stronger than association related to intake of fruit and vegetable in general. Brassica plants are rich sources of glucosinolates and the unique, sulfur containing phytoalexins. The aim of this study was to investigate antitumor potential of the selected indole phytoalexin homobrassinin. The ability to metastasize is one of the basic features of cancer cells. Vascularization of a tumour is crucial for its progression from a small, strictly localized tumour to an expanding cancer with the ability to metastasize. That is why suppression of vessel growth is the key strategy to fight against cancer disease. We studied the effect of the selected phytoalexins on vasoactivity and angiogenesis by the CAM assay. This method allows watching an irritation potential and angiogenesis on the chorioallantoic membrane. In our study, homobrassinin did not show any antiangiogenic effect. The average growth of vessel branching was in contrast with our expectations. Application of homobrassinin caused increase in the average growth of vessel branching depending on its concentration after 72 hours from its application. According to Luepke classification (1985), the resulting irritation of homobrassinin on the CAM (chorioallantoic membrane) vessels was evaluated as mild. Results of our study suggest that the tested phytoalexin probably does not have any

antiangiogenic potential and the following studies of its anticancer potential should be based on different mechanism of action.

Key words: angiogenesis; carcinogenesis; cruciferous plants; indole phytoalexins; isothiocyanates.

ÚVOD

Početné vedecké štúdie a práce poukazujú na koreláciu medzi zvýšenou konzumáciou kapustovitej zeleniny a zníženou incidenciou nádorových ochorení pľúc (Lam a kol., 2009), prsníka (Minich a Bland, 2007), hrubého čreva (Tse a Eslick, 2014), žalúdka (Keck a Finley, 2004), prostaty (Kirsh a kol., 2007), ovárií (Han a kol., 2014), non-Hodginského lymfómu (Pham a kol., 2004) a močového mechúra (Tang a Zhang, 2005).

Rovnako ako ostatná zelenina, aj kapustovité rastliny obsahujú množstvo živín a fytochemikálií, ktoré pôsobia priaznivo na zdravie človeka, no rastliny z čeľade *Brassicaceae* sú jedinečné svojím bohatým zdrojom glukozinolátov, čo sú z chemického hľadiska síru obsahujúce zlúčeniny zodpovedné sa štiplavú arómu, pikantnejšiu a horkastú chuť týchto rastlín (Drewnowski a Gomez-Carneros, 2000). Glukozinoláty sa zaraďujú medzi sekundárne metabolity rastlín, ktoré však samotné nevykazujú významnú biologickú aktivitu. Aktívne sú až produkty ich hydrolýzy (Higdon a kol., 2007). Kapustovité rastliny sú podľa všetkého jediné, ktoré produkujú síru obsahujúce indolové fytoalexíny (Mezencev a kol., 2003). Indolové fytoalexíny sú svojou štruktúrou podobné glukozinolátom a niektoré glukozinoláty sú prekurzormi fytoalexínov (Kimber a McGregor, 1995). Ako sekundárne antimikrobiálne metabolity sú indolové fytoalexíny syntetizované *de novo* v reakcii na biotický či abiotický stres (Pedras a Yaya, 2010). Ich presný antikancerogénny účinok zatiaľ nie je úplne objasnený (Mezencev a kol., 2003). Dokázaný však bol ich priaznivý účinok na bunkový cyklus a apoptózu v procese karcinogenézy (Izutani,

2012; Kim a kol., 2014; Pilatova a kol., 2013).

Hydrolytické produkty glukozinolátov, izotiokyanáty, majú okrem iného aj antiangiogénnu aktivitu, ktorá bola v mnohých štúdiách pozorovaná aj v *in vivo* podmienkach. Tieto účinky boli dokonca pozorované už na úrovni expresie proangiogénnych faktorov. Keďže angiogenezou vzniknuté nové cievy zásobujú nádorové bunky kyslíkom a živinami, potlačenie rastu krvných ciev je v súčasnosti kľúčovou stratégiou v boji proti rakovinovým ochoreniam (Thejass a Kuttan, 2007; Xiao a Singh, 2007; Boreddy a kol., 2011).

MATERIÁL A METÓDY

V našej štúdii sme testovali antiangiogénny efekt homobrasinínu. Syntéza tejto látky bola vykonaná na Katedre organickej chémie PF UPJŠ pod vedením Doc. RNDr. P. Kutschyho, CSc. Látka bola následne rozpustená v dimetyl sulfoxide (DMSO), pričom finálna koncentrácia DMSO bola menšia ako 0,2 % a nevykazovala cytotoxický účinok.

Experiment sme realizovali v dvoch zhodne prebiehajúcich cykloch za použitia menovanej vzorky fytoalexínu. Cyklus sme vykonávali počas šiestich dní s presne určenými časovými odstupmi.

V prvý deň cyklu sme mali k dispozícii 30 kusov oplodnených slepačích vajčiek. Každé vajčko sme vložili do inkubačnej liahne s automatickým otáčaním (Incubator ET 49, AUTOMATIC River systems SRL, Taliansko) ostrým koncom smerom nadol. V inkubačnej liahni sme neustále zabezpečovali optimálnu vlhkosť pre vývin kuracích embryí ($62,5 \pm 7,5$ %), teplota bola nastavená a udržiavaná na hodnote 38 °C, automatické otáčanie inkubátora bolo zapnuté.

V práci sme pokračovali nasledujúci deň. Na každom vajčku sme na jeho tupom konci na mieste, kde sa nachádza vzduchová bublina, v škrupine urobili malý otvor, cez ktorý sme odobrali 2,0 ml albumínu. Otvor v škrupine sme zalepili lepiacou páskou. Vajčka sme nechali takto inkubovať 48 hodín, pričom teplota a vlhkosť v inkubátore boli

neustále sledované.

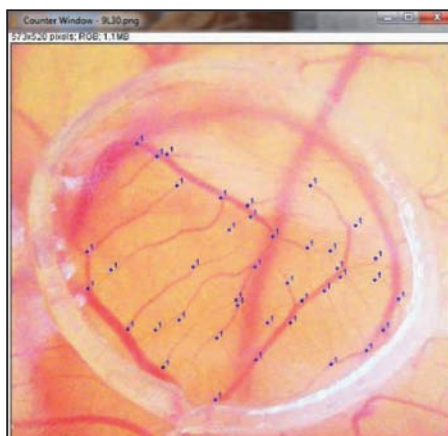
Na piaty deň sme už mohli pozorovať vyvíjajúci sa cievny systém vo vysoko vaskularizovanej chorioalantoickej membráne embrya. Predtým sme však pomocou nožníc vystrihli otvor na ostrom konci vajčiek s priemerom približne 2 až 3 cm. Následne sme opatrne stiahli papierovú blanú, čím sme obnažili chorioalantoickú membránu. Vystrihnutý otvor sme čo najskôr prelepili a vajčka urýchlene vložili späť do inkubátora, aby sme minimalizovali vplyv vonkajších stresových podmienok. Vajčka sa takto inkubovali ďalších 48 hodín pri stanovenej teplote a dostatočnej vlhkosti, avšak automatické otáčanie inkubátora sme po tomto kroku vypli.

Ďalej sme pokračovali na ôsmy deň, kedy sme do každého vajčka cez vystrihnutý otvor vložili dva silikónové krúžky. Do nasledujúceho dňa sa krúžky k membráne prichytili a počas deviateho dňa sme mohli prejsť k hlavnej časti našej štúdie. Tento deň už bolo možné vyhodnocovať vazoaktivitu po aplikácii našej účinnej látky. Angiogenézu sme vyhodnocovali po 72 hodinách, teda na dvanásty deň.

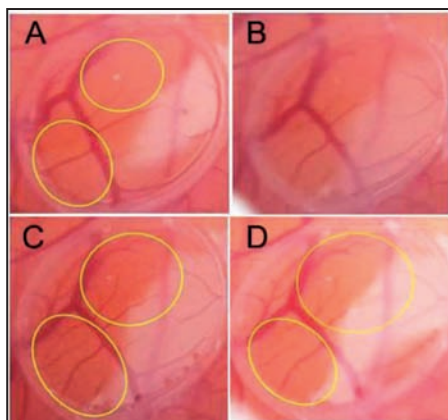
Ako účinnú látku sme použili homobrasinín, ktorý bol skladovaný v mraziacom boxe v mikroskúmavke. Koncentrácia tejto látky bola $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$, teda 50 μM . Homobrasinín sme po jeho rozmrazení nariedili pomocou fyziologického roztoku na koncentrácie 30 μM , 100 μM a 300 μM . Vajčka sme rozdelili do štyroch skupín. Prvá skupina zodpovedala kontrole a zvyšné tri skupiny prislúchali riedeniam. Jednotlivé oblasti ciev nachádzajúce sa v krúžkoch sme pred aplikáciou homobrasinínu najskôr vyfotografovali. Následne sme pomocou mikropipiet aplikovali 20 μl látky do oblasti krúžkov. Po tejto aplikácii sme oblasti ciev v krúžkoch vyfotografovali po 30 sekundách, 2 minútach a 5 minútach, čo nám umožnilo sledovať potenciálne iritačné účinky po aplikácii homobrasinínu. Kontrolnú skupinu vajec sme vyfotografovali po aplikácii 20 μl fyziologického roztoku. Pre vyššiu kvalitu výsledných fotografií sme pri fotení použili zväčšujúci softvér (Optika PRO 5 Digital camera, Taliansko).

Nasledujúcich 72 hodín sa vajčka naďalej

Obr. 1: Metóda stanovenia angiogenézy počítaním vetvenia ciev



Obr. 2: Iritačný účinok homobrasinínu s koncentráciou 30 μ M v určených časových intervaloch: (A) 0 min (B) 0,5 min (C) 2 min (D) 5 min. Pozorovaná vazodilatácia v čase 2 a 5 minút.



inkubovali pri nezmenených podmienkach. Po tomto časovom intervale sme jednotlivé krúžky opäť vyfotografovali. Fotografie sme po ich úprave vyhodnocovali v programe ImageJ (1.48v Wayne Rasband National Institutes of Health, USA).

Stanovenie vazoaktivity ciev chorioalantoickej membrány

Vazoaktivitu ciev chorioalantoickej membrány (CAM) po aplikácii fytoalexínu sme skúmali z dôvodu zistenia jeho potenciálneho iritačného efektu, ktorý by bol pri teoretickom využití týchto látok v praxi neprípustný. Pri stanovení sme sa riadili metódou podľa N. P. Luepke (1985), pri ktorej sa vazoaktivita vyhodnocuje po 30 sekundách a po 2 a 5 minútach od aplikácie testovanej látky.

Stanovenie angiogenézy ciev chorioalantoickej membrány

Angiogenézu sme stanovovali po 72 hodinách od aplikácie testovanej látky do oblasti krúžku. Pre získanie výsledkov tohto stanovenia sme sledovali a počítali každé miesto v krúžku, kde došlo k vetveniu ciev. Dôležité pre toto vyhodnotenie boli teda fotografie krúžkov, ktoré sme vložili do programu Image J 1.48, umožňujúceho počítanie jednotlivých vetvení ciev (viď obr. 1).

VÝSLEDKY

Stanovenie vazoaktivity

Pri koncentrácii homobrasinínu 30 μ M bola v 60 % vyhodnocovaných prípadov pozorovaná veľmi mierna vazodilatácia s následnou hyperémiou

Tab. 1: Sumárne vyhodnotenie priemerného prírastku vetvenia ciev chorioalantoickej membrány po aplikácii homobrasíninu

	Priemerný prírastok vetvenia ciev [%]	STDEV	Max.	Min.
Kontrola	55,34	30,26	89,13	21,62
Homobrasínin 30 μ M	54,36	37,05	108,33	18,92
Homobrasínin 100 μ M	65,39	38,84	92,86	37,93
Homobrasínin 300 μ M	117,62	50,03	150,00	60,00

v čase 2 a/alebo 3 minút (viď obr. 2). Hyperémia bola najlepšie pozorovateľná na menších cievach, ktoré sa po aplikácii homobrasíninu zvýraznili. Po aplikácii homobrasíninu s koncentráciou 100 μ M a 300 μ M neboli na cievach CAM pozorované žiadne zmeny. Výsledný iritačný efekt homobrasíninu bol vyhodnotený ako slabý (Luepke, 1985).

Stanovenie angiogenézy

Vyhodnotenie angiogenézy ciev chorioalantoickej membrány po 72 hodinách od aplikácie homobrasíninu znázorňuje tabuľka 1.

Z tabuľky vyplýva, že homobrasínin stimuluje vetvenie ciev, t. j. angiogézu v závislosti od koncentrácie. Aj keď najnižšia koncentrácia spôsobila takmer zhodný nárast vetvenia ciev oproti kontrole, s postupne sa zvyšujúcou koncentráciou homobrasíninu sa zvyšoval aj priemerný prírastok vetvenia ciev.

DISKUSIA

V našom experimente sme sa venovali štúdiu antikancerogénneho potenciálu vybraného fytoalexínu – homobrasíninu. Konkrétne sme zisťovali vplyv tohto fytoalexínu na angiogézu, ktorá hrá v progresii rakoviny dôležitú úlohu, keďže proliferácia a metastatické šírenie rakovinových buniek závisí od adekvátnej dodávky kyslíka a živín a odstraňovania odpadových produktov. Práve úroveň expresie angiogénnych faktorom odrážajú agresivitu

nádorových buniek, preto nájdenie vhodných angiogénnych inhibítorov by malo byť kľúčovým v boji proti rakovine (Nishida a kol., 2006). Vplyv testovaného fytoalexínu na angiogenetickú aktivitu sme sledovali prostredníctvom systému vysoko vaskularizovaných chorioalantoických membrán na modeli vyvíjajúcich sa kuracích embryí.

Samotný homobrasínin v našom experimente nevykazoval antiangiogénny účinok. Naopak, po 72 hodinách od aplikácie homobrasíninu na cievy CAM sa priemerný prírastok vetvenia ciev v závislosti od koncentrácie homobrasíninu zvyšoval, čo je v kontraste s účinkom, ktorý sme očakávali. Izotiokyanáty, zlúčeniny biogeneticky príbuzné indolovým fytoalexínom, vykazovali antiangiogénny účinok na niektorých bunkových líniách (HUVEC, PC-3) (Xiao a Singh, 2007). Avšak okrem mnohých pozitívne publikovaných štúdií o prospešných a antikancerogénnych účinkoch ITK, rôznymi výskumnými skupinami boli hlásené aj negatívne správy o pôsobení ITK, napr. fenetylizotiokyanát v *in vivo* experimente na modeli potkana dokonca indukoval proces karcinogenézy močového mechúra. Mnohé *in vitro* štúdie a následné *in vivo* experimenty poukázali, že tieto fytochemikálie môžu teda mať priaznivé, ako aj škodlivé účinky v závislosti od času ich podávania či podávaného množstva (Masutomi a kol., 2001; Okazaki a kol., 2003; Agaki a kol., 2003; Kumar a kol., 2015).

Aj keď homobrasínin podľa nášho experimentu nemá schopnosť inhibovať proces angiogenézy, iné

štúdie poukázali na jeho antikancerogénny potenciál, ktorý je výsledkom odlišného mechanizmu účinku. Po iba 24 hodinách inkubácie s homobrasíninom bola zistená redistribúcia obsahu buniek do G2/M. Akumulácia buniek v G2/M naznačuje možnú interakciu tejto látky s tubulínom (Chripkova a kol., 2014).

Indolové fytoalexíny predstavujú základ pre syntézu niekoľkých substituovaných derivátov s cieľom nájsť ich výraznejšie antiproliferatívne a chemopreventívne účinky (Chripkova a kol., 2014). Syntetizované a skúmané boli viaceré deriváty cyklobrasíninu, ktoré vznikli nahradením jeho SCH3 skupiny. Niekoľko nových analógov preukázalo vyšší antiproliferatívny potenciál ako prírodný fytoalexín na niektorých rakovinových bunkových líniiach (bunky Jurkat, MCF-7, MDA-MB-23, HeLa, CCRF-CEM a A-549) (Budovská a kol., 2013).

Pred vyhodnotením účinku homobrasíninu na proces angiogenézy sme sa venovali nemenej dôležitému iritačnému potenciálu, ktorý nám poskytol informáciu o bezpečnosti použitia vybranej látky z hľadiska toxicity. Homobrasínín preukázal potenciálne iritačné vlastnosti a jeho výsledná iritácia bola v súlade s klasifikáciou podľa Luepke (1985) vyhodnotená ako slabá. Toto pôsobenie bolo pozorované po aplikácii homobrasíninu s najnižšou určenou koncentráciou (30 μM), zatiaľ čo koncentrácie 100 μM a 300 μM nespôsobili na cievach žiadne pozorovateľné zmeny. Táto zmena môže úzko súvisieť so štruktúrou homobrasíninu. Fytoalexín brasínín (teda aj homobrasínín) a 1-metoxýbrasínín obsahujú ditiokarbamátovú skupinu (Takasugi a kol., 1986), pričom práve ditiokarbamáty sú pesticídmi a herbicídmi (Pedras a Yaya, 2010). Ditiokarbamátové fungicídy majú široké využitie. Pozorované boli ich nízke toxické účinky na organizmus cicavcov, ich dermálna toxicita je taktiež nízka, aj keď ich náhle použitie spôsobuje príležitostné podráždenie kože, zápal spojiviek, bronchitídu a pod. (Matsushita a kol., 1976). Aj keď mierne hyperemické zmeny na cievach CAM spôsobil homobrasínín s najnižšou určenou koncentráciou, pre jeho využitie v praxi

by bolo ďalšie skúmanie toxikologických vlastností tohto fytoalexínu nevyhnutné.

ZÁVER

Výsledky tejto štúdie môžeme zhrnúť do nasledujúcich bodov:

1. Iritačný potenciál homobrasíninu, pozorovaný pri jeho najnižšej koncentrácii (30 μM), bol výsledne vyhodnotený ako slabý, preto by bolo potrebné ďalšie preskúmanie jeho toxikologických vlastností.
2. Homobrasínín nepreukázal antiangiogénnu aktivitu, naopak, priemerný nárast vetvenia ciev sa v závislosti od koncentrácie mierne zvyšoval.

ZOZNAM LITERATÚRY

Agaki, K., Sano, M., Ogawa, K., Hirose, M., Goshima, H., Shirai, T.: Involvement of Toxicity as an early event in urinary bladder carcinogenesis induced by phenethyl isothiocyanate, benzyl isothiocyanate, and analogues in F344 rats. *Toxicologic pathology*, 2003, 31, 388 – 396.

Boreddy, S. R., Sahu, R. P., Srivastava, S. K.: Benzyl isothiocyanate suppresses pancreatic tumor angiogenesis and invasion by inhibiting HIF- α /VEGF/Rho-GTPases: pivotal role of STAT-3. *PLoS One*, 2011;6(10):e25799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025799>

Budovská, M., Pilátová, M., Varinská, L., Mojžiš, J., Mezencev, R.: The synthesis and anticancer activity of analogs of the indole phytoalexins brassinin, 1-methoxyspirobrassinol methyl ether and cyclobrasinin. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2013, 21, 6623 – 6633.

Chripkova, M., Drutovic, D., Pilatova, M., Mikes, J., Budovska, M., Vaskova, J., Broggin, M., Mirossay, L., Mojžiš, J.: Brassinin and its derivatives as potential anticancer agents. *Toxicology in Vitro*, 2014, 28, 909 – 915.

Drewnowski A. a Gomez-Carneros, C.:

- Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 72, 1424 – 1435.
- Han, B., Li, X., Yu, T.: Cruciferous vegetables consumption and the risk of ovarian cancer: a meta-analysis of observational studies. *Diagnostic Pathology*, 2014, 9:7 <https://doi.org/10.1186/1746-1596-9-7>.
- Higdon J. V., Delage, B., Williams, D. E., Dashwood, R. H.: Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research*, 2007, 55, 224 – 236.
- Izutani, Y., Yogosawa, S., Sowa, Y., Sakai, T.: Brassinin induces G1 phase arrest through increase of p21 and p27 by inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in human colon cancer cells. *International Journal of Oncology*, 2012, 40, 816 – 824.
- Keck A. S., Finley, J. W.: Cruciferous Vegetables: Cancer Protective Mechanisms of Glucosinolate Hydrolysis Products and Selenium. *Integrative Cancer Therapies*, 2004, 3, 5 – 12.
- Kim, S. M., Park, J. H., Kim, K. D., Nam, D., Shim, B. S., Kim, S. H., Ahn, K. S., Choi, S. H., Ahn, K. S.: Brassinin induces apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells through the suppression of PI3K/Akt/mTOR/S6K1 signaling cascades. *Phytotherapy Research*, 2014, 28, 423 – 431.
- Kimber, D. S. a McGregor, D. I.: Brassica oilseeds. *Chemické listy*, 1995, 99, 455 – 466.
- Kirsh, V. A.: Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 2007, 99, 1200 – 1209.
- Kumar, G., Tuli, H. S., Mittal, S., Shandilya, J. K., Tiwari, A., Sandhu, S. S.: Isothiocyanates: a class of bioactive metabolites with chemopreventive potential. *Tumor Biology*, 2015, 36, 4005 – 4016.
- Lam, T. K., Gallicchio, L., Lindsley, K., Shiels, M., Hammond, E., Tao, X. G., Chen, L., Robinson, K. A., Caulfield, L. E., Herman, J. G., Guallar, E., Alberg, A. J.: Cruciferous vegetable consumption and lung cancer Risk: A systematic review. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 2009, 18, 184 – 195.
- Luepke, N. P.: Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology*, 1985, 23, 287 – 291.
- Masutomi, N., Toyoda, K., Shibutani, M., Niho, N., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M.: Toxic effects of benzyl and allyl isothiocyanates and benzyl-isoform specific metabolites in the urinary bladder after a single intravesical application to rats. *Toxicologic Pathology*, 2001, 29, 617 – 622.
- Matsushita, T., Arimatsu, Y., Nomura, S.: Experimental study on contact dermatitis caused by dithiocarbamates maneb, mancozeb, zineb, and their related compounds. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 1976, 37, 169 – 178.
- Mezencev, R., Mojzis, J., Pilatova, M., Kutschy, P.: Antiproliferative and cancer chemopreventive activity of phytoalexins: focus on indole phytoalexins from crucifers. *Neoplasma*, 2003, 50, 239 – 245.
- Minich, D. M., Bland, J. S.: A Review of the Clinical Efficacy and Safety of Cruciferous Vegetable Phytochemicals. *Nutrition Reviews*, 2007, 65, 259 – 267.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., Kojiro, M.: Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management*, 2006, 2, 213 – 219.
- Okazaki, K., Umemura, T., Imazawa, T., Nishikawa, A., Masegi, T., Hirose, M.: Enhancement of urinary bladder carcinogenesis by combined treatment with benzyl isothiocyanate and N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in rats after initiation. *Cancer Science*, 2003, 94, 948 – 952.
- Pedras, M. S. C. a Yaya, E. E.: Phytoalexins from Brassicaceae: news from the front. *Phytochemistry*, 2010, 71, 1191 – 1197.
- Pham, N. A., Jacobberger, J. W., Schimmer, A. D., Cao, P., Gronda, M., Hedley, D. W.: The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress

in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2004, 3, 1239 – 1248.

Pilatova, M., Ivanova, L., Kutschy, P., Varinska, L., Saxunova, L., Repovska, M., Sarissky, M., Seliga, R., Mirossay, L., Mojzis, J.: *In vitro* toxicity of camalexin derivatives in human cancer and noncancer cells. *Toxicology in Vitro*, 2013, 27, 939 – 944.

Takasugi, M., Katsui, N., Shirata, A.: Isolation of three novel sulphur-containing phytoalexins from the chinese cabbage *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (cruciferae). *Journal of the Chemical Society. Chemical Communications*, 1986, 14, 1077 – 1078.

Tang L. a Zhang, Y.: Mitochondria are the primary target in ITC-induced apoptosis in human bladder cancer UM-UC-3 cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2005, 4, 1250 – 1259.

Thejass, P. a Kuttan, G.: Inhibition of endothelial cell differentiation and proinflammatory cytokine production during angiogenesis by allyl isothiocyanate and phenyl isothiocyanate. *Integrative Cancer Therapies*, 2007, 6, 389 – 399.

Tse G. a Eslick, G.D.: Cruciferous vegetables and risk of colorectal neoplasms: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition and Cancer*, 2014, 66, 128 – 139.

Xiao D. a Singh S. V.: Phenethyl isothiocyanate inhibits angiogenesis *in vitro* and *ex vivo*. *Cancer Research*, 2007, 67, 2239 – 2246.



VPLYV PROBIOTICKEJ BAKTÉRIE A KAMPYLOBAKTÉRIOVEJ INFEKcie NA IMUNOLOGICKÉ UKAZOVATELE U MODELOVÉHO ZVIERAĽA

INFLUENCE OF PROBIOTIC BACTERIA AND CAMPYLOBACTERIAL INFECTION ON IMMUNE PARAMETERS IN A MODEL ANIMAL

Revajová, V.¹, Beslerová, M.¹, Levkutová, M.², Levkut, M. Sr.^{1,3}

¹Ústav patologickej anatómie, ²Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Komenského 73, 041 81 Košice

³Neuroimunologický ústav SAV

Dúbravská cesta 5799/9, 845 10 Bratislava

Slovenská republika

viera.revajova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Imunitná odpoveď kurčiat infikovaných *Campylobacter coli* po preventívnej aplikácii *Lactobacillus fermentum* bola sledovaná hematologicky vyšetrením bieleho krvného obrazu a prietokovou cytometriou stanovením imunokompetentných buniek v krvi. Za týmto účelom bolo celkovo 120 jednodňových *Campylobacter* spp. negatívnych kurčiat brojlerového plemena COBB 500 rozdelených do 4 skupín (n = 30). Kontrolná skupina (K) bola kŕmená iba komerčnou diétou, Lf skupine bol denne počas prvých 7 dní pokusu orálne individuálne aplikovaný *Lactobacillus*

fermentum Biocenol™ LF99 (CCM14). Skupina Cc bola jednorazovo na 4. deň aplikácie probiotika perorálne infikovaná *Campylobacter coli*. Kombinovanej skupine Lf/Cc bol preventívne aplikovaný *Lactobacillus fermentum* ako Lf skupine a *Campylobacter coli* ako Cc skupine. Experiment trval celkovo 12 dní s odbermi vykonanými na 4. a 7. deň po *C. coli* čelenži. Hodnoty bieleho krvného obrazu (celkové leukocyty, lymfocyty, heterofily, eozinofily, monocyty) na 4. deň po infekcii (dpi) preukázali nesignifikantné zvýšenie v Lf a Lf/Cc skupinách v porovnaní s K a Cc skupinami. Na 7. dpi iba hodnoty heterofilov v Lf/Cc skupine prevýšili počty v Cc skupine. Prietoková cytometria periférnej krvi na 4. dpi

preukázala stimuláciu CD8⁺ a IgM⁺ lymfocytov v oboch probiotických skupinách, Lf aj Lf/Cc. Na 7. dpi dosiahla skupina Cc najvyššie počty všetkých meraných lymfocytárných subpopulácií (CD3, CD4, CD8, IgM, IgA, CD45) v porovnaní s Lf, Lf/Cc a K skupinami so signifikanciou ($P < 0.05$) v CD3⁺ a CD8⁺ fenotypoch. Dosiahnuté výsledky naznačujú, že pre zvládnutie infekcie je potrebná aktivácia tak vrodenej, ako aj adaptívnej imunitnej odpovede. Napriek potenciálu probiotického kmeňa stimulovať leukocyty a imunokompetentné bunky v krvi nedošlo v priebehu pokusu k inhibícii *C. coli* infekcie.

Kľúčové slová: *Campylobacter* spp.; imunita; kurča; *Lactobacillus* spp.; prietoková cytometria

ABSTRACT

Immune response in chickens infected with *Campylobacter coli* after preventive administration of *Lactobacillus fermentum* was evaluated hematologically by the examination of white blood cell count and flow cytometry in order to monitor immunocompetent cells in blood. For that purpose, total 120 one-day-old *Campylobacter* spp. negative chickens of COBB 500 broiler breed were divided into 4 groups ($n = 30$). The control group (K) was fed only commercial diet, the Lf group was daily individually administrated *Lactobacillus fermentum* CCM 7514 orally during 7 days of the experiment. The Cc group was perorally challenged by *Campylobacter coli* on the day 4. The combined group was preventively administered *Lactobacillus fermentum* and challenged by *Campylobacter coli* identically with both Lf and Cc groups. The experiment lasted 12 days and samplings were done 4 and 7 days post *C. coli* infection (dpi). Values of white blood cells (total leukocytes, lymphocytes, heterophils, eosinophils, monocytes) on the 4th dpi showed no significant increase in the Lf and Lf/Cc groups compared to the K and Cc groups. At the seventh dpi only number of

heterophils in the Lf/Cc group exceeded the values of the Cc group. Flow cytometry of peripheral blood at the 4th dpi demonstrated overstimulation of CD8⁺ and IgM⁺ in both probiotic groups, the Lf and Lf/Cc. At the seventh dpi the highest values of the Cc groups were observed in all determined lymphocyte subpopulations (CD3, CD4, CD8, IgM, IgA, CD45) in comparison with the Lf, Lf/Cc and K groups with the significance ($P < 0.05$) of CD3⁺ and CD8⁺ phenotypes. Current results indicated that in spite of some potential of probiotic strain to stimulate white blood cells and immunocompetent cells in an early phase of infection, in our experiment no prevention of *Campylobacter coli* inhibition was observed.

Key words: *Campylobacter* spp.; chickens; flow cytometry; immunity; *Lactobacillus* spp.

ÚVOD

Kontaminácia maloobchodných produktov hydiny patogénnou baktériou *Campylobacter jejuni* bola rozpoznaná ako signifikantný zdroj humánných gastrointestinálnych ochorení. *Campylobacter jejuni* je často nachádzaný v obsahu čriev komerčných brojlerových kurčiat v koncentráciách $10^4 - 10^9$ KTJ vo fécas pred odporazením (Grant a kol., 1980), avšak bez škodlivých účinkov na ich zdravotný stav. Pri spracovaní kadáverov vysokou rýchlosťou mechanizovaných výrobných prostriedkov fekálna kontaminácia z *C. jejuni* kolonizovaných brojlerov môže viesť ku krížovej kontaminácii iných kadáverov. Niektoré štúdie preukázali 48 – 70 % kontamináciu hydínových produktov *C. jejuni*. Snahy eliminovať túto kontamináciu počas spracovania boli neúspešné, čo podporuje potrebu eliminácie *C. jejuni* na produkčnej úrovni, t. j. počas výkrmu. Situáciu sťažuje aj nejasnosť mechanizmov, ktorými *C. jejuni* infikuje hydinu, napriek predpokladanému množstvu potenciálnych zdrojov vrátane vody, hmyzu, farmového personálu a hlodavcov (Kazwala a kol., 1990). Akonáhle *C. jejuni* infikuje hydinu bez

ohl'adu na zdroj, rýchlo a účinne sa šíri, často so 100 % kontamináciou kŕdľa (Harris a kol., 1986).

Incidencia humánných infekcií spôsobených *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*, hlavných bakteriálnych agensov izolovaných pri kampylobakterióze z črevného traktu ľudí po nakazení kontaminovaným mäsom hydiny, nadobúda v celosvetovom meradle stúpajúci trend. Kampylobakterióza je najbežnejšou infekciou vyskytujúcou sa pred spustením Guillain-Barrého syndrómu, ťažkej demyelinizačnej neuropatie, postihujúcej 3 z 10 000 humánných pacientov z celkového počtu diagnostikovaných prípadov (Skallan a kol., 2015). V súvislosti s kampylobakteriózou je uvádzaný aj signifikantný nárast iných poškodení organizmu, akými sú napríklad reaktívna artritída a chronický syndróm dráždivého čreva (Mangen a kol., 2015).

Kolonizácia hydiny baktériami *Campylobacter* spp. sa vyskytuje na úrovni fariem, kde je potrebné zamerať sa na zvyšovanie biobezpečnosti a realizovanie monitoringu. Zavedené intervenčné stratégie a monitorovacie programy v primárnom reťazci produkcie hydiny, považovanej za hlavný prameň ochorenia, sa ukázali úspešnými v znižovaní stupňa kolonizácie brojlerov v niektorých severských európskych krajinách a na Novom Zélande. Obmedzenie rizika infekcie je limitované zvyšovaním biobezpečnosti na farmách a vzdelávaním zákazníkov (Skarp a kol., 2016).

Použitie probiotík u hydiny je považované za veľmi sľubnú alternatívu, ktorá môže redukovať rozsah infekcie u brojlerových kurčiat infikovaných *Campylobacter* spp. Napriek určitému pokroku v *in vivo* experimentoch do dnešných dní neexistuje ucelená štúdia, ktorá by zhodnotila tento problém v terénnych podmienkach. Boli vykonané štúdie s jedným alebo aj viacerými probiotickými kmeňmi (Saint-Cyr a kol., 2017; Smialek a kol., 2018). Ukázalo sa, že ich pridávanie do krmiva redukovalo množstvo *Campylobacter* spp. v gastrointestinálnom trakte kurčiat a následne znižovalo hladinu kontaminácie v halách, čím sa eventuálne prispelo

k zvýšeniu hygienických parametrov analyzovaných hydínových kadáverov. Z tohto pohľadu je použitie probiotík jednou z alternatív, ktorá môže byť ľahko implementovaná na úrovni primárnej produkcie a prevencie.

Probiotiká, jedny z najstarších kŕmnych aditív, predstavujú živé mikroorganizmy, ktorých suplementácia v správnom množstve môže mať priaznivý účinok na zdravie hostiteľa vo viacerých smeroch: a) zaistenie priaznivej rovnováhy medzi komenzálnymi a patogénnymi mikrobiotami v gastrointestinálnom trakte, b) zvýšenie stráviteľnosti a látkovej výmeny, c) prejavenie sa imunomodulačných a imunostimulačných účinkov (Nemcová a kol., 2019). Pravidelná suplementácia hydiny probiotikami môže minimalizovať riziko infekcie a následnej klinickej manifestácie u nej, ako aj pokles rizika kontaminácie mäsa takými patogénmi ako sú *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* a *E. coli* (Smialek a kol., 2018).

Dôležitým účinkom niektorých probiotík je ich pozitívny vplyv na imunitný systém. Takými baktériami sú rôzne laktobacilové kmene pôsobiace zvyšovaním hladín sérových cytokínov, protilátok a fagocytózou makrofágmi (Brisbin a kol., 2015; Haghighi a kol., 2006).

Laktobacily vykazujú vlastnosti probiotických mikroorganizmov, ktoré by mohli redukovať riziko potravinových infekcií spôsobenými patogénmi črevného traktu. Príkladom je *Lactobacillus salivarius* SMCD51 prejavujúci niekoľko probiotických schopností *in vitro*, vrátane produkcie bakteriocínu a modulácie imunitného systému (Messoudi a kol., 2012). Zvýšenie počtov *L. salivarius* v céku na 1.10^7 KTJ/g je považované za nevyhnutnú podmienku pre modifikovanie mikrobioty a hostiteľskej imunitnej odpovede.

V našej štúdii sme sa zamerali na sledovanie systémovej imunity monitorovaním bieleho krvného obrazu a hlavných subpopulácií T- a B- lymfocytov u kurčiat preventívne ošetrovaných probiotickým kmeňom *Lactobacillus fermentum* a infikovaných *Campylobacter coli*.

MATERIÁL A METÓDY

Zvieratá a schéma experimentu

Do experimentu, trvajúceho celkovo 12 dní, bolo zaradených 120 ks jednodňových kurčiat brojlerového typu COBB 500 (Baromfi Coop KFT, Budapešť, Maďarsko). Tieto boli rozdelené do 4 skupín ($n = 30$ ks) označených nasledovne: K (kontrola), Lf (*Lactobacillus fermentum*), Cc (*Campylobacter coli*) a Lf/Cc (kombinovaná skupina).

Kurčatá boli umiestnené vo schválenom zverinci v 4 odchovňových izolátoroch s rozmermi 149 x 72 x 79 cm, s dodržiavaním pitného, kŕmneho, vetracieho a teplotného režimu zabezpečovaného zodpovednými pracovníkmi. Dno odchovňových izolátorov bolo vystlané buničitou vatou pokrytou filtračným papierom. Tie boli menené 2 x denne počas celého experimentu. Klietky boli osvetlené nepretržite. Teplota bola udržiavaná na hodnote požadovanej pre vek kurčiat (32 °C v 1. týždni, zredukovaná o 2 °C v 2. týždni). Vlhkosť v boxoch bola meraná vlhkomerom a udržiavaná v hodnotách 58 – 60 %. Voda a krmivo boli k dispozícii *ad libitum*. Kurčatá boli kŕmené komerčnou kŕmnou zmesou Altromin (GmbH & Co., Nemecko), pripravenou špeciálne pre tento experiment ako štartér bez probiotík, antibiotík a antikokcidík. Pred začatím experimentu boli od kurčiat odobraté kontrolné vzorky trusu na mikrobiologické vyšetrenie za účelom vylúčenia kampylobaktérievej a salmonelovej infekcie. Zmesná vzorka trusu bola odoberaná z umelohmotných misiek vložených do boxu.

Experiment bol schválený Etickou komisiou UVLF v Košiciach a ŠVaPS SR pod číslom č. k. Ro-863/17-221.

Od 1. do 7. dňa experimentu bol kurčatám Lf a Lf/Cc skupiny individuálne raz denne perorálne aplikovaný probiotický kmeň *Lactobacillus fermentum* v dávke 10^9 kolónie tvoriacich jednotiek (KTJ/ml). Na 4. deň experimentu boli kurčatá Cc a Lf/Cc skupiny individuálne jednorazovo perorálne infikované *Campylobacterom coli* v dávke 10^8 KTJ/ml.

Odbery krvi na hematologické vyšetrenie a prietokovú cytometriu boli vykonávané na 4. a 7. deň po infekcii *C. coli* od 6 ks kurčiat z každej skupiny. V rámci odberov boli kurčatá humánne usmrtené dekapitáciou a vykrvením.

Bakteriálne kmene

Preventívne bol použitý probiotický bakteriálny kmeň *Lactobacillus fermentum* – Biocenol™ LF99 (CCM 7514), izolovaný z tráviaceho traktu kurčiat v Laboratóriu gnotobiológie, Ústav mikrobiológie a gnotobiológie UVLF v Košiciach. Za jeho poskytnutie a kultiváciu patrí naše poďakovanie doc. MVDr. Radomíre Nemcovej, PhD.

L. fermentum bol kultivovaný podľa literárnych údajov Stropfova a kol. (2005). Kultivácia kmeňa v De Mann-Rogosa-Sharpe broth (MRS, Merck, Nemecko) prebiehala 48 hod v anaerostate (BBL GasPak™ Plus, USA) pri 37 °C. Následne bola bujónová kultúra centrifugovaná pri 2268 g (4 °C) počas 45 minút. Sediment bol resuspendovaný v 50 ml pufrovaného fyziologického roztoku (PBS; 1 L – deionizovaná voda; 0,137 M NaCl; 0,0027 M KCl; 0,01 M Na₂HPO₄; 0,0018 M 0,0018 M; pH 7,4), bolo vykonané desiatkové riedenie a konečná koncentrácia bola stanovená kultivačnou metódou na agarových platniach určením počtu kolónií (KTJ). Pripravené probiotikum bolo uskladňované pri 4 °C až do použitia.

Za účelom experimentálnej infekcie bol použitý málo invazívny kmeň *Campylobacter coli* (izolát z črevného obsahu prasiat), získaný zo Zbierky mikroorganizmov (Brno, Česká republika). *Campylobacter coli* bol kultivovaný podľa metodológie popísanej Ščerbovou a kol. (2016). Na kultiváciu bol použitý *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base CM0739 suplementovaný so SR0155 [obsahujúcim Cefoperazón a Amfotericín B (Oxoid Ltd., Veľká Británia)]. Samotná kultivácia bola vykonaná v anaeróbnom prostredí (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) (CampyGen, Oxoid Ltd., Veľká Británia). Inkubácia v termostate pri 42 °C trvala 2 dni. Kolónie boli resuspendované v 50 ml PBS a bolo

Tab 1: Primárne monoklonové protilátky použité pre imunofenotypizáciu vybraných subpopulácií imunokompetentných buniek

Špecifická	Klón	Izotyp	Katalógové číslo	Množstvo 10 ⁶ buniek
CD3 PE	CT-3	IgG ₁ κ	8200-09	0,2 µg
CD4 PE	CT-4	IgG ₁ κ	8210-09	0,2 µg
CD8α FITC	CT-8	IgG ^{2b} κ	8220-02	1 µg
CD45 PE	LT 40	IgMκ	8270-09	0,2 µg
IgM FITC	M-1	IgG _{2b} κ	8310-02	1 µg
IgA FITC	A-1	IgG _{2b} κ	8330-02	1 µg

vykonané desiatkové riedenie. Nariedené baktérie boli ihneď aplikované kurčatám. Za kultiváciu patrí naše poďakovanie MVDr. Jane Koščovej, PhD.

Hematologické vyšetrenie

V rámci hematologického vyšetrenia bol v periférnej krvi stanovený celkový počet leukocytov a diferenciálny krvný obraz.

Po odobratí krvi do Heparínu (50 IU.ml⁻¹ v PBS, Zentiva, ČR) boli leukocyty nariedené baničkovou metódou a počítané v Bürkerovej komôrke. Na riedenie bol použitý Fried-Lukáčovej roztok (475 µl roztoku/25 µl krvi) a leukocyty boli spočítané v 100 malých štvorcoch.

Diferenciálny krvný obraz bol hodnotený na krvných náteroch ofarbených Hemacolorom (Merck, Nemecko) po vyhodnotení 100 buniek/náter. Výsledkom bolo relatívne percento jednotlivých podtypov bielych krviniek. Absolútne hodnoty jednotlivých podtypov bielych krviniek (G.l⁻¹) boli stanovené prepočtom: celkový počet leukocytov × relatívne % jednotlivého podtypu bielych krviniek (DKO)/100.

Imunofenotypizácia lymfocytov metódou prietokovej cytometrie

Lymfocyty z periférnej krvi boli izolované metódou podľa Boyuma (1987). Heparinizovaná plná krv bola nariedená v PBS v pomere 1:1. Následne bola navrstvená na Histopaque-1077 (Sigma, Nemecko) v pomere 1:2 a centrifugovaná pri 400 g počas 40

min. Izolované bunky boli opatrne odpipetované do čistej skúmavky, trikrát premyté v 1 ml PBS (Sigma-Aldrich, Nemecko) a centrifugované 5 min pri 110 g. Životnosť buniek stanovená trypanovou modrou (0,4 % roztok, Lonza, Nemecko) predstavovala viac ako 95 %.

Po separovaní boli lymfocyty spočítané v Bürkerovej komôrke nariedením v Türkovom roztoku a ich počet bol upravený na 1.10⁶/50 µl PBS (Sigma, Nemecko). Imunofenotypizácia bola vykonaná metódou priamej imunofluorescencie značenými monoklonovými myšacími antikuráciami protilátkami (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA) uvedenými v tab. 1. Po pridaní protilátok k lymfocytom nasledovala 15 min inkubácia pri 22 °C v tme. Označené bunky boli premyté v PBS 5 min centrifugáciou pri 110 g a resuspendované v 0,2 ml PBS s 0,1 % paraformaldehydom (Sigma, Nemecko), čo umožňuje uskladnenie značených buniek v chladničke pri 4 °C až do merania prietokovým cytometrom.

Prietokový cytometer FACSScan a Cell Quest Program (Becton Dickinson, Nemecko) boli použité na meranie a analýzu značených krvných lymfocytov. Bunky boli zbierané do gejtů v počte 10 000 a hodnotené dvojparametrovým dot-plotovým histogramom. Výsledky vyjadrené ako relatívne percento pozitívnych subpopulácií lymfocytov pre použité špecifické protilátky boli prepočítané na absolútne hodnoty (G.l⁻¹): absolútny počet lymfocytov x relatívne percento danej subpopulácie/100.

Tab. 2: Hodnoty bieleho krvného obrazu (G.I⁻¹) na 4. a 7. deň po infekcii (p. i.) *C. coli*

Parameter	dni p. i.	K	Lf	Cc	Lf/Cc
Leukocyty	4	5,54 ± 1,70	6,11 ± 1,89	4,24 ± 1,34	5,63 ± 1,75
	7	5,59 ± 3,03	7,34 ± 2,82	11,30 ± 9,65	7,64 ± 4,30
Lymfocyty	4	3,80 ± 1,57	3,90 ± 1,14	2,70 ± 0,76	3,28 ± 0,66
	7	3,34 ± 1,54	3,92 ± 1,73	6,33 ± 4,70	4,58 ± 1,74
Heterofily	4	1,62 ± 0,60	1,88 ± 0,96	1,35 ± 0,61	2,09 ± 0,95
	7	1,85 ± 1,34	2,93 ± 2,00	3,83 ± 3,00	4,28 ± 3,00
Eozinofily	4	0,11 ± 0,08	0,12 ± 0,08	0,08 ± 0,05	0,12 ± 0,09
	7	0,15 ± 0,11	0,25 ± 0,15	0,25 ± 0,21	0,20 ± 0,15
Monocyty	4	0,20 ± 0,07	0,21 ± 0,09	0,11 ± 0,05	0,19 ± 0,10
	7	0,20 ± 0,13	0,19 ± 0,08	0,30 ± 0,21	0,21 ± 0,14

Tab. 3: Absolútny počet subpopulácií lymfocytov v periférnej krvi (G.I⁻¹)

Fenotyp	dni p. i.	K	Lf	Cc	Lf/Cc
CD3	4	1,16 ± 0,86	1,06 ± 0,33	0,82 ± 0,21	0,82 ± 0,30
	7	0,69 ± 0,26 ^b	0,96 ± 0,56 ^b	2,30 ± 0,38 ^a	1,47 ± 0,40
CD4	4	0,90 ± 0,69	0,79 ± 0,25	0,59 ± 0,16	0,64 ± 0,27
	7	0,51 ± 0,19	0,77 ± 0,44 ^c	1,60 ± 0,84	0,98 ± 0,39
CD8	4	0,28 ± 0,14	0,37 ± 0,16	0,22 ± 0,09	0,26 ± 0,10
	7	0,18 ± 0,09 ^c	0,27 ± 0,16 ^c	0,70 ± 0,47 ^a	0,42 ± 0,09 ^a
IgM	4	0,21 ± 0,12	0,22 ± 0,07	0,13 ± 0,06	0,17 ± 0,09
	7	0,19 ± 0,10	0,27 ± 0,13 ^c	0,50 ± 0,22	0,34 ± 0,14
IgA	4	0,15 ± 0,10	0,13 ± 0,08	0,07 ± 0,06	0,10 ± 0,06
	7	0,07 ± 0,02	0,10 ± 0,07 ^c	0,20 ± 0,13	0,12 ± 0,04
CD45	4	2,41 ± 1,40	3,35 ± 0,82	2,62 ± 0,78	2,50 ± 0,37
	7	3,16 ± 1,05 ^b	4,41 ± 1,22	7,90 ± 4,37 ^a	3,86 ± 1,23 ^b

Špecifické indexy v riadkoch vyjadrujú signifikantné rozdiely: ^{ab}P < 0,05; ^{ac}P < 0,01

Štatistická analýza

Štatistická analýza bola vykonaná programom GraphPad InStat version 3.1 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornia) jednosmernou analýzou (ANOVA) a Bonferoniho *post-hoc* testom. Hodnoty sú uvádzané ako priemer ± SD s najnižšou signifikanciou na štatistickej hladine P < 0,05.

VÝSLEDKY

Hematologické vyšetrenie bieleho krvného obrazu (viď tab. 2) viedlo k zaujímavému obrazu predovšetkým v súvislosti s *C. coli* infekciou. Zatiaľ čo na 4. deň po infekcii hodnoty celkového

počtu leukocytov, ako aj všetkých ich subpopulácií, preukázali v čistej kampylobakterovej skupine (Cc) nesignifikantne najnižšie hodnoty v porovnaní s probiotickou aj kontrolnou skupinou, na 7. dpi dosiahli naopak nesignifikantne najvyššie hodnoty v rámci sledovaných skupín. V čistej probiotickej skupine (Lf) sa na 4. dpi prejavila mierna stimulácia dosiahnutím maximálnych hodnôt sledovaných subpopulácií v porovnaní s ostatnými skupinami, avšak na 7. dpi bola jej aktivácia pozorovaná iba oproti kontrole. V kombinovanej Lf/Cc skupine maximálne hodnoty prezentované pri heterofiloch poukazovali na ich aktiváciu nielen na 4., ale aj 7. dpi, pričom došlo k prevýšeniu hodnôt aj čistej

kampylobakterovej skupiny (Cc).

Zastúpenie jednotlivých subpopulácií lymfocytov (viď tab. 3) na 4. dpi preukázalo v závislosti od stimulácie variabilné hodnoty medzi jednotlivými skupinami. Zhodne s obrazom v periférnej krvi, aj tu boli hodnoty v Cc skupinách na 4. dpi najnižšie. Zatiaľ čo nárast absolútnych počtov v oboch probiotických skupinách (Lf aj Lf/Cc) poukázal na stimuláciu CD8⁺ T- lymfocytov v porovnaní s K a Cc skupinami a pri IgM⁺ v porovnaní s K skupinou, najvyššie hodnoty CD3⁺, CD4⁺ a IgA⁺ subpopulácií lymfocytov boli zistené v kontrolných skupinách. Na 7. dpi dosiahla Cc skupina, podobne ako pri subpopuláciách leukocytov v periférnej krvi, najvyššie počty všetkých meraných lymfocytárnych subpopulácií (CD3, CD4, CD8, IgM, IgA, CD45) v porovnaní s Lf, Lf/Cc a K skupinami so signifikanciou v CD3⁺, CD45⁺ ($P < 0.05$) a CD8⁺ ($P < 0.01$) fenotypoch. Avšak hodnoty v oboch probiotických skupinách boli vyššie než v kontrolných skupinách a kombinovaná Lf/Cc skupina poukázala dosiahnutím maximálnych počtov na vyššiu stimuláciu oproti čistej Lf skupine.

DISKUSIA

Je známe, že imunitný systém vyliahnutých kurčiat je nezrelý a vnímavý na infekciu (Levkutová a kol., 2017). Viaceré štúdie poukazujú na nárast odolnosti voči infekcii *C. jejuni* so zvyšujúcim sa vekom kurčiat, čím dochádza k poklesu reakcie imunitného systému na danú baktériu (Smith a kol., 2005; Levkut a kol., 2018). Autori Herich a Levkut (2002) vo svojej štúdii poukazujú na fakt, že probiotické baktérie včítane *Lactobacillus* predstavujú pre svojho hostiteľa skupinu prospešných mikróbov a vyznačujú sa dobrými imunomodulačnými vlastnosťami. Tieto schopnosti zahŕňujú aj stimuláciu imunokompetentných buniek, ktorá reguluje vrodenu a získanú imunitnú odpoveď na prítomnosť patogénu.

Pre interakciu probiotickej baktérie *L. fermentum* a *C. coli* v experimente na kurčatách sme sa rozhodli na základe predchádzajúceho *in vitro* pokusu. Stašová a kol. (2015) v *in vitro* štúdii na

izolovaných periférnych lymfocytoch vyhodnotili *L. fermentum* ako probiotickú baktériu s najvyššou imunomodulačnou aktivitou pri koinfekcii s *C. jejuni*. Autori v pokuse použili probiotické baktérie *E. faecium* EF55, *E. faecium* AL41, *E. faecium* H31 a *L. fermentum* AD1. Hodnotenie bolo stanovené meraním génovej expresie prozápalových cytokínov qRT-PCR a analýzou lymfocytárnych subpopulácií prietokovou cytometriou (Revajová a kol., 2014).

Lactobacillus fermentum je okrem iných prospešných vlastností známy aj produkciou bakteriocínov (Strompfová a kol., 2005). Takéto bakteriocíny-produkujúce baktérie môžu konkurenčne osídľovať sliznicu a fungovať ako prirodzená bariéra proti patogénom v čreve (Lin, 2009).

Z viacerých druhov kampylobaktérií dominujú *C. jejuni* a *C. coli*. Ďalšie druhy ako *C. lari* a *C. fetus* sú izolované z tráviaceho traktu hydiny zriedkavo (Meunier a kol., 2015). V našom experimente sme sledovali vplyv *Lactobacillus fermentum* na málo invazívny *Campylobacter coli* u novovyliahnutých kurčiat. Celkový počet leukocytov, lymfocytov a monocytov v periférnej krvi kurčiat preukázal nesignifikantné zvýšenie týchto buniek v skupine kurčiat infikovaných kampylobaktériami, čo poukazuje na možné zápalové zmeny v tráviacom trakte kurčiat tejto skupiny, predovšetkým na 7. deň po infekcii *C. coli*.

Bunky vrodenej imunity (neutrofil, monocyt, makrofág, NK bunky) sú prvou obrannou líniou v boji proti patogénom, ale nie sú veľmi špecifické v schopnosti rozpoznávania cieľa. Experimentálne nálezy predpokladajú, že rôzne probiotické druhy majú podobné účinky na vrodenu imunitu zdokonaľovaním mechanizmov deštruujúcich patogén. Na druhej strane, ich vplyv na adaptívny imunitný systém je variabilný a ich imunomodulačné vlastnosti závisia od špecificity baktérie aj okolitého prostredia (Gourbeyre a kol., 2011). Zvýšenie hodnôt heterofilov by v našom prípade mohlo súvisieť s produkciou interleukínu-8 (IL-8), ktorý iniciuje lokálnu zápalovú odpoveď prezentovanú infiltráciou neutrofilov, aktiváciou makrofágov a proliferáciou

rôznych T- a B- lymfocytov, čo môže podporovať elimináciu *C. jejuni* (Han a kol., 2016).

Uvedené náznaky zápalových zmien sa prejavili v periférnej krvi hostiteľa signifikantným zvýšením CD3⁺ a CD8⁺, aj nesignifikantným nárastom CD4⁺T-lymfocytov kampylobaktérievej skupiny kurčiat v porovnaní s ostatnými skupinami. Zvýšenie počtu CD8⁺ a CD4⁺ buniek v kampylobaktérievej skupine je možné odôvodniť aj tým, že CD3 bunkový receptor pomáha aktivovať tak CD8⁺, ako aj CD4⁺ T-lymfocyty. CD8⁺ lymfocyty, nazývané aj cytotoxické T-lymfocyty, sú veľmi dôležité pre imunitnú obranu proti vnútrobunkovým patogénom, či už vírusom alebo baktériám. CD4⁺ T bunky sú okrem iného dôležité aj pre tvorbu protektívnych pamäťových CD8⁺ T buniek po infekcii alebo imunizácii (Laidlaw a kol., 2016).

IgA⁺ lymfocyty sú veľmi dôležité pre udržiavanie črevnej homeostázy a zohrávajú významnú úlohu pri imunite a v boji s infekciou (Husáková a kol., 2015). B- lymfocyty sú vlastne prvou obrannou líniou slizničnej imunity proti črevným infekciám, akou je napríklad aj salmonelóza u hospodárskych zvierat (Levkut a kol., 2012).

V našom experimente nárast IgA pozitívnych lymfocytov v periférnej krvi kurčiat oboch probiotických skupín (Lf a Lf/Cc) v porovnaní s kontrolou na 7. deň po infekcii poukazuje na možnú aktiváciu tvorby IgA protilátok. V tom istom pokuse sme v cekálnej sliznici zistili maximálny počet intraepitelových aj lamina propria IgA⁺ lymfocytov v kombinovanej Lf/Cc skupine, čo poukazuje na imunomodulačnú aktivitu probiotickej baktérie *L. fermentum* (Revajová a kol., 2017). Maximálne hodnoty IgA⁺ lymfocytov v periférnej krvi čistej infikovanej skupiny (Cc) na 7. dpi súvisia pravdepodobne so zvýšenou produkciou špecifických IgA protilátok. Tento náš predpoklad podporujú viaceré štúdie, v ktorých bolo publikované signifikantné zvýšenie IgA špecifických protilátok v čreve a v sére po infekcii *C. jejuni* (Stern a kol., 1990; Meunier a kol., 2015).

ZÁVER

Preventívna aplikácia probiotického kmeňa *L. fermentum* pri infekcii *C. coli* stimulovala z leukocytov iba heterofily na 7. dpi v kombinovanej Lf/Cc skupine. Determinácia subpopulácií lymfocytov v periférnej krvi dosiahnutím vyšších hodnôt v oboch probiotických skupinách v porovnaní s kontrolami síce preukázala imunomodulačný účinok aplikovaného probiotického kmeňa, avšak maximálne hodnoty infikovanej Cc skupiny nesvedčia o jeho inhibičnom účinku v nami sledovanom časovom úseku. Na druhej strane signifikantný vzostup CD3⁺ a CD8⁺ lymfocytov v infikovanej Cc skupine demonštruje vznik systémovej imunitnej reakcie kurčiat na infekciu *C. coli*. Výsledky experimentu naznačujú, že pre zvládnutie infekcie je potrebná aktivácia tak vrodenej ako aj adaptívnej imunitnej odpovede. Komplexné štúdium imunitných mechanizmov a správne dávkovanie by mohli viesť k redukcii kampylobakterov u farmových zvierat bez toho, aby boli použité antibiotiká, čo predstavuje ekologickú cestu, ochraňuje spotrebiteľa a v konečnom dôsledku prináša finančné benefity pre spoločnosť.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia vznikla v rámci VEGA projektov 1/0112/18, 1/0355/19 a APVV-15-0165. Za pomoc s organizáciou a usporiadaním experimentu patrí naše poďakovanie MVDr. Soni Gancarčíkovej, PhD. z Ústavu mikrobiológie a gnotobiológie.

ZOZNAM LITERATÚRY

- Boyum, M. A.: Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens*, 1974, 4, Suppl. 97, 269 – 274.
- Brisbin, J. T., Davidge, L., Roshdieh, A., Sharif, S.: Characterization of the effects of three *Lactobacillus* species on the function of chicken macrophages. *Res. Vet. Sci.*, 2015, 100, 39 – 44.
- Gourbeyre, P., Denery, S., Bodinier, M.:

- Probiotics, prebiotics and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J. Leu. Biol.*, 89, 5, 2011, 685 – 695.
- Grant, I. H., Richardson, N. J., Bokkenheuser, V. D.: Broiler chickens as a potential source of *Campylobacter* infection in humans. *J. Clin. Microbiol.*, 1980, 11 5, 508 – 510.
- Haghighi, H. R., Gong, J., Gyles, C. L., Hayes, M. A., Zhou, H., Sanei, B., Chambers, J. R., Sharif, S.: Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2006, 13, 9, 975 – 980.
- Han, Z., Pielsticker, C., Gerzova, L., Rychlik, I., Rautenschlein, S.: The influence of age on *Campylobacter jejuni* infection in chicken. *Dev. Comp. Immunol.*, 2016, 62, 58 – 71.
- Harris, N. V., Weiss, N. S., Nolan, C. M.: The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* enteritis. *Am. J. Pub. Health.*, 1986, 76, 4, 407 – 411.
- Herich, R. a Levkut, M.: Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet. Med.-Czech.*, 2002, 47, 6, 169 – 180.
- Husáková, E., Bobíková, K., Stašová, D.: Total IgA in spleen, bursa and intestine of chickens pretreated with *E. faecium* AL41 and challenged with *Salmonella* Enteritidis PT4. *Food Agricult. Immunol.* 2015, 26, 3, 366 – 370.
- Kazwala, R. R., Collins, J. D., Hannan, J., Crinion, R. A., O'Mahony, H.: Factors responsible for the spread of *Campylobacter jejuni* infection in commercial poultry production. *Vet. Rec.*, 1990, 126, 13, 305 – 306.
- Laidlaw, B. J., Craft, J. E., Kaech, S. M.: The multifaceted role of CD4⁺ T cells in CD8⁺ T cell memory. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, 16, 2, 102 – 111.
- Levkut a kol. *Molekulovo-biologické metódy pri modulácii imunitnej odpovede u zvierat. Košice: UVLF*, 2014, 50 – 61.
- Levkut, M., Revajová, V., Lauková, A., Ševčíková, Z., Spišáková, V., Faixová Z., Levkutová, M., Stropfiová, V., Pistl, J., Levkut, M.: Leukocytic responses and intestinal mucin dynamics of broilers protected with *Enterococcus faecium* EF55 and challenged with *Salmonella* Enteritis. *Res. Vet. Sci.*, 2012, 93, 1, 195 – 201.
- Levkut, M. Jn., Revajová, V., Bobíková, K., Levkutová, M., Ševčíková, Z., Levkut, M.: Detection of *Campylobacter* spp. in cloacal swab of hens reared in different breeding conditions in Slovakia. *Appr. Poult. Dairy Vet. Sci.*, 2018, 5, 3, 1 – 3.
- Levkutová, M., Paulík, Š. a kol.: *Infekčné choroby hydiny a ich diferenciálna diagnostika*. 1. vyd. Prešov: M&M, 2007. 264 s.
- Lin, J.: Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. *Foodborne Path. Dis.*, 2009, 6, 7, 755 – 765.
- Mangen, M. J., Bouwknegt, M., Friesema, I. H., Haagsma, J. A., Kortbeek, L. M., Tariq, L., Wilson, M., van Pelt, W., Havelaar, A. H.: Cost-of-illness and disease burden of food-related pathogen in the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.*, 2015, 196, 84 – 93. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.022.
- Messaoudi, S., Kergourlay, G., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Ferchichi, M., Prévost, H., Pilet, M. F., Chobert, J. M., Manai, M., Dousset, X.: Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiol.*, 2012, 32, 1, 129 – 134.
- Meunier, M., Guyard-Nicodème, M., Dory, D., Chemaly, M.: Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. *J. Appl. Microbiol.*, 2015, 120, 5, 1364 – 5072.
- Nemcová, R., Styková, E., Englerová, K.: Využitie probiotických baktérií a ich bioaktívnych produktov pri kožných ochoreniach. *Folia Pharmaceutica Cassoviensia*, 2019, 1, 3, 43 – 58.
- Revajová, V., Husáková, E., Stašová, D., Spišáková, V.: Flow cytometry immunophenotyping of in vitro cultivated lymphocytes after *Campylobacter jejuni* infection with some probiotic bacteria strains.
- Revajová, V., Gancarčíková, S., Karaffová, V., Nemcová, R., Bobíková, K., Šefcová, M., Herich, R., Levkut, M., Letnická, A., Ševčíková,

- Z., Levkutová, M., Žitňan, R., Levkut, M.: Study of immune response in blood, spleen and cecum to *Lactobacillus fermentum* CCM 7514 in chickens infected with *Campylobacter* spp. In *International Conference Analytical Cytometry IX, 14. – 17.10.2017, Prague, Czech Republic: Program and Book of Abstracts*. Kalina, T. (ed.). 1. vyd. Praha: AMCA, 2017. 139 – 140.
- Saint-Cyr, M. J., Haddad, N., Taminiau, B., Poezevara, T., Quesne, S., Amelot, M., Daube, G., Chemaly, M., Dousset, X., Guzard-Nicodème, M.: Use of the potential probiotic strain *Lactobacillus salivarius* SMXD51 to control *Campylobacter jejuni* in broilers. *Int. J. Food Microbiol.*, 2017, 247, 9 – 17. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.003.
- Skallan, E., Hoekstra, R. M., Mahon, B. E., Jones, T. F., Griffin, P. M.: An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. *Epidemiol. Infect.*, 2015, 143, 13, 2795 – 2804.
- Skarp, C. P. A., Hänninen, M. L., Rautelin, H. I. K.: *Campylobacteriosis*: the role of poultry meat. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2016, 22, 2, 103 – 109.
- Smialek, M., Burchardt, S., Koncicki, A.: The influence of probiotic supplementation in broiler chickens on population and carcass contamination with *Campylobacter* spp. – Field study. *Res. Vet. Sci.*, 2018, 312 – 316. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.03.009.
- Smith, C. K., Keiser, P., Rothwell, L., Humphrey, T., Barrow, P. A., Jones, M. A.: *Campylobacter jejuni*-induced cytokine responses in avian cell. *Infect. Immun.*, 2005, 73, 4, 2094 – 2100.
- Stašová, D., Husáková, E., Bobíková, K., Karaffová, V., Levkutová, M., Levkut, M.: Expression of cytokines in chicken peripheral blood mononuclear cells after stimulation by probiotic bacteria and *Campylobacter jejuni* in vitro. *Food Agricult. Immunol.*, 2015, 26, 6, 813 – 820.
- Stern, N. J., Meinersmann, R. J., Cox, N. A., Bailey, J. S., Blankenship, L. C.: Influence of host lineage on cecal colonization by *Campylobacter jejuni* in chickens. *Avian Dis.*, 1990, 34, 3, 602 – 606.
- Strompfova, V., Marciňáková, M., Gancarčíková, S., Jonecová, Z., Sciranková, L., Guba, P., Koščová, J., Boldižárová, K., Lauková, A.: New probiotic strain *Lactobacillus fermentum* AD1 and its effect in Japanese quail. *Vet. Med. – Czech.*, 2005, 50, 9, 415 – 420.
- Ščerbová, J. a Lauková, A.: Sensitivity to enterocins of thermophilic *Campylobacter* spp. from different poultry species. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2016, 13, 12, 668 – 673.



ÚČINKY AZATHIOPRINU A HUMÁNNEHO DIALYZOVATEĽNÉHO LEUKOCYTÁRNEHO EXTRAKTU NA MONONUKLEÁRNE LEUKOCYTY KRVI MORČIAT

EFFECTS OF AZATHIOPRINE AND HUMAN DIALYZABLE LEUKOCYTE EXTRACT ON GUINEA PIG BLOOD MONONUCLEAR LEUKOCYTES

Hrčková, G.,¹ Ryzner, M.,² Mačák Kubašková, T.¹

¹Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice

²IMUNA PHARM, a. s., Jarková 269/17, 082 22 Šarišské Michaľany
Slovenská republika

hrcka@saske.sk

ABSTRAKT

Adjuvantná liečba chronických ochorení s poruchou imunity imunomodulačnými látkami naturálneho pôvodu je vhodným doplnením primárnej terapie. Dialyzovateľný leukocytárny extrakt (DLE) je zložený z veľkého počtu látok s molekulovou hmotnosťou do 10 kDa s významnými imunomodulačnými vlastnosťami pri ochoreniach s rôznou patológiou. Cieľom štúdie bolo preskúmať koncentračne závislý účinok lieku Imuran s účinnou látkou azathioprin (AZA) a humánneho dialyzovateľného extraktu pripraveného z leukocytov periférnej krvi zdravých darcov IMMODIN-u (IMO) na metabolickú aktivitu a proliferáciu mononukleárnych leukocytov krvi

morčiat. V MTT teste sa cytotoxický účinok AZA na 1×10^5 leukocytov prejavil od koncentrácie 0,62 μg . IMO mal neutrálne účinky až do objemu 50 μl , ktorý však stimuloval metabolickú aktivitu nižšieho počtu buniek (2×10^4). Proliferácia konkanavalínom aktivovaných T lymfocytov sa sledovala na základe inkorporácie BrdU do jadier ELISA kolorimetrickým testom. AZA významne inhiboval proliferáciu T buniek (1×10^5) od koncentrácie 1,25 μg ($P < 0,01$) a signifikantné zníženie proliferácie lymfocytov po inkubácii s IMO počas 70 h sa zaznamenalo pri objeme 50 a 100 μl . IMO neovplyvnil proliferáciu nestimulovaných lymfocytov krvi a čiastočne eliminoval supresorický účinok AZA (2,5 $\mu\text{g}/1 \times 10^5$ buniek) v koncentračnej závislosti. Najvyšší

účinkom na obnovenie proliferácie T lymfocytov pri uvedenej koncentrácii AZA sa prejavil pri objeme 50 µl IMO. Naše výsledky poukazujú, že leukocyty krvi morčiat sú veľmi citlivými primárnymi bunkami na overenie účinkov cytotoxických, imunosupresívnych a imunomodulačných látok, kde bol v prípade AZA a IMO rozhodujúci pomer koncentrácie týchto látok a počtu buniek. Humánny DLE čiastočne obnovil azatioprinom potlačenú proliferáciu kapacitu T lymfocytov, čo poukazuje na jeho komplexný imunomodulačný a cytoprotektívny účinok.

Kľúčové slová: azatioprin; IMMODIN; mononukleárne leukocyty krvi; morčatá; MTT test; proliferálny test

ABSTRACT

Adjuvant treatment of chronic diseases with immune deficiency by immunomodulatory substances of a natural origin is a suitable complement to a primary therapy. The dialyzable leukocyte extract (DLE) is composed of a large number of substances with a molecular weight of up to 10 kDa with significant immunomodulatory properties in diseases with different pathologies. The aim of this study was to investigate the concentration-dependent effect of Imuran with the active substance azathioprine (AZA) and human dialysable extract prepared from the peripheral blood leukocytes of healthy donors of IMMODIN (IMO) on the metabolic activity and proliferation of the guinea pig blood mononuclear leukocytes. In the MTT assay, the cytotoxic effect of AZA on 1×10^5 leukocytes was manifested from the concentration of 0,62 µg. IMO had neutral effects up to the volume of 50 µl, which, however, stimulated the metabolic activity of a lower number of cells (2×10^4). Proliferation of concanavalin A-activated T cells was monitored by BrdU incorporation into the nuclei by the colorimetric ELISA assay. AZA significantly inhibited T cell proliferation

(1×10^5) from the concentration of 1.25 µg ($P < 0.01$) and a significant decrease in lymphocyte proliferation after incubation with IMO for 70 h was noted at 50 and 100 µl volumes. IMO did not affect proliferation of the unstimulated blood lymphocytes and partially eliminated the suppressive effect of AZA (2,5 µg / 1×10^5 cells) in concentration dependence. The highest effect on the restoration of T cell proliferation at the indicated concentration of AZA was demonstrated in the volume of 50 µl IMO. Our results indicated that the guinea pig blood leukocytes were very sensitive primary cells to verify the effects of cytotoxic, immunosuppressive and immunomodulatory agents, where the decisive factor was the AZA or IMO ratio to the number of cells. Human DLE partially restored the azathioprine suppressed T cell proliferative capacity, indicating its complex immunomodulatory and cytoprotective effect.

Key words: azathioprine; guinea pigs; IMMODIN; mononuclear blood leukocytes; MTT assay; proliferation assay

ÚVOD

Adjuvantná liečba chronických ochorení s poruchou imunity imunomodulačnými látkami naturálneho pôvodu je vhodným doplnením primárnej terapie chemoterapeutikami, pretože má pozitívne účinky na organizmus a v mnohých prípadoch redukuje nežiaduce vedľajšie účinky liekov. K takýmto prípravkom patrí dialyzovateľný leukocytárny extrakt (DLE), pričom na Slovensku sú dostupné dva registrované preparáty. DLE izolovaný z leukocytov krvi prasiat (IMUNOR, ČR) sa podáva pacientom per os a DLE izolovaný z leukocytov periférnej krvi zdravých darcov krvi (IMMODIN, ImunaPharm, SR; SevaPharma, ČR) je určený na intramuskulárnu, resp. intraperitoneálnu aplikáciu. Modulácia imunitného systému je proces modifikácie imunitnej odpovede, či už v smere indukcie, stimulácie (imunopotenciácia, imunostimulácia) alebo supresie (imunosupresia,

imunooptimalizácia) určitých zložiek alebo fázy imunitnej odpovede (Krejsek a Kopecký, 2004; Saroj a kol., 2012).

Dialyzovateľný leukocytárny extrakt (DLE) je komplex zložený z veľkého počtu látok s molekulovou hmotnosťou do 10 kDa a má imunomodulačné vlastnosti, ktoré sú najčastejšie pripisované 3 – 5 kDa frakcii tohto extraktu, nazývanej ako „transfer faktor“. DLE navyše obsahuje aj ďalšie zložky ako sú peptidy, askorbát, prostaglandíny, histamín, serotonin, bradykinín, thymosín, nikotínamid, cyklické nukleotidy, niektoré aminokyseliny, purínové bázy, chemokíny, časti cytokínov a rozpustné receptory, ktoré majú tiež rôzne biochemické a imunologické vlastnosti a dopĺňajú imunomodulačný účinok transfer faktora (Arnaudov a Kostova, 2015; Svoboda, 2014). Ďalšie štúdie ukázali, že hlavná zložka DLE so špecifickou aktivitou – transfer faktor obsahuje malé peptidy s molekulovou hmotnosťou od 3,5 do 6,0 kDa, ku ktorým sú pripojené oligoribonukleotidy. Ak je extrakt získaný od zdravých darcov, môže alebo nemusí obsahovať požadovanú antigénnu špecifickosť a jeho účinnosť závisí od stavu imunitného systému darcu a taktiež aj príjemcu (Viza a kol., 2013). Dôležitým faktorom je aj podávaná dávka (Fabre a kol., 2004). Z hľadiska humánnej aj veterinárnej medicíny je podstatné aj to, že prekračuje medzidruhové bariéry (Toman a kol., 2009). DLE nie je imunogénny a neobsahuje žiadne histokompatibilné antigény (Krishnaveni, 2013). Bernadič (2014) uvádza, že úlohou transfer faktora je normalizácia imunitného systému, resp. reaktivácia znížených imunitných mechanizmov a naopak supresia nadmerných reakcií. Všeobecne sa predpokladá, že DLE nemá iba jediný samostatný účinok a obsahuje niekoľko menších frakcií s niekedy opačnými funkciami alebo účinkom. Obsahuje antigén-špecifickú, induktorovú, supresorovú alebo regulačnú zložku (Krishnaveni, 2013; Salazar-Ramiro a kol., 2016; Arnaudov a Kostova, 2015). IMMODIN sa podáva pacientom s chronickými prozápalovými ochoreniami ako sú reumatoidná artritída a lupus, u ktorých je liečba primárne založená na

dlhodobom podávaní imunosupresívnych látok. K nim patrí liek Imuran, ktorý obsahuje účinnú látku azatioprin (AZA) a je určený na liečbu autoimunitných ochorení, ale napríklad aj na vyvolanie imunosupresie pri transplantácii orgánov. V organizme sa AZA metabolizuje na merkaptopurin, ktorý má schopnosť inhibovať enzým potrebný na syntézu DNA, preto jeho supresívny účinok je najvýraznejší na deliace sa bunky imunitného systému, ako sú T a B lymfocyty, ale aj ďalšie typy proliferujúcich buniek. V našej štúdii sme sledovali koncentračne závislé účinky oboch prípravkov na metabolickú aktivitu a proliferáciu mononukleárných leukocytov krvi zdravých morčiat za účelom objasnenia účinkov IMO v prípade chemicky vyvolanej supresie primárnych imunitných buniek.

MATERIÁL A METÓDY

Odber krvi morčiat a izolácia mononukleárných leukocytov

Krv bola získaná od morčiat (plemena TRIK) vo veku 6 – 8 týždňov, ktoré boli chované v štandardných podmienkach vo zvieratníku IMUNA PHARM a. s., Šarišské Michaľany. Zvieratám bola poskytnutá pitná voda obohatená o vitamín C v koncentrácii zabezpečujúcej denný príjem 30 – 50 mg/kg ž. hm. a štandardizované peletované krmivo pre morčatá (Altromin, Nemecko) *ad libitum*. Svetelný režim bol prirodzený. Odber krvi bol vykonaný intrakardiálnou punkciou jednorazovou sterilnou ihlou a striekačkou obsahujúcou antikoagulum heparín (50 UI/ml krvi) po bezprostrednej dezinfekcii miesta vpichu 70 % izopropyl alkoholom. Izolovaná krv bola následne použitá na izoláciu mononukleárných buniek (lymfocyty a monocyty) pomocou gradientovej centrifugácie na roztoku Histopaque-1077 (Sigma Aldrich, USA) v sterilných podmienkach. Do plastových 15 ml skúmaviek sa pridalo po 1 ml roztoku a na povrch sa opatrne navrstvila krv (0,5 – 1 ml) jednotlivých morčiat. Centrifugácia prebiehala počas 30 min, 400 g a teplote 22 °C. Prstenec mononukleárných leukocytov bol odobratý do čistých

skúmaviek a premytý sterilným PBS 2-krát pri otáčkach 250 g, 10 min. Bunky boli resuspendované v RPMI médiu, do ktorého boli pridané nasledujúce zložky: 10 % inaktivovaného bovinného fetálneho séra, 100 U/ml penicilínu, 100 µg.ml⁻¹ streptomycínu, 10 µg.ml⁻¹ gentamicínu a 2,5 µg.ml⁻¹ amphotericínu B. Izolované bunky krvi morčiat (n = 10) boli poolované, spočítané a ich viabilita sa hodnotila na základe absorpcie trypanovej modrej. Vo všetkých experimentoch bola viabilita buniek viac ako 98 %.

Príprava imunomodulačných preparátov

Azatioprin (AZA) je účinnou látkou v imunosupresívnom prípravku Imuran (Aspen, Austrália) a jedna tableta obsahuje 50 mg AZA. Zásobný roztok AZA s koncentráciou 10 mg.ml⁻¹ sa pripravil rozpustením tablety v 5 ml sterilnej destilovanej vody. Následne sa pripravil pracovný roztok s koncentráciou 2 mg.ml⁻¹ v RPMI médiu a objemy zodpovedajúce koncentráciám AZA 10, 5, 2,5, 1,25 a 0,62 µg/jamka boli pridané do jednotlivých jamiek 96-jamkovej platničky po pridaní suspenzie buniek. V *in vitro* testoch bol použitý humánný DLE – IMMODIN (IMO), ktorého pracovný roztok sa pripravil rozpustením jednej ampuly lyofilizovaného DLE v 4 ml vody pre injekciu. Podľa inštrukcií výrobcu jedna ampula obsahuje extrakt z 2 x 10⁸ leukocytov periférnej krvi zdravých darcov. Uvedený roztok sa priamo pridával k bunkám v objemoch 5, 10, 25, 50 a 100 µl/jamka. Celkový objem bunkovej suspenzie bol doplnený do médiom do 200 µl.

Test metabolickej aktivity (MTT)

Mononukleárne leukocyty krvi (MLK) morčiat, resuspendované v RPMI médiu, boli nariadené na koncentráciu 1 x 10⁶/1 ml a do jamiek sa pridali objemy zodpovedajúce 1 x 10⁵, respektíve 2 x 10⁴ buniek. Po pridaní látok bol objem doplnený do 200 µl. Metabolická aktivita buniek sa sledovala pomocou MTT testu a účinok látok sa stanovil po 70 hodinách inkubácie buniek pri 37 °C a 5 % CO₂ atmosfére. Zásobný roztok MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) sa pripravil

rozpuštením 5 mg v 1 ml PBS, filtroval a pridal 4 hodiny pred ukončením kultivácie v objeme 20 µl/jamka. Následne bola platnička centrifugovaná pri 340 g, 10 min, supernatant z jamiek bol odstránený a do jamiek sa pridal DMSO v objeme 100 µl. Po rozpustení kryštálov formazánu sa odčítala absorbancia pri vlnovej dĺžke 550 nm a 620 nm (referenčný filter). Experiment bol zopakovaný 2-krát a hodnoty (%) pre jednotlivé ovplyvnené skupiny buniek boli prepočítané voči kontrole (bez ovplyvnenia), ktorá predstavovala hodnotu 100 %.

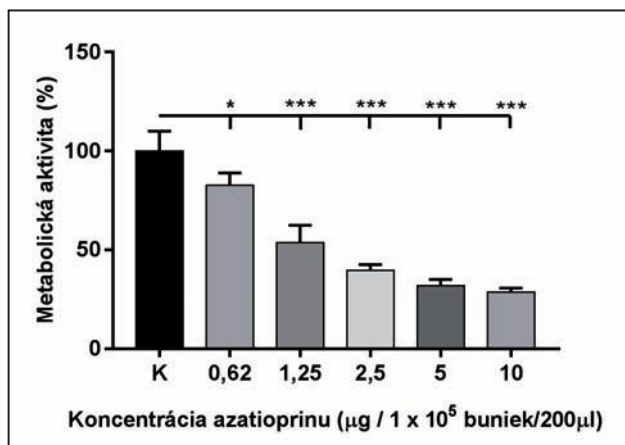
Test proliferácie lymfocytov

Proliferačiu lymfocytov vo vzorkách mononukleárných leukocytov sme hodnotili pomocou komerčne dostupného kitu – BrdU Cell Proliferation ELISA Kit (Roche Diagnostics GmbH, Nemecko). V *in vitro* experimentoch sme sledovali účinky AZA a IMO na nestimulované lymfocyty a lymfocyty, ktoré sme stimulovali konkanavalínom A (KoA, 3 µg.ml⁻¹). Táto látka stimuluje proliferáciu T lymfocytov cez špecifické receptory. Študoval sa koncentračne závislý účinok oboch látok podľa rovnakej schémy ako bola použitá v MTT teste. Bunky boli nariadené na koncentráciu 1 x 10⁶/1 ml v kompletnom RPMI médiu a do jamiek sa pridávalo po 100 µl suspenzie buniek (n = 4/skupina). Následne boli pridané látky, objem bol doplnený médiom do 200 µl a kultivácia trvala 70 hodín pri 37 °C v 5 % CO₂ atmosfére. BrdU sme pridali 18 hodín pred ukončením kultivácie a platničky sa centrifugovali pri 350 g počas 10 min. Koncentrácia inkorporovaného BrdU v deliacich sa bunkách bola stanovená podľa inštrukcií výrobcu kitu. Proliferačný index (PI) bol vypočítaný ako pomer absorbancie stimulovaných/ovplyvnených a nestimulovaných buniek (kontrola). Experimenty boli zopakované 2-krát a hodnoty indexu pre jednotlivé ovplyvnené skupiny buniek boli prepočítané ako násobok kontroly (bunky stimulované KoA), ktorá predstavovala hodnotu 1.

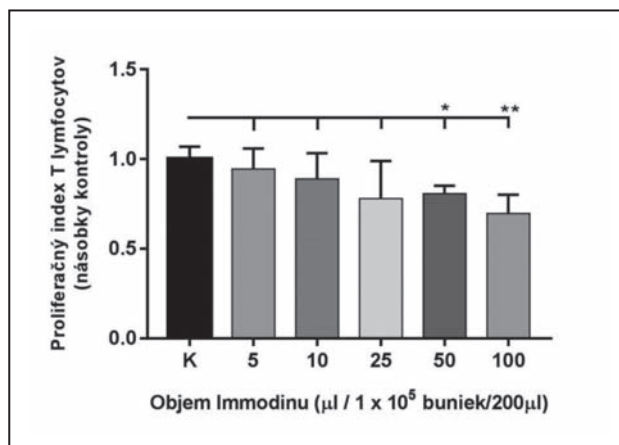
Štatistické vyhodnotenie

Získané údaje sme vyjadrili ako priemer ±

Obr. 1A: Koncentračno-závislý účinok azatioprinu na metabolickú aktivitu mononukleárných leukocytov krvi morčiat



Obr. 1B: Koncentračno-závislý účinok IMMODIN-u na metabolickú aktivitu mononukleárných leukocytov krvi morčiat



smerodajná odchýlka (SD), štatistická významnosť výsledkov bola hodnotená testom „jednocestná ANOVA“ a rozdiely medzi skupinami boli následne hodnotené Tukey porovnávacím testom v štatistickom programe GraphPad Prism verzia 7.00. Štatisticky významný rozdiel v porovnaní s kontrolnou skupinou alebo inými hodnotenými skupinami je zaznamenaný ako * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

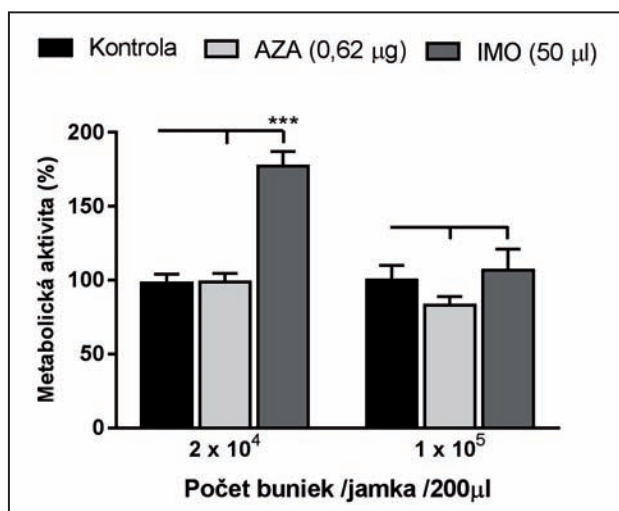
VÝSLEDKY

Metabolická aktivita mononukleárných leukocytov krvi morčiat

MTT test sa rutinne využíva na sledovanie cytotoxického účinku látok, ale v prípade netoxických látok poukazuje aj na aktivitu enzýmov dehydrogenáz, ktoré redukujú MTT na formazán. V tomto teste sme sledovali metabolickú aktivitu spolu pre monocyty a lymfocyty krvi – na obr. 1A je znázornený koncentračne závislý účinok AZA vyjadrený ako percento kontroly (100 %). Štatisticky významný cytotoxický účinok na 1×10^5 buniek sa zistil od koncentrácie 1,25 µg; zodpovedajúcej percentu metabolickej aktivity $53,59 \pm 8,6$ %. Supresívny účinok sa prehľboval so zvyšujúcou sa koncentráciou AZA v médiu, čo pre koncentráciu 10 µg pre daný počet buniek predstavovalo pokles metabolickej aktivity na hodnotu $28,61 \pm 2,3$ %.

V ďalšom *in vitro* experimente sme sledovali

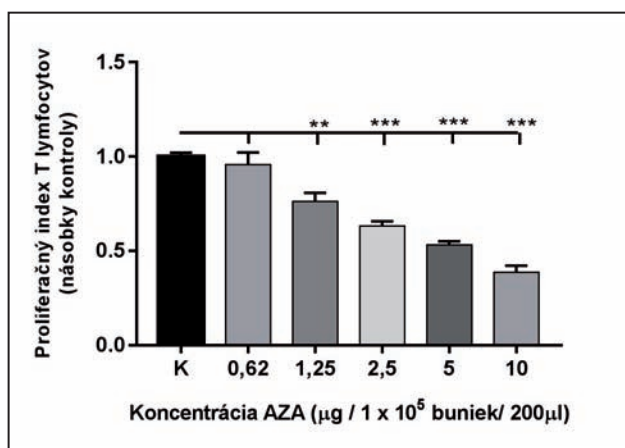
Obr. 1C: Účinok azatioprinu a IMMODIN-u na metabolickú aktivitu rôzneho počtu buniek



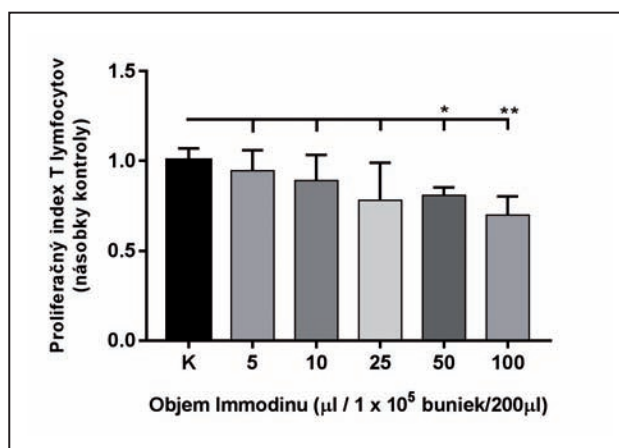
koncentračne závislý účinok IMMODIN-u (IMO) na ten istý počet buniek. Ako vidieť na obr. 1B, objemy IMO od 5 do 50 µl signifikantne neovplyvnili metabolickú aktivitu buniek a nárast bol pozorovaný až pri objeme 100 µl ($142,5 \pm 3,5$ %). Na overenie, či účinky oboch preparátov na metabolickú aktivitu sú závislé od pomeru buniek ku koncentráciám látok, sme v ďalšom experimente porovnali účinky hraničnej koncentrácie AZA (0,62 µg) a hraničnej koncentrácie IMO (50 µl), ktoré ešte signifikantne neovplyvnili metabolickú aktivitu (viď obr. 1A, B).

Na obr. 1C sú porovnané výsledky účinku tých istých koncentrácií látok na dve koncentrácie buniek, a to 2×10^4 buniek a 1×10^5 buniek. Potvrdilo sa, že

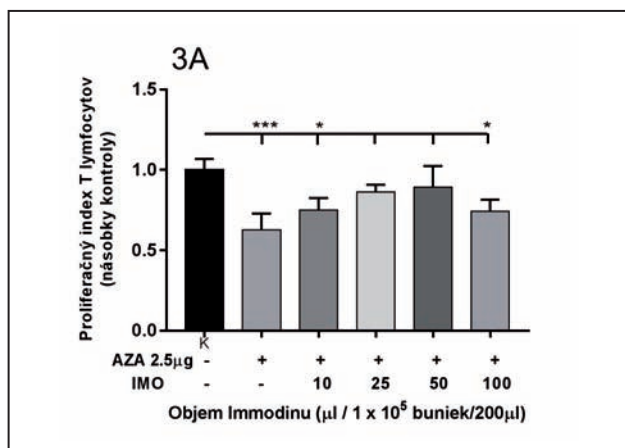
Obr. 2A: Koncentračno-závislý účinok azatioprinu na proliferačný index lymfocytov



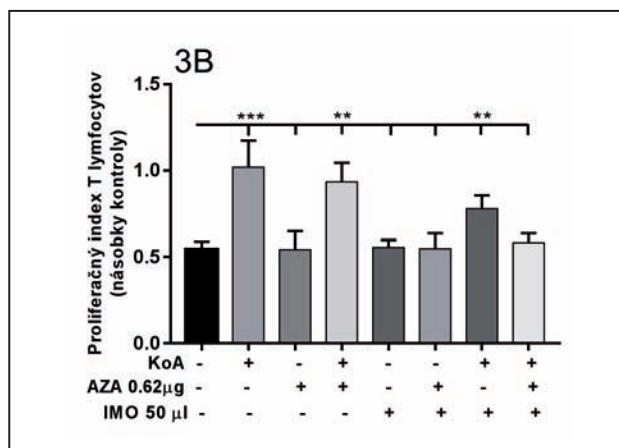
Obr. 2B: Koncentračno-závislý účinok IMMODIN-u na proliferačný index buniek



Obr. 3A: Koncentračno-závislý účinok IMMODIN-u (IMO) na proliferačný index buniek suprimovaných dávkou 2,5μg azatioprinu (AZA)



Obr. 3B: Účinok AZA (0,62μg) a IMO (50μl) na proliferačný index nestimulovaných a KoA stimulovaných lymfocytov



rozhodujúcim je pomer počtu buniek a koncentrácie látok, keďže IMO v tomto objeme signifikantne ($P < 0,001$) stimuloval metabolickú aktivitu menšieho počtu buniek, ale neovplyvnil aktivitu vyššieho počtu buniek (1×10^5).

Test proliferácie T lymfocytov krvi morčiat

V našej štúdii sme ďalej sledovali proliferačnú kapacitu buniek po aktivácii naivných T lymfocytov krvi KoA, ktorá je vyjadrená ako proliferačný index (PI). Kontrolná skupina ($PI = 1$) predstavuje KoA stimulované lymfocyty. Koncentračne závislý účinok AZA na KoA stimulované T lymfocyty je zobrazený na obr. 2A. Signifikantné zníženie deliacej schopnosti

T lymfocytov sa zaznamenalo už pri koncentrácii 1,25 μg ($PI = 0,76 \pm 0,06$) a pri koncentrácii 10 μg bol $PI = 0,38 \pm 0,032$. Účinok zvyšujúcej sa koncentrácie IMO na mononukleárne bunky krvi je zobrazený na obr. 2B. Významné zníženie proliferácie bolo zistené pri koncentrácii 50 a 100 $\mu\text{l}/1 \times 10^5$ buniek ($PI = 0,80 \pm 0,04$ a $0,69 \pm 0,1$).

Cieľom ďalších *in vitro* experimentov bolo overiť koncentračne závislý účinok IMO na proliferáciu T lymfocytov, ktorá bola významne potlačená AZA v koncentrácii 2,5 μg ($P < 0,001$). IMO v objeme 25 a 50 μl eliminoval supresívny účinok AZA na delenie stimulovaných T lymfocytov, pričom 100 μl IMO neutralizovalo supresívny účinok AZA len čiastočne

(vid' obr. 3A). V ďalšej štúdií (vid' obr. 3B) sme zistili, že ani AZA v najnižšej testovanej koncentrácii (0,62 µg) a ani IMO v najúčinnnejšej koncentrácii (50 µl) neovplyvnili proliferáciu nestimulovaných lymfocytov v porovnaní s kontrolnou skupinou buniek, pričom aj AZA aj IMO mierne potlačili proliferáciu KoA stimulovaných T lymfocytov v korelácii s obr. 2A, B.

DISKUSIA

Morča ako laboratórne zviera veľmi citlivo reaguje na protizápalové látky ako sú kortikosteroidy, napríklad dexametazon a látky vyvolávajúce supresiu proliferácie buniek na báze inhibície enzýmov ako je azatioprin. Morčatá senzibilizované na ovalbumín sú bežne používaný zvierací model alergickej astmy, pretože vykazujú podobné imunopatologické charakteristiky ako astmatickí pacienti, a preto sa využívajú na štúdium imunomodulačných účinkov rôznych látok (Boskabady a kol., 2014; Murad a Hasanin, 2014). V našej *in vitro* štúdií sme sledovali koncentračne závislé účinky azatioprinu a IMMODIN-u na mononukleárne leukocyty krvi zdravých morčiat. V MTT teste sme zistili, že vplyv oboch látok na metabolickú aktivitu buniek je závislý od pomeru koncentrácie látok a počtu buniek. AZA významne znižoval metabolizmus 1×10^5 buniek už od koncentrácie 0,62 µg, čo poukazuje na jeho silný cytotoxický účinok. Tento účinok bol dokázaný aj v *in vivo* štúdií na CD-1 myšiach, kde opakované podávanie AZA vyvolalo poškodenie buniek kostnej drene procesom apoptózy a redukovalo extramedulárnu hematopoézu v slezine (Molyneux a kol., 2008). Naopak, inkubácia s IMO neovplyvnila metabolizmus buniek okrem jeho zvýšenia pri vysokom objeme, ktorý pri odporúčaných dávkach pri liečbe zvierat a ľudí nie je možné v krvi reálne dosiahnuť. Pomocou MTT testu Cardoso a kol. (2017) sledovali účinok AZA a DLE pripraveného z leukocytov zdravých darcov krvi na ľudskú leukemickú líniu T lymfocytov „Jurkat“ a myšiaciu leukemickú líniu B lymfocytov „A20“. Títo autori

zistili potlačenie proliferácie oboch typov buniek (bez stimulácie KoA) po inkubácii s $2,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ AZA po 70 hodinách, čo zodpovedá koncentrácii 0,5 µg/200 µl (jamka) v našich experimentoch. V našej štúdií táto nízka koncentrácia nepotlačila delenie KoA stimulovaných T lymfocytov krvi morčiat významne, čo poukazuje na vyššiu citlivosť nádorových línií na azatioprin. Inkubácia so samotným IMO (50 µl) len mierne znížila proliferáciu buniek oboch leukemických línií, čo sme pozorovali aj v našich *in vitro* testoch. Naše výsledky poukázali aj na to, že pri vyšších koncentráciách pôsobí DLE supresívne na delenie stimulovaných T lymfocytov, ale neovplyvňuje naivné nestimulované bunky. Podobne Zajícová a kol. (2014) zistili, že DLE (IMO) vo vyšších koncentráciách znižoval proliferáciu stimulovaných T a B lymfocytov izolovaných zo sleziny Balb/c myší *in vitro* a ovplyvnil aj produkciu cytokínov, čo poukazuje na jeho potenciálny protizápalový účinok. V našej predchádzajúcej štúdií na modelovej parazitárnej infekcii vyvolanej metacestódami pásomnice *Mesocostoides vogae* u myší, ktorá navodzuje imunosupresiu s protizápalovými imunitnými reakciami, viedlo intraperitoneálne podávanie DLE (IMO) k stimulácii potlačenej proliferácie KoA aktivovaných splenocytov *ex vivo*. Podobne, *in vitro* štúdia na izolovaných splenocytoch z infikovaných neliečených myší ukázala, že DLE stimuloval potlačenú proliferáciu aktivitu T lymfocytov a čiastočne eliminoval supresorický účinok antigénov produkovaných parazitmi (Mačák Kubašková a kol., 2018). Aj v našej súčasnej práci IMO čiastočne eliminoval supresorický účinok AZA ($2,5 \mu\text{g} / 1 \times 10^5$ buniek) v závislosti od koncentrácie. Na základe toho predpokladáme, že jednotlivé zložky prítomné v DLE rozoznávajú patologicky zmenené funkcie lymfocytov a pravdepodobne aj ďalších imunitných buniek a navodzujú ich normalizáciu smerom k fyziologickej rovnováhe. Klinické štúdie, v ktorých sa DLE podával pacientom s nerovnováhou imunitných reakcií buď v smere nadmernej aktivácie alebo supresie ukázali, že liečba iniciovala proces

normalizácie špecificky pre daný typ imunitnej reakcie (Svoboda, 2014). Mechanizmus, akým DLE redukuje cytotoxický účinok AZA nie je presne známy, ale predpokladá sa, že niektoré jeho zložky majú cytoprotektívny efekt sprostredkovaný aktiváciou endogénnych antioxidantných mechanizmov. Vo svojej štúdii autori Franco-Molina a kol. (2011) na bunkovej línii makrofágov stimulovaných LPS zistili, že inkubácia buniek s DLE pripravenom z bovinných leukocytov zvýšila intracelulárnu aktivitu antioxidantných enzýmov vrátane katalázy, glutatiónpoxidázy a superoxiddismutázy spolu so znižujúcou sa hladinou oxidantov a oxidu dusnatého.

ZÁVER

V našej štúdii sme potvrdili, že mononukleárne leukocyty krvi morčiat sú vhodnými primárnymi imunitnými bunkami na overenie cytotoxického účinku azatioprinu a imunomodulačného účinku humánneho DLE (IMMODIN). Zistili sme, že pri ovplyvnení metabolizmu a proliferácie lymfocytov v krvi je rozhodujúcim parametrom pomer počtu buniek a koncentrácia látok, ktorý určuje, či DLE pôsobí stimulačne. Koncentračne závislý účinok DLE sa prejavil aj pri eliminácii cytotoxického účinku AZA, čo poukazuje na to, že podávanie DLE by mohlo normalizovať proliferáciu T lymfocytov suprimovanú chemickými látkami.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla za finančnej podpory projektu ASFEU s ITMS kódom 26220220157, ktorý bol podporený operačným programom „Research and Development” a financovaný Európskym fondom pre regionálny rozvoj na Slovensku. Čiastočná finančná podpora bola získaná aj z projektu APVV I7-0410.

ZOZNAM LITERATÚRY

Arnaudov, A. a Kostova, Z.: Dialysable leukocyte extracts in immunotherapy. *Biotech.*

Biotechnolog. Equipment, 2015, 29, 6, 1310 – 2818. DOI: <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1060136>

Bernadič, M.: Quo vadis transfer faktor? In Rovenský J., Blažíčková, S., Hrubíško, M. (Eds.). *Transfer faktor v klinickej praxi včera a dnes*. Bratislava: SAP – Slovak Academic Press s. r. o., 2014. s. 23 – 30.

Boskabady, M. H., Byrami, G., Feizpour, A.: The effect of safranal, a constituent of *Crocus sativus* (saffron), on tracheal responsiveness, serum levels of cytokines, total NO and nitrite in sensitized guinea pigs. *Pharm. Reports*, 2014, 66, 1, 56 – 61.

Cardoso, F. M., Tomková, M., Petrovajová, D., Bubánova, M., Ragač, O., Horňáková, T.: New and cost effective cell-based assay for Dialyzed Leukocyte Extract (DLE)-induced Jurkat cells proliferation under azathioprine treatment. *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 2017, 138, 100 – 108.

Fabre, R. A., Perez, T. M., Aguilar, L. D., Rangel, M. J., Estrada-Gacia, I., Hernandez-Pando, R., Estrada Parra, S.: Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, 136, 2, 215 – 223.

Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Miranda-Hernández, D. F., Sierra-Rivera, C. A., Zapata-Benavides, P., Vera-García, M. E., Reyes, S., Tamez-Guerra, R. S., Rodríguez-Padilla, C.: Anti-inflammatory and antioxidant effects of IMMUNEPOTENT CRP in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2011, 5, 3726 – 3736.

Krejsek, J. a Kopecký, O.: *Klinická imunologie*. Pardubice: Nucleus, 2004, 941 s.

Krishnaveni, M.: A review on transfer factor an immune modulator. *Drug Invention Today*, 2013, 5, 2, 153 – 156.

Mačák Kubašková, T., Mudroňová, D., Velebný, S., Hřčková, G.: The utilisation of human dialyzable leukocyte extract (IMMODIN) as adjuvant in albendazole therapy on mouse model of larval cestode infection: Immunomodulatory and

hepatoprotective effects. *Int. Immunopharm.*, 2018, 65, 148 – 158.

Molyneux, G, Gibson, F. M., Chen, C. M., Marway, H. K., McKeag, S., Mifsud, C. V., Pilling, A. M., Whayman, M. J., Turton, J. A.: The haemotoxicity of azathioprine in repeat dose studies in the female CD-1 mouse. *Int. J. Exp. Pathol.*, 2008, 89, 2, 138 – 158.

Murad, H. A. a Hasanin, A. H.: The anti-inflammatory effects of 1,1 dimethyl-4-phenylpiperazinium (DMPP) compared to dexamethasone in a guinea pig model of ovalbumin induced asthma. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2014, 18, 15, 2228 – 2236.

Salazar-Ramiro, A., Hernandez-Pedro, N. Y., Rangel-Lopez, E., Perez de la Cruz, V., Estrada-Parra, S., Pineda, B. Dialyzable leukocyte extract (transfer factor) as adjuvant immunotherapy in the treatment of cancer. *MOJ Autoimmune Dis.*, 2016, 1, 1 (Open Access).

Saroj, P., Mansi, V., Jha, K. K., Pal, M.: An overview on immunomodulation. *J. Adv. Scien. Res.*, 2012, 3, 1, 7 – 12.

Svoboda, J.: *40 let zkušeností s léčbou transfer faktorem. Transfer faktor v klinické praxi včera a dnes.* 1. vyd. Bratislava: SAP – Slovak Academic Press s. r. o., 2014. 13 – 22.

Toman, M.: *Veterinární imunologie.* Praha: Grada, 2009, 392 s.

Viza, D., Fudenberg, H. H., Palareti, A., Ablashi, D., De Vinci, C., Pizza, G.: Transfer factor: an overlooked potential for the prevention and treatment of infectious diseases. *Folia biologica (Praha)*, 2013, 59, 2, 53 – 67.

Zajícova, A., Javorková, E., Trosan, P., Chudičková, M., Kruhlová, M., Holáň, V. A.: Low-molecular-weight dialysable leukocyte extract selectively enhances development of CD4(+)ROR gamma t(+) T cells and IL-17 production. *Folia biologica*, 2014, 60, 253 – 60.

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