FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis
UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609
ISSN 2729-790X

1

III • 2021

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA je vedecký časopis vydávaný Univerzitou veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika. Časopis je vydávaný štvrťročne s príspevkami v slovenskom, českom alebo anglickom jazyku s abstraktom v angličtine.

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

Šéfredaktorka/Editor-in-Chief: *Jana Mojžišová*
Výkonná redaktorka/Deputy/Managing Editor: *Zita Faixová*
Redakčná rada/Editorial Board: *Abu-Darwish, M. S. (Shoubak, Jordan), Boknik, P. (Münster, Germany), Castejon, A. M. (Fort Lauderdale, Florida, USA), Csöllei, J. (Brno, Czech Republic), Deelman, L. E. (Groningen, Netherlands), Devinyak, O. (Uzhhorod, Ukraine, El Naggar, El M. B. A. (Damanhour, Egypt), Getova, D. (Plovdiv, Bulgaria), Kyselovič, J. (Bratislava, Slovak Republic), Leddy, J. J. (Ottawa, Canada), Mojžiš, J. (Košice, Slovak Republic), Klimas, J. (Bratislava, Slovak Republic), Mučaji, P. (Bratislava, Slovak Republic), Opatřilová, R. (Brno, Czech Republic), Pirník, Z. (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-vytlacky.

Marec 2021

FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

VYDÁVA
UNIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE V KOŠICIACH
SLOVAKIA

FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA
III., 1, 2021

PUBLISHED BY
THE UNIVERSITY OF VETERINARY MEDICINE AND PHARMACY IN KOŠICE
2021

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 1, 2021

O B S A H

Malinovská, Zuzana; Čonková, Eva:
ONYCHOMYCOSIS – SUMMARY OF KNOWLEDGE 5
Jašíčková, Andrea; Faixová, Dominika; Faixová, Zita; Gažová, Andrea; Kyselovič, Ján:
KOMPLIANCIA A ADHERENCIA HYPERTENZNÝCH PACIENTOV K TERAPII
COMPLIANCE AND ADHERENCE OF HYPERTENSIVE PATIENTS TO THERAPY 14
Kadáková, Denisa; Marcinčáková, Dana; Sowa, Patrycja:
HODNOTENIE VPLYVU ETANOLOVÉHO EXTRAKTU KOMONICE LEKÁRSKEJ
NA MODELOVÚ BUNKOVÚ LÍNIU
IMPACT OF MELILOTUS OFFICINALIS EXTRACT ON A MODEL CELL LINE 22
Jurášková, Jaroslava; Ungvarská Maľučká, Lucia:
IZOLÁCIA A CHARAKTERIZÁCIA BIOLOGICKY AKTÍVNYCH SACHARIDOV
Z HÚB RODU *CORDYCEPS* (FR.) LINK.
ISOLATION AND CHARACTERISATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SACCHARIDES
FROM FUNGI OF THE GENUS *CORDYCEPS* (FR.) LINK. 29
Duranková, Klaudia; Piešová, Elena:
CROHNOVA CHOROBA A JEJ FARMAKOTERAPIA
CROHN'S DISEASE AND ITS PHARMACOTHERAPY 39
Proškovcová, Martina; Čonková, Eva; Takáč, Peter; Harčárová, Michaela:
ANTIPROLIFERATÍVNE ÚČINKY LIEČIV RASTLINNÉHO PÔVODU
ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF DRUGS OF THE PLANT ORIGIN 49
Lukáčová, Katarína; Šutorová, Martina; Bačkorová, Miriam:
TERAPIA A SÚČASNÉ MOŽNOSTI LIEČBY OSTEOARTRÓZY
THE THERAPY AND CURRENT OPTIONS FOR THE TREATMENT OF OSTEOARTHROSIS 60
Huľová, Monika; Kolesárová, Mária:
ANALÝZA PRESKRIPCIE LIEKOV U PACIENTOV S ISCHEMICKOU CHOROBOU SRDCA
ANALYSIS OF THE DRUG PRESCRIPTION IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE 70
Blatníková, Teodora; Faixová, Zita; Piešová, Elena:
SYNTÉZA ČREVNÉHO HLIENU A JEHO DYNAMIKA
SYNTHESIS OF INTESTINAL MUCUS AND ITS DYNAMICS 82
Lehotská, Viktória; Eftimová, Jarmila:
OBSAH CELKOVÝCH POLYFENOLOV A ANTIRADIKÁLOVÁ AKTIVITA
PLODOV *ARONIA MELANOCARPA* (MICHX.) ELLIOTT
TOTAL POLYPHENOL CONTENT AND ANTIRADICAL FRUIT ACTIVITY
OF *ARONIA MELANOCARPA* (MICHX.) ELLIOTT 93
Pokyny pre autorov 101

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 1: 5 – 13, 2021

ONYCHOMYCOSIS – SUMMARY OF KNOWLEDGE

Malinovská, Zuzana; Čonková, Eva

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

zuzana.malinovska@uvlf.sk

ABSTRACT

Onychomycosis is the most common disease of the fingernails and toenails, which involves fungal infection of the nail plate, bed or matrix. It is caused by dermatophytes of the genera *Trichophyton* and *Epidermophyton*, less often by yeasts as *Candida albicans* or non-dermatophyte microscopic fungi as *Aspergillus, Fusarium, Scopulariopsis* and other. Onychomycosis is a disease which, in addition to health, also has an adverse effect on a person's social enjoyment. The elderly or patients with diabetes, HIV and immunosuppression are more susceptible to onychomycosis. Local factors as humidity, occlussive footwear or insufficient hygiene contribute to the progression of infection. Onychomycosis is divided into several forms and types according to the clinical picture, type of pathogens and severity of infection. The clinical signs of onychomycotic nails include a wide range of discoloration of the nail, thickening, hyperkeratosis and splitting of the nail plate, accumulation of subungual debris, onycholysis and other. In case of mild symptoms, many people do not know about the infection or do not treat it. However, over the time, the condition of onychomycosis worsens and the treatment is difficult with uncertain results.

Key words: antimycotics; dermatophytes; nails; onychomycosis; yeasts

INTRODUCTION

Onychomycosis (*tinea unguium*) is a fungal disease occurring in the fingernails and toenails. It is the most common infectious disease of the nails, involving infection of the nail plate, nail bed or matrix. It occurs mainly in adults and the incidence increases with the age of the patients. Onychomycosis is significant from a health and aesthetic point of view. The prevalence of onychomycosis is estimated to be 2 % to 14 %. The therapy of this contagious infection is problematic and lasts a long time (Ghannoum, et al. 2000; Scher et al., 2007; Watanabe et al., 2010).

Onychomycosis is most often caused by dermatophytes, less often by yeasts and non-dermatophyte microscopic fungi. The dermatophytes have the ability to invade keratinized tissue (skin, hair and nails); they produce protease and keratinase to digest keratin. They usually attack the nonliving cornified layer because of their inability to penetrate viable tissue of an immunocompetent host. Dermatophytes with virulence factors (acid proteinases, elastase, keratinases and other proteinases) induce the invasion, infection and consequential damage of the nails, the nail plates and the adjacent skin (Scher et al., 2007; Kaur et al., 2008; Bombace et al., 2016). From the dermatophytes initiating onychomycosis (the genera *Trichophyton* and *Epidermophyton*), mostly identified species are *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Epidermophyton floccosum*. Yeast onychomycosis occurs less frequently as a single nail infection. From the yeast species, *C. albicans* is mostly isolated, which is more common in fingernail infections. Non-dermatophyte microscopic (filamentous) fungi can also cause onychomycoses (Snyder et al., 2011; Bombace et al., 2016; Gupta et al., 2017; Bitew and Wolde, 2019).

Clinical forms of onychomycosis

Onychomycosis is divided into several forms: distal and lateral subungual onychomycosis (DLSO), superficial onychomycosis (SO), endonyx onychomycosis (EO), proximal subungual onychomycosis (PSO), mixed pattern onychomycosis (MPO) and total dystrophic onychomycosis (TDO). The division depends on a mode of invasion of the nail, structural and morphologic patterns. The classification of the forms helps determine the diagnosis, predict the appropriate therapy and the prognosis (Hay and Baran, 2011).

Distal and lateral subungual onychomycosis is the most common form of onychomycosis. It first appears in the corner layer of hyponychium and in distal or lateral nail bed. Subsequently, proximal nail bed invasion and ventral nail plate invasion occur. The clinical signs include discrete distal foci of onycholysis; the nails gradually thicken, chip, become dystrophic and discoloured yellow-brown or brown-black and hyperkeratosis of nail bed occurs, too. Infection progresses proximally, inflammatory changes in the hyponychium and the nail bed lead to further hyperkeratosis with accumulation of subungual debris (causing linear channels or "spikes"), discoloration and onycholysis. Many cases begin as *tinea pedis* with the subsequent invasion of the nail plate. The causative organisms are: *E. floccosum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Fusarium* spp., *Candida albicans*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Scytalidium* spp. and other (Maatouk et al., 2019).

Superficial onychomycosis was previously referred to as superficial white onychomycosis. In superficial onychomycosis the primary site of infection is the nail plate. Subsequently, the infection can spread to the nail bed and to the hyponychium. The predominant occurrence is in toenails with white scattered areas on the nails and may result in damage to the entire nail plate. The colour of a nail depends on the species of the pathogen and includes a wide range of dyschromias. The most commonly identified is *T. Mentagrophytes*, which produces enzymes with the ability to disrupt the plate directly. In some cases in the elderly patients, the nails may be yellow. When identifying other fungal species, the colour may be dark because they produce black debris. Superficial patches or striae can occur on the nails (Grover et al., 2020).

Endonyx subungual is a rare form, the infection affects the entire nail plate without infecting the nail bed. The fungal hyphae penetrate directly the distal nail plate. The clinical signs include milky-white nail colour, indentations, lamellar or length-wise splitting. Hyperkeratosis and onycholysis are not present. The etiological agent is usually fungi of the genus *Trichophyton* (Tosti et al., 1999).

Proximal subungual onychomycosis affects the nails on the hands and feet to the same extent. Fungal pathogens enter the *stratum corneum* of

proximal nail fold and cuticle, and then penetrate into the newly forming nail plate. A white discoloration occurs around the lunula and a secondary paronychia may occur. Debris accumulates under the proximal portion of the nail, causing onycholysis. This form of onychomycosis is less common and is difficult to treat successfully. It may occur after trauma and is more common in immunocompromised patients. *T. rubrum* is most often isolated, but another species as *T. mentagrophytes*, *T. schoenleinii*, *T. tonsurans* and *T. menginii* can also be identified (Hay et al., 2011; Lee et al., 2011).

Mixed pattern onychomycosis can occur in case of a combination of several onychomycoses, most often it is a connection of proximal subungual onychomycosis with superficial onychomycosis, or a connection of distal and lateral subungual onychomycosis with superficial onychomycosis. The clinical picture is manifested with different patterns of nail plate invasion (Hay et al., 2011).

Total dystrophic onychomycosis arises as the terminal stage of other forms, most often from severe long-lasting distal and lateral subungual onychomycosis. It manifests as a complete destruction and deformation of the nail, nail structure is lost (Gupta et al., 2000; Hay et al, 2011; Bombace et al., 2016).

Yeast-*Candida* onychomycosis is a less common type. Yeasts affect the fingernails and toenails and can cause infection directly, but can also be a secondary pathogen in nail diseases induced by dermatophytes. Onychomycosis caused by yeasts can occur in nails as an associate disease, when the yeasts attack the surrounding area (mostly interdigital mycosis, chronic mucocutaneous candidiasis) (Gupta et al., 2000; Thomas et. al., 2010). *Candida* yeasts attack the nail plate directly in full thickness. The yeast infection results in thickening of the nail bed, yellow-brown discoloration of nails and swelling of the proximal and lateral nail folds. The yeast onychomycosis occurs in patients with *diabetes mellitus*, immunosuppression, thyroid disease, psoriatic onycholysis and other diseases, or when the nails on hands and feet are exposed to long-term adverse effects (chemical and mechanical, exposure to water and humid environments (Gupta et al., 2000; Bitew et al., 2019).

Non-dermatophyte microscopic (filamentous) fungi are identified in 1.5 – 6 % of onychomycosis, especially in geriatric or imucompromissed patients and in patients with dermatoses affecting the nails. Non-dermatophyte microscopic (filamentous) fungi are the predominant pathogens in patients with onychomycosis and human immunodeficiency virus infection. Some authors report a higher percentage of yeasts and non-dermatophyte microscopic fungi that cause onychomycosis (Jary et al., 2005; Surjushe et al., 2007; Bitew et al., 2019). Mostly toenails are affected and the clinical symptoms are the absence of *tinea pedum*, affecting one or two nail plates, trauma in anamnesis, periungual inflammation and no response to systemic treatment. In addition to that, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Scystalidium*, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. and other fungal species can be identified, but they are often considered only associated saprophytes. It may require repeated microscopy or cultivation examination, as non-dermatophytes can be both contaminants as well as causative organisms (Jary et al., 2004; Bombace et al., 2016; Bitew et al., 2019).

Risk factors and diagnosis

An anamnesis, clinical examination, microscopic and culture examination and patient compliance are required to determine the diagnosis and subsequently successful treatment of nail diseases. In case of anamnesis, it is necessary to notice e. g. the duration of the disease, traumatic nail damage preceding the trauma on the affected limb, type of preferred sport (swimming, running, tennis, football), type of employment, serious systemic diseases, unprofessional manicure or pedicure and other. Onychomycosis affects toenails more often than fingernails. When onychomycosis lasts for a long time, the nail plate and nail bed are more damaged and the treatment will last longer (Scher et al.,

2007; Kaur et al., 2008; Thomas et al., 2010). An open wound in the traumatic nail damage can be a gateway for pathogens, or crushing the nail can cause reduced peripheral vascular circulation or even blood stagnation. A limb trauma can result in poor limb blood flow and a reduced gypsum hygiene. Sport activities, wearing closed shoes, public swimming pools can contribute to the emergence of onychomycosis, which often arises from *tinea pedis* or fungal infection on the surrounding skin. Some professions, e. g. masseurs or bakers require working with hands that are exposed to adverse effects such as water, sugar masses, creams and oils and there is a greater risk of onychomycosis. Insufficient sterilization of instruments in beauty salons is the source of many cases of onychomycosis. Immune disorders and systemic diseases, e. g. AIDS, *diabetes mellitus* are serious predispositions for onychomycosis. It is reported that about a third of people with diabetes have onychomycosis and in patients with human immunodeficiency virus infection, the prevalence ranges from 15 % to 40 % (Surjushe et al, 2007; Cathcart et al., 2009; Thomas et al., 2010; Welsh et al., 2010). The great toe nail is usually the most affected due to various microtrauma, compression in shoes. The patient's data, especially age, are closely related to the anamnesis. Onychomycosis morbidity also increases with age. Geriatric patients are most affected; up to 50 % of the population over the age of 70 is affected by onychomycosis (Thomas et al., 2010). Onychomycosis occurs less frequently in children, mainly due to the rapid growth of nails, the small size of the nail plate and the absence of risk factors. However, its occurrence has also been described with incidence of 0.4 to 2.6 %. Pediatric onychomycosis is mostly transmitted within the family. Children and young adults usually have mild to moderate onychomycosis. When onychomycosis is not treated, a more severe stage occurs (Gupta et al., 1997; Patel et al., 2017; Bitew and Wolde, 2019).

The form or type of onychomycosis is determined according to the clinical picture, morphologic patterns and mode of invasion of the nail and confirmed by microscopic or culture examination. The direct microscopy assessment is false negative in up 20 % of cases while culture may yield a false negative result in up to 40 % of the samples that are positive for microscopy. Ideal for diagnosis is when samples are examined by culture as well as microscopic examination. Then the success of the confirmation of the pathogen is up to 80 %. Some authors favour the diagnosis with positive confirmation of two examinations, for example also by histopathological assessment. The sampling and examination must be performed on at least 6 weeks of medically untreated nails. A sample of subungual debris should be obtained with a sterile nail curette after cleansing the area with solution on an alcohol basis. Choosing the right collection site is very important, the samples should be taken from the interface between a healthy and a clinically altered area of the nail. Dermatophytes penetrate into the solid part of the nail plate and are not found in the loose crumb, because the crumb may contain associated saprophytes as contaminating pathogens (Brillowska-Dabrowska et al., 2007; Kaur et al., 2008). The cut part of the nail is not suitable for cultivation, either. A damaged matrix will always create a deformed nail plate. In women who wear tight shoes, the fifth toenail can be deformed even in the absence of onychomycosis. If it is necessary to remove the upper part of the nail plate, a preparation containing 40 % urea can be used to soften the nail, which acts keratolytically at this concentration. The microscopic examination of a subungual debris contributes to rapid diagnosis, with the use of a native uncolored or colored specimen. Isolation of hyphae, pseudohyphae or spores confirms the diagnosis of onychomycosis, however, identification of a fungal species is only possible during cultivation of the sample. Cultivation takes place on special culture media at room temperature for 3 – 6 weeks to grow dermatophytes; for yeast cultivation 3 – 7 days are enough. Identification of dermatophyte species is based on macromorphological or microscopic examination. In specialized laboratories, PCR is used to directly identify the dermatophyte agent, but this is

not yet common in common dermatological practice for this diagnosis (Brillowska-Dabrowska et al., 2007; Litz et al., 2010; Sato et al., 2010). Diagnostics with the Wood lamp is not possible because the pathogens of onychomycosis do not fluoresce. In some cases, a histopathological examination is used, especially in the differential diagnosis of some dermatoses also related to nail diseases. For differential diagnosis, chronic viral paronychia, viral warts, psoriasis, twenty-nail dystrophy, chronic dermatitis with subungual dermatitis, *lichen planus*, asymmetric gait nail unit syndrome, thick nail (genetically determined), nail change after a trauma, tumors (Bowen disease, fibroma, melanoma) and other should be excluded (Allevato et al., 2010).

TREATMENT

The ideal starting point for the treatment is to accurately identify the onychomycosis pathogen. The therapy is lengthy and can be performed as local, systemic or combined. The severity classification of onychomycosis, Onychomycosis Severity Index (OSI) helps decide on the course of the treatment. The OSI scoring system includes dividing the nail plate into five parallel horizontal lines by adding dermatophytoma or a thick nail plate and distinguishing both mild and severe cases. The Onychomycosis Severity Index score is obtained by multiplying the score for the area of involvement (range 0 – 5) by the score for the proximity of the disease to the matrix (range 1 – 5). Ten points are added for the presence of a longitudinal streak or a patch (dermatophytoma) or for more than 2 mm of subungual hyperkeratosis. Mild onychomycosis corresponds to a score of 1 to 5. Moderate onychomycosis includes numbers from 6 to 15 and severe onychomycosis from 16 to 35 (Carney et al., 2011). Antifungal medication will not cure the dermatophytoma. The dermatophytoma is a mass of fungal filaments compacted, forming a fungal ball of biofilm. Dermatophytoma (yellow spikes) is characterized by single or multiple white or yellow bands on the nail plate. It does not respond to the treatment and must be removed, most often surgically with avulsion of the nail (Burkhart et al., 2002).

The local treatment requires the patients to adhere to the therapy instructions and does not always have a positive result. Due to the structure of the nail and high content of keratin, which is nonvascular and impermeable to many agents, it is ideal if the drug enters the nail transungually and subungually. Properties that influence the permeability of the antimycotic drugs through the nail include molecular weight, lipophilicity, affinity to keratin, ionization, pH and the ability to sublimate (Bombace et al., 2016; Angelo et al., 2017). The local therapy is less successful than systemic treatment, but is safe and mostly without drug side effects, contraindications and drug-drug interactions. Adverse effects include burning, itching, redness and stinging at the application site. The therapy and prognosis vary depending on the severity of nail changes. Because of poor drug delivery to nails, the cure may not occur. The topical drugs are recommended only in cases of initial onychomycosis, in the case when the nail matrix is not involved (not long-lasting onychomycosis), when it affects only 1 or a few nails, or in patients who cannot be treated with systemic drugs, whether due to old age, some serious illness or other causes or to supplement and enhance overall treatment (Bhise et al., 2008; Akhtar et al., 2018). The big disadvantage is that the duration of the treatment is very long, up to several months or more than a year and the restoration of healthy state is uncertain. From topical drugs, most often used are clotrimazole, itraconazole, bifonazole, ciclopirox, terbinafine and others. Newer drug alternatives include efinaconazole, luliconazole and tavaborole for topical application (Gupta et al., 2004; Rotta et al., 2012; Wiederhold et al., 2014; Jinna and Finch, 2015; Poulakos et al., 2016). They are usually processed in the form of nail polish, ointments, sprays and solutions. Nanoparticles are coming to the attention of patients and doctors. Nanoparticles in the form of a topical medication can be easily applied on nail and the inclusion of nanoparticles improves drug targeting and also enhances the drug profile and permeation. For

treating onychomycosis, nanocapsules, polymeric nanoparticles, nanoemulsion, nanovesicles have been tried. From other various novel drug delivery systems liposomes, microemulsions or hydrogels are monitored (Luiza et al., 2012). The local treatment can be enhanced by using mechanical, physical and chemical methods. From mechanical methods, nail trimming and abrasion to increase penetration of topical antifungal drug or nail avulsion with complete separation of nail plate are performed. Chemical compounds (keratolytic agents, enzymes, organic solvents, thiols, mercaptans, hydrophobins) are added to increase penetration (Darkes et al., 2006; Graham et al., 2011; Yin et al., 2012). From physical methods, iontophoresis, laser therapy, ultrasound and photodynamic method can be used. In iontophoresis, a small electric current (0.5 $mA.cm^{-2}$) is applied with two electrodes and an energy source to increase the penetration (Nair et al., 2011; Lahfa et al., 2013; Kushwaha et al., 2016). The laser therapy is currently becoming more widely used. It is especially advantageous when only a few nails are affected, in the initial stages of the disease or when it is impossible to use systemic therapy. The laser creates 100 µm pores and the poration of nails increases permeation by two to three orders of magnitude relative to the untreated nail plates, and so the effectiveness of topical antimycotics is higher (Vanstone et al., 2017). The advantages are non-invasiveness, circumvention of systemic toxicity, no teratogenic risks, and no photo-ablation. The disadvantages are: availability only in specialized workplace, tissue damage, photoageing and not always sufficient efficiency. Before using the laser, abrasion may be performed and a topical treatment scheme must be observed (Gupta and Simpson, 2013; Angelo et al., 2017). The effectiveness of lasers as a standalone treatment is disputable and uncertain (Nenoff et al., 2014; Nematollahi et al., 2015). Without affecting the internal system of the organism, a photodynamic therapy that employs a light source to excite the photo-sensitizer to create reactive oxygen species destroying fungal pathogens is used. In combination with methylaminolevulinic acid three sessions with a 15-day interval are needed, or three sessions with 5-aminolevulinic acid once a week (Suthar et al., 2014; Angelo et al., 2017). Another method used in topical therapy is an ultrasound. Low frequency ultrasonic waves with 400 and 600 kHz frequencies and duration of 120 seconds cause the forming of micropores in the nails that improve penetration of antimycotics. A discipline and patient reliability play an important role in topical treatment, due to the fact that the irregular treatment of nails with antifungals rapidly reduces the success of the treatment. Topical antimycotics are also used as a supportive care in general therapy (Abadi and Zderic, 2011; Kline-Schoder et al., 2018).

Systemic therapy is chosen in case of extensive involvement of several nail plates, in case of unsuccessful topical treatment or in case of long-term or difficult degree of onychomycosis. Systemic treatment of the nail plates on the hands lasts 2 months, on the feet 3 months or longer. The difference in the length of the treatment is due to the slower growth of toenails. Antimycotics for oral application are characterized by an adverse effect on the overall health of the patient, especially on the liver. For the oral treatment of onychomycosis, two most effective antimycotics: itraconazole and terbinafine are used. For *Candida* onychomycosis, also fluconazole is prescribed. Ketoconazole is not used for systemic treatment of onychomycosis due to its high hepatotoxicity and drug interactions. Gupta et al. (2004) published that the mycotic cure rates in a meta-analysis of treatments for toenail onychomycosis were 76 % for terbinafine, 63 % for itraconazole with pulse dosing, 59 % for itraconazole with continuous dosing, and 48 % for fluconazole. Wide differences in the cure rates of onychomycosis were reported in various clinical studies (Gupta et al., 2004; Chang et al., 2007; Yin et al., 2012). Itraconazole therapy can be more likely to produce mycological recurrence compared with terbinafine therapy. Contraindications include hepatic and renal impairment and heart failure. The adverse effects

associated with the oral antifungal agents are usually mild, the most frequently described adverse effects are associated with gastrointestinal system, skin complaints and headaches. Several cases of serious liver damages leading to liver failure, transplantation or death have been stated. It is recommended that the patient should be examined before and during the treatment for parameters of liver damage. The mild adverse effects are usually transient and reversible after discontinuation of the therapy (Ajit et al., 2003).

CONCLUSION

Onychomycosis is a disease which, in addition to health, also has an adverse effect on a person's social enjoyment. At the initial stage of the infection, the disease is often neglected and not given sufficient interest and emphasis on the treatment. Over the time, the fungal infection can spread to deeper layers or invade more nails. However, the more severe the onychomycosis is, the less successful treatment can be achieved.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-15-0377.

REFERENCES

Abadi, D., Zderic, V.: Ultrasound-mediated nail drug delivery system. *J. Ultrasound. Med.*, 2011, 30 (12), 1723 – 1730.

Ajit, C., Suvannasankha, A., Zaeri, N., Munoz, S. J.: Terbinafine-associated hepatotoxicity. *Am. J. Med. Sci.*, 2003, 325 (5), 292 – 295.

Akhtar, N., Sharma, H., Pathak, K.: Onychomycosis: potential of nail lacquers in transungual delivery of antifungals. *Scientifica*, 2016, 1387936.

Allevato, M. A.: Diseases mimicking onychomycosis. *Clin. Dermatol.*, 2010, 28 (2), 164 – 177.

Angelo, T., Borgheti-Cardoso, L. N., Gelfuso, G. M., Taveira, S. F., Gratieri, T.: Chemical and physical strategies in onychomycosis topical treatment: A review. *Med. Mycol.*, 2017, 55 (5), 461 – 475.

Bhise, K., Jan, S., Bora, D.: Preungual drug delivery systems of terbinafine hydrochloride nail lacquer. *Asian. J. Pharm.*, 2008, 2 (1), 53.

Bitew, A., Wolde, S.: Prevalence, risk factors, and spectrum of fungi in patients with onychomycosis in Addis Ababa, Ethiopia: A Prospective Study. *J. Trop. Med.*, 2019, 3652634.

Bombace, F., Iovene, M. R., Galdiero, M., Martora, F., Nicoletti, G. F., D'Andrea, M., Della Pepa, M. E., Vitiello, M.: Non-dermatophytic onychomycosis diagnostic criteria: an unresolved question. *Mycoses*, 2016, 59 (9), 558 – 565.

Brillowska-Dabrowska, A., Saunte, D. M., Arendrup, M. C.: Fivehour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum. J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45 (4), 1200 – 1204.

Burkhart, C. N., Burkhart, C. G., Gupta, A. K.: Dermatophytoma: recalcitrance to treatment because of existence of fungal biofilm. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2002, 47 (4), 629 – 631.

Carney, C., Tosti, A., Daniel, R., Scher, R., Rich, P., DeCoster, J., Elewski, B.: A new classification system for grading the severity of onychomycosis: Onychomycosis Severity Index. *Arch. Dermatol.*, 2011, 147 (11), 1277 – 1282.

Cathcart, S., Cantrell, W., Elewski, B..: Onychomycosis and diabetes. *JEADV*, 2009, 23 (10), 1119 – 1122.

Darkes, M. J. M., Scott, L. J., Goa, K. L.: Terbinafine: a review of its use in onychomycosis in adults. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2003, 4 (1), 39 – 65.

Ghannoum, M. A., Hajjeh, R. A., Scher, R., Konnikov, N., Gupta, A. K., Summerbell, R., Sullivan, S., Daniel, R., Krusinski, P., Fleckman, P., Rich, P., Odom, R., Aly, R., Pariser, D., Zaiac, M., Rebell, G., Lesher, J., Gerlach, B., Ponce-De-Leon, G. F.,

Ghannoum, A., Warner, J., Isham, N., Elewski, B.: A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2000, 43 (4), 641 – 648.

Graham, L. V. D., Elewski, B. E.: Recent updates in oral terbinafine: its use in onychomycosis and tinea capitis in the US. *Mycoses*, 2011, 54 (6), 679 – 685.

Grover, C., Jakhar, D., Sharma, S.: The grid pattern of white superficial onychomycosis. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 2020, 86 (5), 568 – 570.

Gupta, A. K., Jain, H. C., Lynde, C. W., Macdonald, P., Cooper, E. A., Summerbell, R. C.: Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patiens visiting physicians'offices: A multicenter Canadian survey of 15,000 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2000, 43, 244 – 248.

Gupta, A. K., Ryder, J. E., Johnson, A. M.: Cumulative meta-analysis of systemic antifungal agents for the treatment of onychomycosis. *Br. J. Dermatol.*, 2004, 150 (3), 537 – 544.

Gupta, A. K., Sibbald, R. G., Lynde, C. W., Hull, P. R., Prussick, R., Shear, N. H., De Doncker, P., Daniel, C. R., Elewski, B. E.: Onychomycosis in children: prevalence and treatment strategies. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1997, 36 (3 Pt. 1), 395 – 402.

Gupta, A. K., Simpson, F. C.: Diagnosing onychomycosis. *Clin. Dermatol.*, 2013, 31 (5), 540 – 543.

Gupta, A. K., Versteeg, S. G., Shear, N. H.: Onychomycosis in the 21st century: An update on diagnosis, epidemiology, and treatment. *J. Cutan. Med. Surg.*, 2017, 21 (6), 525 – 539.

Hay, R. J., Baran, R.: Onychomycosis: a proposed revision of the clinical classification. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2011, 65 (6), 1219 – 1227.

Chang, CH., Young-Xu, Y., Kurth, T., Orav, J. E., Chan, A. K.: The safety of oral antifungal treatments for superficial dermatophytosis and onychomycosis: a meta-analysis. *Am. J. Med.*, 2007, 120 (9), 791 – 798.

Jarv, H., Naaber, P., Kaur, S., Eisen, M., Silm, H.: Toenail onychomycosis in Estonia. *Mycoses*, 2004, 47 (1 – 2), 57 – 61.

Jinna, S., Finch, J.: Spotlight on tavaborole for the treatment of onychomycosis. *Drug. Des. Devel. Ther.*, 2015, 9, 6185 – 6190.

Kaur, R., Kashyap, B., Bhalla, P.: Onychomycosis--epidemiology, diagnosis and management. *Indian J. Med. Microbiol.*, 2008, 26 (2), 108 – 116.

Kline-Schoder, A., Le, Z., Zderic, V.: Ultrasoundenhanced drug delivery for treatment of onychomycosis. *J. Ultrasound. Med.*, 2018, 37 (7), 1743 – 1752.

Kushwaha, A., Shivakumar, H. N., Murthy, S. N.: Iontophoresis for drug delivery into the nail apparatus: exploring hyponychium as the site of delivery. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 2016, 42 (10), 1678 – 1682.

Lahfa, M., Bulai-Livideanu, C., Baran, R., Ortonne, J. P., Richert, B., Tosti, A., Piraccini, B. M., Szepietowski, J. C., Sibaud, V., Coubetergues, H., Voisard, J. J., Paul, C.: Efficacy, safety and tolerability of an optimized avulsion technique with onyster® (40 % urea ointment with plastic dressing) ointment compared to bifonazole-urea ointment for removal of the clinically infected nail in toenail onychomycosis: a randomized evaluator-blinded controlled study. *Dermatology*, 2013, 226 (1), 5 – 12.

Lee, K. J., Lee, Y. B., Lee, J. Y., Cho, B. K., Choi, J. S., Park, H. J.: Proximal subungual onychomycosis in a patient with classic kaposi sarcoma caused by *Trichophyton rubrum*. *Ann. Dermatol.*, 2011, 23 (Suppl. 1), 11 – 15.

Litz, C. E., Cavagnolo, R. Z.: Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis: a large, single-institute study. *Br. J. Dermatol.*, 2010, 163 (3), 511 – 514.

Luiza, R. D. A., Priscila, K. C., Kolenyak, D. F., Marielli, D. G., Rocha, E. H., Chorilli., M., Palmira, D. G. M.: Nanotechnology-based drug delivery systems for dermatomycosis treatment. *Curr. Nanosci.*, 2012, 8, 512 – 519.

Maatouk, I., Haber, R., Benmehidi, N.:

Onychoscopic evaluation of distal and lateral subungual onychomycosis: A cross-sectional study in Lebanon. *Curr. Med. Mycol.*, 2019, 5 (2), 41 – 44.

Nair, A. B., Kiran Vaka, S. R., Murthy, S. N.: Transungual delivery of terbinafine by iontophoresis in onychomycotic nails. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 2011, 37 (10), 1253 – 1258.

Nematollahi, A. R., Badiee, P., Nournia, E.: The efficacy of ultraviolet irradiation on Trichophyton species isolated from nails. *Jundishapur J. Microbiol.*, 2015, 8, e18158.

Nenoff, P., Grunewald, S., Paasch, U.: Lasertherapie der Onychomykose. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 2014, 12 (1), 33 – 38.

Patel, D., Castelo-Soccio, L. A., Rubin, A. I., Streicher, J. L.: Laboratory monitoring during systemic terbinafine therapy for pediatric onychomycosis. *JAMA Dermatol.*, 2017, 153 (12), 1326 – 1327.

Poulakos, M., Grace, Y., Machin, J. D., Dorval, E.: Efinaconazole and tavaborole: emerging antifungal alternatives for the topical treatment of onychomycosis. *J. Pharm. Pract.*, 2016, 30, 245 – 255.

Rotta, I., Sanchez, A., Gonçalves, P. R., Otuki, M. F., Correr, C. J.: Efficacy and safety of topical antifungals in the treatment of dermatomycosis: a systematic review. *Br. J. Dermatol.*, 2012, 166 (5), 927 – 933.

Sato, T., Takayanagi, A., Nagao, K., Tomatsu, N., Fukui, T., Kawaguchi, M., Kudoh, J., Amagai, J., Yamamoto, N., Shimizu, N.: Simple PCR-based DNA microarray system to identify human pathogenic fungi in skin. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, 48 (7), 2357 – 2364.

Scher, R. K., Tavakkol, A., Sigurgeirsson, B., Hay, R. J., Joseph, W. S., Tosti, A., Fleckman, P., Ghannoum, M., Armstrong, D. G., Markinson, B. C., Elewski, B. E.: Onychomycosis: diagnosis and definition of cure. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2007, 56 (6), 939 – 944.

Snyder, J. W., Atlas, R. M., LaRocco, M. T.: Reagents, stains, and media: mycology. In: Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Warnock, D. W.: *Manual of Clinical Microbiology*. 10th edn. Washington DC.: ASM Press, 2011. 1767.

Surjushe, A., Kamath, R., Oberai, C., Saple, D., Thakre, M., Dharmshale, S., Gohil, A.: A clinical and mycological study of onychomycosis in HIV infection. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 2007, 73 (6), 397 – 401.

Suthar, H. P., Patel, N. M., Solanki, A. D., Barot, J. P.: Nail avulsion with adjuvant therapy in nail disorders. *Arch. Int. Surg.*, 2014, 4, 158 – 161.

Thomas, J., Jacobson, G. A., Narkowicz, C. K., Peterson, G. M., Burnet, H., Sharpe, C.: Toenail onychomycosis: an important global disease burden. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 2010, 35 (5), 497 – 519.

Tosti, A., Baran, R., Piraccini, B. M., Fanti, P. A.: „Endonyx“ onychomycosis: a new modality of nail invasion by dermatophytes. *Acta Derm. Venereol.*, 1999, 79 (1), 52 – 53.

Vanstone, S., Cordery, S. F., Stone, J. M., Gordeev, S. N., Guy, R. H.: Precise laser poration to control drug delivery into and through human nail. *J. Control. Release*, 2017, 268, 72 – 77.

Watanabe, S., Harada, T., Hiruma, M., Iozumi, K., Katoh, T., Mochizuki, T., Naka, W., Japan Foot Week Group: Epidemiological survey of foot diseases in Japan: results of 30,000 foot checks by dermatologists. *J. Dermatol.*, 2010, 37 (5), 397 – 406.

Welsh, O., Vera-Cabrera, L., Welsh, E.: Onychomycosis. *Clin. Dermatol.*, 2010, 28 (2), 151 – 159.

Wiederhold, N. P., Fothergill, A. W., McCarthy, D. I, Tavakkol, A.: Luliconazole demonstrates potent in vitro activity against dermatophytes recovered from patients with onychomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, 58 (6), 3553 – 3555.

Yin, Z., Xu, J., Luo, D. A. N.: A meta-analysis comparing long-term recurrences of toenail onychomycosis after successful treatment with terbinafine versus itraconazole. *J. Dermatolog. Treat.*, 2012, 23 (6), 449 – 452.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 1: 14 – 21, 2021

KOMPLIANCIA A ADHERENCIA HYPERTENZNÝCH PACIENTOV K TERAPII

COMPLIANCE AND ADHERENCE OF HYPERTENSIVE PATIENTS TO THERAPY

Jašíčková, Andrea[1]; Faixová, Dominika[2]; Faixová, Zita[3]; Gažová Andrea[4]; Kyselovič, Ján[1,5]

[1] Katedra farmakológie a toxikológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 081 41 Košice
[2] Katedra mikrobiológie a imunológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 081 41 Košice
[3] Katedra biológie a fyziológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 081 41 Košice
[4] Ústav farmakológie a klinickej farmakológie
Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Špitalská 24, 813 72, Bratislava
[5] Jednotka klinického výskumu V. Internej kliniky
Lekárska fakulta Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava
Slovenská republika

dominika.faixova@student.uvlf.sk

ABSTRAKT

Adherencia a kompliancia pacienta zohrávajú významnú úlohu v úspešnosti a efektívnosti terapie ktoréhokoľvek ochorenia. Preto cieľom štúdie bolo vyhodnotiť adherenciu a kompliancíu 70 hypertonikov k liečbe, ktorí navštívili lekáreň Schneider v Košiciach, prostredníctvom dotazníka. Pri hodnotení adherencie a kompliancie sa sledovala pravidelnosť návštev u lekára, dodržiavanie intervalov užívania liekov, prítomnosť nadváhy u respondentov, dodržiavanie správnej životosprávy, samosledovanie hodnôt krvného tlaku, používanie pomôcok pri užívaní liekov a spoluužívanie výživových doplnkov. Z výsledkov vyplýva, že prevažnú časť respondentov tvorili respondenti v strednom a vyššom veku, viac muži (61 %) ako ženy (39 %). Z toho u 46 % mužov a 18 % žien bola diagnostikovaná artériová hypertenzia I. stupňa, zároveň 38 % respondentov trpelo pridruženými ochoreniami k artériovej hypertenzii. V zmysle pozitívnej adherencie a kompliancie bola vyhodnotená vysoká pravidelnosť návštev lekára (67 %) a užívanie liekov len jedenkrát denne (54 %). Za negatívnu adherenciu a kompliancíu bola stanovená prítomnosť nadváhy u respondentov (51 % mužov), nedodržiavanie správnej životosprávy (55 %), meranie krvného tlaku v domácom prostredí (42 %), využívanie pomôcok pri

užívaní liekov (24 %) a neužívanie žiadnych výživových doplnkov s pozitívnym účinkom na cievny systém (65 %). Získané výsledky rozšírili existujúce údaje o možných príčinách nedostatočnej kontroly krvného tlaku u hypertenzných pacientov.

Kľúčové slová: adherencia; artériová hypertenzia; kompliancia; terapia

ABSTRACT

Patient adherence and compliance play an important role in the success and effectiveness of therapy for any disease. Therefore, the aim of the study was to evaluate the adherence and compliance of 70 hypertensive patients to the treatment, who visited the Schneider pharmacy in Košice, through a questionnaire. The assessment of adherence and compliance monitored the frequency of visits to the doctor, adherence to drug use intervals, the presence of overweight in the respondents, adherence to good lifestyle, self-monitoring of blood pressure values, use of medication aids and co-administration of nutritional supplements. The results show that the majority of the respondents were middle-aged and older, more men (61 %) than women (39 %). Of these, 46 % of men and 18 % of women were diagnosed with grade I arterial hypertension, while 38 % of the respondents suffered from diseases associated with arterial hypertension. In terms of positive adherence and compliance, the high frequency of doctor visits (67 %) and the use of drugs only once a day (54 %) were evaluated. Negative adherence and compliance were defined as the presence of overweight in the respondents (51 % of men), failure to follow a proper lifestyle (55 %), measurement of blood pressure at home (42 %), use of aids when taking medication (24 %) and not taking any nutritional supplements with a positive effect on the vascular system (65 %). The results obtained expanded the existing data on possible causes of insufficient blood pressure control in hypertensive patients.

Key words: adherence; arterial hypertension; compliance; therapy

ÚVOD

Artériová hypertenzia (AH) je najčastejším kardiovaskulárnym ochorením, ktoré predstavuje závažný rizikový faktor pre ďalšie ochorenia ako je zlyhanie srdca, fibrilácia predsiení, chronické zlyhanie obličiek a aj pre vznik kognitívnej dysfunkcie (Gašpar a kol., 2013). V priemyselne vyspelých krajinách u dospelej populácie má AH vysokú prevalenciu (20 – 50 %) (Spinar a kol., 2015), ktorej výskyt s vekom stúpa. Odhaduje sa, že v roku 2025 bude prevalencia AH u 1,5 miliardy populácie (Williams a kol., 2018). Medzi hlavné rizikové faktory AH patria: genetická predispozícia, inzulínová rezistencia, metabolický syndróm, fajčenie a nevhodná životospráva, ktorých prítomnosť zvyšuje kardio-cerebrovaskulárne riziko (Gregorová a Holečková, 2019).

Cieľom liečby pacientov s vysokým tlakom krvi (TK) je maximálne redukovať celkové riziko kardiovaskulárnej morbidity a mortality. Rozlišujeme farmakologickú a nefarmakologickú liečbu AH. Nefarmakologická liečba zahŕňa obmedzenie solenia, alkoholu, zanechanie fajčenia, redukciu telesnej hmotnosti a zvýšenie fyzickej aktivity. Ak táto terapia nepostačuje, najmä u pacientov so zvýšeným kardiovaskulárnym rizikom, prechádza sa na farmakologickú terapiu (Lincová a kol., 2007). Medzi prvú líniu antihypertenzív patria inhibítory enzýmu konvertujúceho angiotenzín (ACE inhibítory), sartany (antagonisti AT1 receptora pre angiotenzín II), betablokátory, blokátory kalciových kanálov (BBK) a diuretiká. Druhú líniu antihypertenzív predstavujú α-blokátory, centrálne antihypertentíva a priame vazodilatanciá. Preferovaná je kombinovaná antihypertenzná liečba. Najprv sa kombinujú liečivá z prvej línie, pri neúspešnosti terapie sa môžu pridať

antihypertenzíva II. voľby.

Liečba AH je globálnym problémom. Liečených je len 40 % pacientov s hypertenziou, z nich je len 35 % liečených adekvátne bez ohľadu na štát, ekonomiku a úroveň zdravotníctva (Williams a kol., 2018).

Úspech liečby úzko súvisí s adherenciou a kompliancíou pacienta k liečbe. Adherencia je stav, kedy sa pacient aktívne prispôsobuje liečebným postupom a nárokom lekára, akceptuje požiadavky preskripcie a dodržiava pokyny lekára a ošetrujúceho personálu, prispôsobuje tomu aj svoj životný štýl. Kompliancia je úzko spojená s užívaním liekov, dodržiavaním časového harmonogramu a dávkovacích schém (Medzihorský a kol., 2011; Gajdošík, 2017). Adherencia predstavuje správanie sa pacienta v súvislosti s jeho zdravotným stavom a jeho schopnosť a snahu dodržiavať rady lekára alebo lekárnika, a tým zabezpečiť čo možno najefektívnejšiu terapiu ochorenia (WHO, 2003; Zummerová a Kolesárová, 2020). Kompliancia určuje presnosť a správnosť užívania lieku (Payer a kol., 2010; Zummerová a Kolesárová, 2020).

Vo väčšine štúdií sa za adherentného a kompliantného pacienta považuje taký, ktorý užíva lieky na viac ako 80 %, vtedy hovoríme o úplnej medikácii. Pokiaľ pacient užíva lieky v intervale 50 – 70 %, ide o čiastočnú adherenciu a neadherencia predstavuje užívanie liekov pod 50 % (Gajdošík, 2017). Neadherenciu delíme na primárnu a sekundárnu, pričom primárna neadherencia predstavuje stav, kedy si pacient predpísaný liek ani nevyzdvihne z lekárne. Uvádza sa, že tak urobí 25 – 30 % pacientov, pričom ako dôvody uvádzajú, že liek nepotrebujú (51 %), nechcú ho užívať (21 %), cena lieku je vysoká (10 %) a liek nebol dostupný v lekárni (5 %). Sekundárna neadherencia opisuje správanie sa pacienta po vyzdvihnutí lieku z lekárne a jeho neužívanie, ako je napr. neschopnosť zapamätať si pokyny (32,4 %), komplikovanosť užívania (28,40 %), cena lieku a následné šetrenie lieku zníženým dávkovaním (22,6 %), a nežiaduce účinky liekov (12,50 %) (Gajdošík, 2017). Najspoľahlivejšia metóda na kontrolu adherencie je analýza koncentrácie liekov v krvi a v moči pacienta.

Jednou z hlavných úloh European Society of Hypertension (ESH) a European Society of Cardiology (ESC) (2018) je odhaľovanie nízkej adherencie pacienta k liečbe, ktorá môže byť hlavnou príčinou neadkvátnej kontroly TK (Williams a kol., 2018).

V našej štúdii sme vyhodnocovali mieru adherencie a kompliancie hypertenzných pacientov k liečbe.

MATERIÁL A METÓDY

Pre zber údajov bol použitý štruktúrovaný dotazník, ktorý obsahoval 12 otázok, z toho 7 otázok bolo uzatvorených a 5 otázok otvorených. Prieskum sa uskutočňoval v lekárni Schneider v Košiciach a zúčastnilo sa na ňom 70 pacientov, ktorí boli liečení na AH. Výsledky boli vyhodnotené v programe Excel formou tabuliek.

Respondenti vypisovali dotazník sami. Prvé tri otázky sa týkali pohlavia, hmotnosti, výšky a veku respondenta. Ďalšie otázky boli zamerané na frekvenciu užívania liekov, prítomnosť komorbidít, dĺžku užívania liekov na liečbu AH, pravidelnosť návštev u lekára a spôsob kontroly TK, používanie pomôcok pri dávkovaní liekov, spoluužívanie výživových doplnkov, dodržiavanie správnej životosprávy a riešenie situácie, keď pacient nemal lieky.

VÝSLEDKY

Dotazník vyplnilo 70 pacientov, z toho bolo 43 mužov (61,4 %) a 27 žien (38,6 %). Najpočetnejšiu vekovú skupinu respondentov s AH tvorili respondenti v rozmedzí 51 – 65 rokov (34,3 %), do ktorej patrilo 14 mužov (20 %) a 10 žien (14,3 %). Veková skupina od 31 – 50 rokov a veková skupina 66 rokov a viac bola rovnako zastúpená v 31,4 %, pričom v skupine 31 – 50 rokov bol rovnaký počet mužov a žien – 11 (15,7 %). V skupine 66 rokov a viac bolo 16 mužov (22,9 %) a 6 žien (8,6 %). Najmenej pacientov

Tab. 1: Početnosť pohlavia, BMI a veku pacientov

		Muži				Ženy			
Vek	**BMI (kg/m²)**	**18 – 30**	**31 – 50**	**51 – 65**	**66 a viac**	**18 – 30**	**31 – 50**	**51 – 65**	**66 a viac**
Podváha	**menej ako 18,5**	0	0	0	0	0	1	0	0
Normálna hmotnosť	**18,5 – 24,9**	0	1	0	1	0	5	4	2
Nadváha	**25,0 – 29,9**	1	5	9	7	0	2	1	2
Obezita I. stupňa	**30,0 – 34,9**	1	3	4	5	0	2	2	1
Obezita II. stupňa	**35,0 – 39,9**	0	0	1	2	0	1	2	1
Obezita III. stupňa	**40,0 a viac**	0	2	0	1	0	0	1	0
Spolu		**2**	**11**	**14**	**16**	**0**	**11**	**10**	**6**

Tab. 2: Diferenciácia krvného tlaku u mužov a žien

Kategória krvného tlaku	**Muži**	**Ženy**
Optimálny krvný tlak	3 (7 %)	4 (14,8 %)
Normálny krvný tlak	4 (9,3 %)	6 (22,2 %)
Vyšší (vysoký) normálny krvný tlak	15 (34,9 %)	12 (44,5 %)
Artériová hypertenzia 1. stupňa	20 (46,5 %)	5 (18,5 %)
Artériová hypertenzia 2. stupňa	1 (2,3 %)	0
Artériová hypertenzia 3. stupňa	0	0

malo vek v rozmedzí 18 – 30 rokov, a to dvaja muži (2,9 %).

Z hodnôt hmotnosti (v kg) a výšky (v m) bol pre každého pacienta vypočítaný index telesnej hmotnosti BMI (angl. Body Mass Index) a podľa tohto indexu boli pacienti zaradení do skupín. Podváhu malo 1,4 % respondentov a normálnu hmotnosť malo 18,6 % pacientov. Nadváhou trpelo 38,6 % respondentov, obezitu I. stupňa vykazovalo 25,7 % pacientov, obezita II. stupňa bola zistená u 11,4 % pacientov a obezita III. stupňa bola zaznamenaná u 5,7 % pacientov (viď tab. 1).

Z odpovedí 70 pacientov na otázku, ako často užívajú denne lieky vyplynulo, že až 54,3 % (38) respondentov užíva lieky len jedenkrát denne, trikrát denne berie lieky 21 pacientov (30 %) a dva razy denne užíva lieky 11 pacientov, čo predstavuje 15,7 %.

Až 27 pacientov (38,6 %) sa liečilo aj na iné ochorenie ako je AH. Najčastejšími komorbiditami, ktoré uvádzali pacienti, boli poruchy zrážania krvi, poruchy srdcového rytmu, hyperlipidémia a *diabetes mellitus* 2. typu.

Z odpovedí na otázky ako dlho užívajú antihypertenzíva bolo zistené, že až 42 pacientov (60 %) užívalo lieky v rozmedzí 3 – 10 rokov, 16 pacientov (22,9 %) užívalo lieky viac ako 10 rokov a len 12 pacientov (17,1 %) užívalo lieky menej ako 3 roky.

Na otázku o pravidelnosti návštev u lekára a

meranie TK lekárom v ambulancii alebo v domácom prostredí respondenti uviedli, že 47 pacientov (67,1 %) navštevovalo lekára pravidelne a z nich 17 pacientom (24,3 %) meral TK lekár v ambulancii a 30 pacienti (42,8 %) si merajú TK doma. Nepravidelne chodilo k lekárovi 23 pacientov, čo predstavuje 32,6 %.

Zo 43 mužov mali len traja (7 %) optimálny krvný tlak, normálny TK mali štyria pacienti (9,3 %), vyšší (vysoký) normálny TK bol zistený u 15 pacientov (34,9 %). Najväčšiu skupinu tvorili pacienti s AH 1. stupňa, ktorých bolo 20 (46,5 %). Jeden pacient trpel AH 2. stupňa.

V prípade 27 žien mali 4 pacientky (14,8 %) optimálny krvný tlak, normálny TK malo 22,2 % (6) pacientok a až 44,5 % (12) respondentiek malo vyšší (vysoký) normálny TK. AH 1. stupňa bola zaznamenaná u 5 pacientok (18,5 %). (viď tab. 2).

Na otázku, či pacienti používajú nejaké pomôcky pri dávkovaní liekov, 17 respondentov (24,3 %) uviedlo, že používa dávkovač liekov.

Z dotazníka ďalej vyplynulo, že výživové doplnky, ktoré priaznivo ovplyvňujú cievny systém, užívalo 34,3 % (27) respondentov, a 32 respondentov (45,7 %) uviedlo, že dodržiava správnu životosprávu (pravidelnú fyzickú aktivitu, obmedzený príjem soli). Na otázku, či boli respondenti v situácii, keď nemali lieky a ako túto situáciu riešili, odpovedali takto: 44 pacientom (62,9 %) sa to doteraz nestalo a z 26 pacientov, ktorí už takúto situáciu zažili, 19 pacientov (27,1%) lieky nezháňalo a ani ich neužilo, a 7 pacientom (10 %) pomohli lekárnici v lekárni.

DISKUSIA

Výsledky štúdie ukázali, že AH postihuje častejšie mužov ako ženy. Naše údaje sú v súlade so štúdiou od autorov Williams a kol. (2018).

Systolický aj diastolický tlak stúpa s vekom (Gašpar a kol., 2013). Tento fakt potvrdzujú aj naše výsledky, ktoré ukazujú, že najpočetnejšiu skupinu tvoria pacienti vo veku 51 – 65 rokov (34,2 %) a pacienti nad 66 rokov (31,4 %). U žien bolo zistených najviac pacientov v kategórii 31 – 50 rokov (40,0 %) a 51 – 65 rokov (37,0 %). V európskej dospelej populácii je prevalencia AH 30 – 45 %. Vo veku nad 60 rokov je prevalencia nad 60 %, hlavne ako dôsledok sedavého životného štýlu, nadváhy a obezity (Williams a kol, 2018).

Výsledky štúdie podporujú tento údaj, pretože najpočetnejšiu skupinu tvorili pacienti s nadváhou (39 %), obezitou I. stupňa až III. stupňa trpelo spolu takmer 43 % pacientov. Boli zistené rozdiely medzi mužmi a ženami, kde nadváhu malo 18,5 % žien a obezitu I. až II. stupňa spolu takmer 33 % žien. U mužov bola situácia závažnejšia, kde nadváhu malo takmer 51 % mužov a obezitu I. až III. stupňa spolu viac ako 44 % mužov. Pritom jedným zo základných odporúčaní zdravého životného štýlu je BMI v rozpätí od 20 – 25. Zdravý životný štýl je základom prevencie, môže zabrániť alebo oddialiť nástup hypertenzie a zvyšuje účinnosť medikamentóznej liečby. U 32 respondentov (45,7 %) bola zaznamenaná odpoveď, že respondent dodržiava správnu životosprávu, ako napr. pravidelnú fyzickú aktivitu a obmedzenie príjmu soli. Ak je zdravý životný štýl neefektívny ako forma nefarmakologickej terapie AH, tak sa po 3 – 6 mesiacoch odporúča medikamentózna liečba (Williams a kol., 2018).

Porovnávaním TK u mužov a žien liečených na hypertenziu bolo zistené, že optimálny TK alebo normálny TK malo len 17 % mužov a u žien malo optimálny TK alebo normálny TK 37 % pacientok, pričom to všetko boli liečení pacienti. Ešte závažnejšou skutočnosťou je fakt, že takmer polovica mužov mala artériovú hypertenziu 1. stupňa a jeden muž mal dokonca artériovú hypertenziu 2. stupňa, kým u žien malo artériovú hypertenziu I. stupňa 18,5 % pacientok. Jedným z dôvodov takejto diskrepancie môže byť aj skutočnosť, že muži sú vo všeobecnosti pohodlnejší v dodržiavaní dávkovacích schém, správnej životosprávy a celkového prístupu k liečbe. Neadekvátna kontrola TK je jedným z následkov nízkej adherencie pacienta k liečbe.

Jednou z príčin nízkej kompliancie pacienta je aj dĺžka liečby, ktorá čím dlhšie trvá, tým sa

kompliancia pacienta k terapii znižuje. ESH udáva, že antihypertenzíva prestáva užívať až 1/3 pacientov po 6 mesiacoch a 1/2 pacientov po 1 roku (Williams a kol., 2018). Elzubier a kol. (2000) udávajú, že pacienti s adherenciou a kompliancíou dosahujú až 98 % kontrolu TK, kým pacienti s neadherenciou a nekompliancíou dosahujú len 18 % kontrolu TK. Podľa Psaty a kol. (1990) pacienti s nižšou ako 80 % adherenciou a kompliancíou k užívaniu liekov majú 4-násobne vyššie relatívne riziko kardiovaskulárnych príhod. V našej štúdii bolo evidovaných len 17 % pacientov, ktorí užívali lieky menej ako 3 roky, kedy je kompliancia vyššia, a až 60 % pacientov užívalo lieky v rozpätí 3 – 10 rokov, kedy sa kompliancia znižuje.

Ďalšou príčinou nízkej kompliancie pacienta je aj zložitosť liečby, kedy pacienti užívajú lieky viackrát denne. Adherencia pacienta sa znižuje s narastajúcim počtom užívaných liekových foriem, kde 1 tableta predstavuje 90 % adherenciu pacienta a 3 tablety len 60 % adherenciu (Williams a kol., 2018).

V našej štúdii väčšina pacientov užívala lieky len raz denne (54,3 %); kedy je kompliancia pacienta vyššia. Pri častejšom užívaní liekov viackrát denne je vyššie riziko, že pacienti zabudnú užiť lieky, čo sa potvrdilo aj u 30 % pacientov, ktorí užívali lieky 3-krát denne. U týchto pacientov by bolo vhodné používať pomôcky pri dávkovaní liekov, ktoré zvyšujú kompliancíu pacienta, avšak len 24 % z respondentov používalo dávkovač liekov a ani jeden z opýtaných nevyužíval mobilné aplikácie, ktoré sú v súčasnosti bežne dostupné. Adherenciu zlepšuje kombinovaná medikamentózna liečba, ktorá pôsobí prostredníctvom viacerých mechanizmov a fixná kombinácia, keď sa podáva viac antihypertenzív v jednej tablete (single pill combination).

Komorbidity k AH ako sú *DM*, hyperlipidémia, negatívne vplývajú na vznik a terapiu AH. Bittnerová a kol. (2006) porovnávali klinický stav a terapiu hypertenzných pacientov s *DM* a bez *DM*. Pacienti s AH a súčasným *DM* boli vysoko rizikovou skupinou, u ktorej dosiahnutie dobrej kontroly TK bolo komplikovanejšie v porovnaní s hypertonikmi bez *DM*. V našom prieskume bolo takmer 40 % pacientov liečených aj na iné ochorenia ako AH, najčastejšou komorbiditou bol práve *DM*, čo môže zvýšiť riziko kardiovaskulárnych komplikácií.

Neadherencia a nekompliancia majú aj závažné zdravotné a ekonomické dôsledky. Štúdia z USA uvádza, že vynechanie liečby a striedanie liekových režimov AH zvyšuje ročné náklady na starostlivosť o hypertonikov o 26,9 milióna dolárov (Mc Combs a kol., 1994). Nedostatočná kontrola TK spôsobuje ročne viac o 40 000 kardiovaskulárnych príhod, viac ako 8 000 úmrtí a 964 miliónov dolárov nepriamych nákladov (Flack a kol., 2002).

ACE inhibítory a antagonisti receptora angiotenzínu II a COVID-19

V súčasnosti je diskutovanou otázkou efektívnosť a bezpečnosť skupiny liekov ACEi (ACE inhibítory) a antagonistov receptora angiotenzínu II (ARB) v súvislosti s pandémiou COVID-19. Ukázalo sa, že enzým konvertujúci angiotenzín 2 (ACE2) slúži ako receptor a je vstupným bodom do ľudských buniek pre vírus SARS-CoV-2, ktorý spôsobuje ochorenie COVID-19. Pacienti so základnými kardiovaskulárnymi ochoreniami a hypertenziou, ale aj komorbiditami ako sú *DM,* chronické ochorenia pľúc a onkologickí pacienti majú zvýšené riziko úmrtia na ochorenie COVID-19 (Guzik a kol. 2020). Ťažký priebeh ochorenia bol zistený hlavne u starších mužov. V niektorých experimentálnych štúdiách na zvieracích modeloch sa ukázalo, že ACE inhibítory aj ARB zvyšujú expresiu ACE2 v srdci. Najnovšie výskumy ukázali, že expresia ACE2 receptorov je vyššia u mladých pacientov ako u starších a vyššia u žien ako u mužov (Cheng a kol., 2020). Potenciálne zvýšené množstvo ACE2 receptorov z dôvodu užívania liekov typu ACE inhibítorov alebo ARB vedie k špekuláciám o potenciálnom zvýšenom riziku infekcie COVID-19 u pacientov liečených týmito liekmi. V dôsledku týchto informácií, ktoré boli šírené na stránkach sociálnych médií, pacienti, ktorí tieto lieky užívali na liečbu hypertenzie, ich v niektorých prípadoch svojvoľne prestali užívať.

Na hypotézu okolo úlohy ACE2 pri ochorení COVID-19 vydali stanoviská aj relevantné národné a medzinárodné inštitúcie, ktoré zdržujú popredných odborníkov v oblasti kardiológie, ako napr. Európska kardiologická spoločnosť, Slovenská kardiologická spoločnosť, hlavný odborník MZ SR pre kardiológiu, ktorí odporúčajú, aby lekári aj pacienti pokračovali v nastavenej liečbe v schválených indikáciách, nakoľko neexistujú relevantné klinické alebo vedecké dôkazy, ktoré by naznačovali, že by sa liečba ACE inhibítormi mala prerušiť z dôvodu infekcie COVID-19 (ŠUKL, 2020).

ZÁVER

Hypertenzia patrí medzi závažné kardiovaskulárne ochorenia, na ktoré umiera podľa WHO každý rok približne 17 miliónov pacientov (WHO, 2003). Jednou z príčin je aj neúčinná terapia, ktorá úzko súvisí s kompliancíou a adherenciou pacientov k liečbe. Signifikantným dôkazom sú aj výsledky našej štúdie, ktoré poukazujú na nízku kompliancíu a adherenciu našich hypertenzných pacientov (respondentov). Sú to prevažne muži vo vekovej kategórii 51 – 65 rokov, ktorí majú nadváhu a trpia komorbiditami k AH (najčastejšie *DM* 2. typu). Len málo z nich užíva výživové doplnky, používa pomôcky pri dávkovaní liekov a dodržiava správnu životosprávu, čím by sa zvýšila adherencia k terapii a aj samotná terapia. Významnú úlohu v zlepšovaní adherencie zohráva lekár a ostatní poskytovatelia zdravotníckej starostlivosti, preferencia kombinovanej medikamentóznej liečby a fixnej kombinácie 1-krát denne. Pacient sám môže zvýšiť adherenciu pravidelným meraním TK, používaním pomôcok pri dávkovaní liekov, dodržiavaním zásad zdravého životného štýlu a zodpovedným prístupom k svojmu zdravotnému stavu.

ZOZNAM LITERATÚRY

Bittnerová, M., Vojčíková, A., Magulová, L., Porubská, M., Sirotiaková, J., Kyselovič, J.: Porovnanie klinického stavu a farmakoterapie u pacientov s hypertenziou a súčasne s diabetom mellitom a pacientov s hypertenziou bez diabetu [Clinical condition and pharmacotherapy in patients with hypertension and diabetes in compared to patients without diabetes]. *Klinická farmakológie a farmacie*, 2006, 20 (3), 123 – 128. http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2006/03/02.pdf. [cit. 2017-02-16].

COVID-19 a antihypertenzíva pôsobiace na renín-angiotenzínový systém [COVID-19 and antihypertensives acting on renin-angiotensin system]. *Liekové riziko*, ŠUKL, apríl 2020, 54, 6 – 10.

Elzubier, A. G., Husain, A. A., Suleiman, I. A., Hamid, Z. A.: Drug compliance among hypertensive patient Kassala, eastern Sudan. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 2000, 6 (1),100 – 105.

Flack, J. M., Casciano, R., Casciano, J., Doyle, J., Arikian, S., Tang, S., Arocho, R.: Cardiovascular disease costs associated with uncontrolled hypertension. *Managed Care Interface*, 2002, 15 (11), 28 – 36.

Gajdošík, J.: Adherencia k liečba – dôležitá súčasť dosiahnutia účinku terapie pri chronických chorobách [Adherence to treatment – important part of achieving therapeutical effect in chronic diseases]. *Athro Review*, 2017, 2 (1), 15 – 19.

Gašpar, Ľ, Bendžala, M., Komorníková, A., Mesárošová, D., Baláž, D., Gavorník, P., Dukát, A.: Artériová hypertenzia – rizikový faktor kardiovaskulárnych komplikácií [Arterial hypertension – a risk factor for cardiovascular complications]. *Vaskulárna medicína*, 2013, 5 (1), 7 – 10. https://www.solen.sk/storage/file/article/cca-d0d90b4299984a5da5961d4d50345.pdf. [cit. 2017-01-30].

Gregorová, J., Holečková, P.: Hypertenze jako nežádoucí účinek léčiv [High pressure as a side effect of drugs]. *Klinická Farmakologie a Farmacie*, 2019, 33 (3), 25 – 28.

Guzik, T. J., Mohiddin, S. A., Dimarco, A., Patel, V., Savvatis, K., Marelli-Berg, F. M., Madhur,

M. S., Tomaszewski, M., Maffia, P., D'Acquisto, F., Nicklin, S. A., Marian, A. J., Nosalski, R., Murray, E. C., Guzik, B., Berry, C., Touyz, R. M., Kreutz, R., Wang, D. W., Bhella, D., Sagliocco, O., Crea, F., Thomson, E. C., McInnes, I. B.: COVID-19 and the cardiovascular system: implications for risk assessment, diagnosis, and treatment. *Cardiovascular Research*, 2020, 116 (10), 1666 – 1687. doi:10.1093/cvr/cvaa106.

Cheng, H., Wang, Y., Wang, G.-Q.: Organ-protective effect of angiotensin-converting enzyme 2 and its effect on the prognosis of COVID-19. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92, 726 – 730.

Lincová, D., Farghali, H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie* [Basic and applied pharmacology]. Praha: Galén, 2007, 672 s.

Mc Combs, J. S., Nichol, M. B., Newman, C. M., Sclar, D. A.: The costs of interrupting antihypertensive drug therapy in a Medicaid population. *Medical Care*, 1994, 32 (3), 214 – 226.

Medzihorský, Š., Lehocká, Ľ., Masaryková, L., Snopková, M., Foltán, V.: *Komunikácia a lekárenská starostlivosť* [Communication and pharmacy care]. Bratislava: Linwe Kraft, 2011, 93 s.

Psaty, B. M., Koepsell, T. D., Wagner, E. H., LoGerfo, J. P., Inui, T. S.: The relative risk of incident coronary disease associated with recently stoping the use of beta blockers. *JAMA*, 1990, 263 (121), 1653 – 1657.

Spinar, J., Vitovec, J., Spinarova, L., Bendova, M.: Kombinační léčba hypertenze 2015 [Combination treatment of hypertension in 2015]. *Vnitřní Lékařství*, 2015, 61 (5), 458 – 465.

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

WHO. Poor adherence to long-term treatment of chronic diseases is a worldwide problem. *Pan American Journal of Public Health*, 2003, 14 (3), 84 – 87.

Zummerová, A., Kolesárová, M.: Adherencia pacientov k liečbe reumatoidnej artritídy [Adherence of patients to the therapy of rheumatoid arthritis]. *Folia Pharmaceutica Cassoviensia*, 2020, 2 (3), 69 – 78.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 1: 22 – 28, 2021

HODNOTENIE VPLYVU ETANOLOVÉHO EXTRAKTU KOMONICE LEKÁRSKEJ NA MODELOVÚ BUNKOVÚ LÍNIU

IMPACT OF MELILOTUS OFFICINALIS EXTRACT ON A MODEL CELL LINE

Kadáková, Denisa[1]; Marcinčáková, Dana[1]; Sowa, Patrycja[2]

[1]Katedra farmakológie a toxikológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika
[2]Department of Bioenergetics, Food Analysis and Microbiology
Faculty of Biology and Agriculture University of Rzeszów, Zelwerowicza 4, 35-601 Rzeszów
Poland

dkadakova@gmail.com

ABSTRAKT

Z čeľade *Fabaceae* a rodu *Melilotus* majú farmaceutický potenciál komonica lekárska *Melilotus officinalis* (L.) Pall. a komonica biela *Melilotus officinalis* subsp. *alba* (Medik.). Rod *Melilotus* obsahuje kumarín, ktorý pri vysokých dávkach a dlhodobom užívaní môže pôsobiť toxicky. Cieľom štúdie bolo zhodnotiť vplyv etanolových extraktov komonice v koncentráciách 125, 250, 500, 1000 µg.ml^{-1} na bunky črevného epitelu prasiat (IPEC-1). Zmeny, ktoré nastali na bunkách, sa monitorovali v reálnom čase počas 48 hodín systémom xCELLigence. K bunkám bol pridaný extrakt *Melilotus officinalis* samostatne alebo v kombinácii s kumarínom. Etanolový extrakt *Melilotus officinalis* pri koncentráciách 500 a 1000 µg.ml^{-1} spôsobil výrazný pokles bunkového indexu ($P < 0,05$); len pri najnižšej koncentrácii 125 µg.ml^{-1} bol bunkový index porovnateľný s kontrolou ($P > 0,05$). Najvyššia hodnota bunkového indexu bola zaznamenaná u buniek, ktoré boli ošetrené extraktom *Melilotus* subsp. *alba*, kumarínu a ich vzájomnou kombináciou, kde hodnota bola porovnateľná s kontrolnými bunkami. Najnižšiu proliferáciu buniek sme stanovili pri koncentrácii 250 µg.ml^{-1} u *Melilotus officinalis* (87,35) %. Metabolickú aktivitu buniek sme stanovili pomocou MTT testu (24 hodinová expozícia). Najnižšiu metabolickú aktivitu buniek pri koncentrácii 250 µg.ml^{-1} sme zaznamenali u *Melilotus officinalis* (90,21 %) a *Melilotus* subsp. *alba* (91,40 %) v porovnaní s kontrolou (100 %). Všetky testované látky spôsobili štatisticky

významný pokles metabolickej aktivity, okrem kumarínu v koncentráciách 125 a 250 µg.ml^{-1}, pri ktorých boli hodnoty porovnateľné s kontrolou (P < 0,05).

U testovaných etanolových extraktov sme zaznamenali proliferačné zmeny v bunkách, zmenu adherencie a pokles metabolickej aktivity buniek.

Kľúčové slová: komonica lekárska; kumarín; terapia; toxicita

ABSTRACT

Sweet clover is a type of medicinal plant with a good therapeutic impact and many other positive effects. The plant contains coumarin, which at high doses and long-lasting usage might act toxically. The aim of the study was to evaluate the effect of sweet clover ethanol extract on the cells of pig's intestinal epithelium (IPEC-1). The cells had been exposed to the following pre-prepared ethanol extracts: sweet clover (*Melilotus officinalis*), white clover (*Melilotus* subsp. *alba*), and coumarin at concentrations of 125, 250, 500, 1000 µg.ml^{-1}. Changes that started to appear had been monitored in real-time throughout 48 hours by xCELLigence system. The cells had been exposed to *Melilotus officinalis* extract solely or in a combination with coumarin, and we noticed a significant decrease of proliferation in comparison with a control sample. The tested herbal extract *Melilotus officinalis* with the concentrations of 500 and 1000 µg.ml^{-1} had caused a significant decrease in cell index (P < 0,05), however, only at the lowest concentration of 125 µg.ml^{-1}, the cell index was similar to the control sample (P > 0,05). The highest value of a cell index was encountered in the cells which had been treated by *Melilotus* subsp. *alba* extract, coumarin, and a combination of both, where the value was comparable with a control sample. The lowest proliferation of the cells was appointed at 250 µg.ml^{-1} concentration of *Melilotus officinalis* (87,35 %). The metabolic activity of the cells was evaluated by the MTT test (24-hour exposition). The lowest metabolic activity of the cells was at 250 µg.ml^{-1} of *Melilotus officinalis* (90,21 %) and *Melilotus* subsp. *alba* (91,40 %) in comparison with the control sample (100 %). All tested substances caused a statistically significant decrease in metabolic activity except for coumarin at the concentrations of 125 and 250 µg.ml^{-1}, at which the values had been similar to a control sample (P < 0,05). In the tested ethanol extract we could record proliferative changes in the cells, changes in adherence, and decrease of metabolic activity of cells.

Key words: coumarin; sweet clover; therapy; toxicity

ÚVOD

Komonica lekárska (*Melilotus officinalis*) je hlavnou liečivou rastlinou rodu *Melilotus*. Rastlina má veľa pozitívnych účinkov a dobrý terapeutický efekt. Hlavnou terapeutickou zložkou komonice lekárskej sú kumaríny. Rastlina má protizápalové, antioxidačné, antiedematózne, flebotonické, spazmolytické, diuretické a sedatívne účinky (Burlando a kol., 2010). Pôsobí ako antikoagulans a používa sa pri žilových ochorenia, kŕčových žilách, hemoroidoch, bolestiach hlavy. Vyššie dávky majú tlmivý účinok na centrálny nervový systém. Dlhodobé užívanie nadmerných dávok môže zapríčiniť zvýšenú krvácavosť a vnútorné krvácanie. Otrava sa prejavuje bolesťami hlavy, závratmi, vracaním a ospalosťou (Mika, 2019).

V oblasti toxikológie a farmakológie sa v súčasnosti používa široké spektrum testov na hodnotenie cytotoxicity. Na detekciu životaschopných buniek sa používajú tetrazóliové testy. Test MTT meria životaschopnosť buniek *in vitro* a pomáha vyhodnotiť účinok testovaných molekúl (Lu, 2012).

Pomocou xCELLigence systému sme v reálnom čase sledovali zmeny buniek IPEC-1. Systém

používa špeciálne navrhnuté mikrotitračné platne, ktoré obsahujú zlaté mikroelektródy. Nepretržité monitorovanie životaschopnosti buniek pomocou systému xCELLligence umožňuje rozoznať poškodenie buniek, ako je bunková toxicita (bunková smrť) a znížená proliferácia (zastavenie bunkového cyklu) (Kustermann a kol., 2013).

Cieľom štúdie bolo zhodnotiť účinok etanolového extraktu komonice lekárskej na bunkách črevného epitelu v reálnom čase pomocou xCELLigence systému a metabolická aktivita buniek bola stanovená MTT testom.

MATERIÁL A METÓDY

V experimente boli použité nasledujúce materiály a extrakty: etanolové extrakty rastlín komonice lekárskej (*Melilotus officinalis*), komonice bielej (*Melilotus* subsp. *alba*) a roztok štandardu kumarínu (Sigma Aldrich, Nemecko). Zásobné roztoky boli pripravené 10-krát koncentrované v koncentráciách 125, 250, 500, 1000 $\mu g.ml^{-1}$. Pre zhodnotenie vzájomného pôsobenia etanolových extraktov bola vybraná koncentrácia 250 $\mu g.ml^{-1}$. Ďalšie použité materiály a extrakty boli: bunková kultúra prasacích epitelových buniek čreva IPEC-1, kultivovaná v inkubátore pri konštantnej teplote 37 °C, atmosfére 5 % s obsahom CO_2 v kompletnom kultivačnom médiu 5 % DMEM, ktoré sa skladalo z DMEM/F12 bez glutamínu (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich, Nemecko), s obsahom 5 % fetálneho bovinného séra; 0,2 % ITS (Insulin – Transferin – Selenium, 500 x koncentrovaný, LONZA, Belgicko); 0,05 % EGF (Epidermal Growth Factor) a 0,1 % gentamycínu (Sigma Aldrich, Nemecko).

xCELLigence systém

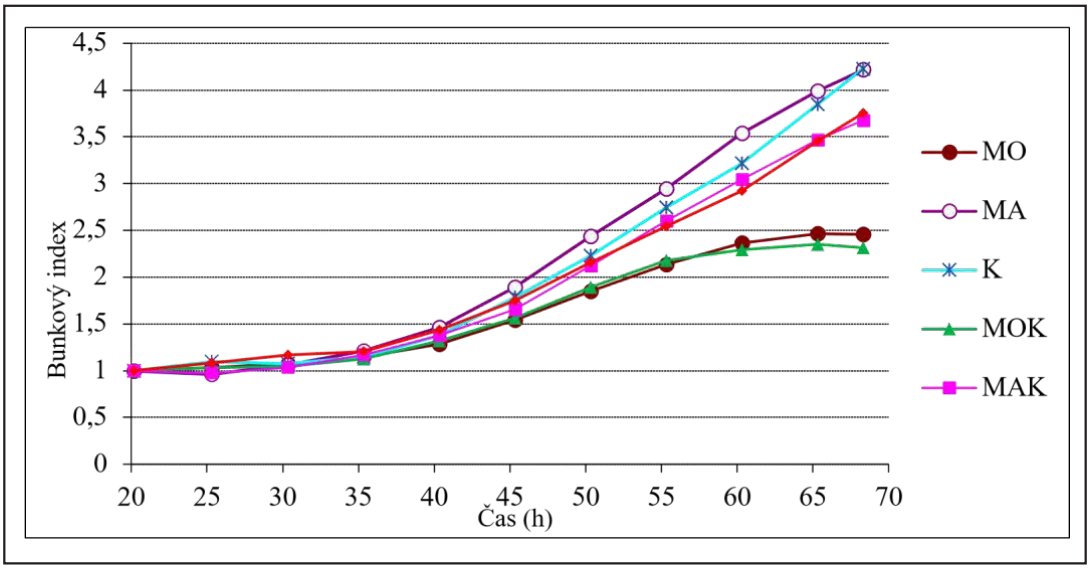
Proliferačné zmeny v bunkách a zmeny v ich adherencii v reálnom čase sme zaznamenali pomocou xCELLigence systému. Do RTCA stanice umiestnenej v inkubátore sme vložili tri E-platne, pričom v každej jamke bolo 100 µl DMEM média. Po zmeraní pozadia sme do každej jamky pridali 50 µl bunkovej suspenzie s obsahom 5000 buniek. Prvá fáza inkubácie trvala 24 hodín za účelom dosiahnutia adherencie všetkých buniek. Platne so zlatými elektródami (E-platne), ktoré sú umiestnené na dne jamiek, zaznamenali zmenu odporu adherentných buniek počas celej doby experimentu. Po 24 hodinách sme bunky ošetrili testovanými látkami. Na testovanie kombinácií extraktov a kumarínu sme zvolili koncentráciu 250 $\mu g.ml^{-1}$, pričom do každej jamky sme pridali 10 µl extraktu, 10 µl kumarínu a 30 µl média. Ošetrené bunky boli inkubované 48 hodín. Systém xCELLigence zaznamenával zmeny odporu na dne každej jamky a zmeny vyjadrené ako hodnoty CI zaznamenával pomocou softvéru do grafov (ACEA, 2013).

MTT test

Súbežne s monitorovaním buniek pomocou RTCA prebiehal aj MTT test. Bunky z rovnakej pasáže boli nasadené do 96-jamkových platní s plochým dnom (Greiner, Nemecko) v množstve 8600 buniek v konečnom objeme 100 µl kultivačného média v 1 jamke. Po 24-hodinovej kultivácii sa k bunkám pridali testované látky v koncentráciách 125, 250, 500 a 1000 $\mu g.ml^{-1}$ v pomere 1:10 s médiom (10 µl extraktu alebo kumarínu a 90 µl média). Pre zhodnotenie účinku kombinácie extraktov a kumarínu boli zvolené koncentrácie extraktov aj kumarínu 250 $\mu g.ml^{-1}$ a boli do jamiek pridané v pomere 1:1, teda 5 µl extraktu, 5 µl kumarínu a 90 µl média.

Po 24-hodinovej kultivácii buniek s prídavkom testovaných látok bol vykonaný MTT test. Bunky boli inkubované so žltým roztokom MTT (0,5 $mg.l^{-1}$) v pomere 1:10 po dobu 4 hodín. Po inkubačnej dobe sa vytvoria fialové kryštály formazánovej soli. Tieto kryštály sú nerozpustné vo vodnom roztoku, boli rozpustené po odsatí média a po pridaní solubilizačného roztoku koncentrovaného DMSO v množstve 100 µl/jamka (Sigma Aldrich, Nemecko). Nakoniec bol pridaný Sorensenov glycínový pufer na stabilizáciu roztoku. Absorbancia bola meraná pri 570 nm pomocou spektrofotometra (Synergy HT; Biotek, Winooski, VT, USA).

Graf 1: Priebeh zmien CI u buniek ošetrených extraktami a ich kombináciami s kumarínom v porovnaní s kontrolou (48 h)



MO – *Melilotus officinalis*, MA – *Melilotus* subsp. *alba*, K – kumarín, MOK – *Melilotus officinalis* v kombinácii s kumarínom, MAK – *Melilotus* subsp. *alba* v kombinácii s kumarínom, kontrola

Štatistické spracovanie výsledkov

Výsledky získané pomocou RTCA sme vyjadrili softvérom xCELLigence ako priemernú hodnotu CI. Porovnávali sme výsledky po 24 a 48-hodinovej kultivácii a taktiež sme porovnávali výsledky vo vzájomných kombináciách testovaných látok pri koncentrácii 250 µg.ml^{-1} (n = 3). Výsledky testov sme vyhodnotili štatisticky pomocou programu GrafPad Prism 5.0 jednocestného Anova testu, Dunnetovým porovnávacím testom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

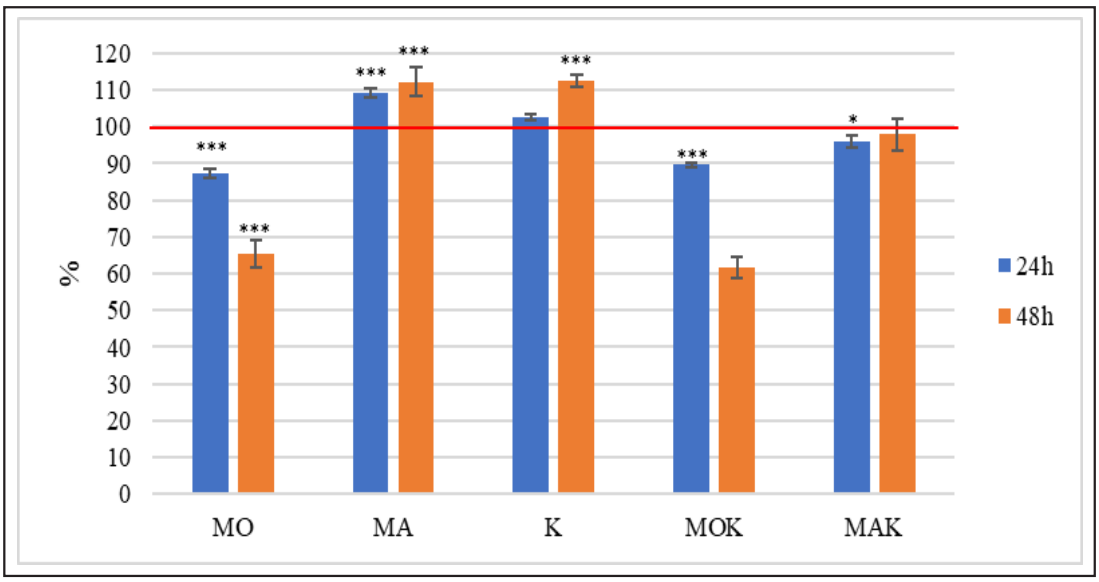
xCELLigence systém predstavuje novú technológiu pre štúdium bunkovej biológie *in vitro* (Kho a kol., 2015). Klinické hodnotenie pomocou xCELLigence technológie bude nepochybne naďalej rásť, pretože predstavuje silnú platformu pre skríning toxicity liekov pomocou ľudských buniek (Jonsson, Wang, Becker, 2011).

V štúdii sme sledovali bunkové zmeny, ktoré nastali počas ošetrenia testovanými látkami. Za testované látky sme si zvolili etanolové extrakty kvetov rastlín *Melilotus officinalis*, *Melilotus* subsp. *alba* a aj kumarín. Testované látky sme sledovali v koncentráciách 125, 250, 500 a 1000 µg.ml^{-1}. Všetky výsledky zmien CI sme porovnali s kontrolnou vzorkou. Čím vyššie sú hodnoty CI, tým vyššia je úroveň adhézie. Pri nižších hodnotách CI predpokladáme zníženú priľnavosť a teda smrť buniek. CI predstavuje stav bunky po zmene v elektrickej impedancii.

Bunkové zmeny, ktoré nastali počas ošetrenia testovanými látkami, sme sledovali pomocou xCELLigence systému. Bunky boli exponované 48 hodín. Zaznamenali sme zmenu priebehu kriviek testovaných látok v porovnaní s kontrolou.

Pri kombinácii extraktov a kumarínu sme bunky vystavili účinkom ich vzájomných kombinácií v koncentrácii 250 µg.ml^{-1}. Výsledky zmien CI sú zaznamenané v grafe 1. Pokles bunkového indexu sme zaznamenali u buniek, ku ktorým bol pridaný extrakt *Melilotus officinalis* samotný, aj v kombinácii s kumarínom ($P < 0,05$). *Melilotus* subsp. *alba*,

Graf 2: Porovnanie zmien CI (v %) v 24. a 48. hodine expozície testovaným látkam vo vzájomných kombináciách



MO – *Melilotus officinalis*, MA – *Melilotus* subsp. *alba*, K – kumarín, MOK – *Melilotus officinalis* v kombinácii s kumarínom, MAK – *Melilotus* subsp. *alba* v kombinácii s kumarínom

kumarín a ich vzájomné kombinácie preukázali hodnoty CI vyššie alebo porovnateľné s kontrolou.

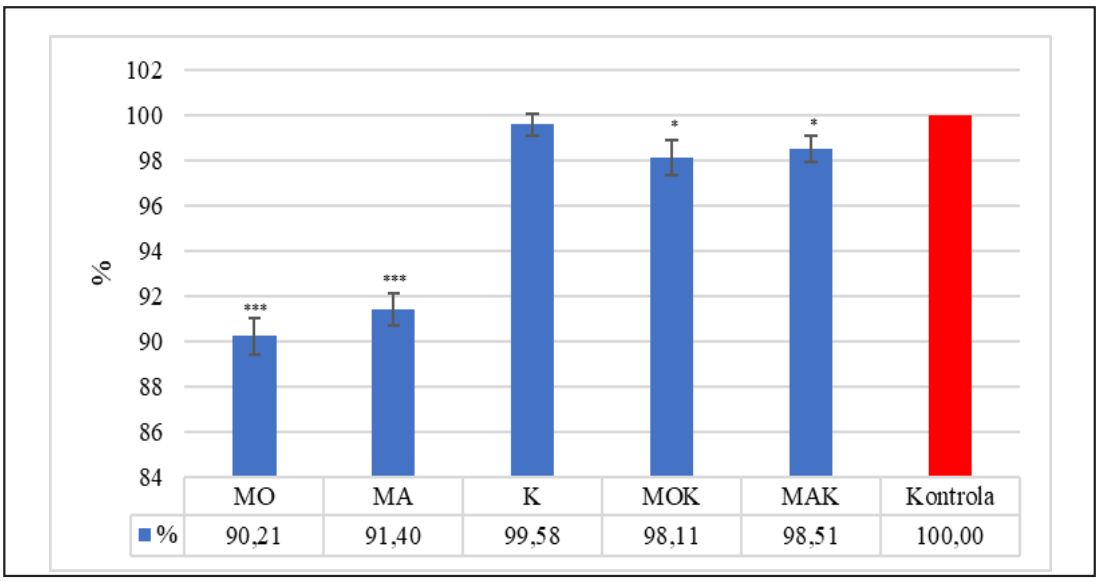
Bunkové zmeny, ktoré nastali po expozícii testovaným látkam v 24. a 48. hodine sme vyhodnotili percentuálne, čo je znázornené v grafe 2.

Najvyššia hodnota CI bola zaznamenaná u buniek ošetrených extraktom *Melilotus* subsp. *alba*, kumarínu a ich vzájomnou kombináciou, kde hodnota bola porovnateľná s kontrolnými bunkami, alebo stúpla štatisticky významne ($P < 0,05$). U buniek, ku ktorým bol pridaný extrakt *Melilotus officinalis* samostatne alebo v kombinácii s kumarínom, došlo k výraznému poklesu proliferácie v porovnaní s kontrolou ($P < 0,05$). Pri koncentrácii 250 $\mu g.ml^{-1}$ bola hodnota proliferácie *Melilotus officinalis* 87,35 %. Hodnota, ktorá bola porovnateľná s kontrolnými bunkami pri koncentrácii 250 $\mu g.ml^{-1}$ bola pri vzájomných kombináciách kumarínu s *Melilotus officinalis* 89,61 % a kumarínu s *Melilotus* subsp. *alba* 95,97 %, alebo stúpla štatisticky významne u buniek, ktoré boli ošetrené extraktom *Melilotus* subsp. *alba* (109,20 %) a kumarínu (102,51 %).

MTT je nerádioaktívny kolorimetrický test, ktorý sa používa na kvantifikovanie bunkovej proliferácie a životaschopnosti buniek. Test je založený na štiepení žltej tetrazóliovej soli MTT na purpurové formazánové kryštály metabolicky aktívnymi bunkami (Roche, 2016).

Metabolickú aktivitu buniek sme stanovili testom MTT v 24 h od pridania látok (viď graf 3). Testované látky, ktoré sú použité v štúdii, spôsobili pokles metabolickej aktivity, okrem kumarínu. Metabolická aktivita buniek, ktorú sme vyjadrili v percentách pri koncentrácii 250 $\mu g.ml^{-1}$ bola najnižšia u *Melilotus officinalis* (90,21 %) a u *Melilotus* subsp. *alba* (91,40 %), avšak nárast metabolickej aktivity sme zaznamenali v kombináciách kumarínu s testovanými látkami [kumarín v kombinácii s *Melilotus officinalis* (98,11 %) a kumarín v kombinácii s *Melilotus* subsp. *alba* (98,51 %)].

Graf 3: Porovnanie zmien metabolickej aktivity buniek ošetrených kombináciou testovaných látok



MO – *Melilotus officinalis*, MA – *Melilotus* subsp. *alba*, K – kumarín, MOK – *Melilotus officinalis* v kombinácii s kumarínom, MAK – *Melilotus* subsp. *alba* v kombinácii s kumarínom, kontrola

V súčasnosti je dôležité a potrebné skúmať účinky rastlín s obsahom kumarínu a jeho vplyv na zdravie ľudí aj zvierat, farmakologický účinok a možnú cytotoxicitu. Je dôležité poznať terapeutický potenciál v manažmente zdravia.

ZÁVER

V súčasnosti sa mnohé výskumné štúdie zameriavajú na vyhľadávanie rastlín s terapeutickými vlastnosťami, ktoré by mohli byť využité v prevencii a v liečbe mnohých ochorení. Komonica lekárska patrí medzi liečivé rastliny s dobrým terapeutickým efektom. Sú známe jej protizápalové, antioxidačné, antiproliferatívne, antiedematické, spazmolytické, diuretické a sedatívne účinky. Podporuje regeneráciu tkanív, zabraňuje starnutiu pokožky a môže znížiť ukladanie tukov. Rastliny sú bežne dostupné a používajú sa u zvierat ako krmivá a u ľudí na liečenie rôznych chorôb s dobrým terapeutickým účinkom. Nevýhodou týchto rastlín z rodu *Melilotus* je obsah kumarínu, ktorý je zastúpený v rastlinách. Rastliny pri prekročení dávkovania a taktiež pri dlhodobom užívaní môžu spôsobiť toxicitu. Dlhodobé užívanie nadmerných dávok môže zapríčiniť zvýšenú krvácavosť a vnútorne krvácanie. Otrava sa prejavuje bolesťami hlavy, závratmi, vracaním a ospalosťou.

V štúdii sme zistili výrazný pokles proliferácie buniek po pridaní extraktu *Melilotus officinalis* a taktiež pokles proliferácie buniek po pridaní tejto rastliny v kombinácii s kumarínom. Pri MTT teste sme zaznamenali najvyšší pokles metabolickej aktivity u *Melilotus officinalis*.

POĎAKOVANIE

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

ZOZNAM LITERATÚRY

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

Burlando, B. et al.: *Herbal principles in cosmetics: Properties and mechanisms of action*. CRC Press, 2010. 460 s.

Jonsson, M., Wang, Q., Becker, B.: Impedance-based detection of beating rhythm and proarrhythmic effects of compounds on stem cell-derived cardiomyocytes. *Assay and drug development technologies*, 2011, 9, (6) 589 – 599. https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/adt.2011.0396. Accessed July 20, 2020.

Kho, D., MacDonald, C., Johnson, R., Unsworth, C. P., O'Carroll, S. J., Mez, E. D., Catherine E. A., Graham, E. S.: Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors*, 2015, 5, 199 – 222. https://www.mdpi.com/2079-6374/5/2/199.

Kustermann, S., Boess, F., Buness, A., Schmitz, M., Watzele, M., Weiser, T., Singer, T., Suter, L., Roth, A.: A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects. *Toxicology in Vitro*, 2013, 27, 1589 – 1595. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233312002263. Accessed July 21, 2020.

Lü, L., Zhang, L., Wai, M. S. M., Yew, D. T. W., Xu, J.: Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicology in Vitro*, 2012, 2 6 , 636 – 644. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887233312000598. Accessed March 17, 2020.

Mika, K.: Komonica lekárska. *Teória a prax – odborný časopis pre farmaceutických laborantov*, 2019, 8, 33.

Roche. Cell proliferation kit I (MTT). 2016. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/1146500700 1bul.pdf. Accessed October 9, 2019.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 1: 29 – 38, 2021

IZOLÁCIA A CHARAKTERIZÁCIA BIOLOGICKY AKTÍVNYCH SACHARIDOV Z HÚB RODU *CORDYCEPS* (FR.) LINK.

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SACCHARIDES FROM FUNGI OF THE GENUS *CORDYCEPS* (FR.) LINK.

Jurášková, Jaroslava; Ungvarská Maľučká, Lucia

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

lucia.ungvarska.malucka@uvlf.sk

ABSTRAKT

***Cordyceps sinensis* je liečivá huba, ktorá sa v Číne používa ako súčasť tradičnej čínskej medicíny. Huby rodu *Cordyceps* sa v medicíne využívajú nielen pre svoj pozitívny vplyv na imunitný systém, ale používajú sa aj pri liečbe chorôb pečene, obličiek a metabolických ochoreniach, ako aj pri liečbe rakoviny. Predložená štúdia sa zaoberá izoláciou a stanovením biologicky aktívnych sacharidov v hubách *Cordyceps sinensis* a *Paecilomyces hepiali*, ktoré boli kultivované na Technickej univerzite vo Zvolene. Na izoláciu polysachridov sa použili extrakčné metódy. Na kvalitatívne stanovenie obsahových látok boli použité chromatografické a spektroskopické metódy. Na identifikáciu chemickej štruktúry bola použitá NMR spektroskopická analýza (1D a 2D NMR). Niektoré z chemických látok boli izolované v čistej forme a ich chemická štruktúra sa chemicky modifikovala. Antioxidačná aktivita sa stanovila DPPH metódou. V izolovaných extraktoch sa testovala ich antimikrobiálna aktivita na kmene baktérií *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Celkovo sa testovali dve vzorky: vzorka 1: *Oryza sativa var. Japonica*, kmeň: *Paecilomyces hepiali* a vzorka 2: *Oryza sativa var. Indica*, kmeň: *Cordyceps sinensis*. Oba extrakty vykazovali porovnateľnú antioxidačnú aktivitu, IC_{50} 3,10 ± 0,25 mg.ml^{-1} (vzorka 1) a vzorka 2 IC_{50} 3,00 ± 0,25 mg.ml^{-1}. Tenkovrstvová chromatografia dokázala prítomnosť D-manitolu iba vo vzorke 2. Analýza 1D a 2D NMR potvrdila v extrakte 1 prítomnosť polyglukánov, aminokyselín (valín, izoleucín, leucín, alanín, tretionín) a glukózy. Vzorka 2 obsahovala len D-manitol. Antimikrobiálna aktivita izolovaných extraktov na kmene baktérií *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* sa nepotvrdila.**

Kľúčové slová: *Cordyceps*; D-manitol; 1D a 2D NMR analýza; chromatografia; kultivácia; polysacharidy

ABSTRACT

***Cordyceps sinensis* is a medicinal fungus in China used in traditional chinese medicine. *Cordyceps* fungi are utilised in medicine for their positive effect on immune system, treatment of liver, kidney and metabolic related diseases as well as cancer treatment. This study deals with isolation and determination of biologically active saccharides in *Cordyceps sinensis* and *Paecilomyces hepiali* fungi cultivated on Technical University in Zvolen. Furthermore, extraction methods were used to obtain polysaccharides. Chromatographic and spectroscopic methods were used for determination of quality of chemical compounds. NMR spectroscopic analysis (1D and 2D) was used to identify chemical structure. Some of the chemical substances were isolated in pure form and their chemical structure has been modified. Antioxidant activity was determined with the DPPH method. In the isolated extracts, their antimicrobial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was tested. Two samples were tested: sample 1: *Oryza sativa var. Japonica*, strain: *Paecilomyces hepiali* and sample 2: *Oryza sativa var. Indica*, strain: *Cordyceps sinensis*. Extract of the samples showed similar antioxidant activity; IC_{50} 3,10 ± 0,25 $mg.ml^{-1}$ (sample 1) and sample 2 3,00 ± 0,25 $mg.ml^{-1}$. The thin-layer chromatography proved the presence of D-mannitol only in sample 2. 1D and 2D NMR analysis in extract 1 confirmed polyglucan, amino acids (valine, isoleucine, leucine, alanine, tretionine) and glucose. Sample 2 contained mostly D-mannitol. Antimicrobial activity of the extracts to bacterial strain of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was not confirmed.**

Key words: *Cordyceps*; cultivation; D-mannitol; 1D and 2D NMR analysis; chromatography; polysaccharides

ÚVOD

Huby ako prírodné liečivá sa stávajú čoraz populárnejšie pri terapii rozmanitých ochorení. Už v minulosti sa preukázalo, že vykazujú široké spektrum biologickej aktivity. Po stáročia je im pripisovaný pozitívny vplyv na zdravie človeka, pomáhajú zlepšovať biologické funkcie organizmu a prispievajú k celkovej fyzickej a duševnej pohode. Huby *Cordyceps* sa po stáročia používali v tradičnej čínskej medicíne.

Rod *Ophiocordyceps* patrí do čeľade Ophiocordycipitaceae a predstavuje viac ako 400 druhov, ktoré rastú na hmyze (Kirk a kol., 2008). Húsenica *Ophiocordyceps sinensis*, predtým známa ako *Cordyceps sinensis (C. sinensis)*, bola prvýkrát predstavená západnej spoločnosti v 17. storočí. *Cordyceps* je bohatým zdrojom chemických látok s rôznou biologickou aktivitou a aj v súčasnosti je široko používaný ako doplnok výživy a zdravia najmä u seniorov v Číne a v ďalších ázijských krajinách. Obsahuje mnoho bioaktívnych zložiek ako sú polysacharidy, kordycepín, D-manitol a ergosterol. Nedávne štúdie ukázali, že chemické zložky extrahované z *Cordyceps* majú rôzne farmakologické účinky, ako sú nefroprotektívne, hepatoprotektívne, protizápalové, antioxidačné, antiapoptotické a protinádorové.

MATERIÁL A METÓDY

Vzorky húb

Vzorky húb boli kultivované a spracované do práškovej formy na Technickej univerzite vo Zvolene. Vzorka 1: substát *Oryza sativa var. Japonica*, kmeň: *Paecilomyces hepiali* (P. hepiali), vzorka 2: substrát *Oryza sativa var. Indica*, kmeň: *C. sinensis*.

Extrakcia vzoriek

Extrakty vzoriek 1 a 2 boli pripravené Sox-

hletovou extrakciou (4,000 g vzorky 1, respektíve 2 sa extrahovalo 4 hodiny v 120,0 ml destilovanej vody). Následne sa extrakty prefiltrovali a odparili do sucha na rotačnej vákuovej odparke (IKA RV 10 digital, Nemecko). U pripravených extraktov sa následne stanovila ich antioxidačná, antimikrobiálna aktivita, chromatografická TLC metóda a NMR spektroskopia VNMRS 600 MHz (Varian, Palo Alto, Kalifornia, USA), sa využili na kvalitatívne stanovenie chemických zlúčenín v izolovaných vodných extraktoch.

Antioxidačná aktivita

Na stanovenie antioxidačnej aktivity sa použila DPPH metóda, ktorá je založená na prenose elektrónov voľných radikálov. Antioxidačná aktivita sa stanovuje spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 517 nm. Postupným pridávaním antioxidantu (extraktu), ktorý je donorom napríklad atómu vodíka, dochádza k premene fialovej farby roztoku na žltú. Zvyšuje sa redukovaná forma DPPH-H. Na vyjadrenie antioxidačnej aktivity sa najčastejšie používa stredná inhibičná koncentrácia označovaná ako IC_{50}. IC_{50} predstavuje koncentráciu látky, ktorá je potrebná na 50 % inhibíciu DPPH radikálu (Molyneux a kol., 2004). Pri stanovení antioxidačnej aktivity sa najskôr zmerala absorbancia roztoku, ktorý vznikol zmiešaním destilovanej vody (1,0 ml) a 0,2 mmol.l^{-1} roztoku DPPH radikálu (1,0 ml). Ako referenčný roztok sa použila destilovaná voda (2,0 ml). Následne sa merali absorbancie pripravených vzoriek 1 a 2; použili sa 4 riedenia extraktov: 2,5 mg.ml^{-1}; 1,25 mg.ml^{-1}; 0,625 mg.ml^{-1}; 0,315 mg.ml^{-1}; ku ktorým sa pridával 1 ml 0,2 mmol.l^{-1} roztoku DPPH radikálu (vzorky sa nechali inkubovať 30 minút v tme pri laboratórnej teplote). Antioxidačná aktivita extraktov sa vypočítala podľa vzorca:

$$I = \frac{A_{DPPH+H2O} - A_{vzorky}}{A_{DPPH+H2O}} x100\%$$

Pre obe vzorky sa zostavila grafická závislosť antioxidačnej aktivity na hmotnostnej koncentrácii vzorky a z rovnice priamky sa určila hodnota IC_{50} v mg.ml^{-1}. Meranie absorbancií sa realizovalo v 3. opakovaniach pomocou spektrofotometra (Biochrom Libra 22, USA).

Antimikrobiálna aktivita

Na stanovenie antimikrobiálnej aktivity extraktov vzoriek 1 a 2 sa použila platňová agarová difúzna metóda. Baktérie *Staphylococcus aeureus* (SA) a *Escherichia coli* (EC) boli získané z Českej zbierky mikroorganizmov v Brne. Baktérie boli kultivované v BHI bujóne pri 37 ºC po dobu 24 hodín. Po kultivácii sa baktérie nariedili vo fosfátovom fyziologickom roztoku na koncentráciu 0,5 – 1,0 McFarlandovej stupnice (McFarland Densitometer, Camlab, Spojené Kráľovstvo). Pripravená suspenzia sa následne inokulovala do tekutého agaru (100,0 ml). 20,0 ml inokulovaného agaru sa potom vylialo do Petriho misiek, v ktorých sa nechal stuhnúť. Do agaru sa následne vyrezali jamky (5 mm), ktoré sa naplnili vzorkou 1, resp. 2 (50,0 µl); vzorky 1 a 2 (35 mg) sa rozpustili v DMSO (400 µl). Ako pozitívna kontrola sa použil roztok gentamycín sulfátu (25 µg.ml^{-1}). Ako negatívna kontrola sa použil roztok DMSO. Naočkované platne sa inkubovali pri 37 ºC počas 24 hodín. Antibakteriálny účinok sa určí podľa rovnice

$$RIZD = \frac{IZD_{vzorka} - IZD_{negatívna\ kontrola}}{IZD_{pozitívna\ kontrola}} \text{ x } 100\ \%,$$

kde RIZD = % priemernej relatívnej inhibičnej zóny v a IZD = priemer inhibičnej zóny v mm.

Kvalitatívna analýza

Pre kvalitatívnu analýzu vzoriek sa použila TLC chtomatografia a ^{1}H NMR spektroskopia. Na TLC chromatografiu sa použili alumíniové platničky s vrstvou silikagélu. Vzorky 1 a 2 sa rozpustili v metanole a kapilárou nanášali na TLC platničky. Chromatografia sa uskutočnila pri teplote miestnosti. TLC platničky sa nechali vyvíjať v troch odlišných mobilných fázach: *n*-butanol:kyselina octová (v/v

5:1), *n*-butanol:toulén (v/v 4:2) a *n*-butanol:kyselina octová (v/v 1:1). Následne sa TLC platničky ponorili do vizualizačného činidla (*p*-anízaldehyd v H_2SO_4/EtOH alebo ninhydrínu). ^{1}H NMR spektrálna analýza sa uskutočnila na 600 MHz spektrometri, vzorky 1 a 2 (25 mg) sa rozpustili v 0,6 ml DMSO-d_6. Pri spracovaní spektier sa použil softvér Mnova-MestReNova (11.0.4-18998, 2017).

Acetylácia D-manitolu

Pri acetylácii D-manitolu ako štandardu, respektíve vzorky 2 sa použili dve reakčné podmienky: k vzorke 2 (42,5 mg) sa pridal anhydrid kyseliny octovej (10,36 ml; 1,08 g.cm^{-3}; 102,09 mol) a katalytické množstvo pyridínu (1 kvapka). Reakčná zmes sa refluxovala pri teplote 160 ºC 6 hodín. Po doreagovaní sa do reakčnej zmesi pridalo 15 ml destilovanej vody a roztok sa dvakrát extrahoval hexánom (2 x 20 ml). Organická vrstva sa vysušila bezvodým síranom sodným (1 lyžička), prefiltrovala a odparila do sucha na rotačnej vákuovej odparke (Branco a kol., 2010). K vzorke 2 (42,5 mg) sa pridal octan sodný (9 mg; 82,03 mol) a acetanhydrid (1,5 ml; 1,08 g.cm^{-3}; 102,09 mol). Reakčná zmes v banke sa refluxovala jednu hodinu. Potom sa produkt premyl destilovanou vodou (2 x 10 ml). Po prefiltrovaní, ďalšom premytí a odparení do sucha sa zmes v banke prekryštalizovala z etanolu za tepla (Cumming a kol., 1937).

VÝSLEDKY

Extrakcia vzoriek a antioxidačná aktivita

Najvyššia výťažnosť sa získala pri vzorke 2 (10,56 %) a takmer dvojnásobne nižšia (4,23 %) pri vzorke 1. Z nameraných výsledkov vychytávania stabilného DPPH radikálu vyplýva, že vzorka 2 (IC_{50} = 3,00 ± 0,25 mg.ml^{-1}) vykazuje len nepatrne vyššiu antioxidačnú aktivitu oproti vzorke 1 (IC_{50} = 3,10 ± 0,25 mg.ml^{-1}).

Antimikrobiálna aktivita

Ani po 24-hodinovej inkubácii sa nepozorovali inhibičné zóny v okolí extraktov vzoriek 1 a 2. To nasvedčuje, že vodné extrakty nevykazujú antimikrobiálnu aktivitu na kmene baktérií *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*.

TLC chromatografia

Škvrny extraktov vzoriek 1 a 2 na TLC platničke po ponorení do zmesi *p*-anízaldehydu v H_2SO_4/EtOH stmavli, čo je kvalitatívnym dôkazom prítomnosti sacharidov. Rovnako ponorením do ninhydrínu niektoré škvrny prítomné na platničke nadobudli fialovú farbu, čo je dôkazom prítomnosti amino-skupiny vo vzorke 1.

NMR analýza

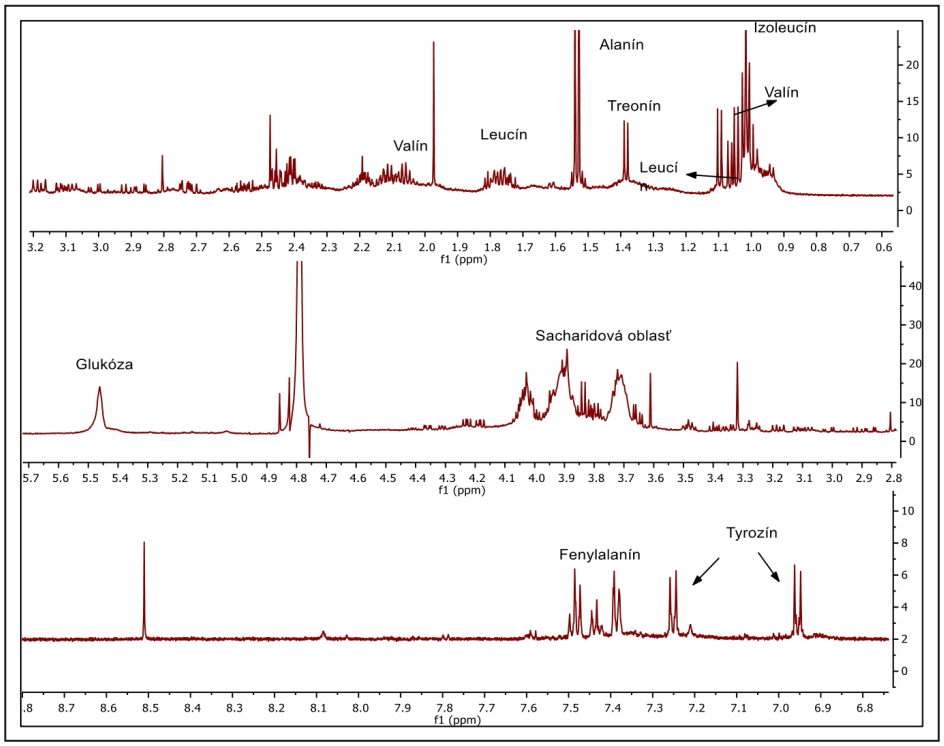
Pomocou NMR analýzy sa podarilo určiť jednotlivé obsahové látky vo vzorke 1: substát *Oryza sativa var. Japonica*, kmeň: *P. hepiali* (viď obr. 1) a vzorke 2: substrát *Oryza sativa var. Indica*, kmeň: *C. sinensis*.

Kompletnou analýzou ďalších 2D NMR spektier (TOCSY a HMBC) sa v tejto zmesi chemických látok podarilo identifikovať nasledujúce zlúčeniny: valín, izoleucín, leucín, treonín, alanín, glukóza, polysacharidy, tyrozín, fenylalanín (viď obr. 1). Na obr. 2 sa nachádza COSY spektrum D-manitolu. Ako vidieť (sivý štvorec), v tomto 2D NMR spektre sa nachádzajú krospíky medzi jednotlivými protónmi patriacimi jednému spinovému systému.

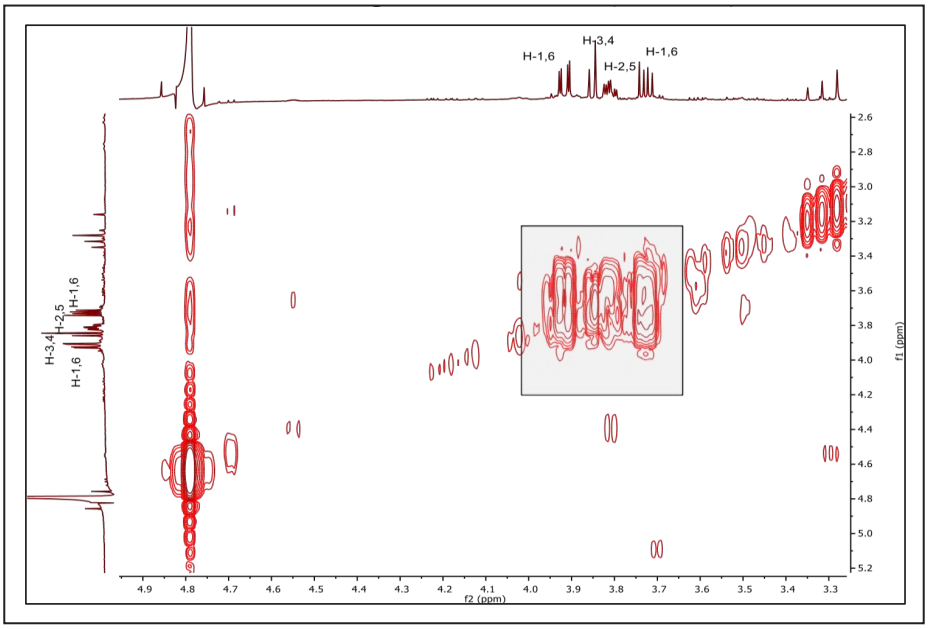
Acetylácia D-manitolu

Pretože v ^{1}H NMR spektre D-manitolu neboli prítomné signály protónov hydroxy- skupín, modifikáciou jeho chemickej štruktúry dvoma rozdielnymi reakčnými podmienkami sa 100 % potvrdila jeho chemická štruktúra. Acetyloval sa čistý D-manitol (ako štandard) a D-manitol izolovaný z extraktu vzorky 2. Použitím oboch reakčných podmienok došlo k 100 % konverzii D-manitolu na hexaacetylovaný D-manitol (acetylácia štandardu a D-manitolu z extraktu vzorky 2 (viď. obr. 3 a 4)).

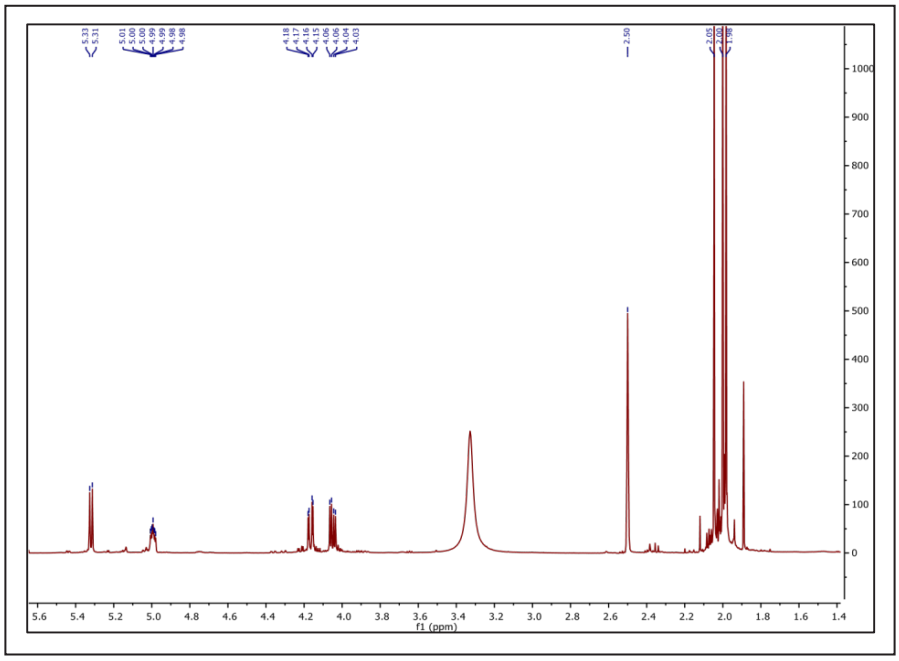
Obr. 1: ^{1}H NMR spektrum extraktu vzorky 1



Obr. 2: COSY spektrum extraktu 2 (D-manitol)

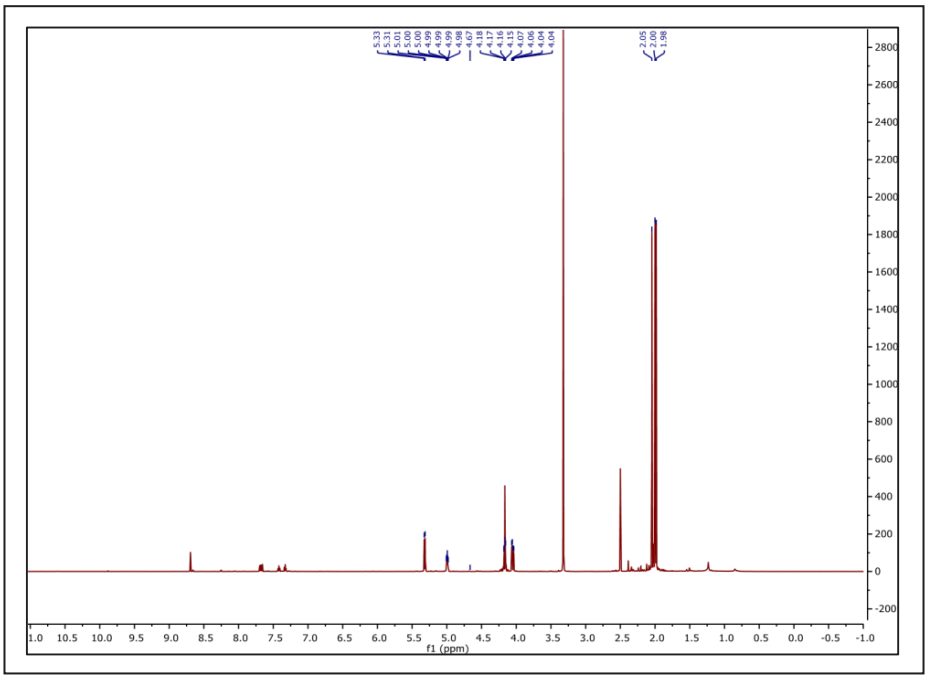


Obr. 3: ^{1}H NMR spektrum acetylácie extraktu vzorky 2 (DMSO)



Reakčné podmienky: Ac_2O, DMAP/py

Obr. 4: ^{1}H NMR spektrum acetylácie extraktu vzorky 2 (DMSO)



Reakčné podmienky: Ac_2O, AcONa

DISKUSIA

Za široké spektrum farmakologických vlastností *Cordyceps* sú zodpovedné rozmanité chemické zlúčeniny, ktoré zmierňujú oxidačné procesy prebiehajúce v živom organizme. V prácach iných autorov sa uvádza, že kmeň *P. hepiali* účinne zmierňuje oxidačné poškodenie a spomaľuje predčasné starnutie. Aj keď v tomto kmeni bola preukázaná antioxidačná aktivita izolovaných polysacharidov, nepodarilo sa autorom dostatočne jasne vysvetliť ich antioxidačný mechanizmus sledovaný *in vivo* (Leung a kol., 2009).

Na stanovenie antioxidačnej aktivity sa použila DPPH metóda, ktorá je zložená na vychytávaní stabilného DPPH radikálu (Xu a kol., 2016). Antioxidačná aktivita pripravených extraktov vzorky 1 a 2 sa sledovala farebnou zmenou roztokov v skúmavkách. Roztoky, ktoré zmenili farbu z fialovej na žltú, vykazovali antioxidačnú aktivitu. Z nameraných výsledkov vyplýva, že vzorka 2 s hodnotou IC_{50} = 3,00 ± 0,25 $mg.ml^{-1}$ vykazuje len mierne vyšší antioxidačný účinok oproti vzorke 1 s hodnotou IC_{50} = 3,10 ± 0,25 $mg.ml^{-1}$. Vyplýva to z porovnania hodnôt IC50, kedy je vychytaných 50 % DPPH radikálu. Porovnaním s prácami iných autorov o antioxidačnej aktivite vodných extraktov sledovaných *in vitro* z prírodného, respektíve kultivovaného mycélia *C. sinensis* vyplýva, že oba extrakty majú priame a silné antioxidačné účinky. Vodné extrakty z prírodného aj kultivovaného mycélia sa vyznačujú inhibíciou lipidovej peroxidácie, a tiež vykazujú porovnateľný účinok ako α-tokoferol, dobre známy prírodný antioxidant (Zhang a kol., 2006). Vodné extrakty inhibujú hromadenie cholesterolu v makrofágoch prostredníctvom potlačenia oxidácie LDL (Yamaguchi a kol., 2000). Extrakty *C. sinensis* majú aj mierne chelatačné schopnosti železitých iónov (Tsai a kol., 2006). V extraktoch z mycélia *C. sinensis* sa v mnohých prácach uvádzajú ako hlavné zložky pri vychytávaní voľných radikálov najmä polysacharidy (Li a kol., 2002), D-manitol a kordycepín (Zhang a kol., 2003). D-manitol obsahoval len extrakt vzorky 2. Taktiež bola dokázaná jeho schopnosť zhášať hydroxylový radikál (André a kol., 2017).

Za široké spektrum farmakologických vlastností *Cordyceps* sú zodpovedné rozmanité chemické zlúčeniny, ktoré zmierňujú oxidačné procesy prebiehajúce v živom organizme. V prácach iných autorov sa uvádza, že kmeň *P. hepiali* účinne zmierňuje oxidačné poškodenie a spomaľuje predčasné starnutie. Aj keď v tomto kmeni bola preukázaná antioxidačná aktivita izolovaných polysacharidov, nepodarilo sa autorom dostatočne jasne vysvetliť ich antioxidačný mechanizmus sledovaný *in vivo* (Leung a kol., 2009). Vo vzorke 1 sa podarilo pomocou NMR analýzy identifikovať aminokyseliny ako valín, izoleucín, leucín, alanín (tie boli potvrdené aj v práci Oh a kol., 2014) a polysacharid označovaný ako CBHP (opísaný v práci Nie a kol., 2011). Výsledky štúdií dokazujú, že kmeň húb *Cordyceps* vo všeobecnosti vykazuje silnú antioxidačnú aktivitu. Zistilo sa, že kultivované druhy *C. sinensis* majú antioxidačnú aktivitu porovnateľnú s prírodnými druhmi (Li a kol., 2001).

V pripravených extraktoch sa testovala aj ich antibakteriálna aktivita pomocou platňovej agarovej difúznej metódy na kmene baktérií *S. aureus* a *E. coli*. Ani jeden z týchto extraktov nepotláčal rast vyššie spomenutých baktérií. Walker a kol. (1993) vo svojej práci opisuje využitie rovnakej metódy na identifikáciu antibakteriálneho účinku vodných extraktov *P. hepiali* a *C. sinensis*. Z *P. hepiali* a *C. sinensis* boli extrahované bioaktívne zložky ako kordycepín, polysacharidy, ergosterol, D-manitol a adenozín (Yue a kol., 2013), no za látky s antibakteriálnym účinkom sa považujú kordycepín a ergosterol (Tuli a kol., 2013). Iní autori uvádzajú, že aktívnymi zložkami *Cordyceps* sú aj peptidy, glykoproteíny (Zhang a kol., 2006), adenozín, adenín, hypoxantín, kordycepín (Huang a kol., 2004). Vodný extrakt *P. hepiali* a *C. militaris* má výrazný účinok na inhibíciu bakteriálneho rastu baktérií *E. coli, E. faecalis* a *S. aureus*. Vodný extrakt z *C. militaris* kultivovaný na sójových bôboch spomaľuje rast

baktérií *S. aureus* a *E. coli* (Yang a kol., 2010).

V izolovaných vodných extraktoch sa pomocou TLC chromatografie a NMR analýzy podarilo identifikovať niekoľko chemických zlúčenín. Vo vzorke 1 sa dokázala reakciou s ninhydrínom prítomnosť niekoľkých aminokyselín. Vo vzorke 2 sa reakciou s vizualizačným činidlom *p*-anízaldehyd v H_2SO_4/EtOH preukázala prítomnosť sacharidového alkoholu D-manitolu. 1D a 2D NMR spektroskopiou sa podarilo detailnejšie analyzovať obsahové látky vo vzorkách extraktov. Vo vzorke 1 sa identifikovali polyglukány, ktoré vykazujú aj silnú imunostimulačnú aktivitu na základe svojej schopnosti podporovať proliferáciu makrofágov, zvyšovať produkciu NO a sekréciu cytokínov (IL-1β a TNF-α) (Wang a kol., 2017). Pomocou nukleárnej magnetickej rezonancie a infračervenej spektroskopie Chen stanovil kordycepín v extrakte *Cordyceps* (Chen a kol., 2010). Nie a kol. (2011) študovali štruktúrne vlastnosti hydrofilného polysacharidu (CBHP) použitím 2D NMR spektroskopie. Tento polysacharid obsahuje aj vzorka 1. Podľa týchto autorov sa polysacharidová štruktúra skladá hlavne z glukózy (95,19 %); čo predstavuje kostru polysacharidu, v ktorej sú glukózové jednotky spojené pomocou (α-1,4)-glykozidickej väzby. V tomto extrakte sa podarilo identifikovať ešte niekoľko aminokyselín: valín, izoleucín, leucín, treonín, alanín, tyrozín, fenylalanín. Ako vyplýva z kompletnej analýzy 1D a 2D NMR spektier, pri extrakcii vzorky 2 sa do vody dostal len D-manitol. Manitol (cukrový alkohol) je zlúčenina extrahovaná z prírodných *Cordyceps*, ktorá vykazuje antioxidačnú aktivitu (Dong a kol., 2005; Nanlin a kol., 2003).

Acetylácia D-manitolu v extrakte 2 slúžila na presné stanovenie chemickej štruktúry manitolu, keďže v ^{1}H NMR spektre neboli prítomné signály protónov -OH skupín. Na acetyláciu D-manitolu sa použili dve reakčné podmienky, Ac_2O za katalytického množstva DMAP/py a AcONa v Ac_2O. Obsah D-manitolu v prírodných vzorkách je významne vyšší v porovnaní s kultivovanými druhmi (Li a kol., 1999). Kordycepín sa nepodarilo identifikovať ani v jednom z pripravených vodných extraktov, čo potvrdzuje aj štúdia od Yanga a kol., 2009. V tejto práci sa zistilo, že v kultivovaných vzorkách *Cordycepsu* sa kordycepín vyskytuje iba v minimálnom množstve. Obsah minerálov, polysacharidov a D-manitolu je oveľa vyšší v prírodných *C. sinensis* ako v kultivovaných vzorkách (Wang a kol., 2015).

ZÁVER

Práca sa zaoberá štúdiom extraktov z dvoch vzoriek liečivých húb, *C. sinensis* a *P. hepiali,* ktoré boli kultivované na dvoch odlišných ryžových substrátoch (ryža indická a japonská). Vodné extrakty sa pripravili z práškovej formy húb *P. hepiali* a *C. sinensis*. Vzorka 1 sa kultivovala na ryži *Oryza sativa var. Japonica*, kmeň *P. hepiali* a vzorka 2 sa pestovala na substráte *Oryza sativa var. Indica*, kmeň *C. sinensis*. Vyššia výťažnosť sa zistila vo vzorke 2 (10,56 %) v porovnaní s extraktom vzorky 1 (4,23 %). Pri stanovení antioxidačnej aktivity DPPH metódou sa zistilo, že oba extrakty vykazujú porovnateľnú aktivitu. Vo vzorke 1 sa zistila hodnota strednej inhibičnej aktivity 3,10 ± 0,25 $mg.ml^{-1}$ a vo vzorke 2 3,0 ± 0,25 $mg.ml^{-1}$. Testovali sa aj antibakteriálne účinky pripravených extraktov pomocou platňovej agarovej difúznej metódy, no pripravené extrakty nevykazovali antimikrobiálnu aktivitu na kmene baktérií *S. aureus* a *E. coli*. Pomocou TLC sa dokázala prítomnosť sacharidov a aminokyselín v extraktoch vzoriek. Vo vzorke 1 sa reakciou s ninhydrínom dokázala prítomnosť aminokyselín, a vo vzorke 2 sa reakciou s *p*-anízaldehydom v H_2SO_4/EtOH dokázala prítomnosť len D-manitolu. Pomocou 1D a 2D NMR analýzy sa podarilo analyzovať kvalitatívne zloženie hlavných chemických zlúčenín vo vodných extraktoch. Vzorka 1 pestovaná na ryži *Oryza sativa var. Japonica*, kmeň *P. hepiali* obsahovala hlavne polyglukány, aminokyseliny, glukózu. Vo vzorke 2, ktorá bola kultivovaná na ryži *Oryza sativa var. Indica*, kmeň *C. sinensis* sa zistila prítomnosť hlavne D-manitolu. Pretože v ^{1}H NMR spektre extraktu vzorky 2 nebolo vidieť signály protónov OH skupín,

uskutočnila sa acetylácia D-manitolu (ako štandardu a ako extraktu vzorky 2) dvoma odlišnými reakčnými podmienkami: Ac_2O za katalytického množstva DMAP/py a AcONa v Ac_2O. Okrem polysacharidov obsahujú huby rodu *Cordyceps* aj rôzne iné biologicky aktívne látky, ktorých izolácia, charakterizácia ich chemickej štruktúry a testovanie ich biologickej aktivity je stále predmetom nových vedeckých štúdií.

ZOZNAM LITERATÚRY

Andé, P., Villain, F.: Free radical scavenging properties of mannitol and its role as a constituent of hyaluronic acid fillers: a literature review. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2017, 39, 355 – 360.

Branco, A., Santos, J. D. G., Pimentel, M. A. M., Osuna, J. T. A., Lima, L., David, J. M.: d-Mannitol from Agave sisalana biomass waste. *Industrial crops and products*, 2010, 32 (3), 507 – 510.

Cumming, W. M., Hopper, I. V., Sherlock, T.: Systematic organic chemistry. *J. Chem. Tech. Biotech.*, 1932, 51 (16), 346.

Dong, C., Yao, Y.: Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. *J. Appl. Microbiol.*, 2005, 99 (3), 483 – 492.

Huang, Y. L., Leu, S. F., Liu, B. C., Sheu, C. C., Huang, B. M.: *In vivo* stimulatory effect of *Cordyceps sinensis* mycelium and its fractions on reproductive functions in male mouse. *Life Sciences*, 2004, 75, 1051 – 1062.

Chen, W., Zhang, W., Shen, W., Wang, K.: Effects of the acid polysaccharide fraction isolated from a cultivated *Cordyceps sinensis* on macrophages *in vitro*. *Cell. Immunol.*, 2010, 262 (1), 69 – 74.

Kirk, P., Cannon, P., Minter, D. W., Stalpers, J. A.: *Dictionary of the Fungi*. 10th edn. UK: Wallingford, 2011, 784 p.

Leung, P. H., Zhao, S., Ho, K. P., Wu, J. Y.: Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus CsHK1. Food *Chem., 2009*, 114, 1251 – 1256.

Li, S. P., Su, Z. R., Dong, T. T. X., Tsim, T. W. K.: The fruiting body and its caterpillar host of *Cordyceps sinensis* show close resemblance in main constituents and anti-oxidation activity. *Phytomedicine*, 2002, 9 (4), 319 – 24.

Li, S. P., Li, P., Ji, H., Zhang, P., Dong, T. T., Tsim, K. W.: The contents and their change of nucleosides from natural *Cordyceps sinensis* and cultured Cordyceps mycelia. *Yao xue xue bao*, 2001, 36 (6), 436 – 9.

Li, X., Bac, T., Wang, Y.: Determination of mannitol in Dongchongxiacao (*Cordyceps sinensis*) by colorimetric method. *Chinese traditional and herbal drugs*, 1999, 30 (1), 19 – 21.

Molyneux, P.: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 2004, 26 (2), 211 – 219.

Nanlin, Y., Yiyu, Ch., Haibin, Q.: Quantitative determination of mannitol in *Cordyceps sinensis* using near infrared spectroscopy and artificial neural networks. *Chinese J. Anal. Chem.*, 2003, 31 (6), 664 – 668.

Nie, S. P., Cui, S. W., Phillips, A. O., Xie, M. Y., Phillips, G. O., Al-Assaf, S., Zhang, X. L.: Elucidation of the structure of a bioactive hydrophilic polysaccharide from *Cordyceps sinensis* by methylation analysis and NMR spectroscopy. *Carbohydr. Polym.*, 2011, 84 (3), 894 – 899.

Oh, T. J., Hyun, S. H., Lee, S. G., Chun, Y. J., Sung, G. H., Choi, H. K.: NMR and GC-MS based metabolic profiling and free-radical scavenging activities of *Cordyceps pruinosa* mycelia cultivated under different media and light conditions. *PLoS One*, 2014, 9 (6), e90823.

Tsai, S. Y., Huang, S. J., Mau, J. L.: Antioxidant properties of hot water extracts from *Agrocybe cylindracea*. *Food Chem.*, 2006, 98 (4), 670 – 677.

Tuli, H. S., Sharma, A. K., Sandhu, S. S., Kashyap, D.: Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential. *Life Sci.*, 2013, 93 (23), 863 – 869.

Walker, D. K., Gilliland, S. E.: Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus. J. Dairy Sci.*, 1993, 76 (4), 956 – 961.

Wang, J., Kan, L., Nie, S. P., Chen, H., Cui, S. W., Phillips, A., Phillips, G. O., Li, Y., Xie, M.: A comparison of chemical composition, bioactive components and antioxidant activity of natural and cultured *Cordyceps sinensis. LWT-Food Science and Technology*, 2015, 63 (1), 2 – 7.

Wang, J., Nie, S., Cui, S. W., Wang, Z., Phillips, A. O., Phillips, G. O., Li, Y., Xie, M.: Structural characterization and immunostimulatory activity of a glucan from natural *Cordyceps sinensis. Food Hydrocoll.*, 2017, 67, 139 – 147.

Xu, J., Huang, Y., Chen, X. X., Zheng, S. C., Chen, P., Mo, M. H.: The mechanisms of pharmacological activities of *Ophiocordyceps sinensis* fungi. *Phytother. Res.*, 2016, 30 (10), 1572 – 1583.

Yang, F. Q., Li, D. Q., Feng, K., Hu, D. J., Li, S. P.: Determination of nucleotides, nucleosides and their transformation products in Cordyceps by Ion-Pairing Reversed Phase Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 2010, 1217 (34), 5501 – 5510.

Yang, F. Q., Feng, K., Zhao, J., Li, S. P.: Analysis of sterols and fatty acids in natural and cultured Cordyceps by one-step derivatization followed with gas chromatography–mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, 49 (5), 1172 – 8.

Yamaguchi, Y., Kagota, S., Nakamura, K., Shinozuka, K., Kunitomo, M.: Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis. Phytother. Res.*, 2000, 14 (8), 647 – 670.

Yue, K., Ye, M., Zhou, Z., Sun, W., Lin, X.: The genus Cordyceps: A chemical and pharmacological review. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2013, 65 (4), 474 – 93.

Zhan, Y., Dong, C. H., Yao, Y. J.: Antioxidant activities of aqueous extract from cultivated fruit bodies of *Cordyceps militaris* (L.) Link. *in vitro. J. Integr. Plant Biol.*, 2006, 48 (11), 1365 – 1370.

Zhang, G., Huang, Y., Bian, Y., Wong, J. H., Ng, T. B., Wang, H.: Hypoglycemic activity of the fungi *Cordyceps militaris*, *Cordyceps sinensis*, *Tricholoma mongolicum*, and *Omphalia lapidescens* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 72 (6), 1152 – 1156.

Zhang, X., Pu, Y., Yin, L.: Study on the scavenging effect on superoxide anion free radical and hydroxyl free radical of *Cordycep sinensis* and mycelium of cultured *Cordyceps sinensis. Chinese Journal of Gerontology*, 2003, 11 (23), 773 – 775.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 1: 39 – 48, 2021

CROHNOVA CHOROBA A JEJ FARMAKOTERAPIA

CROHN'S DISEASE AND ITS PHARMACOTHERAPY

Duranková, Klaudia; Piešová, Elena

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

elena.piesova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Štúdia sa zaoberá farmakologickou liečbou Crohnovej choroby. Ide o systémové zápalové ochorenie tráviaceho traktu, ktorého etiológia a patogenéza nie je dodnes úplne objasnená. Výskyt Crohnovej choroby v populácii každým rokom stúpa, hlavne v dobre rozvinutých krajinách. Postihuje prevažne ľudí v produktívnom veku, ktorým do značnej miery negatívne ovplyvňuje každú sféru života. V štúdii sme sa zamerali na spracovanie získaných údajov o farmakoterapii a farmakoterapeutických postupoch používaných pri liečbe Crohnovej choroby. Analyzované informácie boli vyhodnotené k roku 2018 zo súboru pacientov liečených v nami sledovanej gastroenterologickej ambulancii počas rokov 2004 – 2018, pričom sme sa zamerali hlavne na použitú liečbu, terapiu podanú pri extraintestinálnych prejavoch, adjuvantnú liečbu a prejavené nežiaduce účinky liečby. Postupy liečby boli individuálne upravené na konkrétny prípad pacienta a stav ochorenia. V štúdii sme dospeli k nasledujúcim záverom: najpredpisovanejším liečivom sa zo skupiny aminosalicylátov stal mesalazín, ktorý bol používaný v monoterapii alebo v kombinovanej terapii s ďalšími skupinami liečiv. Najmenej predpisované boli tzv. biologické liečivá, čo bolo spôsobené chorobným stavom, v ktorom sa pacienti nachádzali a nákladmi na liečbu.

Kľúčové slová: aminosalicyláty; biologická liečba; Crohnova choroba, glukokortikoidy; imunosupresíva

ABSTRACT

This paper deals with the pharmacotherapy of Crohn's disease. It is a systemic inflammatory disease of the digestive tract, the etiology and pathogenesis is still not completely clarified. The

presence of Crohn's disease in the population is increasing every year, especially in well-developed countries. It affects mainly people of productive age, to whom it has a significant negative impact on every sphere of life. In the paper, we focused on processing the obtained data on pharmacotherapy and pharmacotherapeutic procedures used in the treatment of Crohn's disease. The analyzed information were evaluated for 2018 from a group of patients treated in the gastroenterology clinic, which was monitored during the years 2004 - 2018, focusing mainly on the applied treatment, the therapy used in extraintestinal symptons, adjuvant treatment and the manifested side effects of the treatment. Treatment procedures were individually modified for the patient's specific condition and disease phase. In this paper, we made the following conclusions: the most prescribed drug was mesalazine from the group of aminosalicylates, which was used as a monotherapy, in a combination therapy with other groups of drugs. The least prescribed were biologic therapy drugs due to the condition the patients were in and also the cost of the treatment.

Key words: aminosalicylates; biological treatment; Crohn's disease; glucocorticoids; immunosuppressants

ÚVOD

Crohnova choroba je systémové autoimunitné zápalové ochorenie tráviaceho traktu. Ide o nešpecifický chronický zápal akejkoľvek časti tráviacej trubice, transmurálny, plurisegmentálny alebo segmentálny, v typických prípadoch granulomatózny.

Výskyt Crohnovej choroby môže byť diagnostikovaný od úst až po konečník. Najčastejšie je lokalizovaný v ileocekálnej oblasti a asi u 30 % pacientov ochorenie postihuje súčasne ileum aj kolon (Huorka, 2009).

Etiológia Crohnovej choroby, napriek intenzívnemu dlhoročnému výskumu, nie je úplne známa. Predpokladá sa však vzájomná interakcia genetického faktora a vonkajšieho prostredia. K najviac skúmaným faktorom prostredia patria: výživa, fajčenie, gastrointestinálne infekcie a antikoncepcia. Predpokladá sa, že významnú úlohu pri vzniku ochorenia zohrávajú gény CARD15/NOD2, ATG16L1, IBD5 a receptor pre interleukín L23R (Gabalec, 2009). Mutáciou génu CARD15/NOD2 dochádza k zníženiu vrodenej slizničnej imunity, zmenou odpovede Panethových buniek na muramyl dipeptid, a to narušením zloženia a funkcie sekrétov (Kastin, Ouellette, Selsted, 2013). ATG16L1 je zložka veľkého proteínového komplexu nevyhnutného pre autofágiu. Mutáciou ATG16L1 na 2. chromozóme dochádza k nástupu Crohnovej choroby v ileu s postihnutím alebo bez postihnutia kolonu v dôsledku narušenej črevnej flóry (Naser a kol., 2012). IL23R interaguje s IL23, čo je cytokín, ktorý reguluje aktivitu imunitných buniek a má dôležitú úlohu pri zápalovej reakcii proti vírusom a baktériám. Gén IBD5 je umiestnený v polohe 5q31, jeho dva varianty SLC22A4 (OCTN1) a SLC22A5 (OCTN2) sú spájané so zvýšeným rizikom vzniku Crohnovej choroby.

Obidva gény OCTN kódujú transmembránové proteínové transportné proteíny. OCTN2 funguje ako prepravca karnitínu. Karnitín je nevyhnutný pre prechod mastných kyselín s dlhým reťazcom z cytozolu do mitochondrií na následnú beta-oxidáciu. Chyby v tomto systéme môžu viesť k poškodeniu mechanizmov sprostredkujúcich oxidáciu. Za ďalšiu z možných príčin vzniku Crohnovej choroby sa považuje aj perzistentná infekcia v dôsledku zhoršenej eradikácie luminálnych patogénov (Waller a kol., 2006).

Samotná genetická mutácia na vznik Crohnovej choroby nestačí. Na vzniku a rozvoji ochorenia sa podieľajú aj viaceré vonkajšie faktory. Z hľadiska diéty je to vyšší príjem rafinovaných cukrov, hlavne sacharózy. Čoraz viac je spomínaná aj hygienická hypotéza. Zlepšená sanácia a hygiena v ranom detskom veku môže viesť k väčšej náchylnosti na

vznik nevhodnej imunologickej odpovede na nový antigén.

Vzájomný vzťah bol preukázaný aj medzi fajčením a vznikom Crohnovej choroby. Aktívni fajčiari majú zvýšené riziko vzniku tohto ochorenia, po nich hneď nasledujú bývalí fajčiari. Perorálne antikoncepčné tabletky môžu zvýšiť riziko vzniku Crohnovej choroby v dôsledku účinku estrogénu. Estrogén pôsobí ako imunitný zosilňovač, najmä pokiaľ ide o humorálnu imunitu a proliferáciu makrofágov (Molodecky a Kaplan, 2010).

Crohnova choroba (CD) sa vyznačuje heterogénnou povahou. Charakteristika ochorenia sa prekrýva s inými zápalovými ochoreniami tráviaceho traktu (IBD – z angl. Inflammatory Bowel Disease), preto býva ťažšie diagnostikovaná. Príznaky Crohnovej choroby sa môžu pohybovať od miernych až po závažné. Ochorenie sa obvykle rozvíja postupne, ale niekedy príde náhle bez predchádzajúcich problémov. Môže sa vyskytnúť aj časové obdobie, kedy pacient nemá žiadne známky ochorenia (remisia). Medzi symptómy CD patria – chronické hnačky, horúčka, bolesti brucha, únava, strata hmotnosti, nechutenstvo a zriedkavo krv v stolici. Pacienti s ťažkou formou Crohnovej choroby môžu trpieť aj zápalom kože, kĺbov a očí, zápalom pečene alebo žlčových ciest. U detí môže dôjsť k oneskorenému rastu alebo sexuálnemu vývoju (Mantzaris a kol., 2015).

Aminosalicyláty sú lieky, ktoré obsahujú aktívnu zložku kyselinu 5-aminosalicylovú. Najviac používané sú preparáty s obsahom mesalazínu a iba v špeciálnych prípadoch prípravky so sulfasalazínom. Mesalazín bol pripravený v rôznych liekových formách, aby sa zabezpečilo jeho postupné alebo riadené uvoľňovanie do všetkých častí tráviaceho traktu podľa potreby pacienta, keďže mesalazín v klasických tabletách je iba minimálne distribuovaný do distálnej časti tenkého čreva a kolonu (Prokopová a kol., 2012; Lukáš a kol., 2018).

Systémové glukokortikoidy (prednizón, metylprednizolón) sú určené pre stredne ťažkú až ťažkú formu ochorenia na dosiahnutie remisie. Efektivita liečby je vysoká a vyplýva z účinku glukokortikoidov redukovať systémový zápal. Cieľom liečby je dosiahnuť čo najrýchlejšie klinickú remisiu a v priebehu 3 – 4 mesiacov liečbu úplne vysadiť z dôvodu rozsiahlych nežiaducich účinkov, straty liečebnej odpovede alebo vzniku závislosti (kortikodependencia) (Lukáš, 2011; Červený, 2014).

Imunosupresíva ako azatioprin a 6-merkaptopurín potláčajú proliferáciu aktivovaných B a T-lymfocytov. Na začiatku liečby sa najčastejšie používajú spolu s inými liekmi ako glukokortikoidmi, infliximabom, prípadne antibiotikami. Oproti biologickej liečbe ide o lacnejšiu formu terapie. Nevýhodou tiopurínov je ich pomalý nástup účinku od 2 – 6 mesiacov (Magro a kol., 2014).

Biologická liečba v súčasnosti predstavuje jeden z najúčinnejších spôsobov liečby IBD. Je založená na podávaní protilátok proti tumor nekrotizujúcemu faktoru alfa (TNFα). Určená je pre pacientov so stredne ťažkou až ťažkou formou Crohnovej choroby. Ide o pomerne drahú formu liečby, preto je aplikovaná až po nedostatočnej odpovedi na liečbu kortikoidmi a/alebo imunosupresívami. Voľbou číslo jeden sa stáva pri pacientoch, u ktorých ochorenie môže viesť k trvalému poškodeniu zdravia (Dujsíková, 2018).

MATERIÁL A METÓDY

Údaje o pacientoch s Crohnovou chorobou sme získali z gastroenterologickej ambulancie v Starej Ľubovni za obdobie 14 rokov jej fungovania. Gastroenterologická ambulancia je umiestnená priamo v ľubovnianskej nemocnici, ktorá predstavuje spádovú oblasť pre 53 949 obyvateľov okresu. Ako metódu zberu dát sme použili nemocničný informačný systém Promis, ktorý nám umožnil získať potrebné údaje: diagnózu, vek a pohlavie pacientov, zastúpenie pacientov s CD podľa medzinárodnej klasifikácie chorôb (MKCH), farmakoterapeutickú liečbu a nežiaduce účinky liečby.

Všetky získané údaje boli v súlade so zákonom o ochrane osobných údajov depersonalizované. Vek a pohlavie pacientov boli určené na základe rodného

čísla pacienta.

Podľa MKCH sme pacientov rozdelili do jednotlivých skupín podľa toho, ktorú časť tráviaceho traktu Crohnova choroba postihovala. Následne sme analyzovali liečbu pacientov v gastroenterologickej ambulancii. Pomocou ADC číselníka sme určili farmakoterapeutickú skupinu liečiv priamo používaných na liečbu Crohnovej choroby. Druhú skupinu tvorili adjuvantné liečivá, ktoré predstavovali podpornú liečbu Crohnovej choroby.

V ďalšej časti analýzy sme vyhodnotili najviac používané liečivá, liečivá užívané pri extraintestinálnych ťažkostiach a kombinácie liečiv používaných na liečbu Crohnovej choroby. Do analýzy sme zahrnuli aj nežiaduce účinky farmakologickej liečby. Vykonaná analýza zahŕňa zdravotný stav pacientov ku koncu roka 2018, keďže choroba sa u pacientov neustále vyvíja a s tým sa mení aj poskytovaná liečba.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Do 31.12.2018 mala gastroenterologická ambulancia v databáze 61 pacientov liečených na Crohnovu chorobu. V roku 2018 navštívilo gastroenterologickú ambulanciu 2874 pacientov, z toho bolo 25 diagnostikovaných v rozmedzí K50.0 – K52.9 ako neinfekčné zápaly tenkého a hrubého čreva, čo predstavuje 0,86 %. Z 25 diagnostikovaných pacientov boli iba štyria zahrnutí do nami skúmaného rozmedzia diagnózy K50.0 – K50.9, čo je 16 %. V roku 2012 bol v nami sledovanej ambulancii diagnostikovaný najväčší počet pacientov na Crohnovu chorobu. Zaznamenaný bol ročný prírastok o siedmich nových pacientov. Naopak, najnižší ročný prírastok bol zistený v roku 2009, kedy pribudli len dvaja noví pacienti. Na základe týchto výsledkov sme vykonali analýzu všetkých doteraz diagnostikovaných pacientov na Crohnovu chorobu.

Z výsledkov sme zistili, že v sledovanej skupine pacientov bol pomer mužov a žien takmer vyrovnaný. Ženy tvorili iba veľmi miernu prevahu, a to iba o jednu pacientku (31; 50,82 %). U oboch pohlaví bolo najväčšie zastúpenie pacientov vo vekovej kategórii od 18 – 30 rokov a najmenšie vo veku od 40 – 50 rokov (13,18 %). Najmladším pacientom bol muž vo veku 18 rokov a najstarším tak isto muž vo veku 65 rokov. Tieto nami získané a vyhodnotené údaje sa zhodujú s inými literárnymi zdrojmi, kde je tak isto pomer mužov a žien takmer vyrovnaný a vekové rozhranie najpočetnejšej skupiny pacientov je tak isto od 18 – 30 rokov (Hulková, 2016).

Crohnova choroba môže postihovať akúkoľvek časť tráviacej trubice. Takmer u polovice pacientov bola diagnostikovaná K50.0 Crohnova choroba tenkého čreva (29 pacientov; 47,54 %). Druhou najviac zastúpenou skupinou boli pacienti s K50.1 Crohnovou chorobou hrubého čreva (34,43 %; 21 pacientov). Skupina K50.82 Crohnova choroba viacerých častí tráviacej trubice bola diagnostikovaná len u 5 pacientov (8,19 %) a 4 pacientom (6,56 %) bola stanovená iná Crohnova choroba K50.88. Najmenej pacientov bolo diagnostikovaných v skupine K50.9 Crohnova choroba, bližšie neurčená (2 pacienti; 3,28 %). Nami získané údaje sa od údajov Huorku (2009) mierne odlišovali, čo mohlo byť spôsobené menším počtom pacientov v porovnaní s celoplošným hodnotením pacientov s Crohnovou chorobou. Spomínané rozdielne výsledky boli zaznamenané v postihnutí ilea a kolónu súčasne, kde Huorka (2009) uvádza zastúpenie v 30 %, zatiaľ čo v našej analýze to bolo len 8,19 %. Rovnaké výsledky však boli pozorované u Gabalca (2009), ktorý uvádza ako jednu z najčastejších lokalizácií postihnutia čreva oblasť ilea, čo bolo potvrdené aj v našej analýze.

Najviac užívanou farmakoterapeutickou skupinou liečiv boli antidiaroiká, črevné antiinfektíva, antiflogistiká a črevné protizápalové liečivá (42,96 %). Do tejto skupiny zaraďujeme topický kortikoid budezonid a aminosalicyláty, ku ktorým patria liečivá ako mesalazín a sulfasalazín. Indikáciou ich použitia bola mierna a stredne aktívna forma Crohnovej choroby (Lukáš, 2011). Imunosupresíva, ako druhá najviac užívaná skupina liečiv (29,79 %), bola účinná na udržanie remisie navodenej kortikoidmi alebo chirurgickým zákrokom (Kužeľ,

Tab. 1: Percentuálne zastúpenie farmakoterapeutických skupín liečiv

Farmakoterapeutické skupiny liečiv	%
Antidiaroiká, črevné antiinfektíva, antiflogistiká, črevné protizápalové liečivá	42,96 %
Imunosupresíva	29,79 %
Kortikosteroidy na systémové použitie, glukokortikoidy	25,60 %
Antiinfektíva na systémové použitie, antibiotiká na systémové použitie	1,65 %

2013). Gabalec (2009) uvádza, že imunosupresíva sú indikované aj u pacientov relabujúcich na kortikoidy alebo u kortikodependentných pacientov. Do farmakoterapeutickej skupiny imunosupresív patria aj liečivá ako inhibítory tumor nekrotizujúceho faktora alfa, infliximab a adalimumab, ktoré sa používajú pri strednej až ťažkej forme Crohnovej choroby. Kortikoidy boli indikované hlavne u pacientov s aktívnou formou Crohnovej choroby na docielenie remisie. Pri podávaní kortikoidov došlo u pacientov k ustúpeniu tráviacich ťažkostí, ale k vyhojeniu zápalových zmien na sliznici čreva nedošlo. Po docielení remisie boli kortikoidy z liečby postupne vysadené a pacientom bola nasadená ďalšia liečba podľa individuálnej potreby. Iba 1,65 % pacientov užívalo antibiotickú liečbu v dôsledku luminálnej i penetrujúcej formy Crohnovej choroby a niektorých hnisavých komplikácií (viď tab. 1).

Dôležitou súčasťou liečby Crohnovej choroby je podporná liečba, ktorá dopĺňa liečbu primárnu. Adjuvantná liečba je u niektorých pacientov trpiacich Crohnovou chorobou nevyhnutná z dôvodu nedostatočného vstrebávania vitamínov a minerálnych látok zo zapálených častí tráviaceho traktu. Zo 61 pacientov liečených na Crohnovu chorobu nepotrebovalo podpornú liečbu iba 13,75 % pacientov. Najpredpisovanejšou skupinou liečiv adjuvantnej liečby sa stali vitamíny a minerálne látky v podobe vitamínu B_{12}, cholekalciferolu (Vigantol) a kombinovaného prípravku Caltrate plus. Z nich najviac bola predpisovaná kombinácia vitamínu B_{12} spolu s Caltrate plus (25,59 %). O niečo menej bol predpisovaný vitamín B_{12} s Vigantolom (19,67 %). Nedostatkom vitamínu B_{12} trpeli hlavne pacienti, ktorí mali Crohnovou chorobou postihnuté ileum. Práve na tomto mieste tráviacej sústavy prebieha vstrebávanie kobalamínu do organizmu, preto je tento vitamín u pacientov podávaný v injekčnej forme. Vstrebateľnosť vitamínu D zo zapáleného čreva je tak-isto horšia. Navyše, nedostatok vitamínu D zhoršuje priebeh ochorenia a vedie častejšie ku komplikáciám Crohnovej choroby (Kabbani a kol., 2016). Vigantol bol preto v kvapkách podávaný buď samostatne v monoterapii (14,76 %); alebo v kombinácii s inými doplňujúcimi preparátmi ako vyššie spomínaný vitamín B_{12}. Okrem kvapkovej formy vitamínu D bola pacientom podávaná aj tabletová forma Caltrate plus, čo predstavuje kombináciu vitamínu D, vápnika a minerálov ako samostatný preparát v 13,11 % alebo v kombinácii s vitamínom B_{12} ako spomínaná najpredpisovanejšia forma (25,59 %). Dietetická potravina Modulen bola podávaná u 9,84 % pacientov. Modulen bol užívaný pacientmi v aktívnej fáze Crohnovej choroby a tiež podvyživenými pacientmi v remisii. Iba 3,28 % pacientov užívalo Hylak forte ako doplňujúcu liečbu k antibiotikám a antiinfektívam (viď tab. 2).

Tab. 2: Adjuvantná liečba

Podaná liečba	%
Vitamín B12 + Caltrate plus	25,59 %
Vitamín B12 + Vigantol	19,67 %
Vigantol	14,76 %
Bez podpornej terapie	13,75 %
Caltrate plus	13,11 %
Modulen	9,84 %
Hylak forte	3,28 %

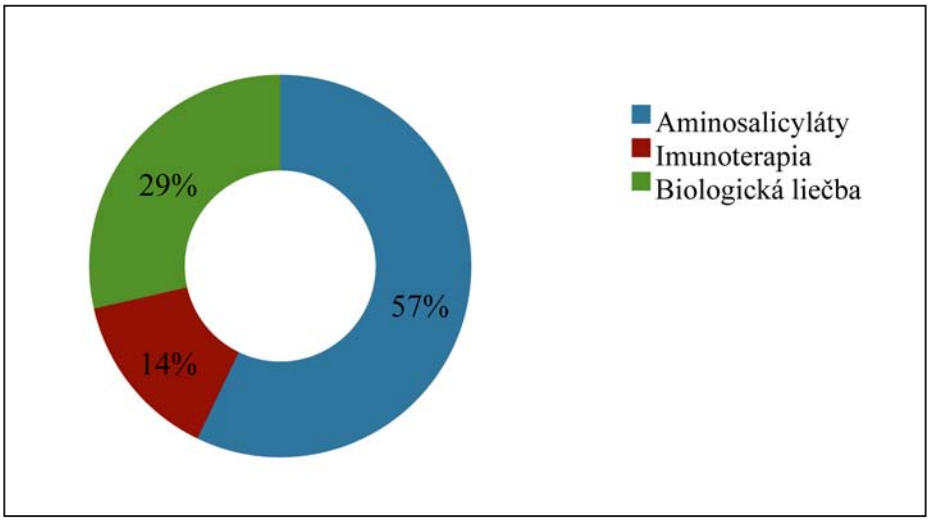
Tab. 3: Najčastejšie predpisované liečivá

Liečivá	%
Mesalazín	39,66 %
Azatioprin	24,79 %
Prednizón	19,00 %
Budezonid	4,13 %
Sulfasalazín	3,30 %
Adalimumab	2,89 %
Infliximab	2,11 %
Ciprofloxacín a Metronidazol	1,65 %

Najpoužívanejším liečivom na liečbu Crohnovej choroby bol mesalazín (39,66 %). Indikáciou jeho použitia je hlavne navodenie a udržanie remisie u pacientov s postihnutím tenkého čreva a ileocekálnej oblasti, ako aj zníženie rizika vzniku kolorektálneho karcinómu, čo je v súlade aj s výsledkami štúdie Kužeľa (2013). V o niečo menšom množstve bolo predpisované liečivo zo skupiny imunosupresív – azatioprin (24,79 %). Pacientov, ktorí liečbu azatioprinom dobre tolerovali a odpovedali na ňu, táto terapia udržovala v dlhodobej stabilnej remisii. Okrem toho bol azatioprin použitý aj pri aktívnej forme Crohnovej choroby ako podporná liečba (Kužeľ, 2013). Z glukokortikoidov bol najviac predpisovaným liečivom prednizón (19 %), ktorý disponuje nižším rizikom nežiaducich účinkov ako iné kortikoidy. Prednizón bol užívaný pacientmi len s účelom navodenia remisie. U 4,13 % pacientov bola nasadená liečba lokálne pôsobiacim kortikosteroidom budezonidom v podobe rektálnej peny, ktorá je obzvlášť vhodná u pacientov s horšou toleranciou rektálnych nálevov (Lukáš, 2011). Dokopy u 5 % pacientov bola indikovaná biologická liečba infliximabom v 2,11 % a adalimumabom v 2,89 % v špecializačnom pracovisku biologickej liečby v Košiciach. Infliximab bol podávaný pacientom s ťažkou formou CD, ktorí neodpovedali na liečbu kortikoidmi a imunosupresívami, alebo bola táto liečba z nejakého dôvodu kontraindikovaná a netolerovaná. Túto liečbu tiež užívali pacienti s fistulujúcim ochorením. Adalimumab bol podávaný pacientom, u ktorých došlo k zlyhaniu liečby infliximabom, alebo keď bol infliximab pacientom netolerovaný (Lukáš, 2012). Pri akútnych atakoch Crohnovej choroby hrubého čreva bol v 3,30 % užívaný sulfasalazín a len v 1,65 % bola indikovaná liečba metronidazolom a ciprofloxacínom (viď tab. 3).

U niektorých pacientov s Crohnovou chorobou môže dôjsť k mimočrevným prejavom ochorenia v podobe extraintestinálnych ťažkostí, kedy ide hlavne o postihnutia kĺbov, očí, kože, žlčníka či pečene. Tieto pridružené symptómy sa väčšinou zlepšia samotnou liečbou Crohnovej choroby, niektoré naopak potrebujú samostatný liečebný prístup. Vyplývajú z toho aj naše výsledky analýzy extraintestinálnych prejavov a následnej farmakologickej liečby. Deväť pacientov trpelo pri Crohnovej chorobe artritídou, z toho 5 pacientov bolo liečených metotrexátom zo skupiny cytostatík (22,73 %) a zvyšní 4 pacienti sulfasalazínom zo skupiny antireumatík, antiflogistík a antiuratík (18,18 %). Obe liečivá metotrexát aj sulfasalazín môžu byť podávané aj priamo na liečbu Crohnovej choroby. Metotrexát je liečivom prvej voľby na liečbu reumatoidnej artritídy. Na liečbu Crohnovej choroby sa využíva hlavne u pediatrických pacientov (Douda, 2017). Sulfasalazín bol indikovaný pacientom s Crohnovou chorobou hrubého čreva, ktorí súčasne trpeli problémami kĺbov ako mimočrevnými prejavmi ochorenia. Siedmim pacientom bolo predpísané liečivo zo skupiny antianemík – Sorbifer Durules (31,82 %). Liečbu anémie sme zaradili do tejto skupiny aj

Graf 1: Monoterapia liečivami

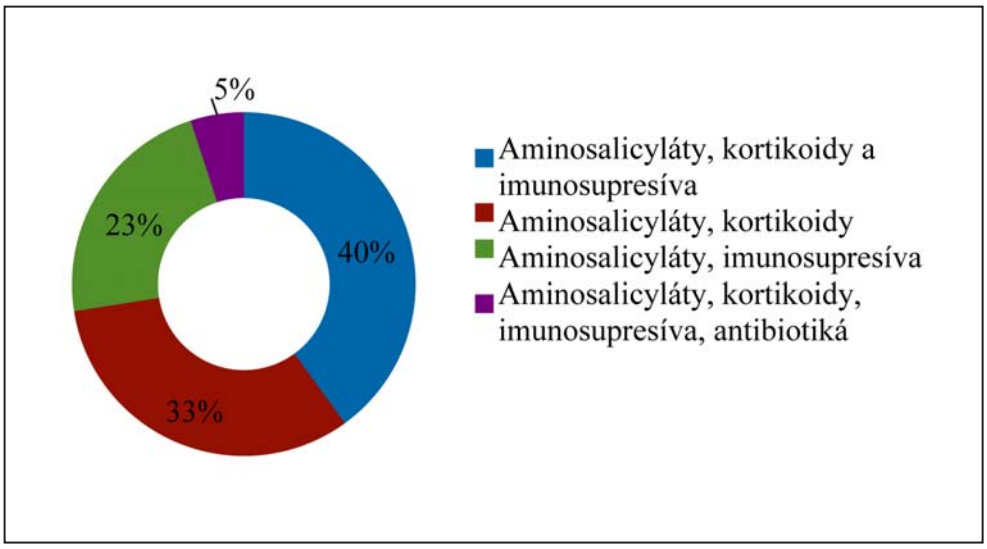


napriek tomu, že anémia nepatrí k extraintestinálnym prejavom ochorenia Crohnovej choroby, a to z toho dôvodu, že práve anémiou trpí pomerne veľké množstvo pacientov liečených na Morbus Crohn. Jednou z najčastejších príčin anemizácie pacientov je chronický zápal, ktorý znižuje kapacitu vstrebávania železa (Bátovský, 2012). Kožné ochorenie *Erythema nodosum* bolo podľa údajov z gastroenterologickej ambulancie liečené kortikoidmi (18,18 %), ktoré sa priamo používajú aj na navodenie remisie u pacientov s aktívnou formou Crohnovej choroby. Očnými ochoreniami trpeli len 2 pacienti a obom boli podávané oftalmologiká (9,09 %); a to v kombinácii lokálneho kortikoidu a antibiotika.

U 21 pacientov bola pozorovaná monoterapia liečby Crohnovej choroby. V priebehu sledovaného obdobia boli najviac užívanou skupinou liečiv v monoterapii práve aminosalicyláty (12 pacientov; 57,14 %). Z výsledkov analýzy vyplýva, že ide o pacientov s miernou formou Crohnovej choroby, ktorí sa momentálne nachádzajú v remisii. Šiesti pacienti boli odoslaní v dôsledku ťažkej aktivity Crohnovej choroby a zlyhaniu predchádzajúcich, lacnejších foriem liečby na monoterapiu biologickou liečbou (28,57 %). Ide o účinnú a pomerne bezpečnú liečbu, ktorej užívaniu bráni hlavne vysoká cena. Zvyšní traja pacienti dosiahli remisiu na základe imunomodulačnej terapie pomocou azatioprinu (14,29 %). Išlo o pacientov so stredne ťažkou formou ochorenia (viď graf 1).

Z analýzy údajov bolo zistené, že nad monoterapiou Crohnovej choroby do značnej miery prevláda kombinovaná terapia. Súvislosť je predpokladaná s diagnostikovaním aktívneho stredného stupňa Crohnovej choroby. Najviac predpisovanou bola kombinácia aminosalicylátov, glukokortikoidov a imunosupresív (40 %). Druhú najviac užívanú terapiu tvorili aminosalicyláty a kortikoidy (32,5 %). Aminosalicyláty disponujú protizápalovou aktivitou na sliznicu čreva, čo je pri liečbe Crohnovej choroby kľúčové (Prokopová a kol., 2012). Kortikoidy zase potláčajú imunitné reakcie organizmu redukciou systémového zápalu a používajú sa výhradne na navodenie remisie ochorenia (Lukáš, 2014). V poradí treťou najpredpisovanejšou bola kombinácia aminosalicylátov a imunosupresív (22,5 %). Imunosupresívum azatioprin z dôvodu pomalého nástupu účinku sa pri navodení remisie nepodáva samostatne, ale v kombinovanej liečbe. Pri podávaní s kortikoidmi má zase kortikoidný šetriaci efekt (Kužeľ, 2013). Naopak, najmenej predpisovaná bola štvorkombinácia liečiv aminosalicylátov, glukokortikoidov, imunosupresív a antibiotík (5,0 %). Antibiotická liečba sa využíva hlavne pri

Graf 2: Kombinovaná terapia liečivami



perianálnom ochorení, medzikľučkových abscesoch, pri septických komplikáciách a bakteriálnom prerastaní (Kužeľ, 2013) (viď graf 2).

Podávaná farmakologická liečba pri Crohnovej chorobe bola u väčšiny pacientov znášaná dobre. Z celkového počtu 61 pacientov boli nežiaduce účinky pozorované u 28 pacientov (45,90 %). Pri liečbe aminosalicylátmi bol liek mesalazín veľmi dobre tolerovaný.

Nežiaduce účinky boli hlásené len u 7 pacientov zo 48 liečených. Prejavené nežiaduce účinky mesalazínu sa zhodovali aj s údajmi v ADC číselníku s označením ako veľmi časté. Hlásené boli hlavne gastrointestinálne ťažkosti ako sú nauzea a vomitus u 3 pacientov, bolesti brucha u 2 pacientov a hnačku hlásil iba 1 pacient. Z neurologických ťažkostí 1 pacient trpel bolesťami hlavy. Pri liečbe sulfasalazínom je výskyt nežiaducich účinkov častejší o cca 20 % oproti mesalazínu. ADC číselník uvádza ako príčinu hlavne vysoké koncentrácie sulfapyridínu v krvi. Z toho dôvodu sa v súčasnosti od jeho užívania upúšťa a používa sa len veľmi zriedkavo. Zo 4 pacientov užívajúcich sul-fasalazín jeden pacient trpel svrbením kože.

Azatioprin z imunosupresívnej liečby sa vyznačuje pomerne častým výskytom nežiaducich účinkov. Z gastrointestinálnych ťažkostí 3 pacienti trpeli nauzeou a vomitom. Výskyt gastrointestinálnych ťažkostí je charakteristický hlavne v 2. až 3. týždni po nasadení lieku. Douda (2017) uvádza, že terapeuticky aktívny metabolit azatioprinu je nukleotid 6-thioguanín, ktorý génovou supresiou spôsobuje apoptózu T-lymfocytov a inkorporáciou do DNA znižuje tvorbu leukocytov. Toto zistenie potvrdzuje aj naša analýza, podľa ktorej leukocytopéniou trpeli 2 pacienti.

Najväčší výskyt nežiaducich účinkov bol zaznamenaný u pacientov užívajúcich kortikosteroidnú liečbu. Pozitívny účinok, ale aj nežiaduce účinky, sú priamo úmerné dávke lieku a obsadeniu glukokortikoidných receptorov. Kortikoidy majú vplyv na rôzne tkanivá, bunky a orgány v tele. Z toho dôvodu ovplyvňujú celý rad funkcií a vznik nežiaducich účinkov je častejší, čo uvádza aj Šteňová a Koreň (2009). Z 31 pacientov užívajúcich glukokortikoidnú liečbu hlásilo ťažkosti 14 pacientov. Najviac pacientov hlásilo nárast telesnej hmotnosti a opuch, najmenej nadmerné ochlpenie.

Naopak, biologická liečba patrí vo všeobecnosti k dobre znášanej, čo bolo potvrdené aj v našej štúdii. Pacienti liečení infliximabom a adalimumabom nemali žiadne ťažkosti počas ich užívania.

ZÁVER

Pri terapii Crohnovej choroby je veľmi dôležité stanovenie správnej liečby a dodržiavanie správnej životosprávy. Cieľom liečby je vymiznutie primárnych klinických príznakov, čiže zvládnutie zápalu a vyvolanie klinickej remisie farmakologickou liečbou. Liečba je stanovená podľa aktivity a formy ochorenia, postihnutej časti tráviaceho traktu a prítomnosti extraintestinálnych symptómov. Z výsledkov analyzovaných údajov sme dospeli k nasledujúcim záverom: pohlavie na vznik Crohnovej choroby nemalo zásadný vplyv a pomer chorých mužov (49,18 %) a žien (50,82 %) bol takmer vyrovnaný. Čo sa týka veku, zaznamenaný bol vyšší výskyt ochorenia u pacientov vo veku od 18 do 30 rokov (39,34 %). Najvyšší počet pacientov podľa medzinárodnej klasifikácie chorôb trpelo Crohnovou chorobou tenkého čreva (47,54 %). Najviac užívanou skupinou liečiv boli antidiaroiká, črevné antiinfektíva, antiflogistiká, črevné protizápalové liečivá (42,96 %) a z tejto skupiny bolo aj najviac užívané liečivo mesalazín (39,66 %). Z adjuvantnej liečby bola najviac predpisovaná kombinácia Caltra-te plus s vitamínom B_{12} (25,59 %). Liek Sorbifer Durules zo skupiny antianemík (31,82 %) sa stal najviac predpisovaným liekom pri diagnózach zapríčinených Crohnovou chorobou. Z našich výsledkov sme ďalej zistili, že prevažná časť pacientov bola liečená kombinovanou terapiou (65,57 %). Pri kombinovanej terapii boli užívané aminosalicyláty, kortikoidy a imunosupresíva (40 %) a u pacientov užívajúcich monoterapiu prevažovali aminosalicyláty (57,14 %). Počas farmakologickej liečby sa u 28 pacientov (45,80 %) prejavili nežiaduce účinky hlavne v podobe gastrointestinálnych ťažkostí.

Keďže nie je známa príčina vzniku Crohnovej choroby a v súčasnosti jej nemožno predísť, výberom správnej terapie je možné znížiť počet a závažnosť vzplanutí ochorenia a predĺžiť tak dobu remisie. Získanie celkového obrazu o farmakologickej liečbe bolo sťažené nižším počtom pacientov v skúmanej vzorke. Pre posúdenie farmakoterapeutických postupov je potrebná širšia skúmaná vzorka chorých, čomu by mohlo pomôcť elektronické zdravotníctvo a elektronické prepojenie databáz nemocníc.

ZOZNAM LITERATÚRY

Bátovský, M.: Súčasný prístup k anémii u pacientov s nešpecifickými črevnými zápalmi [Current approach to anemia in patients with nonspecific intestinal inflammation]. *Gastroenterologie a hepatologie*, 2012, 66 (2), 131.

Červený, P.: Farmaceutická péče u pacientů s idiopatickými střevními záňety [Pharmaceutical care in patients with inflammatory bowel disease]. *Praktické lékárenství*, 2014, 10 (1), 27.

Douda, T.: Pokroky v terapii idiopatických střevních zánětů [Innovations in treatment of IBD]. *Interní medicína pro praxi*, 2017, 19 (3), 112.

Dujsíková, H.: Farmakoterapie idiopatických střevních zánětů [Pharmacotherapy of inflammatory bowel disease]. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2018, 32 (3), 9.

Gabalec, L.: Crohnova nemoc – klasifikace, diagnostika, léčba a kvalita života [Crohn's disease – classification, diagnosis, therapy and quality of life]. *Interní medicina pro praxi*, 2009, 11 (1), 16.

https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/sulfasalazin-en-151620.html. Aktualizované marec, 2017. [cit.2019-10-10].

https://www.adc.sk/databazy/produkty/detail/pentasa-slow-release-tablets-1-g-341450.html. Aktualizované november, 2019. [cit.2019-10-10].

https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/inflectra-100-mg-344957.html. Aktualizované september, 2013. [cit.2019-10-15].

https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/humira-80-mg-injekcny-roztok-v-naplnenom-pere788089.html. Aktualizované august 16, 2019.

[cit.2019-10-15].

Hulková, V.: *Štandardizácia v ošetrovateľstve* [Standardization in nursing]. Praha: Grada Publishing, 2016. 53.

Huorka, M.: Crohnova choroba [Crohn's disease]. *Via practica*, 2009, 6, 108 – 109.

Kabbanti, T. A., Koutroubakis, I. E., Schoen, R. E., Ramos-Rivers, C. N.: Association of Vitamin D level with clinical status in inflammatory bowel disease: A 5-year longitudinal study. *Am. J. Gastroenterol.*, 2016, 111 (5), 712 – 719. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26952579. Accessed September 26, 2019.

Kastin, A. J., Ouellete, J. A., Selsted, E. M.: *Handbook of Biologically activite peptides*, 2nd edn., San Diego: Academic Press, 2013. 1300 – 1307.

Kužeľ, L.: Liečba nešpecifických zápalov čreva v súčasnosti [Current therapy of non-specific intestinal inflammation]. *Via practica*, 2013, 10 (5), 179.

Kužela, L., Zakuciová, M.: Racionálna liečba chronických nešpecifických zápalov čreva [Rational treatment of chronic non-specific intestinal inflammation]. *Metodické listy racionálnej farmakoterapie*, 2012, 15 (7), 6 – 8.

Lukáš, M.: Možnosti medikamentózní léčby u Crohnovy nemoci a ulcerózní kolitidy [The options of medicamentuous therapy in Crohn's disease and ulcerative colitis]. *Interní medicína pro praxi*, 2011, 13 (11), 424 – 426.

Lukáš, M.: Biologická léčba Crohnovy nemoci [Biological treatment of Crohn's disease]. *Medicina pro praxi*, 2012, 9 (2), 53 – 56.

Lukáš, K., Hoch, J. a kolektiv: *Nemoci střev* [Intestinal diseases]. Praha: Grada Publishing, 2018. 347 – 348.

Magro, F., Santos-Antunes, J., Vilas-Boas, F., Rodrigues-Pinto, E., Coelho, R., Ribeiro, O. S., Lopes, S., Macedo, G.: Crohn's disease outcome in patients under azathioprine: A tertiary referral center experience. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2014, 8, 617 – 625.

Mantzaris, G. J., Viazis, N., Polymeros, D., Papamichael, K., Bamias, G., Koutroubakis, I. E.: Clinical profiles of moderate and severe Crohn's disease patients and use of anti-tumor necrosis factors agents. *Ann. Gastroenterology*, 2015, 28, 417 – 419.

Molodecky, N. A., Kaplan, G. G.: Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology and hepatology*, 2010, 6 (5), 339 – 343.

Naser, S. A., Arce, M., Khaja, A., Fernandez, M., Naser, N., Elwasila, S., Thanigachalam, S.: Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 2012, 18 (5), 414.

Prokopová, L., Ďuricová, D., Bortlík, M., Zbořil, V., Lukáš, M., Pracovní skupina pro idiopatické střevní záněty ČGS ČLS JEP: Doporučené postupy pro podávání aminosalicylátů u nemocných s idiopatickými střevními záněty [Guidelines for the administration of aminosalicylates in patients with inflammatory bowel diseases]. *Gastroenterologie a hepatologie*, 2012, 66 (5), 391 – 393.

Šteňová, E., Koreň, M.: Systémová kortikoterapia – špecifiká liečba glukokortikoidmi. [Systemic corticotherapy – specifics of glucocorticoid treatment]. *Ambulantná terapia*, 2009, 7 (1), s. 38.

Waller, S., Tremelling, M., Bredin, F., Godfrey, L., Howson, J., Parkes, M.: Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis. *GUT*, 2006, 55 (6), 809 – 814.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III.,1: 49 – 59, 2021

ANTIPROLIFERATÍVNE ÚČINKY LIEČIV RASTLINNÉHO PÔVODU

ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF DRUGS OF THE PLANT ORIGIN

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

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

martina.proskovcova@student.uvlf.sk

ABSTRAKT

Terapia nádorových ochorení je dlhý a náročný proces, počas ktorého sa u pacienta objavujú viaceré nežiaduce účinky. Napriek neustálej produkcii chemicky syntetizovaných liečiv sa výskum zameriava na hľadanie nových a bezpečnejších liečiv, ktorými sú napríklad zlúčeniny rastlinného pôvodu. Rastliny ako zdroj biologicky aktívnych látok sú čoraz viac sledované ako podporná terapia v onkologickej liečbe za účelom predĺžiť život pacienta a zlepšiť jeho kvalitu. Klinicky testované zlúčeniny sa ďalej spracovávajú farmaceutickým priemyslom a následne sa zaraďujú do klinickej praxe. Prínosom v tejto oblasti sú predovšetkým polyfenolové látky obsiahnuté v rastlinných extraktoch, charakteristické antiproliferatívnou či antioxidačnou aktivitou. Prehľadový článok približuje účinok flavonoidov, brasinosteroidov, alkaloidov, trieslovín či antioxidačného vitamínu E, ktorých účinok je potrebné naďalej skúmať.

Kľúčové slová: apoptóza; antiproliferatívny účinok; fytoterapeutiká; nádor

ABSTRACT

The cancer therapy is a long and difficult process with various side effects. Despite the constant production of the chemically synthesized drugs, research is focused on finding the new and safer drugs, which are compounds of plant origin. Plants are a source of biologically active substances, monitored as adjuvant therapy in oncological treatment for the benefit of the quality and length of patients' life. The clinically tested compounds are further processed by the pharmaceutical

industry and subsequently the compounds are incorporated into clinical practice. The main benefits are polyphenolic substances contained in plant extracts, characterized by antiproliferative or antioxidant activity. The review article describes the effect of flavonoids, brassinosteroids, alkaloids, tannins or antioxidant vitamin E, whose effect needs to be further investigated.

Key words: apoptosis; antiproliferative effect; phytotherapeutics; cancer

ÚVOD

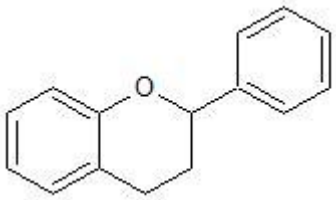
Mnoho rastlinných extraktov obsahuje zlúčeniny so schopnosťou chrániť bunky pred škodlivými účinkami reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Ak dôjde k prevahe ROS nad celkovým množstvom antioxidantov, nastáva v organizme tzv. oxidačný stres. Oxidačný stres je jeden z mnohých faktorov, ktorý sa významne podieľa na rozvoji chorôb. Antioxidačné látky majú schopnosť premeniť reaktívne formy kyslíka na nereaktívne, poprípade menej reaktívne alebo dokonca zabrániť ich vzniku. Vychytávanie voľných radikálov, či ich zneškodňovanie, umožňuje predchádzať možným patologickým procesom (Du a kol., 2012). Nádorové ochorenia sú celosvetovo druhou najčastejšou príčinou mortality, v dôsledku ktorých za rok 2018 zomrelo odhadom 9,6 milióna ľudí (WHO, 2018). V štatistikách OECD (z roku 2017) je Slovensko krajinou s treťou najvyššou úmrtnosťou na zhubné nádory. Ženy najčastejšie zomierajú na karcinóm prsníka a muži na karcinóm pľúc. Avšak v súčasnosti sa najrozšírenejšou formou malígnych ochorení stáva nádor hrubého čreva a konečníka. Ročne v priemere pribúda 277 nových prípadov na 100 000 obyvateľov (SLK, 2017). Nádor predstavuje zhluk buniek, ktoré sa nekontrolovane delia s potenciálom metastázovať v tele. Liečba predstavuje dlhý a náročný proces, počas ktorého sú ovplyvňované nielen nádorové, ale aj zdravé bunky. Preto v súčasnosti vzrastá záujem vedcov o nové, bezpečnejšie látky s menším výskytom závažných nežiaducich účinkov na organizmus, medzi ktoré patria napríklad obsahové látky prítomné v rôznych druhoch rastlín (Akhtar a Swamy, 2018). Afrika a Ázia sú krajinami využívajúcimi skrytý potenciál rastlín už tisícky rokov. Látky produkované rastlinami s antiproliferatívnou aktivitou majú schopnosť inhibovať rast buniek a navodiť apoptózu (Greenwell a Rahman, 2015). Významnú skupinu tvoria polyfenoly, ktorých typická štruktúra predurčuje ich antioxidačnú aktivitu, vďaka čomu sa stávajú možnou voľbou liečby či prevencie ochorení. Predstavujú veľkú skupinu vyše 8000 známych zlúčenín klasifikovaných do 10 tried, vrátane flavonoidov, trieslovín i zlúčenín kurkumínu či resveratrolu (Greenwell a Rahman, 2015). Tento prehľadový článok prináša stručnú charakteristiku významných prírodných látok potenciálnej adjuvantnej liečby onkologických ochorení.

1. FLAVONOIDY

Flavonoidy sú fenolové látky, ktoré v sebe zahŕňajú množstvo derivátov. Sú rozšírené ako farbivá a veľmi často ich nachádzame v plodoch rastlín z čeľade *Rutaceae* (rutovité) (Chahar a kol., 2011). Sú zodpovedné za vôňu, farbu rastlín, čím dokážu lákať hmyz. Na druhej strane však predstavujú jeden z obranných mechanizmov na biotický i abiotický stres. Pôsobia ako antimikrobiálne defenzívne zlúčeniny, UV filtre, alelopatické zlúčeniny alebo ako fytoalexíny. Na základe obmeny ich základnej molekulárnej štruktúry predstavujúcej dva benzénové kruhy spojené s lineárnym 3-C reťazcom tvoriacim kyslíkatý heterocyklus, sa delia na viaceré podskupiny (viď tab. 1) (Panche a kol., 2016).

Majú potenciál využitia v liečbe ochorení tým, že disponujú rôznymi účinkami vrátane antioxidačného, protizápalového, protivírusového, a tiež antiproliferatívneho účinku. V súčasnosti je dôležitou otázkou chemoprevencia nádorových ochorení. Flavonoidy sú jedným z možných riešení tým, že účinkujú supresívnym spôsobom, čím potláčajú vznik nádorov z prokarcinogénov. Taktiež môžu

Tab. 1: Základná štruktúra flavonoidov a ich klasifikácia

Základná štruktúra	Podtrieda
	Flavón: tangeretín, apigenín
	Flavonol: kvercetín, kempferol, fisetín
	Chalkón: arbutín, chalkonaringenín
	Antokyanín: malvidín, cyanidín
	Izoflavón: genisteín, daidzeín
	Flavanón: hesperidín, naringenín

Zdroj: Vlastné spracovanie podľa Panche a kol., 2016

Tab. 2: Biomolekulárna aktivita flavonoidov

väzba elektrofilov	H-donácia (napríklad GSH-peroxidázy)
indukcia ochranných enzýmov	zvýšenie miery apoptózy
inhibícia angiogenézy	inhibícia proliferácie buniek
inaktivácia kyslíkových radikálov	inhibícia aktivácie NF-κB
inhibícia lipidovej peroxidácie	inhibícia COX-2, LOX

Zdroj: Vlastné spracovanie podľa Chahar a kol., 2011; GSH-peroxidáza – glutatión-peroxidáza, NF-κB – nukleárny faktor kappa B, COX-2 – cyklooxygenáza 2, LOX – lipoxygenáza

blokovať tvorbu karcinogénnych zlúčenín v miestach iniciácie, či napomáhať tvorbe menej toxických zlúčenín v metabolizme karcinogénnych látok. Ich možné biologické účinky uvádza tabuľka 2. Dokážu ovplyvniť karcinogenézu nielen v štádiu iniciácie, ale aj v štádiu promócie a progresie (Manthey a kol., 2001; Chahar a kol., 2011).

1.1. Genisteín

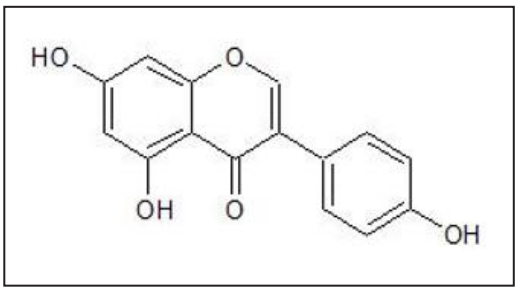
Jednu z podskupín flavonoidov tvoria izoflavóny, medzi ktoré sa radí genisteín (viď obr. 1). Nachádza sa v sójových bôboch alebo v rastline *Flemingia vestita*, čeľade *Fabaceae* (bôbovité) (Marboh a Mahanta, 2020).

Viacerými štúdiami sa preukázali mechanizmy jeho protinádorového pôsobenia. V *in vitro* teste na myšacích nádorových bunkách prsníka, kože a prostaty preukázal účinok nielen na hormón-dependentných tumoroch, ale aj na non-hormón dependentných tumoroch v dostatočne vysokých koncentráciách. Ich význam spočíva v ovplyvňovaní estrogénovej aktivity, v kompetícii s estrogénom (17β-estradiol) o väzobné miesto na estrogénový receptor (ER). Vyššiu afinitu má k ERβ, kde ER vystupuje ako DNA-viažuci transkripčný faktor, regulujúci génovú expresiu (Wang a kol., 2012). Inhibuje proliferáciu nádorových buniek prostaty (LNCaP) a podporuje apoptózu. V nádorových bunkách močového mechúra inhibuje aktivitu cdc2 kinázy a pozastavuje bunkový cyklus vo fáze G2/M (Lambert a kol., 2005).

1.2. Apigenín

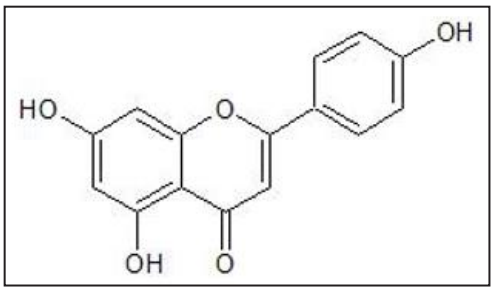
Apigenín (viď obr. 2) zo skupiny flavonoidov nájdeme v zelenine a ovocí ako je petržlen, cibuľa, grapefruit, hrozno, dokonca ho nájdeme aj v červenom víne. Prítomný je v rastlinách *Matricaria chamomilla* (rumanček kamilkový) a *Moringa peregrina* (El-Alfy a kol., 2011; Yan a kol., 2017). Vďaka svojím fyziologickým vlastnostiam je využívaný v tradičnej

Obr. 1: Štruktúrny vzorec genisteínu



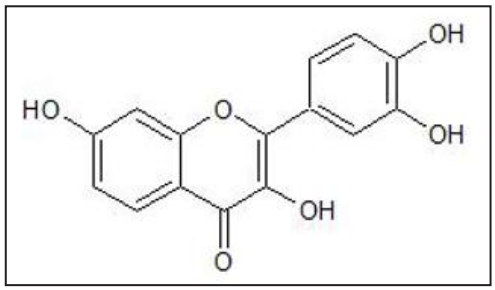
Zdroj: Vlastné spracovanie podľa Chahar a kol., 2011

Obr. 2: Štruktúrny vzorec apigenínu (4, 5, 7 – trihydroxyflavón)



Zdroj: Vlastné spracovanie podľa Panche a kol., 2016

Obr. 3: Štruktúrny vzorec fisetínu



Zdroj: Vlastné spracovanie podľa https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fisetin

medicíne už zopár storočí. Okrem antibakteriálnej, antiflogistickej, antioxidačnej aktivity disponuje aj protinádorovou aktivitou, dokonca znižuje krvný tlak. Dokáže indukovať apoptózu, autofágiu a ovplyvňuje aj imunitnú odpoveď. Na druhej strane potláča migráciu, inváziu nádorových buniek a reguluje bunkový cyklus (Yan a kol., 2017).

Zheng a kol. (2005) uvádzajú pôsobenie apigenínu prostredníctvom indukovania apoptózy na nádorových bunkových líniách krčka maternice HeLa. Zaznamenali redukciu expresie antiapoptického proteínu Bcl-2, no zároveň indukciu expresie p53 a p21/WAF1, čo vedie k apoptóze.

1.3. Fisetín

Bioaktívny flavonol – fisetín (viď obr. 3) sa prirodzene syntetizuje v rôznych druhoch ovocia (jahody, jablká, mango, hrozno) a zeleniny (paradajky, cibuľa, uhorky), pôsobí tiež ako farbivo (Mehta a kol., 2018).

Fisetín je ďalším potenciálnym liečivom v adjuvantnej liečbe nádorových ochorení, vďaka schopnosti navodiť apoptózu. V indukcii apoptózy je dôležitý p53 proteín, ktorého hladinu dokáže fisetín zvyšovať. Zmenami Bcl-2 proteínov sa indukuje jej vnútorná dráha. Dochádza k uvoľneniu cytochrómu c v dôsledku zvýšenej mitochondriálnej permeability a dochádza k aktivácii kaspázy 9. Tento mechanizmus bol pozorovaný *in vitro* štúdiou na humánnych nádorových bunkách hrubého čreva (HCT-116). Účinok na molekulárnej úrovni sledovali aj Lim a Park (2009). Dospeli k výsledku, že fisetín pôsobil ako aktivátor apoptózy, v dôsledku aktivovania kaspázy 3, 9 a zvýšenia hladiny proteínu p53 tumorového supresora (Lim a Park, 2009).

Jeho antimetastatický účinok po prvýkrát sledovali Liao a kol. (2009) na A549 – bunkovej línii ľudského adenokarcinómu pľúc. Ovplyvnením ERK1/2, MMP-2 a u-PA inhiboval adhéziu, migráciu a inváziu buniek nádoru. Moduláciou NF-κB (nukleárny faktor kappa B) je zabezpečená jeho antiproliferatívna a antiflogistická aktivita (Adhami a kol., 2012). Mustaza a kol. (2009) na nádorových bunkách pankreasu AsPC-1 *in vitro* spozorovali inhibíciu rastu a proliferácie buniek pri súbežnej aktivácii apoptózy. Došlo k up-regulácii DR3 (death receptor-3) buniek karcinómu pankreasu (AsPC-1) a k ovplyvneniu NF-κB (Murtaza a kol., 2009).

2. TRIESLOVINY (TANÍNY)

Triesloviny sú rastlinné polyfenolické zlúčeniny nachádzajúce sa v kôre stromov, v ovocí (hrozno, granátové jablko, čučoriedky), v listoch druhu

Camellia sinensis (čajovník čínsky), v kávových i kakaových bôboch (Nagy a kol. 2017).

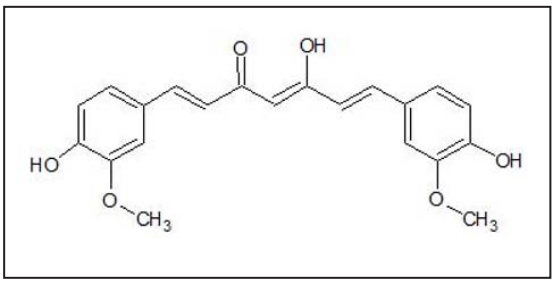
Taníny, obsiahnuté v extrakte *Punica granatum* (granátové jablko), predurčujú nielen jeho antioxidačnú aktivitu, ale aj antiproliferatívny efekt. Za aktivitu sú pravdepodobne zodpovedné obsahové látky ako kyselina elagová a punikalagín. V predklinickom *in vitro* a *in vivo* modeli nádorových buniek prostaty PC-3 (Malik a kol., 2005), ako aj nádorových buniek pľúc (A549) (Khan a kol., 2007), preukázali svoju potenciálnu antiproliferatívnu aktivitu. Mechanizmus pôsobenia zahŕňa viacero dráh vrátane modulácie cyklínov, indukcie kaspáz, inhibície expresie COX-2 (cyklooxygenázy-2), indukcie glutathion S transferázy (GST) alebo PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (Khan, 2009). Z tanínov majú význam aj sakuranetín a 6-metoxykapilarisín. Sú prítomné v extrakte *Artemisia dracunculus* (palina dračia), ktorý okrem iného reguluje proteíny apoptózy v nádorových bunkách prsníka (Akhtar a Swamy, 2018). Výsledok štúdie Varalakshmi a kol. (2014) uvádza možné využitie extraktu kôry škoricovníka cejlónskeho (*Cinnamomum zeylanicum*) v klinickej praxi. Po jeho 24-hodinovej expozícii expozícii nádorovým bunkám pečene (HepG2) došlo k indukcii apoptózy.

3. KURKUMÍN

Tento polyfenolový kurkuminoid (viď obr. 4) je v prevažnej miere zastúpený v kurkume – žltom pigmente produkovanom rastlinou *Curcuma longa* – kurkumovník dlhý z čeľade *Zingiberaceae* (ďumbierovité) (Panda a kol., 2017; Akhtar a Swamy, 2018). V roku 1987 bola prevedená prvá klinická skúška kurkumínu pôsobiaceho na vonkajšie nádorové lézie (Kuttan a kol., 1987; Panda a kol., 2017).

V predklinickej štúdii v synergickom pôsobení s tamoxifénom na bunkovej línii nádoru prsníka MCF-7, čo sú bunky rezistentné na tamoxifén, sa potvrdila jeho schopnosť zvrátiť rezistenciu buniek voči liečivu. Taktiež na nádorových bunkových líniách

Obr. 4: Štruktúra kurkumínu



Zdroj: Vlastné spracovanie podľa https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Curcumin

hrubého čreva HCT-116 zvyšuje chemosenzitivitu buniek na 5-fluorouracil (Shakibaei a kol., 2014).

Kurkumín dokáže navodiť apoptózu nádorových buniek bez cytotoxického pôsobenia na zdravé okolité bunky, preto je aj predmetom viacerých štúdií (Wang a kol., 2012). Štúdie uvádzajú jeho pôsobenie na mitochondriálne dráhy, dráhy proteínkináz i prostredníctvom DR (death receptor). Inhibíciou angiogenézy pozastavuje vývoj ciev nádorov, čím sa preruší dodávanie živín pre nádorové bunky. Potenciálnymi cieľovými molekulami, ktoré kurkumín ovplyvňuje, sú COX-2 (cyklooxygenáza-2) alebo iNOS (indukovateľná syntetáza oxidu dusnatého). V mechanizme účinku, ktorý sa sledoval na leukemických bunkách, zohrávajú úlohu aj transkripčné faktory AP-1 (aktivátorový proteín-1) a NF-κB (Lambert a kol., 2005).

4. RESVERATROL

Tento stilbén (viď obr. 5) nájdeme v bobuľovitom ovocí (napríklad v šupke hrozna) alebo v arašidoch. Objavený bol v roku 1940 v koreni rastliny *Veratrum grandiflorum* (kýchavica veľkokvetá), *Liliaceae* (ľaliovité) (Schaafsma a kol., 2016; Eftimová a Legáth, 2017). O pár rokov na to (1992) bola zistená jeho prítomnosť vo víne, kedy mu bol dokázaný kardioprotektívny účinok. Resveratrol dokáže blokovať expresiu HIF-Iα (hypoxia-inducible factor 1-alpha), VEGF (vascular endothelial growth factor) a zároveň inhibuje iNOS, čím bráni progresii nádo-

rov. Z hľadiska vzniku metastáz, ktoré znemožňujú liečbu a úspešnosť vyliečenia, má veľký význam (Schaafsma a kol., 2016).

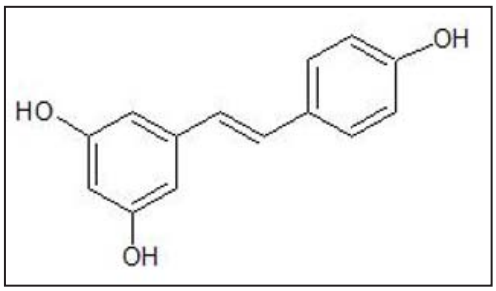
Resveratrol obsiahnutý v extrakte rastliny *Cissus quandragularis, Vitaceae* (viničovité) indukoval apoptózu uvoľnením cytochrómu c v bunke (Akhtar a Swamy, 2018). V bunkovom cykle nádorovej bunkovej línie CaCo-2 spôsobil hromadenie buniek na fázovom rozhraní G2/S. Za účinok je pravdepodobne zodpovedná inhibícia expresie ornitíndekarboxylázy. Avšak jeho presný mechanizmus účinku nie je úplne jasný (Schneider a kol., 2005).

5. BRASINOSTEROIDY

Ide o skupinu rastlinných steroidných hormónov dôležitých v procese rastu, diferenciácie, predĺženia koreňov a stoniek. Okrem fyziologických funkcií prispieva k odolnosti voči chorobám, stresovej tolerancii a starnutiu. Brasinosteroidy boli detegované a izolované zo semien, plodov, listov, hálky a peľu *Brassica napus* (kapusta repková), *Brassicaceae* (kapustovité). Rozšírený a hlavne nízkotoxický brasinosteroid 24-epibrasinolid (viď obr. 6) je impulzom na ďalší výskum brasinosteroidov za účelom možného využitia v onkológii. Veľkou výhodou týchto zlúčenín je nízky vplyv na okolité bunky, čo znamená nízky výskyt vedľajších, nežiaducich účinkov (Zullo a Adam, 2002; Malíková a kol., 2008). Prírodné i syntetické brasinosteroidy reagujú s estrogénovými receptormi a navyše inhibujú angiogenézu a bránia metastázovaniu (Rárová a kol., 2012).

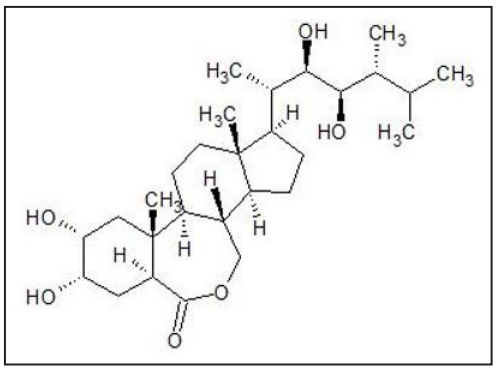
Štúdia vykonaná na bunkovej línii karcinómu prsníka (najpoužívanejší experimentálny model) preukázala ich inhibičný účinok zasahujúci bunkový cyklus vo fáze G1. Ovplyvňujú aj fázu S, kde sa následne znižuje podiel buniek syntetizujúcich DNA. Avšak na bunkových líniách nádoru prostaty nezávislého od androgénov, na rozdiel od hormóndependentných nádorov, spôsobí značné percentuálne zvýšenie buniek na rozhraní G2/M fázy (Malíková a kol., 2008).

Obr. 5: Resveratrol



Zdroj: Vlastné spracovanie podľa https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resveratrol

Obr. 6: Chemická štruktúra 24-epibrasinolidu



Zdroj: Vlastné spracovanie podľa Waisi a kol., 2017

6. ALKALOIDY

Rastliny s vysokým obsahom alkaloidov patria do viacerých známych čeľadí: *Papaveraceae* (makovité), *Ranunculaceae* (iskerníkovité), *Solanaceae* (ľuľkovité) a *Amaryllidaceae* (amarylkovité) (Encyclopaedia Britannica, 2020).

In vitro štúdia Chen a kol. (2016) na nádorových bunkových líniách HT-29 (kolorektálny adenokarcinóm) a HepG2 (hepatocelulárny karcinóm) preukázala antiproliferatívny účinok hippeastrínu, alkaloidu získaného z *Lycoris radiata* (pavúčia ľalia), *Amaryllidaceae* (amarylkovité). Preukázal sa jeho inhibičný vplyv na aktivitu topoizomerázy I, čím došlo k prerušeniu reťazca DNA. Navyše enzým topoizomeráza I spolu s topoizomerázou II predstavujú ideálny cieľ pôsobenia vo vývoji nových potenciálnych chemoterapeutík (Champoux, 2001). Ďalšou potenciálnou rastlinou,

vhodnou pre adjuvantnú liečbu, je *Catharanthus roseus* (katarant ružový) z čeľade zimozeleňovité, *Apocynaceae*. Obsahové látky ako vinblastín, vinkristín dokážu blokovať bunkový cyklus v metafáze. Naviazaním sa na tubulín bránia jeho polymerizácii, čím nedochádza k vzniku mikrotubulov (blokáda tvorby mikrotubulárnej infraštruktúry bunky) (Moudi a kol., 2013). Do klinickej praxe sa dostali aj ich semisyntetické deriváty vindesín, vinorelbín. Dva majoritné alkaloidy produkované stromom *Senna spectabilis* (*Fabaceae*, bôbovité) spôsobujú silnú inhibíciu proliferácie buniek HepG2 a redukujú aktiváciu ERK (extracellular signal-regulated kinase). Zároveň indukujú down-reguláciu cyklínu D1 v bunkách HepG2. Sú schopné pozastaviť bunkový cyklus vo fáze G1/S a inhibovať cyklín-dependentné kinázy. Regulácia aktivity kináz bunkového cyklu predurčuje význam liečiv v protinádorovej terapii (Pereira a kol., 2016).

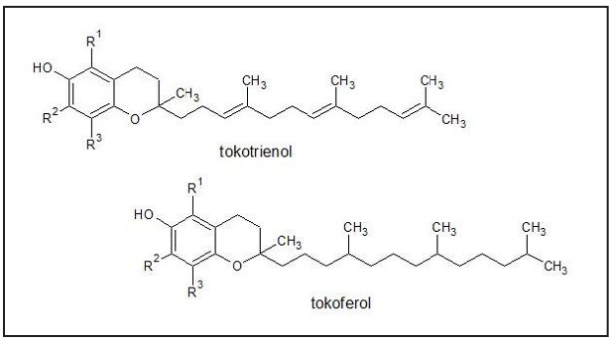
7. VITAMÍN E

Lipofilný vitamín E ako silný antioxidant zabraňuje vzniku voľných radikálov. Ich vychytávanie či zneškodňovanie umožňuje predchádzať možným patologickým procesom. Medzi zdroje vitamínu E patria orechy (mandle, arašidy, lieskové orechy) a rastlinné oleje (olivový, slnečnicový, kukuričný, sójový olej). Nájdeme ho aj v avokáde či v olivách.

Zahŕňa dve podskupiny: tokoferoly a tokotrienoly (viď obr. 7). V molekulárnej štruktúre sa navzájom líšia bočným fytylovým reťazcom, ktorý je v polohe 1 chrománu trienolov nenasýtený. Nenasýtenosť bočného reťazca udáva protinádorovú aktivitu tokotrienolov, predovšetkým izomérnych foriem γTE a δTE, vrátane protizápalovej aktivity (Sylvester a Shah, 2005).

Vplýva na proliferáciu, angiogenézu, metastázovanie a slúži aj ako chemoprevencia. Vyvoláva supresiu aktivity NF-κB a zároveň znižuje hladiny Bcl-2 proteínu v závislosti od dávky a času. Taktiež je zodpovedný za aktiváciu kaspáz 3, 7, 8, 9 a PARPγ (Yap a kol., 2008). Tokotrienol spôsobuje

Obr. 7: Vitamín E



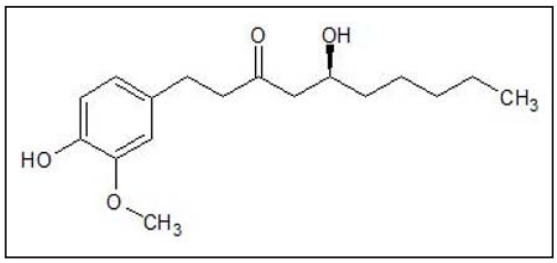
Zdroj: Vlastné spracovanie podľa Colombo, 2010

down-reguláciu expresie antiapoptotických, proliferatívnych a angiogénnych génových produktov, regulovaných STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). V onkologickej terapii je potrebné tlmiť aktivitu STAT3, pretože reguluje expresiu génov proliferácie, gény potláčajúce apoptózu, inváziu a podporujúce angiogenézu. Vplýva aj na hladiny Nrf2 [nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2], ktorý má významnú úlohu v ochrane buniek pred oxidačným stresom (Kannappan a kol., 2012). Hsieh a kol. (2010) zaznamenali vo svojej štúdii u tokotrienolov selektívnu reguláciu Nrf2-KEAP1 systému. Zvyšovala sa hladina Nrf2 a naopak znižovali sa hladiny KEAP-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). V štúdii na nádorových bunkách žalúdka SGC-7901 sa zistilo, že pravdepodobným cieľom účinku vitamínu E je HIF-1/VEGF. K výraznému zníženiu akumulácie proteínu HIF-1a (hypoxia-inducible factor 1-alpha) indukovanej hypoxiou a navyše k zníženiu sekrécie VEGF (vascular endothelial growth factor) dôjde inhibovaním aktivácie p-ERK1/2 sprostredkovanej hypoxiou (Bi a kol., 2010).

8. GINGEROL

Gingerol (viď obr. 8) je hlavnou farmakologicky aktívnou zložkou extraktu získaného z koreňa *Zingiber officinalis*, ďumbier lekársky (*Zingiberaceae*, ďumbierovité) a je charakteristický protizápalovým,

Obr. 8: Gingerol



Zdroj: Vlastné spracovanie podľa https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gingerol

antioxidačným či antiemetickým účinkom (Pal Kaur a kol., 2016).

V synergizme s 6-shoagolom (obsahová látka extraktu) zabraňuje metastázovaniu, a to indukciou apoptózy so súčasnou reguláciou autofágie (Pal Kaur a kol., 2016). V nádorových bunkách krčka maternice HeLa pozastavoval bunkový cyklus vo fáze G0/G1 (De lima a kol., 2018). Jeong a kol. (2009) sa taktiež venovali sledovaniu chemopreventívneho i chemoterapeutického účinku 6-gingerolu na bunky karcinómu hrubého čreva. Cieľom pôsobenia bola LTA4H (Leukotriene A4 Hydroláza), ktorú 6-gingerol inhiboval. Zvýšená expresia LTA4H a následná produkcia LTB4 (Leukotrién B4) sú potenciálnymi faktormi podporujúcimi progresiu nádoru. Preto je potrebné znižovať produkciu LTB4 (inhibíciou LTA4H), čím dôjde k supresii proliferácie nádorových buniek (Jeong a kol., 2009).

ZÁVER

Nádorové ochorenia sú častou príčinou úmrtí ľudí, preto je potrebné hľadať nové a efektívne liečivá v terapii a zároveň v profylaxii. Základom liečby je nielen predĺžiť život pacienta, ale aj zlepšiť jeho kvalitu. Ľudia už oddávna v liečbe rôznych ochorení využívajú skrytý potenciál prírody. V súčasnosti sú látky prírodného pôvodu predmetom vývoja nových liečiv s minimálnym nežiaducim vplyvom na zdravé tkanivá a sú vhodnou voľbou adjuvantnej, resp. podpornej liečby onkologických ochorení. Perspektívnymi substanciami sú zlúčeniny s antioxidačným a aniproliferatívnym účinkom ako napríklad flavonoidy (apigenín, genisteín, fisetín), triesloviny, alkaloidy, steroidné brasinosteroidy. Taktiež vitamín E s významnou antioxidačnou aktivitou, kurkumín, resveratrol či zázvorový extrakt s obsahom gingerolu predstavujú prínos v podpornej terapii onkologických ochorení. Pri rastlinných polyfenoloch je dôležité sledovať ich biologickú dostupnosť v ľuskom organizme, ich terapeutické dávky, ako aj podmienky pôsobenia, čo je však doposiaľ nedostatočne preskúmané.

POĎAKOVANIE

Publikácia vznikla za podpory IGA UVLF 05/2020 „In vitro“ stanovenie proapoptickej, antibiofilmovej a antioxidačnej aktivity vybraných silíc z rastlín čeľade Lamiaceae.

ZOZNAM LITERATÚRY

Adhami, V. M., Syed, D. N., Khan, N., Mukhtar, H.: Dietary flavonoid fisetin: a novel dual inhibitor of PI3K/Akt and mTOR for prostate cancer management. *Biochem. Pharmacol.*, 2012, 84 (10), 1277 – 1281.

Akhtar, M. S., Swamy, M. P.: *Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements*. 2nd edn. Singapore: Springer, 2018. 383 – 390.

Bi, S., Liu, J. R., Li, Y., Wang, Q., Liu, H. K., Yan, Y. G., Chen, B. Q., Sun, W. G.: γ-Tocotrienol modulates the paracrine secretion of VEGF induced by cobalt (II) chloride via ERK signaling pathway in gastric adenocarcinoma SGC-7901 cell line. *Toxicology*, 2010, 274 (1 – 3), 27 – 33.

Colombo, M. L.: An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol – perspectives. *Molecules*, 2010, 15 (4), 2103 – 2113.

De lima, R. M. T., dos Reis, A. C., de Menezes, A. A. P. M., Santos, J. V. D. O., Filho, J. W. G. D.

O., Ferreira, J. R. D. O., de Alencar, M. V. O. B., da Mata, A. M. O. F., Khan, I. N., Islam, A., Uddin, S. J., Ali, E. S., Islam, M. T., Tripathi, S., Mishra, S., K., Mubarak, M. S., de Carvalho Melo-Cavalcante, A. A.: Protective and therapeutic potential of ginger (*Zingiber officinale*) extract and [6]-gingerol in cancer: A comprehensive review. *Phytother Res.*, 2018, 32 (10), 1885 – 1907.

Du, G. J., Zhang, Z., Wen, X. D., Yu, C., Calway, T., Yuan, C. S., Wang, C. Z.: Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients*, 2012, 4 (11), 1679 – 1691.

Eftimová, J.a Legáth, J.: *Rastliny s toxickými účinkami* [Plants with toxic effects]. 1. vyd. Košice: UVLF v Košiciach, 2017. 21 – 22.

El-alfy, T. S., Ezzat, S. M., Hegazy, A. K., Amer, A. M., Kamel, G. M.: Isolation of biologically active constituents from *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori. (family: *Moringaceae*) growing in Egypt. *Pharmacogn. Magn.*, 2011, 7 (26), 109.

Encyclopaedia Britannica. Alkaloid, chemical compound, 2020. https://www.britannica.com/science/alkaloid. Accessed December 11, 2020.

Greenwell, M., Rahman, P. K. S. M.: Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 2015, 6 (10), 4103.

Hsieh, T. C., Elangovan, S., Wu, J. M.: Differential suppression of proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells exposed to α-, γ-and δ-tocotrienols is accompanied by altered expression of oxidative stress modulatory enzymes. *Anticancer Res.*, 2010, 30 (10), 4169 – 4176.

Chahar, M. K., Sharma, N., Dobhal, M. P., Joshi, Y. C.: Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn. Rev.*, 2011, 5 (9), 1.

Champoux, J. J.: DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, 70 (1), 369 – 413.

Chen, G. L., Tian, Y. Q., Wu, J. L., Li, N., Guo, M. Q.: Antiproliferative activities of *Amaryllidaceae* alkaloids from *Lycoris radiata* targeting DNA topoisomerase I. *Scientific Reports*, 2016, 6, 38 284.

Jeong, C. H., Bode, A. M., Pugliese, A., Cho, Y. Y., Kim, H. G., Shim, J. H., Jeon, Y. J., Li, H., Jiang, H., Dong, Z.: [6]-Gingerol suppresses colon cancer growth by targeting leukotriene A4 hydrolase. *Cancer Res.*, 2009, 69 (13), 5584 – 5591.

Jiang, Q.: Natural forms of vitamin E as effective agents for cancer prevention and therapy. *Adv. Nutr.*, 2017, 8 (6), 850 – 867.

Kannappan, R., Gupta, S. C., Kim, J. H., Aggarwal, B. B.: Tocotrienols fight cancer by targeting multiple cell signaling pathways. *Genes Nutr.*, 2012, 7 (1), 43.

Khan, F., Niaz, K., Maqbool, F., Hassan, F. I., Abdollahi, M., Nagulapalli Venkata, K. C., Nabavi, S. M., Bishayee, A.: Molecular targets underlying the anticancer effects of quercetin: an update. *Nutrients*, 2016, 8 (9), 529.

Khan, N., Hadi, N., Afaq, F., Syed, D. N., Kweon, M. H., Mukhtar, H.: Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice. *Carcinogenesis*, 2007, 28 (1), 163 – 173.

Khan, S. A.: The role of pomegranate (*Punica granatum* L.) in colon cancer. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2009, 22 (3), 346 – 348.

Kuttan, R., Sudheeran, P. C., Josph, C. D.: Turmeric and curcumin as topical agents in cancer therapy. *Tumori Journal*, 1987, 73 (1), 29 – 31.

Lambert, J. D., Hong, J., Yang, G. Y., Liao, J., Yang, C. S.: Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, 81 (1), 284S – 291S.

Liao, Y. Ch., Shih, Y. W., Chao, C. H., Lee, X. Y., Chiang, T. A.: Involvement of the ERK signaling pathway in fisetin reduces invasion and migration in the human lung cancer cell line A549. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57 (19), 8933 – 8941.

Lim, D. Y., Park, J. H. Y.: Induction of p53 contributes to apoptosis of HCT-116 human colon cancer cells induced by the dietary compound fisetin. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2009, 296, G1060 – G1068.

Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., Adhami, V.

M., Syed, D. N., Mukhtar, H.: Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2005, 102 (41), 14 813 – 14 818.

Malíková, J., Swaczynová, J., Kolář, Z., Strnad, M.: Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry*, 2008, 69 (2), 418 – 426.

Manthey, J. A., Guthrie, N, Grohmann, K.: Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr. Med. Chem.*, 2001, 8 (2),135 – 153.

Marboh, V., Mahanta, C. L.: Characterisation and antioxidant activity of sohphlang (*Flemingia vestita*), a tuberous crop. *J. Food Sci. Technol.*, 2020, 57 (10), 3533 – 3544.

Mehta, P., Pawar, A., Mahadik, K., Bothiraja, C.: Emerging novel drug delivery strategies for bioactive flavonol fisetin in biomedicine. *Biomed. Pharmacother.*, 2018, 106, 1282 – 1291.

Moudi, M., Go, R., Yien, C. Y. S., Nazre, M.: Vinca alkaloids. *Int. J. Prev. Med.*, 2013, 4 (11), 1231.

Murtaza, I., Adhami, V. M., Hafeez, B. B., Saleem, M., Mukhtar, H.: Fisetin, a natural flavonoid, targets chemoresistant human pancreatic cancer AsPC-1 cells through DR3-mediated inhibition of NF-κB. *Int. J. Cancer*, 2009, 125 (10), 2465 – 2473.

Nagy, M., Mučaji, P., Grančai, D.: *Farmakognózia. Biologicky aktívne rastlinné metabolity a ich zdroje* [Pharmacognosy. Biologically active plant metabolites]. 2. vyd. Bratislava: Herba, 2017.

Pal Kaur, I., Deol, P., Kiran Kondepudi, K., Bishnoi, M.: Anticancer potential of ginger: mechanistic and pharmaceutical aspects. *Curr. Pharm. Des.*, 2016, 22 (27), 4160 – 4172.

Panda, A. K., Chakraborty, D., Sarkar, I., Khan, T., Sa, G.: New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin. *J. Exp. Pharmacol.*, 2017, 9 (31), 31 – 45.

Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R.: Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 2016, 5, 1 – 15.

Pereira, R. M., Ferreira-Silva, G. Á., Pivatto, M., de Ávila Santos, L., da Silva Bolzani, V., de Paula, D. A. C., de Oliveira, J. C., Júnior, V. C., Ionta, M.: Alkaloids derived from flowers of Senna spectabilis, (−)-cassine and (−)-spectaline, have antiproliferative activity on HepG2 cells for inducing cell cycle arrest in G1/S transition through ERK inactivation and downregulation of cyclin D1 expression. *Toxicol. In Vitro*, 2016, 31, 86 – 92.

Rárová, L., Zahler, S., Liebl, J., Kryštof, V., Sedlák, D., Bartůněk, P., Kohout, L., Strnad, M.: Brassinosteroids inhibit *in vitro* angiogenesis in human endothelial cells. *Steroids*, 2012, 77 (13), 1502 – 1509.

Shakibaei, M., Buhrmann, C., Kraehe, P., Shayan, P., Lueders, C., Goel, A.: Curcumin chemosensitizes 5-fluorouracil resistant MMR-deficient human colon cancer cells in high density cultures. *PLoS One*, 2014, 9 (1), e85397.

Schaafsma, E., Hsieh, T. C., Doonan, B. B., Pinto, J. T., Wu, J. M.: Anticancer activities of resveratrol in colorectal cancer. *Biol. Med.*, 2016, 8 (5), 317 – 318.

Schneider, Y., Vincent, F., Duranton, B., Badolo, L., Gossé, F., Bergmann, Ch., Seiler, N., Raul, F.: Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer lett.*, 2000, 158 (1), 85 – 91.

SLK: Strašiak menom karcinóm [A scarecrow named cancer]. SLek. https://old.lekom.sk/index.php?ID=3754. [cit. 10.11.2020]

Sylvester, P. W., Shah, S. J.: Mechanisms mediating the antiproliferative and apoptotic effects of vitamin E in mammary cancer cells. *Front Biosci.*, 2005, 10 (1 – 3), 699.

Varalakshmi, B., Anand, A. V., Karpagam, T., Bai, J. S., Manikandan, R.: *In vitro* antimicrobial and anticancer activity of *Cinnamomum zeylanicum* Linn. bark extracts. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2014, 6 (1), 12 – 18.

Wang, H., Oo Khor, T., Shu, L., Su, Z. Y., Fuentes, F., Lee, J. H., Tony Kong, A. N.: Plants

vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2012, 12 (10), 1281 – 1305.

Waisi, H. K., Petković, A. Z., Nikolić, B. R., Janković, B. Ž., Raičević, V. B., Lalević, B. T., Giba, Z. S.: Influence of 24-epibrassinolide on seedling growth and distribution of mineral elements in two maize hybrids. *Hem. Ind.*, 2017, 71 (3), 201 – 209.

WHO: Key facts. http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer. Accessed February 10, 2020.

Yan, X., Qi, M., Li, P., Zhan, Y., Shao, H.: Apigenin in cancer therapy: anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell Biosci.*, 2017, 7 (1), 50.

Yap, W. N., Chang, P. N., Han, H. Y., Lee, D. T. W., Ling, M. T., Wong, Y. C., Yap, Y. L.: γ-Tocotrienol suppresses prostate cancer cell proliferation and invasion through multiple-signalling pathways. *Br. J. Cancer*, 2008, 99 (11), 1832.

Zheng, P. W., Chiang, L. C., Lin, C. C.: Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. *Life Sci.*, 2005, 76 (12), 1367 – 1379.

Zullo, M. A. T., Adam, G.: Brassinosteroid phytohormones: structure, bioactivity and applications. *Braz. J. Plant. Physiol.*, 2002, 14 (3), 143 – 181.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 1: 60 – 69, 2021

TERAPIA A SÚČASNÉ MOŽNOSTI LIEČBY OSTEOARTRÓZY

THE THERAPY AND CURRENT OPTIONS FOR THE TREATMENT OF OSTEOARTHROSIS

Lukáčová, Katarína[1]; Šutorová, Martina[2]; Bačkorová, Miriam[1]

[1]Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky
[2]Katedra lekárenstva a sociálnej farmácie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

miriam.backorova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Osteoartróza je degeneratívne kĺbové ochorenie so stúpajúcou prevalenciou. S rastúcim počtom prípadov v poslednom desaťročí zároveň klesá veková hranica novodiagnostikovaných pacientov. Cieľom štúdie bolo zhodnotenie aktuálnych trendov terapie osteoartrózy. Štúdia zahŕňa prehľad preskripcie liekov používaných v liečbe osteoartrózy vo verejnej lekárni nachádzajúcej sa v poliklinike vo Vranove nad Topľou. Analýzou 4340 preskripčných záznamov za referenčné obdobie 18 mesiacov sa zistilo, že v terapii osteoartrózy sú najčastejšie predpisovanou liekovou formou tablety. Z liečiv s rýchlym nástupom účinku (SYRADOA) boli najviac predpisované tablety s obsahom diklofenaku v kombinácii s misoprostolom (682 balení), čo predstavuje 24,48 %. Zo skupiny liečiv s pomalým nástupom účinku (SYSADOA) boli najčastejšie predpisované tablety s obsahom chondroitín sulfátu (615 balení). Z celkového počtu vydaných balení to predstavuje až 90,98 %. Odporúčaným prírodným liečivom s pomalým nástupom účinku (SYSADOA) sú u pacientov s osteoartrózou plody ruže šípovej (*Cynosbati fructus*), extrakt z kôry kadidlovníka pílovitého (*Boswellia serrata* ROXB.), či extrakt z podzemku kurkumy pravej (*Curcuma longa* L.).

Kľúčové slová: diklofenak; chondroprotektíva; NSAID; osteoartróza

ABSTRACT

Osteoarthritis is a degenerative joint disease with increasing prevalence. In the last decades, the number of cases has been growing, while the

age limit of newly diagnosed patients has been decreasing. The aim of the study was to evaluate the current trends in osteoarthritis therapy. The study includes an analysis of osteoarthritis prescription in the pharmacy in Vranov nad Topľou. The analysis of 4340 prescription records over a reference period of 18 months revealed that tablets are the most common prescribed drug form in the treatment of osteoarthritis. The most prescribed drug from the rapid-acting drugs group (SYRADOA), were tablets containing diclofenac in combination with misoprostol (682 packs), which represented 24.48 %. The most commonly prescribed drug from the group of slow-acting drugs (SYSADOA) were tablets containing chondroitin sulphate (615 packs). It represented 90.98 % of the total number of prescriptions. Fruit of *Rosa canina* L. (*Cynosbati fructus*), bark extract of *Boswellia serrata* ROXB. or rhizome extract of *Curcuma longa* L. were recommended as a suitable natural SYSADOA in patients with osteoarthritis.

Key words: diclofenac; chondroprotective drugs; NSAID; osteoarthritis

ÚVOD

Osteoartróza je jedným z desiatich ochorení, ktoré najviac postihujú obyvateľov rozvinutých krajín. Kým do 40. roku života týmto ochorením trpí približne 15 % populácie, u osôb starších ako 65 rokov je to viac ako 50 % a nad 75 rokov dokonca 80 % obyvateľov. V dôchodkovom veku je osteoartróza hlavnou príčinou bolesti a funkčných porúch pohybového aparátu. Podľa výskumov Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) symptomatickou osteoartrózou trpí 9,6 % mužov a 18,0 % žien vo veku nad 60 rokov. Až 80 % pacientov udáva problémy s obmedzením pohybu a 25 % nedokáže vykonávať základné aktivity každodenného života. Osteoartróza je po kardiovaskulárnych ochoreniach druhou najčastejšou príčinou práceneschopnosti. Kým u mužov je v rebríčku príčin práceneschopnosti až na 8. mieste, u žien je v poradí už na 4. mieste (Hawker, 2019).

Osteoartróza je chronické ochorenie poškodzujúce synoviálne, teda pohyblivé kĺby, najčastejšie kĺby rúk, kolien, bedier a chrbtice (Mohan, 2011). Postihuje celé štruktúry kĺbov vrátane kĺbovej chrupavky, subchondrálnej kosti, menisku, synoviálnej membrány a infrapatelárnej tukovej podložky. Spoločnými štrukturálnymi zmenami osteoartrózy sú degradácia chrupavky, remodelácia subchondrálnych kostí, tvorba osteofytov a zmeny v synovii a kĺbovom puzdre (Chow a Chin, 2020). Hlavnými príznakmi je bolesť, porucha funkcie a zhrubnutie kĺbu. Táto bolesť je vyvolaná dráždením nervových zakončení v dôsledku zvýšeného tlaku v tkanivách. Môže byť vyvolaná tiež zápalom. Najdôležitejšie pri diagnostike je lokalizovať postihnuté kĺby a stanoviť stupeň ich poškodenia (viď tab. 1). Podstatné je určiť intenzitu bolesti a charakterizovať doterajšiu medikáciu a všetky sprievodné ochorenia. Len v ojedinelých prípadoch je priebeh osteoartrózy rýchly a je nevyhnutná okamžitá operačná liečba. Väčšina pacientov zaznamenáva postupné zvýrazňovanie bolestivých symptómov a progresiu nálezu (Češka a kol., 2015).

Medzi hlavné klinické príznaky patrí bolesť a stuhnutosť kĺbov, obmedzenie pohybu a praskanie kĺbov (*crepitus)*. Farmakologická liečba zahŕňa liečivá tlmiace bolesť a zápal s rýchlym nástupom účinku, nazývané aj SYRADOA (z angl. symptomatic rapid acting drugs of osteoarthritis) a symptomatické

Tab. 1: Klasifikácia osteoartrózy na základe RTG nálezov

I. stupeň	zúženie kĺbovej štrbiny
II. stupeň	zúženie kĺbovej štrbiny, subchondrálna skleróza na RTG, tvorba osteofytov
III. stupeň	zúženie kĺbovej štrbiny, deformácia kĺbovej jamky a hlavice, osteofyty
IV. stupeň	zánik kĺbovej štrbiny, subchondrálna sklerotizácia, deformácia

Zdroj: Podľa Kellgren-Lawrence, 1957

Tab. 2: Symptomatická farmakologická liečba osteoartrózy

Liečivá s rýchlym nástupom účinku (SYRADOA)	
1. Neopioidné analgetiká	
Analgetiká, antipyretiká	Paracetamol
	Metamizol
	Kys. acetylsalicylová
2. Nesteroidné antiflogistiká	
3. Iné	Itraartikulárne steroidy Lokálna liečba
Liečivá s pomalým nástupom účinku (SYSADOA)	
Glukozamín sulfát	
Chondroitín sulfát	
Kys. hyalurónová	
Diacereín	
ASU (výťažok z avokádového a sójového oleja)	

Zdroj: Lukáčová, 2015

liečivá proti osteoartróze s pomaly nastupujúcim účinkom, tzv. SYSADOA (z angl. symptomatic slow acting drugs of osteoarthritis) (viď tab. 2). Toto označenie nahrádza v minulosti používaný pojem chondroprotektíva (Permuy a kol., 2015).

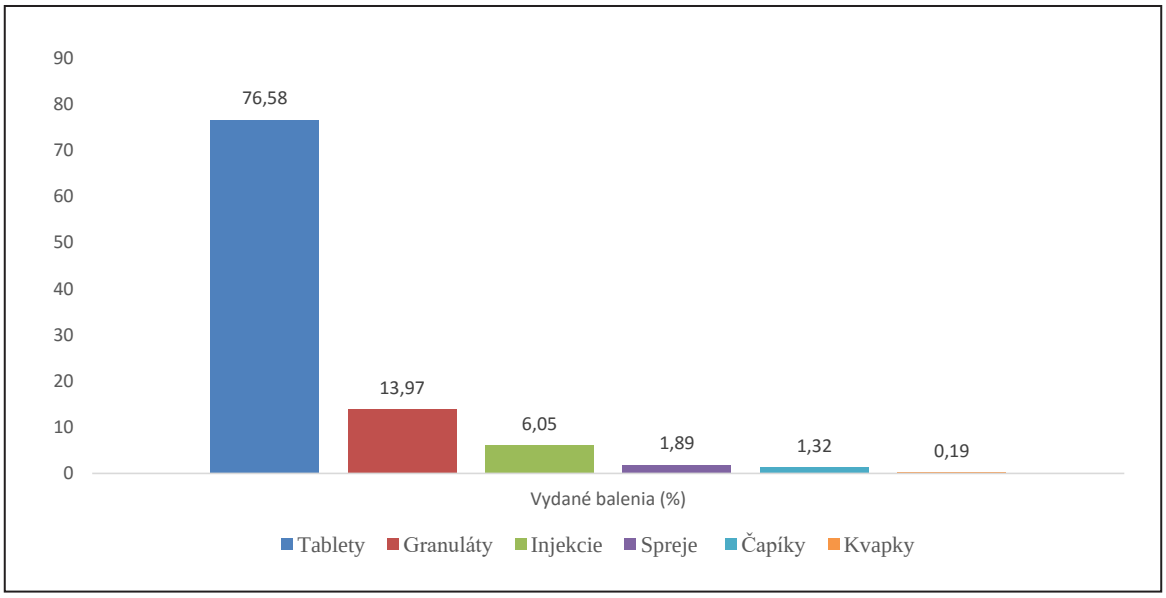
U mnohých pacientov, najmä starších a polymorbídnych, možno sledovať nízku komplianciu pacienta a nevôľu užívať ďalšie lieky najmä kvôli častému výskytu vedľajších účinkov. Hľadajú preto prírodné alternatívy s rovnakým terapeutickým účinkom, ale s nižším rizikom výskytu nežiaducich účinkov. Veľký počet pacientov dáva v samoliečení prednosť najmä prírodným látkam, nakoľko ich efektivitu dokazujú aj klinické štúdie. Christensen a kol. (2008), skúmali empiricky účinok prášku plodov *Rosa canina* L. ako zlúčeniny redukujúcej bolesť. Metaanalýzy randomizovaných kontrolovaných štúdií sa zúčastnilo 287 pacientov trpiacich osteoartrózou. Počas troch mesiacoch pacienti užívali kapsuly s obsahom rozomletých šípok alebo placebo. Primárnym pozorovaným výsledkom bola redukcia bolesti. Znížené skóre bolesti uviedlo 145 pacientov užívajúcich liek, oproti 142 pacientom užívajúcim placebo.

V klinickej štúdii bol skúmaný účinok prášku plodov *Rosa canina* L. u 100 pacientov s osteoartritídou. Štúdie sa zúčastnilo 65 žien a 35 mužov s osteoartritídou bedra alebo kolena, ktorá bola rádiograficky potvrdená. Polovica pacientov užívala počas štyroch mesiacov 2-krát denne želatínovú kapsulu obsahujúcu 0,5 g štandardizovaného prášku šípok. Druhá polovica dostávala v rovnakom dávkovaní placebo. Pohyblivosť bedra alebo kolena bola meraná pri úvodnom skríningu a následne po 4 mesiacoch terapie. U pacientov, ktorí boli zaradení v liečenej skupine, sa významne zlepšila pohyblivosť v porovnaní s kontrolnou skupinou, ktorá užívala placebo (P = 0,033). Rovnako významne bola v referenčnej skupine pozorovaná aj redukcia bolesti kĺbov (P = 0,035). Až 64,6 % pacientov uviedlo počas liečby aspoň určité zníženie bolesti (Warholm a kol., 2003).

Tab. 3: Prehľad vydaných liekových foriem zo skupiny SYRADOA

Lieková forma	Vydané balenia (ks)	Vydané balenia (%)
Tablety	2785	76,58
Granuláty	508	13,97
Injekcie	220	6,05
Spreje	69	1,89
Čapíky	48	1,32
Kvapky	7	0,19

Graf 1: Jednotlivé typy liekových foriem zo skupiny SYRADOA



Cieľom predloženej štúdie bolo analýzou výdaja liekov prostredníctvom preskripčných záznamov pacientov od ortopédov zhodnotiť aktuálne terapeutické postupy. Vo vybranej lekárni boli vydané lieky určené na liečbu osteoartrózy sledované na základe predpísanej liekovej formy.

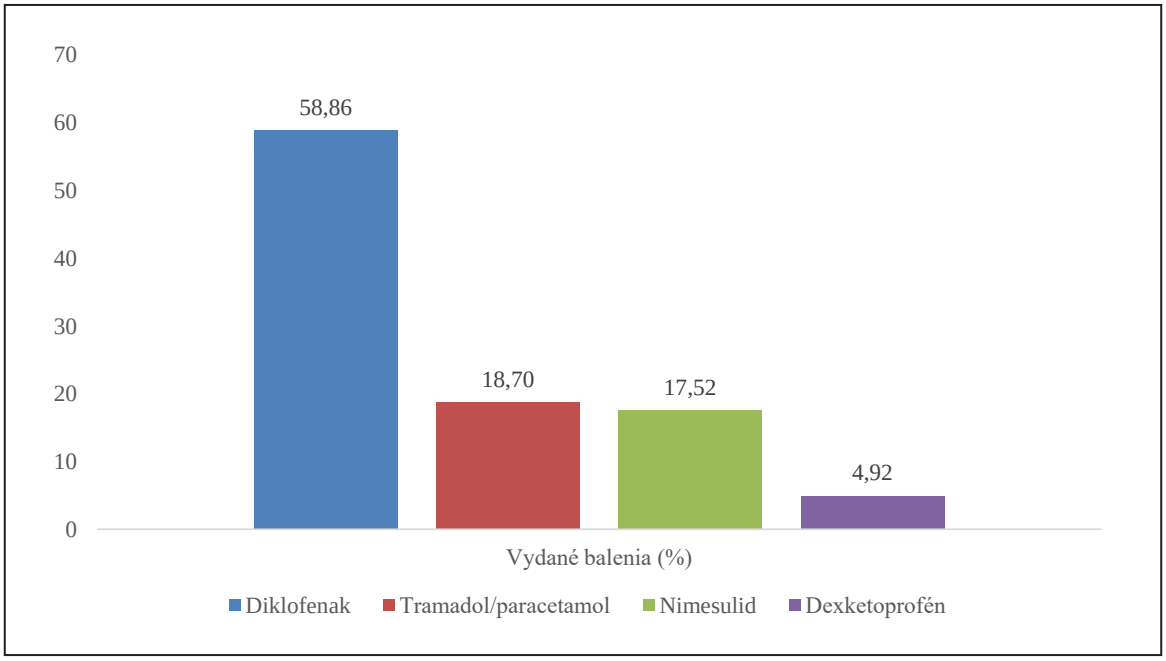
MATERIÁL A METÓDY

Analyzované preskripčné záznamy boli zhromažďované v období 18 mesiacov, od 1. júla 2018 do 31. decembra 2019, vo verejnej lekárni v poliklinike vo Vranove and Topľou. Skúmaná bola preskripcia ortopedickej ambulancie dvoch lekárov, s využitím lekárenského programu NRSYS, s.r.o. Podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb (MKCH-10) boli vyčlenené preskripčné záznamy pacientov s diagnózou artróza (M15 – M19): polyartróza (M15), artróza bedrového kĺbu (M16), artróza kolenného kĺbu (M17), artróza prvého karpometakarpového kĺbu (M18), iné artrózy (M19) (ICD – 10 Version: 2016). Zadané kritériá spĺňalo 4340 prevažne elektronických receptov. Zozbierané údaje boli štatisticky spracované a prezentované vo forme grafov a tabuliek. Pri spracovaní a vyhodnotení získaných dát sa postupovalo v zmysle zákona o ochrane osobných údajov.

Tab. 4: Prehľad jednotlivých liečiv vo forme tabliet používaných v terapii osteoartritídy

Liečivo	Vydané balenia (ks)	Vydané balenia (%)
Diklofenak/misoprostol	682	24,48
Tramadol/paracetamol	635	22,80
Aceklofenak	526	18,88
Naproxén	255	9,15
Metamizol	241	8,65
Nimesulid	141	5,11
Meloxikam	100	3,58
Diklofenak	96	3,45
Celekoxib	69	2,48
Ketoprofén	14	0,50
Diklofenak/omeprazol	12	0,43
Piroxikam	8	0,28
Lornoxikam	4	0,14
Kys. tioprofénová	2	0,07

Graf 2: Výdaj jednotlivých liečiv zo skupiny SYRADOA v aplikačnej forme granulát



VÝSLEDKY

Jednotlivé predpisované liekové formy zo skupiny liečiv s rýchlym nástupom účinku zobrazuje tabuľka 3 a graf 1. Vo verejnej lekárni boli v danom období najčastejšie predpisovanou formou liečiv proti artróze tablety s rýchlym nástupom účinku (76,58 %). Kvapky predstavovali naopak najmenej zastúpenú skupinu liekových foriem v spomínanej kategórii liečiv. Ich preskripcia a výdaj predstavovali iba 0,19 %.

Počet balení najčastejšie predpisovanej liekovej formy tabliet, dostupných a registrovaných na slovenskom trhu, s uvedením jednotlivých

Tab. 5: Prehľad liečiv podávaných injekčne

Liečivo	Vydané balenia (%)
Meloxikam	69,56
Diklofenak	18,18
Metamizol	7,27
Ketoprofén	4,09
Tramadol/paracetamol	0,09

Tab. 6: Prehľad liečiv vo forme kvapiek v terapii ostaoartrózy

Liečivo	Vydané balenia (%)
Metamizol	71,43
Tramadol/paracetamol	28,57

účinných látok zaznamenáva tabuľka 4. Najčastejšie predpisované boli tablety s obsahom diklofenaku v kombinácii s misoprostolom; 24,48 % (682 balení). Samotný diklofenak za skúmané obdobie užívalo vo forme tabliet iba 96 pacientov; t. j. 3,45 %. Najmenej využívanou účinnou látkou bola v sledovanom období kyselina tiaprofénová; 0,07 % (2 balenia).

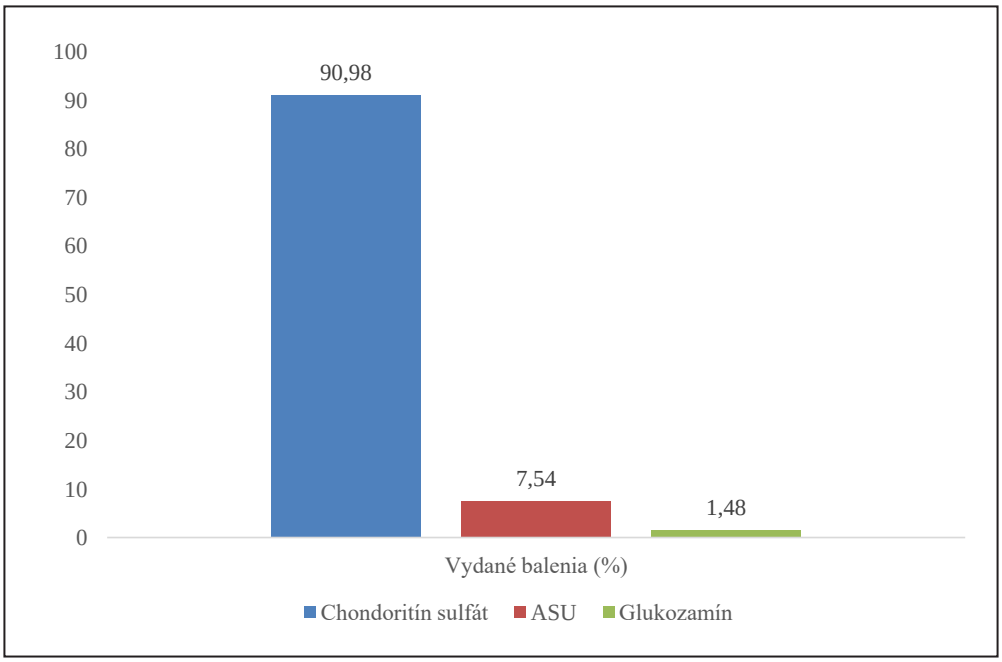
Druhou najčastejšie predpisovanou liekovou formou v terapii osteoartritídy v ambulancii ortopédov boli granuláty. Z uvedenej skupiny boli najviac expedované tie, ktoré obsahujú účinnú látku diklofenak. Samotný diklofenak bol za spomínané obdobie predpísaný pacientom v 58,86 % prípadov (299 balení). V uvedenej skupine bol najmenej predpisovaný dexketoprofén. Vydaných bolo iba 25 balení, čo predstavuje 4, 92 % (viď graf 2).

Z injekčnej formy bol pacientom najčastejšie predpisovaný meloxikam (viď tab. 5). Meloxicam patrí do skupiny neselektívnych nesteroidných antiflogistík, ktoré inhibujú rovnako enzým cyklooxygenázu COX-1 a COX-2, preferenčne však COX-2. Injekcie s obsahom tramadolu v kombinácii s paracetamolom boli predpisované len výnimočne.

Ako je uvedené v tabuľke 6, vo forme kvapiek boli v praxi terapeuticky používané iba dve liečivá s rýchlym nástupom účinku. V tabuľko-vom porovnaní bol zaznamenaný výrazný rozdiel v počte vydaných balení. Metamizol bol vydávaný 2-krát častejšie ako tramadol v kombinácii s paracetamolom.

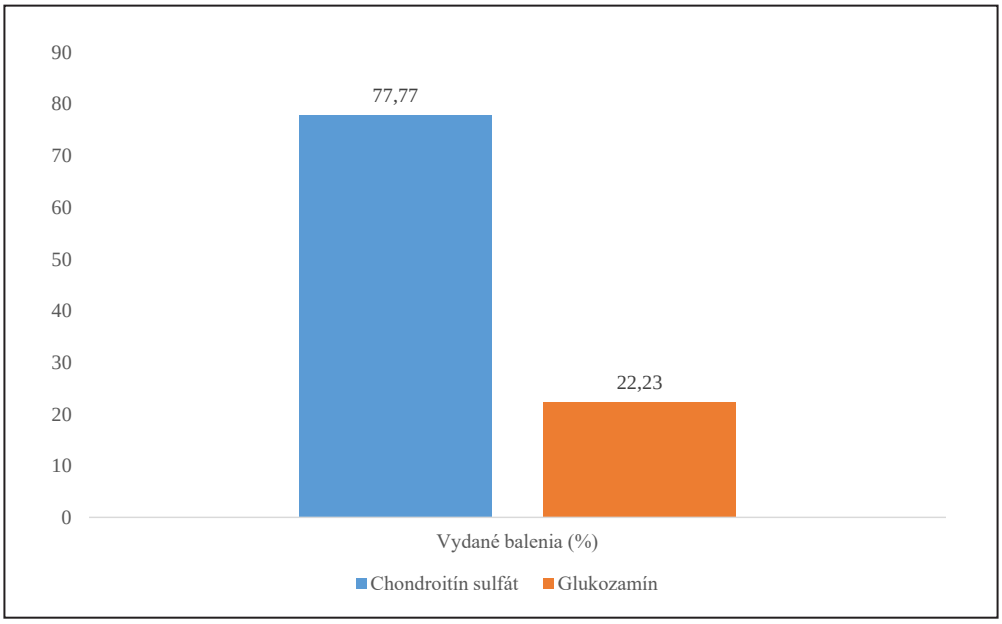
Vo forme granulátu boli na lekársky predpis vydané len dve liečivá. Granuláty s obsahom chondroitín sulfátu lekári predpisovali takmer 3-krát častejšie ako tie, ktoré obsahujú glukozamín (viď graf 4).

Graf 3: Prehľad liečiv vo forme tabliet zo skupiny SYSADOA



*ASU - avokádový a sójový nesaponifikovaný olej

Graf 4: Prehľad jednotlivých liečiv zo skupiny SYSADOA v aplikačnej forme granulát



DISKUSIA

Osteoartróza je degeneratívne kĺbové ochorenie, ktoré najčastejšie postihuje veľké kĺby. V poslednom desaťročí významne stúpa počet pacientov a zároveň klesá veková hranica novodiagnostikovaných pacientov. Osteoartróza je sprevádzaná zápalom, výraznou bolestivosťou, opuchom, nefunkčnosťou a deformáciou postihnutého kĺbu. Z terapeutického hľadiska je ideálna kombinácia liečiv s rýchlym nástupom účinku a liečiv s pomalým nástupom účinku (Češka a kol., 2015).

Gažová a Kyselovič (2014) uvádzajú, že pevné liekové formy užívané perorálne predstavujú najobľúbenejšiu liekovú formu nielen u pacientov, ale aj u zdravotníckych pracovníkov. Potvrdzuje to aj sledovaná analýza preskripcie, kde tuhá lieková forma zahŕňala až 76,58 % zo všetkých predpísaných liečiv s rýchlym nástupom účinku.

Nesteroidné antiflogistiká (NSAID) sa vyznačujú analgetickým, protizápalovým a antipyretickým účinkom. Majú rôznu chemickú štruktúru, podobné farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti, podobný mechanizmus účinku a liečebný účinok. Pri osteoartritíde sú indikované ako lieky druhej voľby, v prípade, že analgetiká nie sú dostatočne účinné (Švihovec a kol., 2015; Vina a kol., 2018). Predpokladá sa, že predlžovanie ľudského veku a s ním spojené starnutie populácie spôsobí, že frekvencia ich preskripcie bude narastať (Lukáč a kol., 2005). Podľa odporúčaní Štátneho ústavu pre kontrolu liečiv (ŠÚKL, 2020) a Európskej liekovej agentúry (EMA, 2020) je nevyhnutné NSAID užívať v čo najmenšej dávke a po dobu čo najkratšiu potrebnú na dosiahnutie ústupu ťažkostí. Medzi dlhodobo známe nežiaduce účinky (NÚ) chronického užívania NSAID patrí edém, hypertenzia a retencia tekutín. Dlhotrvajúce užívanie NSAID zvyšuje riziko vzniku chronického zlyhania srdca až 10-násobne (Howard, 2002). Odborníci odporúčajú užívanie NSAID spolu s gastroprotektívnymi liečivami (misoprostol, H2 antagonisty inhibítory protónovej pumpy). Táto kombinácia je nevyhnutná najmä u pacientov s ochoreniami gastrointestinálneho systému alebo u pacientov s predispozíciou k tvorbe žalúdočných a duodenálnych vredov. Vhodnosť a účinnosť danej kombinácie potvrdzujú aj analyzované preskripčné záznamy. Zo skupiny analgetík bola najviac

predpisovaná kombinácia diklofenaku a misoprostolu (682 balení), čo predstavuje 24,48 % z celkového počtu vydaných liekov. Samotný diklofenak v tabletovej forme užívalo za spomínané obdobie iba 96 pacientov (3,45 %).

Ďalšou cestou prevencie NÚ gastrointestinálneho systému je užívanie preferenčných COX-2 inhibítorov. Tieto liečivá pri nízkych dávkach vplývajú len na COX-2 aktivitu (Švihovec a kol., 2018). Nimesulid bol vo forme tabliet predpísaný v 141 prípadoch (5,11 %) a ako granulát 89-krát (17,52 %). Meloxikam bol najviac využívaným liečivom v injekčnej forme. Expedovaných bolo 153 balení, čo predstavuje 69,56 % z celkového počtu všetkých pacientov. Vo forme tabliet meloxikam užívalo 100 pacientov (3,58 %) vo verejnej lekárni vo Vranove nad Topľou.

Tramadol je indikovaný pacientom, ktorým je terapia NSAID alebo COX-2 inhibítormi nepostačujúca alebo kontraindikovaná. Nie je orgánovo toxický. Nezvyšuje výskyt gastrointestinálnych ťažkostí ani kardiovaskulárnych príhod. Vo všeobecnosti je tramadol kontraidikovaný u pacientov užívajúcich lieky tlmiace CNS (Subedi a kol., 2019). V kombinácii s NSAID je zvýšený jeho analgetický efekt. Napriek NÚ ako sú obstipácia, nauzea, retencia moču alebo útlm dychového centra, boli tablety s obsahom tramadolu a paracetamolu druhým najčastejšie predpisovaným liekom zo skupiny analgetík (22,8 %); čo celkovo predstavovalo 635 balení.

Súhrn charakteristických vlastností lieku (SPC) udáva ako hlavnú terapeutickú indikáciu chondroitín sulfátu koxartrózu, gonartrózu a artrózu prstových kĺbov. U väčšiny pacientov liečených chondroitín sulfátom výsledky klinických štúdií preukázali pokles alebo aj úplný ústup bolestí, zníženie spotreby analgetík a zlepšenie pohyblivosti kĺbov (ŠÚKL, 2020). Morreale a kol. (1998) posudzovali klinickú účinnosť chondroitín sulfátu (CS) v porovnaní s NSAID v klinickej štúdii trvajúcej 6 mesiacov u pacientov s gonartrózou. Pacienti liečení NSAID preukázali rýchle zníženie klinických symptómov, ktoré sa však znovu pomerne rýchlo objavili po ukončení liečby. V skupine užívajúcich CS sa terapeutická odpoveď objavila časovo neskôr, ale trvala až 3 mesiace po ukončení liečby. Z tejto randomizovanej, dvojito-zaslepenej štúdie je zrejmé, že CS má pomalú, ale postupne sa zvyšujúcu klinickú aktivitu v terapii osteoartrózy. Terapeutický účinok pretrváva dlhší čas po ukončení liečby. Zo skupiny liečiv s pomalým nástupom účinku bol za referenčné obdobie v uvedenej lekárni najčastejšie predpisovaný chondroitín sulfát. Bolo vydaných 615 balení tabliet (90,98 %) a 21 balení granulátu (77,77 %). Nakoľko chondroitín sulfát pôsobí ako liek s pomalým nástupom účinku, je nevyhnutné pri súčasnej terapii inými analgetikami pravidelne prehodnocovať ich dávkovanie. Zvyčajne sa užíva v dennej dávke 800 mg v trojmesačných kúrach, po ktorých nasleduje trojmesačná prestávka, z dôvodu nielen analgetického, ale aj štruktúru modifikujúceho účinku (Lukáčová, 2015).

Podľa SPC je glukozamín určený na zmiernenie príznakov miernej až stredne ťažkej gonartrózy. Nie je vhodný na akútnu liečbu bolestivých stavov. Zmiernenie symptómov (najmä zníženie bolesti) sa môže prejaviť až po niekoľkých týždňoch liečby a v niektorých prípadoch aj neskôr. Štúdia farmakologickej epidemiológie gonartrózy (PEGAS) zaznamenáva účinky glukozamínu na používanie NSAID. Zo 6451 zúčastnených pacientov užívalo 315 pacientov počas 2 mesiacov kryštalický glukozamín. Jeho užívanie znížilo riziko užívania NSAID až o 36 %. Žiadny z ďalších testovaných SYSADOA nepreukázal pokles užívania NSAID (Rovati a kol., 2016).

Clegg a kol. (2006) skúmali účinok glukozamínu, chondroitín sulfátu a ich kombinácie v terapii osteoartrózy. Priemerný vek testovaných pacientov bol 59 rokov, z toho 64 % tvorili ženy. Miera odozvy na glukozamín bola o 3,9 % vyššia a na chondroitín sulfát o 5,3 % vyššia v porovnaní s placebom. Na kombinovanú liečbu bola miera odpovede o 6,5 % vyššia oproti placebu. Miera odozvy v kontrolnej skupine užívajúcej celekoxib bola o vyššia 10,0 % v porovnaní so skupinou užívajúcou placebo. U pacientov so stredne ťažkou až závažnou bolesťou

na začiatku bola miera odpovede výrazne vyššia pri kombinovanej terapii oproti placebu (79,2 % oproti 54,3 %; P = 0,002). Nežiaduce účinky boli mierne, zriedkavé a rovnomerne rozdelené medzi jednotlivé testované skupiny. V SPC je uvedené, že zmiernenie symptómov (najmä zníženie bolesti) sa môže prejaviť až po niekoľkých týždňoch liečby a v niektorých prípadoch aj neskôr. Pravdepodobne nutnosť dlhodobejšieho užívania glukozamínu vedie k nízkej frekvencii jeho predpisovania. V nami hodnotenej skupine bolo predpísaných len 10 balení tabliet a 6 balení granulátu. Ak sa ani po 2 – 3 mesiacoch užívania neobjaví zmiernenie symptómov, je potrebné prehodnotiť pokračovanie liečby glukozamínom (Lukáčová, 2015).

ZÁVER

Predložená štúdia sa zaoberá analýzou aktuálnych trendov terapie osteoartrózy v ortopedickej ambulancii. Najčastejšie predpisovanými liekmi s rýchlym nástupom účinku v liečbe osteoartrózy boli tablety s obsahom diklofenaku v kombinácii s misoprostolom. Najčastejšie predpisovanými liekmi s pomaly nastupujúcim účinkom boli tablety s obsahom chondroitín sulfátu. Pacientom, ktorým je znemožnené užívanie dostupných foriem chondroprotektív, sa odporúčajú ako podporná terapia osteoartrózy plody *Rosa canina* L. kvôli vysokému obsahu vitamínu C, extrakt z kôry kadidlovníka pílovitého (*Boswellia serrata* ROXB.), či extrakt z podzemku kurkumy pravej (*Curcuma longa* L.).

ZOZNAM LITERATÚRY

Clegg, D., Reda, D. J., Hariss, C. L., Klein, M. A., O'Dell., J. R., Hopper, M. M., Bradley, J., Bingham, C. O., Weisman, M. H., Jackson, Ch. G., Lane, N. E., Cush, J. J., Moreland, L. W., Schumacher, H. R., Oddis, Ch. V., Wolfe, F., Molitor, J. A., Jocum, D., Schnitzer, T. J., Furst, D., Sawitzke, A. D., Shi, H., Brandt, K. D., Moskowitz, R. V., Williams, H. J.: Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *New England Journal of Medicine*, 2006, 354 (8), 795 – 808.

Cohen, M.: Rosehip: An evidence based herbal medicine for inflammation and arthritis. *Austr. Fam. Physician*, 2012, 41, 495 – 498.

Češka, R., Štulc, T., Tesař, V., Lukáš, M.: I*nterna, svazek 3, 2. aktualizované vydání* [Internal Medicine, volume 3, 2nd updated edition]. Praha: Triton, 2015. 668 – 670.

EMA - Európska Lieková Agentúra [EMA – European Medicines Agency], 2020. https://www.ema.europa.eu/en. [cit. 2020-01-12].

Gažová, A., Kyselovič, J.: Pevné liekové formy a urýchlenie rozpustnosti [Solid dosage forms and the solubility]. *Praktické lekárn.*, 2014, 4 (4), 108 – 109.

Hawker, G. A.: Osteoarthritis is a serious disease. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2019, 37 (5), 3 – 6.

Howard, P. A.: The impactof NSAIDs on the risk of coronary heart disease. *Hosp. Pharm.*, 2002, 37 (9), 919 – 926.

Christensen, R., Bartels, E. M., Altman, R. D., Astrup, A., Bliddal, H.: Does the hip powder of *Rosa canina* (rosehip) reduce pain in osteoarthritis patients? – a meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2008, 16 (9), 965 – 972.

International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10 Version: 2016). http://apps.who.int/classi_cations/icd10/browse/2016/en. Accessed October 27, 2016.

Kellgren, J. H., Lawrence, J. S.: Radiological assesment of osteoarthreitis. *Ann. Rheum. Dis.*, 1957, 16 (4), 494 – 501.

Lukáč, J., Rovenský, J., Lukáčová, O.: Koxiby v reumatológii [Coxibs in rheumatology]. *Via Practica*, 2005, 2 (2), 76 – 82.

Lukáčová, O., Lukáč, J.: Liečba osteoartrózy [Therapy of osteoarthritis]. *Via Practica*, 2015, 12 (3), 114 – 121.

Mohan, H: *Patológia* [Pathology]. Bratislava:

Balneotherma, 2011. ISBN: 9788097015664.

Morreale, P., Manopulo, R., Galati, M., Bacanera, L., Saponati, G., Bocchi, L.: Comparison of the antiinflammatory efficacy of chondroitin sulfate and diclofenac sodium in patients with knee osteoarthritis. *Journal of Rheumatology*, 1996, 23 (8), 1385 – 1391.

Permuy, M., Guede, D., López-Peña, M., Muñoz, F., Caeiro, J. R., González-Cantalapiedra, A.: Comparison of various SYSADOA for the osteoarthritis treatment: an experimental study in rabbits. *BMC musculoskeletal disorders*, 2015, 16, 1 – 12.

Rovati, L. C., Girolami, F., D'Amato, M., Giacovelli, G.: Effects of glucosamine sulfate on the use of rescue non-steroidal anti-inflammatory drugs in knee osteoarthritis: results from the Pharmaco-Epidemiology of GonArthroSis (PEGASus) study. *Seminars in arthritis and rheumatism*. WB Saunders, 2016, 45 (4), S34 – 41.

Subedi, M., Bajaj, S., Kumar, M. S., Mayur, Y. C.: An overview of tramadol and its usage in pain management and future perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 111, 443 – 451.

ŠÚKL – Štátny ústav pre kontrolu liečiv [SIDC – State Institute for Drug Control], 2020. https://www.sukl.sk/. [cit. 2020-01-13].

Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., Votava, M.: *Farmakologie* [Pharmacology]. Praha: Grada Publishing, a. s., 2018, 701 – 756.

Vina, E. R., Kwoh, C. K.: Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Current opinion in rheumatology*, 2018, 30 (2), 160.

Warholm, O., Skaar, S., Hedman, E., Mølmen, H. M., Eik, L.: The effects of a standardized herbal remedy made from a subtype of *Rosa canina* in patients with osteoarthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Current therapeutic research*, 2003, 64 (1), 21 – 31.

WHO: Svetová zdravotnícka organizácia [World Health Organization], 2020. https://www.who.int/. [cit. 2019-12-12].

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 1: 70 – 81, 2021

ANALÝZA PRESKRIPCIE LIEKOV U PACIENTOV S ISCHEMICKOU CHOROBOU SRDCA

ANALYSIS OF THE DRUG PRESCRIPTION IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

Huľová, Monika; Kolesárová, Mária

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

maria.kolesarova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Ischemická choroba srdca (ICHS) je najčastejšou formou kardiovaskulárnych ochorení, ktoré sú najčastejšou príčinou morbidity a mortality vo vyspelom svete. Cieľom štúdie bolo na základe vzorky preskripčných záznamov (PZ) za rok 2018 z 2 rôzne lokalizovaných verejných lekární (L1 a L2) v Košiciach analyzovať a vyhodnotiť charakteristiku pacientov a preskripciu liečiv v diagnóze I20 – I25 ICHS podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb 10 (MKCH10), zároveň tiež vyhodnotiť mieru rizika zamestnania a stresu na vznik a rozvoj ICHS u pracujúcich pacientov a dodržanie postupov farmakoterapie ICHS s postupmi Slovenskej a Európskej kardiologickej spoločnosti. Do analýzy bolo celkovo zaradených 418 pacientov (328 L1, 90 L2); u ktorých boli vyhodnocované vek, pohlavie, diagnóza a preskripcia liečiv. Počet PZ s diagnózou I20 – I25 ICHS predstavoval za rok 2018 v obidvoch lekárňach v priemere 2 % z celkového počtu PZ. ICHS sa najčastejšie vyskytovala u mužov (70,12 % L1 a 74,44 % L2). Najväčšiu skupinu pacientov s ICHS tvorili muži vo veku 60 – 69 rokov v L1 (29,88 %) a muži vo veku 70 – 79 rokov v L2 (23,33 %). Najčastejšie sa vyskytujúcou diagnózou v obidvoch lekárňach bola I25.9 Chronická ischemická choroba srdca, bližšie neurčená. Medzi najčastejšie komorbidity u pacientov s ICHS v obidvoch lekárňach patrili arteriálna hypertenzia, hyperlipidémia a v L1 lekárni aj *diabetes mellitus* 2. typu. Na základe analyzovaných výsledkov týkajúcich sa hlavne

charakteristiky pacientov z obidvoch lekární môžeme predpokladať možný vplyv zamestnania a stresu na vznik a rozvoj ICHS u pracujúcich pacientov. Z celkového pohľadu sa preskripcia liečiv z jednotlivých farmakoterapeutických skupín v terapii ICHS veľmi nelíšila, jej variabilita súvisela s výskytom rôznych diagnóz v rámci ICHS. V terapii boli najčastejšie indikované antiagreganciá (kyselina acetylsalicylová), betablokátory (bisoprolol, metoprolol), nitráty (molsidomín) a hypolipidemiká (atorvastatín). V terapii ICHS bola u pacientov najčastejšie indikovaná kombinovaná terapia, hlavne dvojkombinácia, a to prevažne antitrombotikum a betablokátor (L1), a antitrombotikum a nitrát (L2) alebo antitrombotikum a hypolipidemikum (L2). Na základe analýzy PZ u pacientov s ICHS je možné potvrdiť dodržanie postupov farmakoterapie ICHS v klinickej praxi s postupmi Slovenskej a Európskej kardiologickej spoločnosti.

Kľúčové slová: analýza preskripcie liekov; ischemická choroba srdca; farmakoterapia

ABSTRACT

Ischemic heart disease (IHD) is the most common form of cardiovascular disease, which is the main cause of morbidity and mortality in the developed world. The aim of the study was to analyze and evaluate patient characteristics and prescription of drugs in diagnosis I20 – I25 IHD according to the International Classification of Diseases 10 (ICD10); based on a sample of prescription records (PR) for the year 2018 from 2 differently located public pharmacies (L1 and L2) in Košice; at the same time, to evaluate the degree of risk of employment and stress on the origin and development of IHD in working patients and compliance with the procedures of pharmacotherapy of ischemic heart disease with the procedures of the Slovak and European Society of Cardiology. A total of 418 patients (328 L1, 90 L2) were included in the analysis, whose age, sex, diagnosis and prescription of drugs were evaluated. The number of PR with a diagnosis of I20 – I25 IHD in 2018 in both pharmacies averaged 2 % of the total number of prescription records. IHD was most common in men (70.12 % L1 and 74.44 % L2). The largest group of patients with IHD consisted of men aged 60 – 69 years in L1 (29.88 %) and men aged 70 – 79 in L2 (23.33 %). The most common diagnosis in both pharmacies was I25.9 Chronic ischemic heart disease, unspecified. The most common comorbidities in patients with IHD in both pharmacies were arterial hypertension, hyperlipidemia and in L1 pharmacy also type 2 *diabetes mellitus*. Based on the analyzed results, mainly concerning the characteristics of the patients from both pharmacies, we can assume the possible impact of employment and stress on the onset and development of IHD in working patients. From the overall point of view, the prescription of drugs from individual pharmacotherapeutic groups in the treatment of IHD did not differ much, its variability was related to the occurrence of different diagnoses within IHD. The most commonly indicated in the therapy were antiplatelet agents (acetylsalicylic acid), beta-blockers (bisoprolol, metoprolol), nitrates (molsidomine) and hypolipidemics (atorvastatin). In the treatment of IHD, the most frequently indicated in patients was combination therapy, mainly two-combination, especially combination of an antithrombotic and a beta-blocker (L1), and antithrombotic and nitrate (L2) or antithrombotic and hypolipidemic (L2). Based on the analysis of prescription evidence in patients with IHD, it is possible to confirm compliance with the procedures of pharmacotherapy of IHD in clinical practice with the procedures of the Slovak and European Society of Cardiology.

Key words: drug prescription analysis; ischemic heart disease; pharmacotherapy

ÚVOD

Kardiovaskulárne (KVS) ochorenia svojim častým výskytom a závažnosťou orgánových postihnutí sú v súčasnosti najčastejšou príčinou mortality a morbidity vo vyspelom svete, pričom ischemická choroba srdca (ICHS) je ich najčastejšou formou. ICHS je zodpovedná za viac ako polovicu celej KVS mortality, celosvetovo na ňu zomiera 15 miliónov ľudí ročne, pričom v Európe sú to približne 4 milióny. Na Slovensku sa KVS ochorenia podieľajú na celkovej mortalite 53 % a sú jednou z hlavných príčin kratšej strednej dĺžky života u nás. Podľa štatistických údajov Národného centra zdravotníckych informácií (NCZI) počet pacientov s diagnostikovanou ICHS vzrástol od roku 2009 do roku 2018 dynamicky o 34 %. V roku 2018 bolo predpísaných 10,97 mil. balení liekov indikovaných u pacientov s ICHS (NCZI, 2018). Ako príčina smrti dominujú ochorenia srdca najmä v skupine 45 až 64-ročných mužov (Vargová a kol., 2016). Prevalencia ICHS je vyššia u mužov ako u žien, mortalita je päťnásobne vyššia u mužov, pričom u žien sa ICHS objavuje v priemere o 10 rokov neskôr ako u mužov, riziko však stúpa u žien po menopauze (Smaardijk a kol., 2019).

Ischemická choroba srdca (gr. isch – držať, zadržiavať; haima – krv) je akútna alebo chronická porucha činnosti srdca, ktorá vzniká pri nedostatočnom prietoku krvi myokardom (znížením alebo úplným zastavením dodávky kyslíka a živín do srdcového svalu) poškodením koronárnych tepien – zvyčajne koronárnou aterosklerózou, zriedkavejšie ide o spazmy tepien, embolizáciu atď. Výsledkom je poškodenie srdcového svalu, ktoré je v najťažších prípadoch spojené s jeho nekrózou – infarktom myokardu (IM) (Hrdina a kol., 2009). Hlavnými rizikovými faktormi vzniku ICHS sú vysoká hladina cholesterolu, vysoký krvný tlak a fajčenie. V rámci základnej klasifikácie rozoznávame akútne a chronické formy tejto choroby – obidve formy sa líšia svojím priebehom, závažnosťou, diagnostikou, liečbou a prognózou.

Cieľom liečby ICHS je zlepšiť životnú prognózu a znížiť mortalitu chorých, minimalizovať alebo odstrániť príznaky ochorenia. Liečebné opatrenia sa v súčasnosti zameriavajú na zastavenie/regresiu aterosklerotických zmien, farmakologické zníženie frekvencie a intenzity intermitentných ischémií myokardu, prevenciu trombotických komplikácií, prevenciu a liečbu malígnych arytmií, revaskularizáciu myokardu, ktorá obmedzuje vznik ischémie a nebezpečenstvo vzniku IM, prevenciu zlyhania srdca (Hrdina a kol., 2009; Hradec a Býma, 2013).

Cieľom štúdie bolo na základe vzorky preskripčných záznamov (PZ) za rok 2018 z 2 rôzne lokalizovaných verejných lekární (L1 a L2) v Košiciach analyzovať a vyhodnotiť charakteristiku pacientov a preskripciu liečiv v diagnóze I20 – I25 ICHS podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb 10 (MKCH10) (ICD – 10 Version: 2016), zároveň tiež vyhodnotiť mieru rizika zamestnania a stresu na vznik a rozvoj ICHS u pracujúcich pacientov a dodržanie postupov farmakoterapie ICHS s postupmi Slovenskej a Európskej kardiologickej spoločnosti.

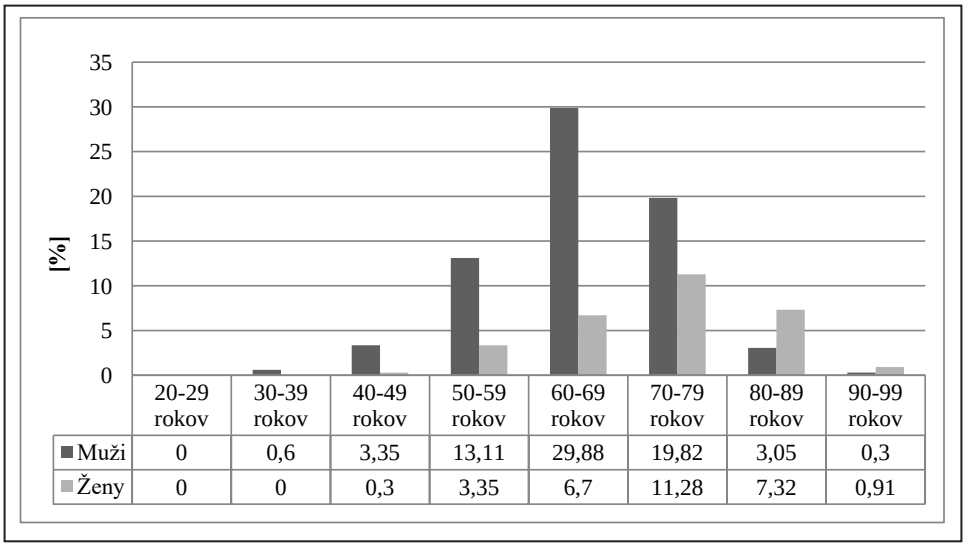
MATERIÁL A METÓDY

Výsledky štúdie vychádzali z údajov preskripčných záznamov (PZ) liečiv u pacientov, ktorí mali zaznamenanú diagnózu I20 – I25 Ischemickú chorobu srdca podľa MKCH10 (ICD – 10 Version: 2016). Preskripcia liečiv pre ICHS bola sledovaná za obdobie od 1.1.2018 do 31.12.2018 v dvoch rôzne lokalizovaných verejných lekárňach v Košiciach, a to:

1. Lekáreň (L1) na poliklinike vo Vstupnom areáli U. S. Steel Košice
2. Lekáreň (L2) v centre mesta Košice.

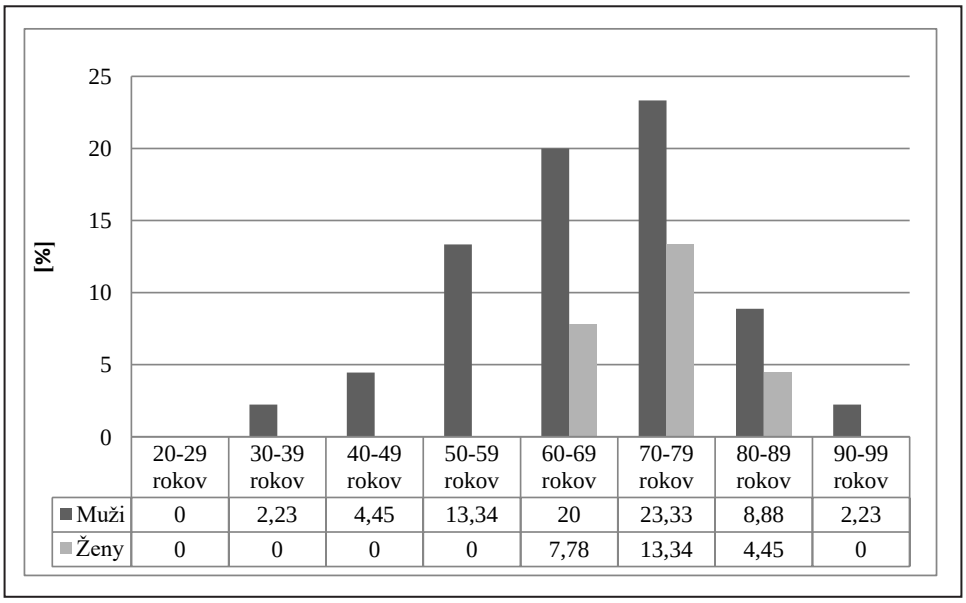
Analýza dát bola vypracovaná prostredníctvom súboru údajov z lekárenského informačného systému NRSys a vyhodnotená do grafov v programe Microsoft Excel.

Graf 1: Rozdelenie pacientov podľa veku a pohlavia v lekárni L1



	20-29 rokov	30-39 rokov	40-49 rokov	50-59 rokov	60-69 rokov	70-79 rokov	80-89 rokov	90-99 rokov
Muži	0	0,6	3,35	13,11	29,88	19,82	3,05	0,3
Ženy	0	0	0,3	3,35	6,7	11,28	7,32	0,91

Graf 2: Rozdelenie pacientov podľa veku a pohlavia v lekárni L2



	20-29 rokov	30-39 rokov	40-49 rokov	50-59 rokov	60-69 rokov	70-79 rokov	80-89 rokov	90-99 rokov
Muži	0	2,23	4,45	13,34	20	23,33	8,88	2,23
Ženy	0	0	0	0	7,78	13,34	4,45	0

VÝSLEDKY

Preskripčné záznamy

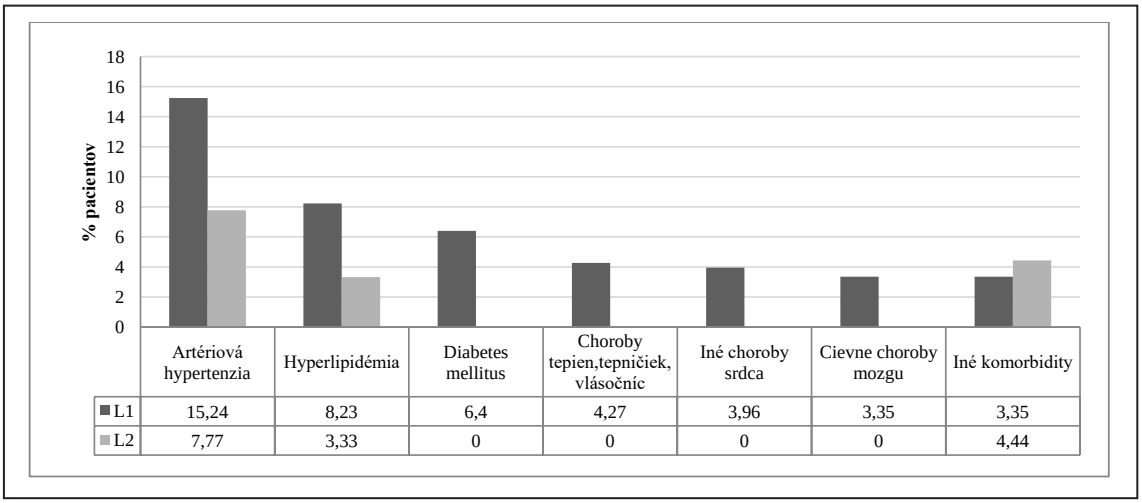
V roku 2018 bolo v lekárni L1 celkovo zaznamenaných 85 470 PZ, pričom počet PZ s diagnózou I20 – I25 ICHS bol 1 499, čo predstavuje 1,75 % z celkového počtu PZ.

V druhej lekárni L2 bolo v priebehu roka 2018 evidovaných 12 796 PZ, kde bolo zaznamenaných 300 PZ s diagnózami I20 – I25 ICHS, čo predstavuje 2,3 % z celkového počtu PZ.

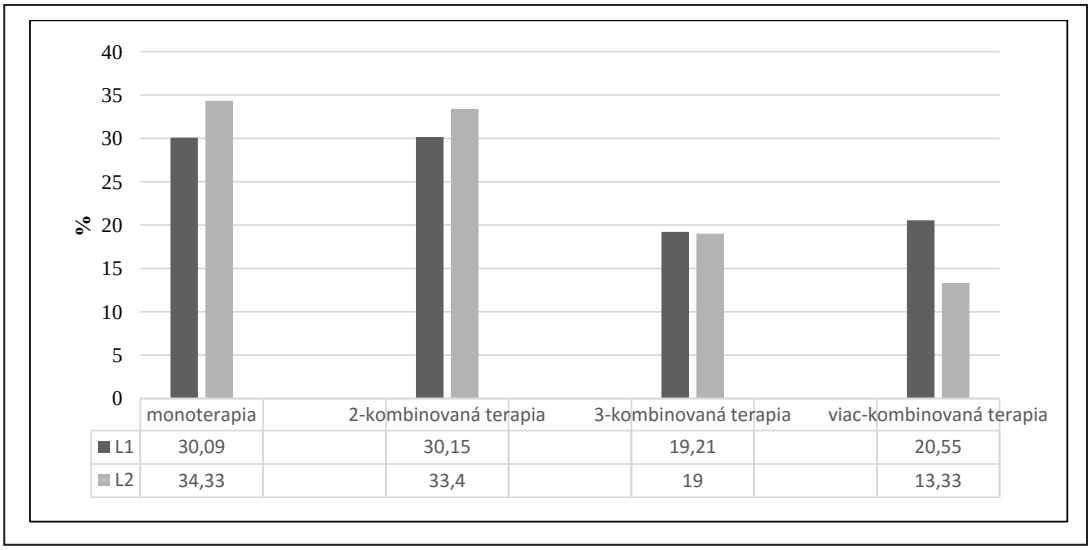
Charakteristika pacientov

Do analýzy bolo celkovo zaradených **418** pacientov s diagnózou I20 – I25 ICHS, pričom **328** pacientov bolo evidovaných v lekárni L1 a **90** pacientov v lekárni L2.

Graf 3: Evidované komorbidity u pacientov s ICHS



Graf 4: Percentuálne zastúpenie monoterapie vs. kombinovanej terapie u pacientov s ICHS

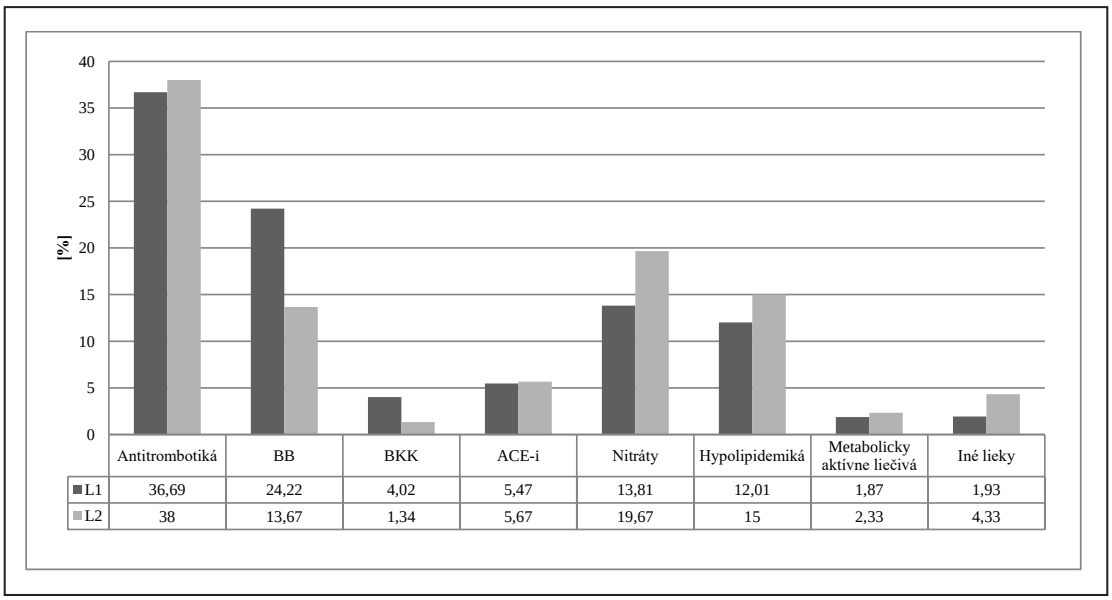


Vek a pohlavie pacientov

V lekárni **L1** tvorili najväčšiu skupinu muži vo veku 60 – 69 rokov (29,88 %); po nich nasledovala skupina mužov vo veku 70 – 79 rokov (19,82 %) (viď graf 1). V prípade mužských pacientov je ICHS zaznamenaná už vo vekovej kategórii 30 – 39 rokov (0,6 %); ktorá má stúpajúci charakter s pribúdajúcim vekom. Najstaršou zo skupiny analyzovaných pacientov bola 93 ročná žena, najmladším bol 35 ročný muž.

V lekárni **L2** tvorili z celkového počtu sledovaných pacientov muži (74,44 %) a ženy (25,56 %). Najpočetnejšiu skupinu tvorili muži vo veku 70 – 79 rokov (23,33 %). Podobne aj v lekárni L2 bol zaznamenaný výskyt mužských pacientov s ICHS už vo veku 30 – 39 rokov (2,23 %); ktorý mal rastúci charakter s pribúdajúcim vekom (viď graf 2). Najstarším pacientom bol muž vo veku 92 rokov, najmladším bol muž vo veku 37 rokov.

Graf 5: Percentuálne zastúpenie jednotlivých farmakoterapeutických skupín liečiv v preskripčných záznamoch lekární L1 a L2



	Antitrombotiká	BB	BKK	ACE-i	Nitráty	Hypolipidemiká	Metabolicky aktívne liečivá	Iné lieky
L1	36,69	24,22	4,02	5,47	13,81	12,01	1,87	1,93
L2	38	13,67	1,34	5,67	19,67	15	2,33	4,33

Legenda: BB – betablokátory, BKK – blokátory kalciových kanálov, ACE-i – inhibítory aniotenzín-konvertujúceho enzýmu

Diagnózy Ischemickej choroby srdca u pacientov

Najvyššiu početnosť v obidvoch lekárňach dosiahla diagnóza **I25.9 Chronická ischemická choroba srdca, bližšie neurčená**. Z celkového počtu PZ v lekárni **L1** tvorili najväčšiu časť PZ s diagnózou: **I25.9 Chronická ischemická choroba srdca, bližšie neurčená** (59,04 % PZ); **I25.19 Aterosklerotická choroba srdca, bližšie neurčená** (22,15 % PZ) a **I25.0 Aterosklerotická srdcovocievna choroba, takto označená** (11,67 % PZ).

Vyššia variabilita diagnóz bola zaznamenaná v lekárni **L2**. Najvyššiu početnosť v lekárni **L2** dosiahli diagnózy: **I25.9 Chronická ischemická choroba srdca, bližšie neurčená** (36,33 % PZ); **I21.0 Akútny transmurálny infarkt myokardu prednej steny** (13,33 % PZ) a **I25.0 Aterosklerotická srdcovocievna choroba, takto označená** (15 % PZ).

Komorbidity u pacientov s Ischemickou chorobou srdca

Komorbidity boli evidované u 44,82 % (147) pacientov v lekárni L1, zatiaľ čo u 55,18 % (181) pacientov L1 sa pridružené ochorenia nevyskytovali. Najčastejšie evidované diagnózy boli artériová hypertenzia (15,24 %); hyperlipidémia (8,23 %) a *diabetes mellitus* 2. typu (6,4 %) (viď graf 3). 4,27 % predstavovali u pacientov Choroby tepien, tepničiek, vlásočníc. Taktiež boli u pacientov zaznamenané aj Iné choroby srdca (3,96 %) a Cievne choroby mozgu (3,35 %). Z iných komorbidít sa najčastejšie vyskytovala hyperurikémia u 2 % pacientov. V lekárni L2 boli pridružené ochorenia zaznamenané u 15,54 % pacientov, v najväčšom rozsahu sa u pacientov vyskytovali diagnózy artériová hypertenzia (7,77 %) a hyperlipidémia (3,33 %) (viď graf 3).

Farmakoterapia Ischemickej choroby srdca

Z celkového pohľadu sa u pacientov s ICHS vyskytovala hlavne **kombinovaná liečba**, ktorá bola zaznamenaná v L1 lekárni u 69,91 % pacientov a v L2 lekárni u 65,73 % pacientov. Monoterapia bola zaznamenaná na úrovni v priemere u cca 30 % pacientov v obidvoch lekárňach (30,09 % L1 a 34,33 % L2) (viď graf 4). V rámci kombinovanej liečby bola u pacientov najviac zastúpená

2-kombinovaná liečba (30,15 % L1 a 33,4 % L2); hlavne kombinácia antitrombotika s betablokátorom (BB) (L1) a kombinácia antitrombotika s nitrátom alebo antitrombotika s hypolipidemikom (L2). Trojkombinovaná terapia sa vyskytla na úrovni v priemere 19 % (19,21 % L1 a 19 % L2). Viackombinovaná terapia ICHS sa vyskytla na úrovni 20,55 % v L1 a 13,33 % v L2 lekárni.

Z farmakoterapeutických skupín boli najčastejšie predpisované **antitrombotiká** (36,69 % L1; 38 % L2) (viď graf 5). Z antitrombotík boli najčastejšie u pacientov predpisované antiagreganciá (30,88 % v L1 a 31,67 % v L2) v porovnaní s antikoagulanciami (5,8 % v L1 a 6,33 % v L2). Z antiagregancií bola najviac indikovaná kyselina acetylsalicylová (ASA) (20,88 % PZ v L1 a 26,67 % v L2).

Na druhom mieste boli najčastejšie predpisované **BB**, kde v lekárni L1 bola zaznamenaná značne vyššia frekvencia preskripcie BB (24,22 %) oproti lekárni L2 (13,67 %). V lekárni **L1** bol najviac predpisovaný metoprolol (11,34 %); za ním nasledoval bisoprolol (10,41 %); karvedilol (2,07 %) a nebivolol (0,4 % PZ). V **L2** bol na prvom mieste expedovaný bisoprolol (10,3 %); tak metoprolol (2,3 %) a karvedilol (0,67 %); nebivolol (0,33 %).

Ďalšími často predpisovanými liečivami boli **nitráty** (v 13,81 % L1; 19,67 % L2). V obidvoch lekárňach bol z nitrátov najčastejšie predpisovaný molsidomín (6,14 %) v L1 a 9 %. Nasledovala preskripcia izosorbidmononitrátu (5,94 %, L1 a 6,67 % L2). Nitroglycerín bol predpisovaný v 1,6 % v L1 a 3,33 % v L2 lekárni.

Hypolipidemiká tvorili 12,01 % PZ L1 a 15 % PZ v L2 lekárni. V obidvoch lekárňach bol z tejto skupiny najčastejšie predpisovaný atorvastatín (11,8 % L1 a 14 %, L2).

ACE-inhibítory tvorili 5,47 % všetkých PZ v L1 a 5,67 % PZ v L2. V L1 bol najčastejšie predpisovaným liečivom tejto skupiny ramipril (3 %), tak perindopril (2 %) a trandolapril (0,47 %). Oproti tomu, v lekárni L2 bol z tejto skupiny najviac expedovaný trandolapril (4 %), ďalej perindopril (1 %) a ramipril (0,67 %).

Blokátory kalciových kanálov (BKK) boli zaznamenané v 4 % PZ v L1 a v 1,34 % PZ v L2, pričom najviac preskribovaným liečivom bol amlodipín v dávke 5 mg v obidvoch lekárňach (3 % v L1 a 1,34 % v L2) .

Ďalšími predpisovanými liečivami u pacientov boli **metabolicky aktívne látky, a to trimetazidín** (1,87 % L1; 2,33 % L2).

Liečivá **z iných farmakoterapeutických skupín** tvorili v L1 lekárni 1,93 % PZ a v L2 lekárni 4,33 % PZ, a to hlavne furosemid a eplerenón, inhibítory protónovej pumpy pantoprazol a alopurinol.

DISKUSIA

Celkovo bolo v lekárni L1 evidovaných 1 499 preskripčných záznamov (1,75 % z celkového počtu PZ v L1) s diagnózou I20 – I25 ICHS za rok 2018, kým v lekárni L2 bolo evidovaných 300 PZ s týmito diagnózami (2,3 % z celkového počtu PZ v L2). Vysoký počet PZ s diagnózou ICHS v L1 súvisí s lokalizáciou lekárne na poliklinike s 10 ambulanciami všeobecných lekárov pre dospelých a poskytovaním preventívnych lekárskych prehliadok pre spoločnosť U. S. Steel Košice, s.r.o. Podľa ATC skupiny boli na Slovensku v roku 2018, ako aj v predošlých rokoch, najviac predpisované lieky na KVS systém (26,8 mil. balení). Podľa štatistických údajov NCZI počet pacientov s diagnostikovanou ICHS vzrástol od roku 2009 do roku 2018 dynamicky o 34 %. V roku 2018 bolo na Slovensku predpísaných 10,97 mil. balení liekov indikovaných u pacientov s ICHS podľa MKCH-10 (I20 – I25.9), čo predstavuje 40,93 % balení liekov z liekov predpísaných na KVS systém. Počet pacientov liečených na ICHS v roku 2018 vystúpil na 1,7 milióna (NCZI, 2018).

Z celkového počtu pacientov s ICHS bol zaznamenaný vyšší počet mužských pacientov (70,12 % L1; 74,44 % L2) než žien (19,88 % L1 a 25,56 % L2) v obidvoch lekárňach. V analyzovanej skupine pacientov s diagnostikovanou ICHS prevažovali muži vo veku 60 – 69 rokov (29,88 %) v lekárni L1, kým v lekárni L2 bolo v tejto vekovej

kategórii zaznamenaných 20 % mužských pacientov. Získané výsledky z PZ ukazujú, že diagnózy ICHS postihujú čoraz nižšie vekové skupiny a majú rastúci charakter s vekom, kde v priemere v obidvoch lekárňach bolo vo vekovej kategórii 40 – 49 rokov cca 4 % pacientov, kým u 50 – 59 ročných bol výskyt ICHS na úrovni v priemere cca 13 %. Podobne rastúci charakter výskytu ICHS s vekom bol zaznamenaný aj u žien, kde sa najvyšší počet pacientok vyskytoval vo vekovej kategórii 70 – 79 rokov (11,28 % v L1 a 13,34 % v L2). Podľa Európskej kardiologickej spoločnosti je pozorovaný posun chronickej formy ICHS – angíny pektoris (AP) do vyšších vekových kategórií. Je to v dôsledku predlžovania veku občanov v Európe, čím vlastne výskyt AP globálne narastá (Gavorník, Dukát, Gašpar, 2012). To môžu potvrdiť aj naše výsledky, kde bol pomerne vysoký výskyt mužských aj ženských pacientov s ICHS vo vekových kategóriách nad 70 rokov. V prípade žien bol zaznamenaný výskyt ICHS v L2 lekárni až vo vekovej kategórii 60 – 69 rokov (7,78 %); kým v lekárni L1 už aj vo vekovej kategórii 50 – 59 rokov (3,35 %) a vekovej kategórii 40 – 49 rokov (0,3 %). To môže súvisieť aj s pravidelným absolvovaním preventívnych prehliadok u zamestnancov U. S. Steelu a jeho častým záchytom. Oneskorený nástup ICHS u žien oproti mužom (o 5 – 10 rokov neskôr ako muži) je kvôli protektívnemu účinku estrogénov. Postmenopauzálne ženy (väčšinou po 55. roku života) strácajú tento priaznivý efekt estrogénu, čím nastupujú významné zmeny v ich lipidovom profile, arteriálnom krvnom tlaku, glukózovej tolerancii a vaskulárnej reaktivite a tým sa zvyšuje riziko rozvoja ICHS (Montalescot, a kol., 2013). Takže prevalencia ICHS u žien v rozvinutých krajinách stúpa hlavne po menopauze.

Najčastejšie sa vyskytujúcou diagnózou v rámci analyzovaných PZ bola **I25.9 – Chronická ischemická choroba srdca, bližšie neurčená**, a to v obidvoch sledovaných lekárňach. V L2 lekárni bolo zaznamenané signifikantne vyššie percento diagnóz spojených s IM, a to I21 – I21.9 oproti lekárni L1, v ktorej sa vyskytovali prevažne diagnózy spojené s aterosklerózou a chronickou ICHS I25.0 – I25.9. Ateroskleróza ako hlavná príčina vzniku ICHS je v súčasnosti hlavnou príčinou morbidity a mortality na kardiovaskulárne ochorenia. Súvisí predovšetkým s nevhodným životným štýlom, teda nárastom fajčenia, zníženou pohybovou aktivitou a zvýšenou konzumáciou jedál bohatých na kalórie, tuky a cholesterol (Fábryová, 2009).

U pacientov bol zaznamenaný aj zvýšený výskyt **komorbidít** – najčastejšie arteriálna hypertenzia, hyperlipidémia či *diabetes mellitus* 2. typu, ktoré predstavujú rizikové faktory pre ischemickú chorobu periférnych artérií a diastolického srdcového zlyhávania. Komorbidity boli zaznamenané u signifikantne väčšieho počtu pacientov v L1 lekárni (44,82 %) oproti L2 lekárni (15,54 %). Riziko vzniku akútneho infarktu myokardu (AIM) v prípade inak zdravého pacienta s *diabetes mellitus* je rovnaké ako u pacienta po prekonanom AIM, ktorý bol práve prepustený z koronárnej Jednotky intenzívnej starostlivosti. Arteriálna hypertenzia, d*iabetes mellitus* či fajčenie osamote zvyšujú riziko Akútneho koronárneho syndrómu (AKS) dvoj- až trojnásobne, pri ich kombinácii riziko stúpne 13-násobne. Ak sa k tomu pridá hyperlipidémia, riziko už bude 42-násobné oproti zdravej populácii (Hudec, 2012). Z daných výsledkov vyplýva, že vznik ICHS je podmienený vekom a pohlavím, či výskytom komorbidít. Významný podiel na vývoji ICHS u pacientov pracujúcich v U. S. Steele môže mať aj zamestnanie a s ním spojený stres. Najnovšie klinické štúdie potvrdili priamu koreláciu medzi prácou na smeny a vznikom a rozvojom ICHS, prípadne možným rizikom vzniku AIM (Cheng a kol., 2019).

V prípade farmakoterapie prevládala u pacientov kombinovaná terapia (69,91 % L1 a 65,73 % L2); kým monoterapia bola zaznamenaná na úrovni v priemere u cca 30 % pacientov v obidvoch lekárňach (30,09 % L1 a 34,33 % L2). Kombinovaná terapia je indikovaná u pacientov s častejšou frekvenciou anginóznych záchvatov ako prevencia po IM a u pacientov s perkutánnou koronárnou intervenciou (Lemesle a kol., 2014). V rámci kombinovanej terapie sa u

pacientov najčastejšie vyskytovala dvojkombinovaná terapia, hlavne kombinácia antitrombotika s BB (10,06 % L1) a antitrombotika s nitrátom (7,78 % L2), alebo antitrombotika s hypolipidemikom (7,78 % L2).

Z hľadiska farmakoterapeutických skupín bola najčastejšie indikovaná **antitrombotická terapia** (36,69 % L1; 38 % L2), kde neboli zaznamenané výrazné rozdiely v preskripcii medzi L1 a L2. Indikácia antitrombotík u pacientov s ICHS je z dôvodu možného vzniku aterotrombózy, ktorá je charakterizovaná postupným narastaním alebo náhlou ruptúrou aterosklerotického plátu v artériách stredného a veľkého priemeru. Preto antitrombotiká predstavujú základnú terapiu v rámci primárnej prevencie rizikových pacientov a sekundárnej prevencie koronárnej choroby (Kaliská, 2011). Najčastejšie predpisovaným antiagreganciom a zároveň najčastejšie celkovo predpisovaným liečivom v analyzovanej vzorke bola ASA. Preskripcia ASA sa vyskytovala v monoterapii, 2-kombinovanej terapii najčastejšie s BB (bisoprolol), a nitrátmi (izosorbidmononitrát), taktiež dominovala spomedzi všetkých liečiv v 3-kombinovanej a viackombinovanej terapii. Druhým najčastejšie predpisovaným liečivom zo skupiny antiagregancií bol klopidogrel, ktorý sa najčastejšie používa v duálnej protidoštičkovej liečbe spolu s ASA u pacientov podstupujúcich Perkutánnu koronárnu intervenciu a u pacientov s AKS bez elevácie a s eleváciou segmentu ST. Táto kombinácia liečiv je účinná, čiže znižuje ischemické komplikácie, a tiež bezpečná s čo najnižším rizikom krvácavých komplikácii (Hricák, 2008).

Na druhom mieste v preskripcii liekov ICHS boli v L1 lekárni **betablokátory** (24,22 % PZ); kým v L2 boli na druhom mieste najčastejšie vydávané nitráty (19,67 % PZ). Rozdiely v preskripcii mohli byť spôsobené variabilitou diagnóz v rámci ICHS, keďže nitráty sa používajú predovšetkým aj v akútnej fáze anginózneho záchvatu, kým BB sú liekmi prvej voľby v terapii stabilnej AP. BB významne znižujú mortalitu chorých po IM a znižujú výskyt reinfarktov (Gibson a kol., 2015; Hradec a Býma, 2013). Z metaanalýzy klinických štúdií účinkov BB vyplýva zníženie dlhodobej mortality o 20 %, výskytu náhlej smrti o 40 % a reinfarktov o 30 % (Andersson a kol., 2014). V terapii ICHS boli najčastejšie predpisované kardioselektívne BB bez ISA bisoprolol (10,41 % L1; 10,33% L2) a metoprolol (11,34 % L1 a 2,33 % L2). V terapii akútnych a chronických foriem ICHS sa uplatňuje hlavne ich bradykardizujúci účinok. Vďaka predĺženiu diastolickej fázy sa zlepšuje prietok myokardom. V sekundárnej prevencii KVS príhod, hlavne u osôb po IM, sa uplatňuje ich antiischemický, antiarytmický a antihypertenzívny účinok. U chorých s AP sa prejaví vlastný antiischemický účinok zvýšenou toleranciou záťaže a poklesom výskytu stenokardií (Švihovec a kol., 2018).

Ďalšiu často predpisovanú farmakoterapeutickú skupinu u pacientov s ICHS tvoria nitráty (13,81 % L1; 19,67 % L2). Z nich sa najčastejšie predpisoval molsidomín (6,14 % L1 a 9 % L2), najčastejšie v liekovej forme tablety v dávke 4 mg a izosorbid mononitrát (5,94 % L1 a 6,67 % L2); najviac bol predpisovaný v liekovej tabletovej forme v dávke 20 a 40 mg. Molsidomín na rozdiel od izosorbid mononitrátu nepotrebuje na uvoľnenie NO sulfhydrylové skupiny v endoteli, ale uvoľňuje NO priamo, čím nenavodzuje toleranciu. Rozhodujúcim účinkom nitrátov a donorov NO je navodenie vazodilatácie, resp. prevencia vazospastických reakcií. Relaxácia cievnej steny prebieha od veľkých tepien až po venózny systém. Izosorbid – 5-mononitrát a molsidomin sa používajú k profylaxii myokardiálnej ischémie, u pacientov s AP zlepšujú toleranciu záťaže a znižujú výskyt stenokardií (Švihovec a kol., 2018). V terapii akútneho anginózneho záchvatu sa naďalej najčastejšie používa nitroglycerín vo forme sublingválnej tablety v dávke 0,5 mg alebo sublingválneho spreja v dávke 0,4 mg. V nami sledovaných lekárňach bol vydaný v 1,6 % v L1 a 3,33 % v L2 lekárni.

Ďalšou veľmi často predpisovanou farmakoterapeutickou skupinou v terapii pacientov s ICHS boli hypolipidemiká (12,01 % L1 a 15 % L2), ktoré

sa predpisujú pacientom v konzervatívnej terapii stabilnej AP pri zvýšenej hladine sérových lipidov (celkový cholesterol 5,2 mmol.l^{-1}, LDL cholesterol >2,5 mmol.l^{-1} ako prevencia vzniku aterosklerózy. Predovšetkým sú to statíny (Hudec, 2012). Statíny okrem iného zvyšujú syntézu NO, čím zlepšujú krvný prietok závislý od endotelu (Marchesi a kol., 2000). Statíny majú aj pleiotropné antiaterogénne účinky, medzi ktoré patrí zlepšenie funkcie endotelu, antioxidačné vlastnosti, protizápalové, antiproliferačné a antitrombotické účinky a neoangiogenéza. Práve tieto účinky statínov sú dôležité v súčasnej liečbe ICHS. Dlhodobá terapia statínmi signifikantne znižuje hladinu sérových lipidov (ako najefektívnejší bol potvrdený atorvastatín) a znižuje riziko ICHS mortality (najmä atorvastatín a fluvastatín), avšak zvyšuje riziko poškodenia svalov a obličiek (Yongbin a kol., 2016). Zo statínov sa v obidvoch lekárňach najčastejšie predpisoval atorvastatín (11,8 % L1 a 14 % L2).

Z vazodilatancií boli predpisované v terapii ICHS aj BKK (4,02 % L1 a 1,34 % L2). Klasickou indikáciou pre podávanie BKK je Prinzmetalova, teda variantná AP, pretože uvoľňujú koronárne spazmy približne u 80 % pacientov s variantnou AP a sú účinné rovnako v prevencii záchvatov námahovej AP (amlodipín je účinnejší v terapii námahovej AP ako atenolol) (Montalescot a kol., 2013; Sueta a kol., 2016). Terapia touto skupinou liečiv je vhodná aj u pacientov, ktorí súčasne trpia systémovou hypertenziou a tiež ak liečba BB u pacientov vedie k závažnej bradykardii. Najčastejšie predpisovaným liečivom tejto skupiny bol amlodipín vo forme tablety v dávke 5 mg 1x denne v obidvoch lekárňach (3,0 % L1 a 1,34 % L2). Dlhý biologický polčas amlodipínu a jeho dobrá tolerancia z neho robia efektívne antianginózne a antihypertenzívne liečivo.

Ďalej boli u pacientov s ICHS predpisované aj ACE-inhibítory (5,47 % L1 a 5,67 % L2). ACE-inhibítory sa predpisujú v rámci ICHS u pacientov s pridruženou arteriálnou hypertenziou, ktorá má najväčší výskyt z komorbidít aj u našich pacientov. Redukujú celkovú mortalitu, riziko IM a srdcového zlyhania (Montalescot a kol., 2013). Najčastejšie predpisovanými liečivami z tejto skupiny boli ramipril (3 % L1 a 0,67 % L2) v dávke 5 mg, perindopril (2 % L1 a 1 % L2) v dávke 4 mg a trandolapril (0,47 % L1 a 4 %. L2).

Z liečiv ovplyvňujúcich energetický metabolizmus sa v súčasnosti predpisuje jedine **trimetazidín**. Zistilo sa, že kombináciou trimetazidínu s BB v porovnaní s izolovanou liečbou sa výrazne znižuje frekvencia záchvatov a pri fyzickej námahe sa predlžuje čas do vzniku ischémie (Hradec a Býma, 2013).

Z ostatných liečiv boli predovšetkým predpisované diuretiká – furosemid a spironolaktón, inhibítor xantínoxidázy alopurinol, v súvislosti s pridruženými diagnózami pacientov.

Výsledky analýzy deklarujú dodržanie terapeutických postupov a usmernení podľa Slovenskej aj Európskej kardiologickej spoločnosti (ESC Guidelines, 2013).

ZÁVER

Na základe analyzovaných výsledkov týkajúcich sa hlavne charakteristiky pacientov z obidvoch lekární môžeme predpokladať, že vznik a vývoj ICHS u pracujúcich pacientov je ovplyvnený pohlavím, vekom a výskytom komorbidít. Nemalú úlohu môže zohrávať aj zamestnanie a s ním spojený stres. V terapii ICHS bola u pacientov najčastejšie indikovaná kombinovaná terapia, hlavne dvojkombinácia, a to prevažne antitrombotikum a BB (L1) alebo antitrombotikum a hypolipidemikum, alebo antitrombotikum a nitrát (L2). Z celkového pohľadu sa preskripcia jednotlivých farmakoterapeutických skupín v terapii ICHS veľmi nelíšila, jej variabilita súvisela s výskytom rôznych diagnóz v rámci ICHS. V terapii boli najčastejšie indikované antitrombotiká (ASA), BB (bisoprolol, metoprolol), nitráty (molsidomín) a hypolipidemiká (atorvastatín). Na základe analýzy PZ u pacientov s ICHS je možné potvrdiť dodržanie postupov farmakoterapie ICHS v klinickej praxi s postupmi Slovenskej a Európskej kadiologickej spoločnosti.

V prevencii ICHS zohráva dôležitú úlohu práve osveta a vzdelávanie populácie. V primárnej prevencii je najdôležitejšie viesť zdravý životný štýl s pravidelným pohybom a zdravou životosprávou. V rámci sekundárnej prevencie je možné signifikantne znížiť riziko ďalšieho infarktu dôslednou adherenciou k odporúčaniam na kontrolu arteriálnej hypertenzie, diabetu či dyslipidémie.

ZOZNAM LITERATÚRY

Andersson, Ch., Shilane, D., Go, A. S., Chang, T. I., Kazi, D., Solomon, M. D., Boothroyd, D. B., Hlatky, M. A.: Beta-blocker therapy and cardiac events among patients with newly diagnosed coronary heart disease., *Journal of the American College of Cardiology*, 2014, 64 (3), 247 – 252.

ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease. *European Heart Journal*, 2013, 34, 2949 – 3003.

Fábryová, Ľ.: Etiopatogenéza aterosklerotického procesu [Etiopathogenesis of atherosclerosis]. *Via practica*, 2009, 6 (2), 69 – 75.

Cheng, M., He, H., Wang, D., Xu, L., Wang, B., Ho, M. H., Chen, W.: Shift work and ischaemic heart disease: meta-analysis and dose–response relationship. *Occupational Medicine*, 2019, 69 (3), 182 – 188.

Gavorník, P., Dukát, A., Gašpar, Ľ.: Manažment stabilnej anginy pectoris a iných foriem chronickej kardiovaskulárnej artériovej choroby [Management of stable angina pectoris and of other chronic cardiovascular arterial diseases]. *Vnitř. Lék.*, 2012, 58 (7 – 8), 29 – 36.

Gibson, J. A., Brooke, R.: Using beta-blockers with coronary artery disease. *Nursing Critical Care*, 2015, 10 (3), 6 – 10.

Hradec, J., Býma, S.: *Ischemická choroba srdeční. Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékare* [Ischemic heart disease. The recommended diagnostic and therapeutic procedure for general practitioners]. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2013, 5 – 19. https://www.svl.cz/files/files/Doporucene-postupy/2017/DP-ICHS.pdf. [cit. 02. 02. 2019]

Hrdina, R., Mladěnka, P., Bobrovová, Z., Hübl, M.: Farmakoterapie ischemické choroby srdeční [Pharmacotherapy of cardiac ischemia]. *Via Pract.*, 2009, 6 (4), 157 – 162.

Hricák, V.: Aká antitrombotická liečba u pacientov s koronárnym stentom vyžadujúcich antikoagulačnú liečbu warfarínom [Which antothrombotic treatment in patients with coronary stenting requiring anticoagulation warfarin therapy]. *Intervenční a akutní Kardiológie*, 2008, 7 (4), 131 – 132.

Hudec, M.: Ischemická choroba srdca [Ischemic heart disease]. *Kardiológia*, 2012, 48 – 52.

International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10 Version:2016). http://apps.who.int/classi_cations/icd10/browse/2016/en. Accessed October 27, 2016.

Kaliská, G.: Antiagregačná liečba v kardiológii [Antiplatelet therapy in cardiology]. *Súčasná klinická prax*, 2011, 1, 4 – 8.

Lemesle, G., Lamblin, N., Meurice, T., Tricot, O., Lallemant, R., Nugue, O., Delomez, M., Equine, O., Tondeux, S., Bauters, Ch.: Dual antiplatelet therapy in patients with stable coronary artery disease in modern practice: Prevalence, correlates and impact on prognosis. *Am. Heart J.*, 2014, 168 (4), 479 – 486.

Marchesi, S., Lupattelli, G., Siepi, D., Schillaci, G., Vaudo, G., Roscini, A. R., Sinzinger, H., Mannarino, E.: Short-term atorvastatin treatment improves endothelial function in hypercholesterolemic women. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2000, 36 (5), 617 – 621.

Montalescot, G., Sechtem, U., Achenbach, S., Andreotti, F., Arden, Ch., Budaj, A., Bugiardini, R., Crea, F., Cuisset, T.: The Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*, 2013, 34 (38), 2949 – 3003.

NCZI – Štatistické výstupy [NHIC –

Statistical outputs], 2018. http://www.nczisk.sk/Statisticke_vystupy/Zdravotnicka_rocenka/Pages/default.aspx. [cit.2020-2-10].

Smaardijk, V. R., Lodder, P., Kop, W. J., van Gennep, B., Mass, A., Mommersteeg, P., M. C.: Sex- and gender-stratified risks of psychological factors for incident ischemic heart disease: systematic review and meta-analysis. *J. Am. Heart. Assoc.*, 2019, 8 (9), e010859.

Sueta, D., Tabata, N., Hokimoo, S.: Clinical roles of calcium channel blockers in ischemic heart diseases. *Hypertens. Res.*, 2017, 40 (5), 423 – 428.

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

Vargová, J., Fedačko, J.: Ischemická choroba srdca [Ischemic heart disease]. *Národný portál zdravia*, 2016.

Yongbin, L., Cheng, Z., Zhao, Y., Chang, X., Chan, C., Bai, Y., Cheng, N.: Efficacy and safety of long-term treatment with statins for coronary heart disease. A Bayesian network meta-analysis. *J. Atherosclerosis*, 2016, 254, 215 – 227.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 1: 82 – 92, 2021

SYNTÉZA ČREVNÉHO HLIENU A JEHO DYNAMIKA

SYNTHESIS OF INTESTINAL MUCUS AND ITS DYNAMICS

Blatníková, Teodora; Faixová, Zita; Piešová, Elena

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

teodora.blatnikova@student.uvlf.sk

ABSTRAKT

Cieľom tohto článku je opísať zloženie, štruktúru a syntézu mucínov ako hlavných komponentov tvoriacich ochrannú vrstvu sliznice čreva a možnosti modifikácie jeho zloženia a štruktúry kŕmnymi aditívami. Črevná hlienová vrstva zohráva dôležitú úlohu v ochrane zdravia. Zabraňuje prieniku patogénnych agensov k črevnému epitelu, uľahčuje pasáž tráveniny do distálnejších úsekov tráviaceho traktu, sprostredkuje imunitnú odpoveď organizmu, chráni pred infekciami a dehydratáciou. Hlavnou zložkou hlienu v črevách sú vysoko O-glykozylované glykoproteíny tvoriace súvislý gél. Gél pokrýva črevnú sliznicu, kde jeho kontinuálnu produkciu zabezpečujú pohárikové bunky, ide o špeciálne sekrečné bunky roztrúsené medzi enterocytmi. Transmembránové alebo membránovo viazané mucíny sa podobajú sekrečným, avšak sú ukotvené v membránach buniek a neparticipujú na tvorbe gélu. Za normálnych podmienok je črevný hlien produkovaný dvoma spôsobmi, kontinuálnou sekréciou a po stimulácii receptorov sekrétogami. Súvislú vrstvu črevného hlienu ovplyvňujú rôzne vonkajšie podmienky, na ktoré sekrečné bunky reagujú moduláciou expresie mucínových glykoproteínov, čím menia množstvo a zloženie produkovaného hlienu. Narušenie kontinuity hlienu alebo jeho komponentov môže spôsobovať náchylnosť k infekciám alebo chorobám.

Kľúčové slová: gastrointestinálny trakt; glykoproteíny; mucín; syntéza

ABSTRACT

The aim of this article is to describe the composition, structure and synthesis of mucins as

the main components forming the protective layer of the intestinal mucosa and the possibilities of modifying its composition and structure by feed additives. The intestinal mucus layer plays an important role in health protection. It prevents the penetration of pathogenic agents into the intestinal epithelium, it facilitates the passage of digesta to the distal parts of the digestive tract, mediates the body's immune response, protects the body against infections and dehydration. The major component of mucus in the gut are highly O-glycosylated glycoproteins forming a continuous gel. This gel covers the intestinal mucosa, its continuous production is ensured by goblet cells, special secretory cells scattered among enterocytes. Transmembrane or membrane-bound mucins resemble secretory mucins, but are anchored in cell membranes and do not participate in gel formation. Under normal conditions, continuous secretion and stimulation of receptors by secretogogues is produced in two ways. The continuous conditioning of mucus is affected by various external conditions to which secretory cells respond by modulating the expression of mucin glycoproteins, thereby altering the amount and composition of mucus produced. Disruption of the continuity of mucus or its components can lead to susceptibility to infection or disease.

Key words: gastrointestinal tract; glycoproteins; mucus; synthesis

ÚVOD

Črevná hlienová vrstva zohráva nezastupiteľnú úlohu v ochrane črevného epitelu. Predstavuje vyváženú obrannú líniu pomocou fyziologickej bakteriálnej kolonizácie čreva, je priestorom dynamicky sa meniacich interakcií medzi mikrobiotom čreva a prichádzajúcou tráveninou, pritom sa podieľa na adaptácii samotného organizmu na meniace sa podmienky črevného lúmenu pomocou imunitného systému a zabezpečuje homeostázu (Tarabová a kol., 2016). Pozostáva z 90 – 95 % z vody, ktorá slúži ako rozpustné médium pre ostatné zložky hlienu. Hlavnou štruktúrnou zložkou hlienu sú mucíny – glykoproteíny – s naviazanými sacharidmi N- alebo O-glykozidickou väzbou na proteínový základ. Mucíny črevného hlienu obsahujú stovky heterogénnych O-GalNAc glykánov na proteínovej kostre (Bansil a Turner, 2018). Dôležitosť mucínov sa ukázala aj pri oplodnení a vzniku chorôb ako sú nádorové ochorenia, zápalové ochorenie čriev či pľúcne choroby. O-glykány svojimi hydrofilnými vlastnosťami a negatívnym nábojom podporujú väzbu vody a solí; zabezpečujú tým viskozitu a priľnavosť hlienu. Hlienové proteíny ako kostry glykoproteínov boli identifikované citlivými metódami v rôznych orgánoch. Doteraz bolo opísaných približne 145 proteínov zúčastňujúcich sa na tvorbe hlienu v gastrointestinálnom trakte. Súčasťou hlienovej bariéry sú antimikrobiálne peptidy – α a β defenzíny; lyzozým, ktorý štiepi bakteriálnu stenu; laktoferín, ktorý v slizniciach chelatuje železo, čím obmedzí jeho dostupnosť pre baktérie. Z rastových faktorov najvýznamnejšie sú β transformačný rastový faktor a epidermálny rastový faktor, ktoré sa nachádzajú takmer vo všetkých vrstvách hlienu (Bansil a Turner, 2018). Hlien je obohatený aj cytokínmi, ktorých zdrojom sú epitelové a imunitné bunky (Thim a kol., 2002).

MATERIÁL A METODIKA

Pre vyhľadávanie odborných publikácií k tematike sme používali online databázy PubMed, ScienceDirect, Web of Science a Scopus.

VÝSLEDKY

Zloženie, štruktúra, syntéza a sekrécia hlienu

Mucíny tvoriace hlien rozdeľujeme do dvoch skupín: membránovo viazané a sekrečné. Obidva typy zdieľajú mnoho podobných vlastností zloženia; tento fakt je založený na skutočnosti, že u oboch typov

je základná proteínová sekvencia riadená rovnakou génovou rodinou (MUC) (Andrianifahanana a kol., 2006). Niektoré glykoproteíny sa segregujú v lyzozómoch a pôsobia ako enzýmy degradujúce určité molekulárne komponenty, napr. bakteriálne (Lieberman a Peet, 2018). Ďalšie glykoproteíny sú produkované ako sekrečné, avšak ich hydrofóbne časti ostávajú ukotvené v bunkovej membráne, pričom ich sacharidové zložky slúžia ako receptory pre určité molekuly (hormóny, transportné proteíny). Tieto vyčnievajúce časti môžu slúžiť tiež ako väzobné miesta pre baktérie a vírusy (Lieberman a Peet, 2018).

Doteraz bolo identifikovaných 22 MUC génov, z toho 13 MUC génov v gastrointestinálnom trakte. Expresia sekrečného mucínu – MUC2 génu a jeho proteínu je jedným z najdôležitejších v intestinálnom trakte (Bansil a Turner, 2018). Primárnu sekvenciu MUC2 mucínu kóduje približne 5200 aminokyselín, ktoré pôsobia ako väzobné miesta O-glykánov, ktoré sú pripojené k PTS doménam (prolín-treonín-serín) (Szabóová a kol., 2018).

Všetky O-glykozydickou väzbou spojené oligosacharidové štruktúry vznikajú väzbou monosacharidov galaktózy (Gal) alebo N-acetylglukózamínu (GlcNAc) priamo na počiatočný N-acetylgalaktózamín (GalNAc) monosacharid, aby vytvorili lineárne alebo rozvetvené jadrá vznikajúcich glykoproteínov. Postupným pridávaním ďalších monosacharidových stavebných jednotiek z nukleotidových prekurzorov vzniká jadro glykoproteínu. Ďalším pridaním monosacharidov sa glykoproteín rozvetvuje (Behera a kol., 2015). V jednom MUC2 proteíne kolónu bolo identifikovaných viac ako 100 rôznych O-viazaných oligosacharidových štruktúr (Bansil a Turner, 2018).

Syntéza glykoproteínov

U stavovcov existuje 9 monosacharidov, ktoré sa zúčastňujú na syntéze glykoproteínov: glukóza (Glc), N-acetylglukózamín (GlcNAc), kyselina sialová (Sia), galaktóza (Gal), kyselina glukurónová (GlcUA), fukóza (Fuc), manóza (Man), N-acetylgalaktózamín (GalNAc), xylóza (Xyl) (Stanley a kol., 2017).

Nie všetky biosyntetické dráhy sú rovnaké u všetkých typov buniek, existujú však určité všeobecné zásady: pri syntéze glykánu sa monosacharidy aktivujú vysokoenergetickým donorom. Syntézu glykoproteínov regulujú enzýmy skupiny glykozyltranferáz a glykozidáz. Glykozyltransferázy katalyzujú transport a naviazanie monosacharidových jednotiek na rastúci reťazec glykánu. Transportnými jednotkami sú uridíndifosfát (UDP) pre glukózu, galaktózu, acetylgalaktózamín, acetylglukózamín; guanozíndifosfát (GDP) pre manózu a fukózu; cytidínmonofosfát (CMP) len pre kyselinu sialovú (Stanley a kol., 2017). Glykozidázy zodpovedajú za odštiepenie koncových sacharidov (Kluková a kol., 2014). Je známych približne 135 glykozidáz zohrávajúcich úlohu v degradácii glykánových štruktúr, podieľajúcich sa na tvorbe medziproduktov potrebných pre tvorbu glykokonjugátov v rôznych bunkových procesoch. Všetky eukaryotické N-glykány sú iniciované oligosacharyltransferázami alebo enzýmovým komplexom; kotranslačne sa prenáša N-glykánový prekurzor Glc3Man9GlcNAc2 na asparagínové zvyšky. GalNAc transferázy zodpovedajú za iniciáciu O-glykánov mucínového typu, prenášajú GalNAc na bočné reťazce serínových/treonínových (Ser/Thr) zvyškov proteínu (Stanley a kol., 2017).

N-glykány

Pomenovanie je odvodené od atómu dusíka, ku ktorému sú pripojené sacharidové zvyšky na asparagínovom (Asn) reziduu (Gamblin a kol., 2009). Všetky N-glykány majú spoločnú sekvenciu jadrového sacharidu: Man3GlcNAc2Asn. Znamená to pripojenie dvoch GlcNAc k asparagínu a troch manózových jednotiek ku GlcNAc. N-glykány rozdeľujeme do troch skupín: oligomanózové, komplexné a hybridné. Všetky eukaryotické N-glykány sa začínajú syntetizovať na cytoplazmatickej strane membrány endoplazmatického retikula. Premiestňuje sa GlcNAc-P z UDP-GlcNAc na dôležitý prekurzor dolicholfosfát (DolP), čím vzniká

dolicholpyrofosfát-N-acetylglukózamín. Pomocou dolicholfosfátu sa premiestňujú monosacharidy na amidový dusík (Stanley a kol., 2017). Postupne sa pridá 14 ďalších sacharidov k dolicholu a následne je hotový glykán transportovaný k proteínu „en block" (v celku), premiestni sa cez membránu na vnútornú stranu endoplazmatického retikula, kde sa pripája kovalentnou väzbou na Asn-X-Ser/Thr sekvenciu (Gomord a kol., 2010).

O-glykány

Pripojenie treonínu alebo serínu na monosacharidy sa uskutočňuje na -OH konci spomínaných aminokyselín s kyslíkom (Gamblin a kol., 2009). Tvorba O-glykánov sa začína pripojením GalNAc k aminokyselinám, glykoproteíny mucínového typu zahŕňajú najväčšiu skupinu O-glykánov nesúcich najviac O-GalNAc (Hang a Bertozzi, 2005). U týchto glykánov zastúpenie Man, Glc, Xyl zvyškov chýba. Mucíny obsahujú stovky heterogénnych O-GalNAc glykánov na proteínovom základe, ako aj menší počet N-glykánov (Brockhausen a Stanley, 2017).

Nevyhnutným krokom O-glykozylácie je pridanie GalNAc v α väzbe na Ser/Thr pomocou enzýmu N-acetylgalaktózamintransferázy (GALNT). Existuje niekoľko druhov GALNT, ktoré sa nachádzajú vo všetkých živočíšnych bunkách okrem baktérií, kvasiniek a rastlín. Imunohistochemické testy ukázali lokalizáciu GALNT hlavne v *cis*-Golgiho aparáte. Prvý krok O-glykozylácie je regulovaný aminokyselinovou sekvenciou proteínového substrátu. Všetky GALNT viažu UDP-GalNAc ako donor, ale môžu sa líšiť v špecifickosti akceptora. Po naviazaní GalNAc na aminokyselinu sa na rozdiel od N-glykánov postupne pridávajú ďalšie monosacharidy a pokračuje tvorba kostry O-mucínov (Brockhausen a Stanley, 2017).

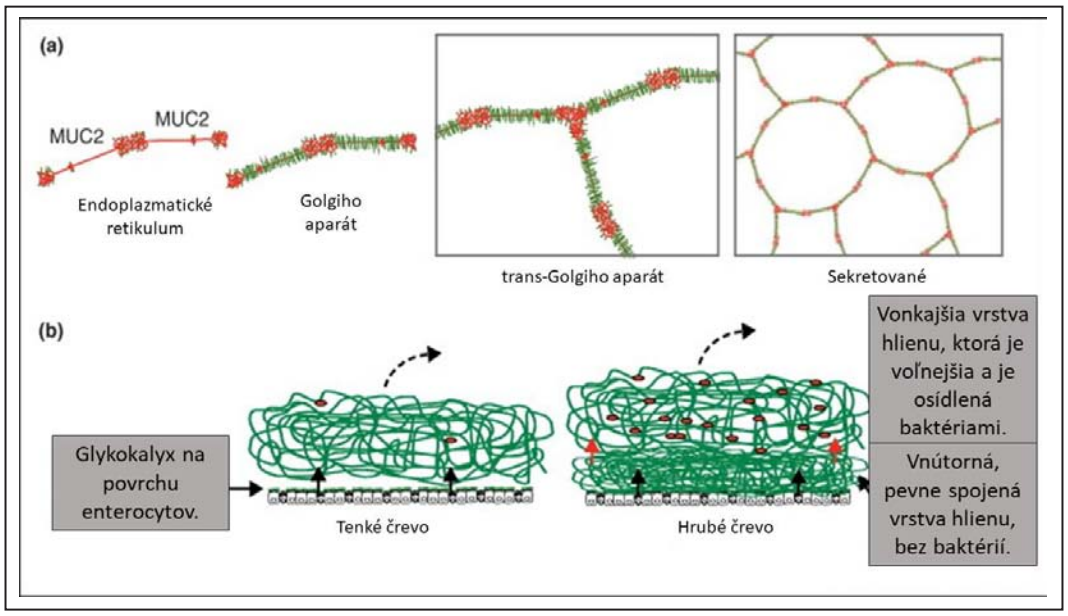
Sekrécia hlienu

Po sformovaní oligosacharidov sa mucíny obaľujú do vezikúl v *trans*-Golgiho sieti a uvoľňujú sa pomocou receptora VIP36 (vezikulárno-integrálny membránový proteín). Mucíny vo vezikulách dozrievajú na sekrečné granuly tvorbou multimérov; tieto multiméry sa tvoria disulfidovou asociáciou aminokoncových domén vWFD (von Willebrandov faktor D). Takto vznikajú tyčinky s rozmerom 1 – 10 µm, ktoré sú balené do vezikúl s veľkosťou do 1 µm. Negatívne náboje zo síranov a sialových kyselín môžu byť neutralizované pozitívnymi protiiónmi ako sú H^+, Na^+, Ca^{2+}. Týmto spôsobom sa umožní mucínovým gélom znížiť objem. Zvyšujúce sa koncentrácie H^+ a Ca^{2+} v endoplazmatickom retikule a Golgiho aparáte zvyšujú hustotu vezikulárnej protónovej pumpy H^+-ATPázy viazanej na membránu. Akonáhle je neutralizované odpudzovanie mucínu H^+alebo Ca^{2+} iónmi, dominujú hydrofóbne interakcie medzi mulekulami mucínu a lipidmi, spôsobujúc kondenzáciu mucínov v sekrečných granulách (Bansil a Turner, 2018).

Príklad sekrécie MUC2: Polyméry MUC2 sú husto zabalené v sekrečných vezikulách kvôli nízkemu pH a vysokej koncentrácii Ca^{2+}. N-terminálne trimére tvoria spontánne zreťazené kruhy a spoja sa s ďalšími molekulami MUC2 na C-koncoch oboch molekúl. Po sekrécii sa mucín rozširuje viac ako 1000-násobne do obrovských sietí pri vyššom pH a po odstránení viazaného vápnika z N-konca (viď obr. 1). V tomto prípade vápnik bráni elektrostatickému odpudzovaniu negatívne nabitých glykánov (McGuckin a kol., 2011).

Zatiaľ sú preštudované dva spôsoby sekrécie, a to kontinuálna sekrécia a sekrécia po stimulácii receptorov sekrétogami. Regulovaná sekrécia vezikúl bola opísaná a študovaná v dýchacích cestách, kde prebieha fúzia jednotlivých vezikúl s plazmatickou membránou pomocou komponentov vezikulárnej exocytózy, ako sú syntaxíny, VAMP (membránový proteín asociovaný s vezikulami), SNAP (proteín asociovaný so synaptozómami) (Birchenough a kol., 2015). Tento proces v tenkom a hrubom čreve ešte nie je dostatočne preskúmaný. Predpokladá sa, že ide o podobný mechanizmus ako v dýchacom systéme. Exocytóza hlienu vo väčších vezikulách sa uskutočňuje na základe predchádzajúcej fúzie vezikúl v pohárikových bunkách. Fúziou zrelých

Obr. 1: Schématické znázornenie sekrécie MUC2



Sekrécia MUC2. a) proteínový základ MUC2 v diméroch v endoplazmatickom retikule. Neskôr v Golgiho aparáte O-glykozylácia (husté zelené čiary), trimerizácia v *trans*-Golgiho aparáte a mnohonásobné zväčšenie po sekrécii. b) schéma rozloženia vrstiev hlienu v tenkom a hrubom čreve. Zdroj: modifikovaný podľa Hansson, 2012
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527411001858

sekrečných granúl a plazmatickej membrány vznikne otvorený pór umožňujúci interakciu granuly s extracelulárnym prostredím. Medzi signálne faktory, ktoré sprostredkujú opustenie granúl, zaraďujeme aktiváciu uvoľnenia Ca^{2+}. Extracelulárny priestor má nižšiu koncentráciu Ca^{2+} a H^{+}, pričom Ca^{2+} a H^{+} difunduje zo zrelých sekrečných granúl rýchlejšie než molekuly mucínu. Táto reakcia spustí odstránenie aniónov, čo spôsobuje negatívny náboj mucínu, a vznikne elektrostatické odpudzovanie mucínu od jeho sialových kyselín a sulfátov. Zrelé sekrečné granuly menia svoj tvar a molekuly hlienu sa rozprestierajú od póru relatívne rýchlo a pokrývajú apikálny povrch bunky (Bansil a Turner, 2018).

Hrúbka hlienu

V črevnom trakte pozorujeme dve vrstvy hlienu s rozdielnymi reologickými vlastnosťami. Sliznica tenkého čreva disponuje jednou tenšou vrstvou hlienu, kým sliznica hrubého čreva obsahuje dve vrstvy. Vnútorná vrstva je tenšia a označuje sa ako sterilná. Vonkajšia hrubšia vrstva obsahuje baktérie, ich toxíny, a množstvo ďalších komponentov súvisiacich s kolonizáciou a trávením (Hansson, 2012). U myší bolo pozorované, že prvá vrstva hlienu v kolóne je tenká (100 – 150 µm), viskoelastická a prilieha na epiteliálne bunky. Druhá vrstva je hrubšia (100 – 700 µm) a leží na prvej vrstve (Johansson a kol., 2008; Gomorod a kol., 2010). Hrúbka hlienu sa dynamicky mení v závislosti od jeho produkcie a odbúravania. Jeho fyziologická hrúbka kolíše u všetkých druhov zvierat a aj v závislosti od črevného segmentu. Príkladom môže byť črevo potkanov, kde v duodene bola zistená hrúbka približne 170 µm, v jejune 123 µm, v ileu 480 µm a v kolóne 830 µm (Atuma a kol., 2001).

Syntéza a sekrécia hlienu v tráviacom trakte, množstvo pohárikových buniek a expresia mucínových génov podlieha regulácii na rôznych úrovniach. Je podmienená taktiež vekom, pohlavím

a chorobnými stavmi (zápal). Ako bolo zistené, môže byť výrazne modifikovaná aplikáciou kŕmnych aditív na báze vitamínov, silíc, liekov, probiotík a i.

Dynamicky sa meniaca expresia mucínov a histochémia

Histochemická diagnostika hlienu

Z histochemického hľadiska hlien rozdeľujeme na neurálny a kyslý (sulfo a sialomucíny). Neutrálne mucíny sa farbia len Periodic Acid Schiff (PAS) reakciou. PAS reakcia zafarbí v podstate všetky polysacharidy zahŕňajúc mucíny, glykoproteíny, glykolipidy, glykogén. Princípom je oxidácia polysacharidov s následnou tvorbou aldehydov, ktoré reagujú so Schiffovým činidlom a farbia sa fialovočerveno. Alternatívou pre špecifikáciu je PAS-diastázová reakcia, ktorá obsahuje enzým diastázu, ktorá štiepi glykogén, ale mucíny ostanú nenaštiepené.

Na dôkaz kyslých mucínov sa používa farbiaca metóda s alciánovou modrou (AB). Pre rozlíšenie silne (sulfomucíny) a slabo (sialomucín) acidických mucínov sa táto reakcia dá realizovať pri rôznych pH hodnotách. Farbiaca metóda alciánovou modrou pri pH 1 zafarbí len silne acidické mucíny a pri pH 2,5 sa slabo zafarbia aj silne acidické mucíny s rôznou intenzitou modrej farby (Nikumbh a kol., 2012).

Dynamika hlienu

Nepretržitá produkcia pohárikovými bunkami prispieva k neustálej obnove hlienovej vrstvy. Hlien je tiež kontinuálne odbúravaný a vymývaný z povrchu epitelu degradačnými mechanizmami luminálnych baktérií. Dynamika produkcie a odbúravania je regulovaná na rôznych úrovniach, podlieha regulácii nervovej, hormonálnej, parakrinnej a imunitnej (Birchenough a kol., 2015). Indukovateľnú génovú expresiu vykazujú mucíny tvoriace gél v mukóznych epitelových bunkách.

V prípade expresie MUC2 v tenkom čreve a hrubom čreve sú zapojené rôzne promótorové oblasti. Všeobecne expresia mucínov môže byť regulovaná post-infekčnými faktormi, zápalovými cytokínmi (IL-1, IL-4, IL-6) a ďalšími faktormi. Neutrofily prostredníctvom neutrofilovej elastázy môžu stimulovať produkciu mucínov rovnako ako mikrobiálne produkty. Štúdie poukázali na existenciu určitého prospešného vplyvu probiotických mikroorganizmov na potláčanie a obmedzenie infekčnosti patogénnych mikroorganizmov. Podstata spočíva vo zvýšenej regulácii expresie mucínov (Linden a kol., 2008).

V experimente zameranom na sledovanie vplyvu fytogénnych aditív (účinné látky karvakrol, anetol a limonén) na zloženie hlienu a morfológiu sliznice u brojlerových kurčiat bolo zistené signifikantné zvýšenie manózových jednotiek v duodene u 14-dňových kurčiat, ktoré boli kŕmené aditívom v dávke 125 mg/kg a 250 mg/kg. V ileu 42-dňových brojlerov už neboli zaznamenané rozdiely v zložení hlienu. Nezistili sa signifikantné rozdiely zafarbenia intestinálnych klkov v závislosti od veku alebo črevného segmentu po ošetrení aditívami. Intenzita zafarbenia AB-PAS metódou slepého čreva bola nižšia v porovnaní s intenzitou v dvanástniku a v ileu. Hrúbka adherovaného hlienu u 14-dňových brojlerov nebola ovplyvnená, avšak u 42-dňových kurčiat sa jej hrúbka v dvanástniku zvyšovala lineárne s koncentráciou fytogénnych aditív (Tsirtsikos a kol., 2012).

Zeinali a kol. (2017) v pokuse na brojlerových kurčatách sledovali vplyv skrmovania rôznych esenciálnych olejov diétou na expresiu MUC2. Kontrolnú skupinu tvorili kurčatá kŕmené bazálnou diétou. Diétu ďalšej skupiny doplnili antibiotikom podporujúcim rast (flavofosfolipol). Ďalšie skupiny zvierat dostávali esenciálne oleje z klinčekov, koriandra siateho, myrty a *Artemisia siberi* (palina) v rôznych koncentráciách. Krmivo obohatené esenciálnym olejom z klinčekov pri dávkach 100 mg/kg a 500 mg/kg výrazne zvyšovalo expesiu MUC2 génu oproti kontrole a antibiotikám. Počet pohárikových buniek bol signifikantne znížený pri koncentrácii 300 mg/kg a 500 mg/kg oproti kontrole. Zvýšená expresia MUC2 génu oproti kontrole a antibiotikám sa dosiahla pridávaním silíc z koriandra

siateho, avšak znížil sa počet pohárikových buniek v duodene, jejune a ileu pri koncentrácii 200 mg/kg a 300 mg/kg. Esenciálny olej z *Artemisia sieberi* najviac zvyšoval expresiu MUC2 génu pri koncentrácii 100 mg/kg, pritom redukoval počet pohárikových buniek pri koncentrácii 200 mg/kg a 300 mg/kg. Skrmovanie diéty s obsahom esenciálneho oleja myrty indukoval expresiu MUC2 génu pri koncentrácii 200 mg/kg a 300 mg/kg. Zníženie počtu pohárikových buniek sa pozorovalo pri všetkých koncentráciach v ileu. Výsledky poukazujú na efekt spomínaných silíc na zvýšenú expresiu MUC2 génu v jejune a znížení počtu pohárikových buniek.

V štúdii Piešovej a kol. (2019) bol skúmaný vplyv suplementácie mangánu v diéte na hrúbku hlienu v čreve u nosníc. Výsledky ukázali výraznú redukciu hrúbky črevného hlienu v jejune vo všetkých experimentálnych skupinách po podaní organického (Mn-Glycinoplex) alebo anorganického ($MnSO_4$) mangánu.

Podobné výsledky boli pozorované u oviec. Hrúbka hlienu v duodene a jejune bola signifikantne znížená v skupine so suplementáciou organického mangánu (Maková a kol., 2018).

Čapkovičová a kol. (2012) sledovali vplyv extraktu z *Thymus vulgaris* (materina dúška, tymián) na množstvo acidických a neutrálnych mucínov v črevnom trakte. Autori zistili, že *Thymus vulgaris* výrazne zvyšoval množstvo acidických mucínov v duodene oproti kontrole 1 (bazálna diéta bez slnečnicového oleja) a znižoval množstvo v jejune oproti kontrole 2 (bazálna diéta s pridaním slnečnicového oleja). Množstvo neutrálnych mucínov sa znižovalo v jejune a céku oproti kontrole 1 a zvyšovalo sa v ileu oproti kontrole 1.

V ďalších pokusoch bol podávaný extrakt zo šalvie lekárskej v rôznych koncentráciách (0,01 %; 0,025 %; 0,05 %; 0,1 %) kurčatám na sledovanie jeho účinkov na hrúbku a množstvo acidických a neutrálnych mucínov v črevách oproti kontrole. Čapkovičová a kol. (2014) zistili, že aplikácia 0,05 % extraktu zo šalvie výrazne znižovala počet pohárikových buniek obsahujúcich acidické aj neutrálne mucíny v duodene a jejune, kým v ileu sa zvyšovali počty obidvoch typov. Avšak hrúbka črevného hlienu v duodene narástla oproti kontrole po skrmovaní 0,05 % extraktu. Počet pohárikových buniek v céku obsahujúcich obidva typy mucínov nebol signifikantne zmenený.

Levkut jr. a kol. (2009) v experimente pozorovali vplyv extraktu zo šalvie lekárskej na dynamiku hlienu v rôznych segmentoch črevného traktu na vývoj salmonelovej infekcie u kurčiat. Na základe výsledkov došli k záverom potvrdzujúcim protizápalové účinky extraktu šalvie a jeho pozitívny efekt na syntézu črevného hlienu. Zistená zvýšená produkcia hlienu bola súvisiaca s prítomnosťou salmonel a ich schopnosťou vyvolať zápalový proces.

Z literatúry je známe, že probiotické baktérie urýchľujú osídlenie črevného traktu stabilnou mikroflórou novovyliahnutých kurčiat a tým pomáhajú k vytvoreniu efektívnej bariéry voči patogénnym mikroorganizmom (Herich a Levkut, 2002). Doplnok probiotík mení dynamiku hlienu čreva. Jedným z používaných probiotických doplnkov je izolát *Enteroccocus faecium* EF55. Izolát svojimi bakteriocínmi sprostredkuje pozitívny účinok proti patogénom, akým je napríklad *S. enterica*, a vplýva na subtypy leukocytov a makrofágov (Strompfová a Lauková, 2007). Levkut jr. a kol. (2012) priaznivo hodnotili podávanie probiotika EF55 na vývoj imunitnej odpovede v periférnej krvi (zvýšená frekvencia lymfocytov v periférnej krvi) a na produkciu hlienu v čreve počas infekcie *S. enterica*.

Okrem bakteriálnych infekcií tiež parazitárne ochorenia ako kokcidiózy (*Eimeria* spp.) spôsobujú straty v hydinárstve. Masívna aplikácia antikokcidík spôsobovala nárast rezistencie. Tento fenomén nasmeroval výskumy k hľadaniu možných alternatívnych metód potláčania kokcídií v chovoch hydiny. Major a kol. (2011) sledovali vplyv extraktu pamajoránu obyčajného (oregano) na infekciu hydiny s *E. acervulina* a následnú imunitnú odpoveď v periférnej krvi. Zistili zvýšené množstvo celkových leukocytov v periférnej krvi u kurčiat s doplnkom extraktu pamajoránu na tretí deň po experimentálnej infekcii *E. acervulina*. Hrúbka hlienu v jejune bola

tenšia v porovnaní s kontrolou u kurčiat infikovaných *E. acervulina* a ošetrených antikokcidikom, ako u kurčiat, ktorým bol pridávaný extrakt. Neskôr, na desiaty deň po infekcii, bola zistená hrubšia vrstva hlienu u infikovaných kurčiat v porovnaní s inými experimentálnymi skupinami.

Výsledky ďalších experimentov ukázali, že klystír obsahujúci prírodné alebo syntetické látky s antioxidačným účinkom zmierňuje príznaky zápalu sliznice postihnutého kolónu. Extrakt z *Curcuma longa* má antioxidačné vlastnosti a využíva sa na zmierňovanie príznakov nešpecifických zápalov čriev. Alves a kol. (2017) hodnotili obsah a expresiu acidických mucínov v kolóne potkanov po vylúčení fekálneho tranzitu. Pri koncentrácii 200 mg/kg/deň extraktu z kurkumy počas štyroch týždňov zaznamenali znížený stupeň zápalu. Ošetrenie extraktom kurkumy pri 50 a 200 mg/kg po dobu 2 alebo 4 týždňov zvýšil koncentráciu acidických mucínov. Výrazný nárast expresie sulfo a sialomucínov sa pozoroval pri koncentrácii 200 mg/kg/deň.

Hydina nie je schopná syntetizovať aminokyselinu treonín, preto je pre ňu suplementácia nepostrádateľná. Výsledky experimentov ukázali, že expresia MUC2 nebola ovplyvnená interakciou dusíkatých látok a koncentráciou treonínu (180 g/kg, 200 g/kg, 220 g/kg, 240 g/kg dusíkatých látok obsahujúcich 100 % alebo 110 % stráviteľného treonínu) experimentálnej diéty brojlerových prepelíc. Avšak zvyšovanie koncentrácie dusíkatých látok s treonínom výrazne redukovali expresiu MUC2 (Emadinia a kol., 2020).

Zastúpenie a pomer neutrálnych a kyslých mucínov je dôležitý pre ochranu črevnej bariéry. Experiment na potkanoch bez prítomnosti fekálnej pasáže v hrubom čreve poukázal na výrazné zníženie množstva neutrálneho mucínu, a to bez ohľadu na trvanie pokusu (6, 12, 18 týždňov). V hrubom čreve s fekálnou pasážou sa zvýšilo množstvo mucínov za 6 týždňov a ich množstvo sa stabilizovalo po 12 týždňoch. Výrazné zníženie celkového množstva neutrálnych mucínov bolo detegované v segmentoch bez fekálnej pasáže v porovnaní so vzorkami s prechodom fekálií. Toto zistenie možno vysvetliť zníženou expresiou neutrálnych mucínov v segmentoch bez fekálneho toku kvôli absencii intraluminálneho obsahu, modifikovanou kolonizáciou baktériami, redukovanou hrúbkou sliznice hrubého čreva a proliferáciou krýpt (Martinez a kol., 2010).

Podobný experiment sa uskutočnil na potkanoch po aplikácii sukralfátu, cytoprotektíva, ktorý sa používa na prevenciu a liečbu horného tráviaceho traktu. Nedávno sa zistil jeho stimulačný efekt na produkciu hlienu a zvýšenie hladiny prostaglandínov a epidermálneho rastového faktoru. Ukázalo sa, že podávanie sukralfátu zvyšuje tvorbu kyslých mucínov horného tráviaceho traktu (Bonassa a kol., 2015).

Okrem diéty na expresiu hlienových mucínov vplýva aj vek a pohlavie. Pevná vrstva hlienu adherovaného na stenu čreva u starších potkanov je tenšia (10 μm) než u mladších (20 – 25 μm) a je ovplyvnená aj pohlavím. Bolo zistené, že u samíc v hrubom čreve bola sliznica pokrytá hrubšou vrstvou hlienu. Pokles hrúbky hlienu s vekom je dostatočný na to, aby umožnil kontakt medzi epitelom a mikrobiotou u oboch pohlaví. Tento fenomén sa vysvetľuje zníženou reguláciu génov MUC a syntézy hlienu. Nebol zaznamenaný rozdiel v expresii MUC génov v ileu u starých a mladých myší oboch pohlaví. V hrubom čreve bola expresia MUC1 významne nižšia u starých samcov. U starých samíc bola vyššia tendencia expresie MUC6 (Elderman a kol., 2017).

Levkut a kol. (2009) študovali vplyv veku kurčiat na množstvo hlienu na 2., 3., 4., 8. a 22. deň života v štyroch úsekoch čreva (*duodenum, jejunum, ileum, caecum*). V duodéne bolo množstvo hlienu najvyššie na 22. deň veku. Na 8. deň boli najvyššie merané hodnoty v jejune, ileu a céku v porovnaní s ostatnými dňami. Sekrécia hlienu pravdepodobne súvisí s prítomnosťou a množstvom pohárikových buniek, vývojom imunity v postnatálnom období a s iritáciou črevného traktu krmivom (Uni a kol., 2003).

ZÁVER

Črevná hlienová vrstva predstavuje komplex, ktorý sa dynamicky mení v závislosti od vonkajších a vnútorných faktorov. Kvantitatívne alebo kvalitatívne zmeny v produkcii a sekrécii hlienu ovplyvňujú jeho ochranné funkcie v závislosti od veku, pohlavia, diéty, fyziologických a patologických stavov. Pochopenie efektu modulácie za rôznych podmienok nám objasní funkčné mechanizmy, ktoré by sme mohli využiť v hľadaní metód prospešných pre ochranu zdravia.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia vznikla s finančnou podporou projektu VEGA č. 1/0554/21.

ZOZNAM LITERATÚRY

Alves, A. J. T. Jr., Pereira, J. A., Pansani, A. H. C., Magro, D. O., Coy, C. S. R., Martinez, C. A. R.: Tissue sulfomucin and sialomucin content in colon mucosa without intestinal transit subjected to intervention with Curcuma longa (curcumin). *Acta Cirúrgica Brasileira*, 2017, 32 (3), 182 – 193.

Andrianifahanana, M., Moniaux, N., Barta, S. K.: Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1765 (2), 189 – 222.

Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., Holm, L.: The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2001, 280 (5), G922 – G929.

Bansil, R., Turner, B. S.: The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018, 124, 3 – 15.

Behera, S. K., Praharaj, A. B., Dehury, B., Negi, S.: Exploring the role and diversity of mucins in health and disease with special insight into non-communicable diseases. *Glycoconjugate Journal*, 2015, 32 (8), 575 – 613.

Birchenough, G. M. H., Johansson, M. E. V., Gustafsson, J. K., Bergström, J. H., Hannson, G. C.: New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunology*, 2015, 8 (4), 712 – 719.

Bonassa, C. E. G., Pereira, J. A., Marxssael de Campos, F. G. C., Rodrugues, M. R., Sato, D. T., Chaim, F. D. M., Martinez, C. A. R.: Tissue content of sulfomucins and sialomucins in the colonic mucosa, without fecal stream, undergoing daily intervention with sucralfate. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 2015, 30 (5), 328 – 338.

Brockhausen, I., Stanley, P.: Chapter 10 – O-GalNAc Glycans. In Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart., G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H. *Essentials of Glycobiology*, 3rd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Bookshelf ID: NBK453058. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453030/. Published online 2017, Accessed 12, October.

Čapkovičová, A., Maková, Z., Piešová, E., Alves, A., Faix, Š., Faixová, Z.: Evaluation of the effects of Salvia officinalis essential oil on plasma biochemistry, gut mucus and quantity of acidic and neutral mucins in the chicken gut. *Acta Veterinaria-Beograd*, 2014, 64 (1), 138 – 148.

Čapkovičová, A., Maková, Z., Piešová, E., Faix, Š., Alves, A., Faixová, Z.: Evaluation of effects of *Thymus vulgaris* extract on metabolism and gut mucus in chicks. *Folia Veterinaria*, 2012, 56 (1), 21 – 27.

Elderman, M., Sovran, B., Hugenholtz, F., Graversen, K., Huijskes, M., Houtsma, E., Belzer, C., Boekschoten, M., de Vos, P., Dekker, J., Wells, J., Faas, M.: The effect of age on the intestinal mucus thickness, mikrobiota composition and immunity in relation to sex in mice. *Plos One*, 2017. https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0184274. Published online September, 12, 2017. Accessed November, 11, 2020.

Emadinia, A., Toghyani, M., Froroozandeh,

A. D., Tabeidian, S. A., Ostadsharif, M.: Growth performance, jejunum morphology and mucin-2 gene expression of broiler Japanese quails fed low-protein diets supplemented with threonine. *Italian Journal of Animal Science*, 2020, 19 (1), 667 – 675.

Gamblin, D. P., Scanlan, E. M., Davis, B. G.: Glycoprotein synthesis: An update. *Chemical Reviews*, 2009, 109 (1), 131 – 163.

Gomorod, V., Fitchette, A. C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D., Faye, L.: Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, 8 (5), 564 – 587.

Hang, H. C., Bertozzi, C. R.: The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2005, 13 (17), 5021 – 5034.

Hansson, G. C.: Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Current Opinion in Microbiology*, 2012, 15 (1), 57 – 62.

Herich, R., Levkut, M.: Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Veterinární Medicína*, 2002, 47 (6), 169 – 180.

Johansson, M. E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G. C.: The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, 105 (39), 15 064 – 15 069. https://www.pnas.org/content/105/39/15064.long. Accessed October, 30, 2020.

Kluková, Ľ., Bertók, T., Tkáč, J.: Glykomika ako nástroj na diagnostiku rôznych chorôb [Glycomics as a tool for diagnosis of various diseases]. *Chemické Listy*, 2014, 108 (10), 942 – 948.

Levkut, M. jr., Faixová, Z., Maková, Z., Piešová, E., Revajová, V.: The influence of Salmonella infection and sage extract on production of mucin in the intestin of chickens. *Folia Veterinaria*, 2009, 53 (1), 50 – 52.

Levkut, M. jr., Revajová, V., Lauková, A., Ševčíková, Z., Spišáková, V., Faixová, Z., Levkutová, M., Strompfová, V., Pistl, J., Levkut, M.: Leukocytic responses and intestinal mucin dynamics of broilers protected with *Enterococcus faecium* EF55 and challanged with Salmonella enteritidis. *Research in veterinary science*, 2012, 93 (1), 195 – 201.

Levkut, M., Pistl, J., Revajová, V., Herich, R., Faixová, Z. a kol.: *Črevná bariéra zvierat a alternatívne metody jej ovplyvnenia* [Animal intestinal barrier and atternative methods of its affecting]. Košice: *Edičné stredisko UVLF*, 2009, 31 – 39.

Lieberman, M., Peet, A.: Chapter 27 – Pentose phosphate pathway and the synthesis of glycosides, lactose, glycoproteins, and glycolipids. In Lieberman, M., Peet, A. *Marks Basic medical biochemistry. A clinical Approach*. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2018. 1188 – 1238.

Linden, S. K., Sutton, P., Karlsson, N. G., Korolik, V., McGuckin, M. A.: Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunology*, 2008, 1 (3), 183 – 197.

Major, P., Revajová, V., Levkut, M. jr., Ševčíková, Z., Spišáková, V., Faixová, Z., Levkutová, M., Kožárová, I., Goldová, M., Levkut, M.: Intestinal mucin dynamic and leukocytic responses of chickens infected with *Eimeria acervulina* and fed oregano supplemented diet. *Acta Veterinaria Brno*, 2011, 80 (2), 147 – 156.

Maková, Z., Faixová, Z., Tarabová, L., Piešová, E., Venglovská, K., Čobanová, K., Grešáková, Ľ., Faix, Š.: Effects of different diatary manganese sources on thickness of mucus layer and selected biochemical and haematological indicators in sheep. *Acta Veterinaria Brno*, 2018, 87 (4), 351 – 356.

Martinez, C. A. R., Nonose, R., Spadari, A. P. P., Máximo, F. R., Priolli, D. G., Pereira, J. A., Margarido, N. F.: Quantification by computerized morphometry of tissue levels of sulfomucins and sialomucins in diversion colitis in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 2010, 25 (3), 231 – 240.

McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P., Florin, T. H.: Mucin dynamics and enteric patho-

gens. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9 (4), 265 – 278.

Nikumbh, R. D., Nikumbh, D. B., Umarji, B. N.: Mucin histochemical study of the colon in normal and malignant lesions. *International Journal of Health Sciences and Research*, 2012, 2 (7), 20 – 32.

Piešová, E., Faixová, Z., Maková, Z., Venglovská, K., Grešáková, Ľ., Faix, Š., Čobanová, K.: Effects of dietary manganese on antioxidant status, biochemical parameters and thickness of intestinal mucus in laying hens. *Czech Journal of Animal Science*, 2019, 64 (3), 99 – 106.

Stanley, P., Taniguchi, N., Aebi, M.: Chapter 9 – N-glycans. In Varki, A. Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart., G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H. *Essentials of Glycobiology*. 3rd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Bookshelf ID: NBK453058. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453020/ Published online 2017, Accessed October, 12, 2020.

Stropmfová, V., Lauková, A.: *In vitro* study on bacteriocin of enteroccoci associated with chickens. *Anaerobe*, 2007, 13 (5 – 6), 228 – 237.

Szabóová, R., Faixová, Z., Maková, Z., Piešová, E.: The difference in the mucus organization between the small and large intestine and its protection of selected natural substances. A review. *Folia Veterinaria*, 2018, 62 (4), 48 – 55.

Tarabová L., Maková, Z., Piešová, E., Szabóová, R., Faixová, Z.: Intestinal mucus layer and mucins (A review). *Folia Veterinaria*, 2016, 60 (1), 21 – 25.

Thim, L., Madsen, F., Poulsen, S. S.: Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *European Journal of Clinical Investigation*, 2002, 32 (7), 519 – 527.

Tsirtsikos, P., Fegeros, K., Kominakis, A., Balaskas, C., Mountzouris, K. C.: Modulation of intestinal mucin composition and mucosal morphology by dietary phytogenic inclusion level in broilers. *Animal*, 2012, 6 (7), 1049 – 1057.

Uni, Z., Smirnov, A., Sklan, D.: Pre and postnatal development of goblet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. *Poultry Science*, 2003, 82 (2), 320 – 327.

Zeinali, S., Ghazanfari, S., Ebrahimi, M. A.: Mucin2 gene expression in the chicken intestinal goblet cells are affected by dietary essential oils. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2017, 23 (1), 134 – 141.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 1: 93 – 100, 2021

OBSAH CELKOVÝCH POLYFENOLOV A ANTIRADIKÁLOVÁ AKTIVITA PLODOV *ARONIA MELANOCARPA* (MICHX.) ELLIOTT

TOTAL POLYPHENOL CONTENT AND ANTIRADICAL FRUIT ACTIVITY OF *ARONIA MELANOCARPA* (MICHX.) ELLIOTT

Lehotská, Viktória; Eftimová, Jarmila

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

jarmila.eftimova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Cieľom predloženej štúdie bolo stanoviť obsah celkových polyfenolov a antiradikálovú aktivitu extraktov vzorky plodov arónie čiernoplodej (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott. Plody odrody „Nero“ boli dopestované v pôdnoklimatických podmienkach Košice-okolie (SR) a zbierané v roku 2019. Spektrofotometrickou metódou pomocou Folin-Ciocalteuovho činidla sme namerali vo vodnom extrakte arónie čiernoplodej obsah celkových polyfenolov 1137,5 µg.100g^{-1} suchých plodov, prepočítaných na kvercetín. Antiradikálová aktivita metanolových extraktov arónie čiernoplodej stanovená ako % redukcie DPPH bola 16,9 % ± 0,46 %. Obsah polyfenolických látok, ktoré sa podieľajú na antiradikálovej aktivite vzorky, ovplyvňuje hlavne odroda, agroekologické podmienky pestovania, príprava vzorky, extrakčný proces a rozpúšťadlo. Na základe dosiahnutých výsledkov odporúčame v experimente aj naďalej pokračovať a overiť rôzne spôsoby prípravy vzoriek, použitie rôznych extrakčných činidiel a spôsoby extrakcie. Plody arónie čiernoplodej patria k prírodným zdrojom antioxidantov a môžu sa užívať na prevenciu pred vznikom ochorení spôsobených oxidačným stresom.

Kľúčové slová: antioxidačná aktivita; arónia čiernoplodá; celkové polyfenoly; oxidačný stres

ABSTRACT

The aim of the presented study was to determine the content of total polyphenols and the anti-

radical activity of extracts of a sample of black chokeberry fruit (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott. The fruits of the „Nero“ variety were grown in the soil-climatic conditions of Košice-okolie (SR) and harvested in 2019. Using the spectrophotometric method using the Folin-Ciocalteu reagent, we measured the content of total polyphenols in the aqueous extract of chokeberry black fruit 1137.5 µg.100g-1 of dry fruit, converted to quercetin. The antiradical activity of methanolic extracts of black chokeberry aronia determined as % reduction in DPPH was 16.9 % ± 0.46 %. The content of polyphenolic substances that are involved in the antiradical activity of the sample mainly affects the variety, agroecological growing conditions, sample preparation, extraction process, and solvent. Based on the results obtained, we recommend continuing the experiment and verifying the different methods of sample preparation, the use of different extraction reagents and extraction methods. Black chokeberry fruits are natural sources of antioxidants and can be used to prevent diseases caused by oxidative stress.

Key words: antioxidant activity; chokeberry aronia; oxidative stress; total polyphenols

ÚVOD

Rastliny rodu *Aronia* nepatria medzi pôvodné rastlinné druhy Slovenska a v Európe sa začali pestovať až v 19 storočí. Sú to opadavé kríky, ktoré voľne rastú vo východnej časti Severnej Ameriky a východnej Kanady. Botanicky ich zatrieďujeme do radu *Rosales*, čeľaď *Rosaceae,* druh *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott – arónia čiernoplodá a *Aronia arbutifolia* (L.) Elliott – arónia jahodovolistová. Na Slovensku sa pestuje aj hybrid *Aronia prunifolia* – arónia slivkolistá, kríženec arónie čiernoplodej a arónie jahodovolistovej (Juríková a kol., 2017). Kríky dorastajú do výšky 2 – 3 m, kvety sú biele, usporiadané do okolíkov, kvitnú v máji až júni. Plody sú červené až fialovo-čierne malvice, veľké v priemere 6 – 13 mm (Werner a kol., 2019). Čerstvé plody sú horkej a trpkej chuti, čo spôsobuje prítomnosť amygdalínu, kyanogénných glykozidov a tanínov (Tolić a kol., 2015; Šnebergrová a kol., 2014). Zelené a nedozreté plody majú vysoký obsah prokyanidínov, flavonoidov a vykazujú vyššiu antioxidačnú aktivitu ako zrelé (Gralec a kol., 2019). Za antioxidačné a liečivé účinky sú zodpovedné fenolické látky (antokyány, flavonoly, flavanoly, proantokyanidíny a fenolové kyseliny) (Oszmiański, Lachowicz, 2016; Tolić a kol., 2017). Z antokyánov sú v plodoch prítomné 3-O-galaktozid, 3-O-glukozid, 3-O-arabinozid a 3-O-xylozid cyanidínu. Z fenolových kyselín je to kyselina chlorogénová a neochlorogénová (Tolić a kol., 2015; Denev a kol., 2019). V malom množstve sú prítomné flavonoly a flavan-3-oly ako deriváty kvercetínu (kvercetín-3-glukozid, 3-galaktozid, 3-rutinozid, 3-robinobiozid, 3-vicianozid), isorhamnetin 3-galaktozid, 3-glukozid, 3-neohesperidozid, 3-rutinozid, myricetín a kemferol 3-galaktozid a 3-glukozid (Tian a kol., 2017). Šťava z plodov arónie obsahuje veľa draslíka a zinku (Juríková a kol., 2017). Nachádzajú sa v nej vitamíny B_1, B_2, B_6, kyselina pantoténová, niacín, vitamín C a *β*-karotén a asparagín.

Cieľom experimentálnej štúdie bolo stanoviť antiradikálovú aktivitu metanolových extraktov plodov arónie čiernoplodej metódou DPPH a stanoviť obsah celkových polyfenolov pomocou Folin-Ciocalteuovho činidla.

MATERIÁL A METÓDY

Vzorky arónie čiernoplodej

V experimentálnej časti boli použité homogenizované sušené plody arónie čiernoplodej odrody „Nero“ zberané v roku 2019, ktoré boli pestované v pôdnych a klimatických podmienkach Sady nad Torysou (Košice okolie). Po vysušení boli plody rozpráškované pomocou elektrického mlynčeka a následne boli pripravené extrakty.

Príprava extraktov na stanovenia

Do suchej Erlenmeyrovej banky sme navážili 0,1 g suchej homogenizovanej vzorky plodov arónie čiernoplodej. Ako extrakčné činidlá sme použili 50 ml metanolu pre stanovenie antioxidačnej aktivity a 50 ml destilovanej vody pre stanovenie celkových polyfenolov. Takto pripravené vzorky sme extrahovali v ultrazvukom kúpeli (Kraintek 18, Slovensko) po dobu 1 hod. Po uplynutí stanoveného času sme zmes prefiltrovali do 50 ml odmernej banky a straty metanolu/destilovanej vody spôsobené odparením počas extrakcie a filtrácie sme doplnili metanolom/destilovanou vodou na objem 50 ml.

Stanovenie antioxidačnej aktivity DPPH metódou

Roztok DPPH radikálu 0,06 mmol.dm^{-3} sme si pripravili rozpustením 2,25 mg difenylpikrylhydrazylu (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) v 100 ml metanolu. Porovnávací roztok DPPH sme pripravili zmiešaním 30 µl metanolu a 900 µl roztoku DPPH radikálu. Potom sme zmerali absorbanciu porovnávacieho roztoku (A_{DPPH}) pri vlnovej dĺžke $\lambda = 517$ nm, pričom hodnota absorbancie vypovedala o 100 % prítomnosti radikálu DPPH. Rovnakým postupom sme pripravili rastlinné extrakty, zmiešali 30 µl extraktu arónie a 900 µl roztoku DPPH radikálu. Roztok sme nechali inkubovať 3 minúty a následne sme odmerali absorbanciu ($A_{extrakt}$). Výsledky meraní boli vyjadrené ako percento redukcie (inhibície) DPPH podľa vzťahu:

$$\textbf{antioxidačná aktivita } (\%) = 100 - (A_{extrakt} / A_{DPPH} \times 100)$$

$A_{extrakt}$ – absorbancia extraktu po 3 minútach
A_{DPPH} – absorbancia roztoku DPPH

U zmesových látok sa antiradikálová aktivita vyjadruje v jednotkách štandardu Troloxu. Spolu so vzorkami sme merali absorbanciu pripravených štandardov Troloxu pre zostrojenie kalibračnej závislosti. Na jej základe sme prepočítali antiradikálovú aktivitu vyjadrenú na Trolox.

Stanovenie obsahu celkových polyfenolov Folin-Ciocalteuovou metódou

Kvôli lepšej viditeľnosti farebnej zmeny a reakcie sme vzorku 5x riedili. Do 25 ml odmernej banky sme napipetovali 5 ml vodného extraktu arónie a doplnili po rysku vodou. Riedenie vzorky sme zohľadnili pri výpočtoch. Z roztoku sme následne odpipetovali 2 ml, pridali sme 1,0 ml Folin-Ciocalteuovho činidla a 17 ml 20 % roztoku Na_2CO_3. Po 2 minútach od pridania posledného činidla sme merali absorbanciu roztoku vzorky pomocou spektrofotometra (UV-VIS Beckman DU 530, USA) pri vlnovej dĺžke $\lambda = 750$ nm.

Spolu so vzorkami sme merali aj pripravené štandardy kvercetínu pre zostrojenie kalibračnej závislosti. Na jej základe sme prepočítali obsah celkových polyfenolov vyjadrených ako ekvivalent kvercetínu Q/l vzorky.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Stanovenie antioxidačnej aktivity DPPH

Z nameraných údajov absorbancií sme zostrojili tabuľku, v ktorej sme vyhodnotili absorbancie extraktu a DPPH (viď tab. 1). Pomocou vzorca vyjadrujúceho % inhibície DPPH radikálu sme vyhodnotili antiradikálovú aktivitu. Priemerná inhibícia DPPH radikálu bola 16,9 % ± 0,46 % (viď tab. 2). Táto redukcia sa však vzťahuje na 50 ml extraktu obsahujúceho 0,1 g sušenej drogy.

Antiradikálová aktivita metanolových extraktov arónie čiernoplodej stanovená ako % redukcie DPPH bola 16,9 % ± 0,46 %. K podobným výsledkom dospeli Hudec a kol. (2009), ktorí namerali u extraktov arónie čiernoplodej nízku antiradikálovú aktivitu (16,49 %). Naše výsledky sú nižšie ako sú prezentované v literatúre. Tieto rozdiely môžu byť zapríčinené tým, že sme nepoužili vhodnú metódu sušenia a prípravy vzorky, vhodné extrakčné činidlo a extrahovali sme nedostatočne dlhú dobu. V našej štúdii bol využívaný extrakt zo sušených plodov arónie čiernoplodej, pričom autori využívali predovšetkým čerstvú šťavu, výlisky či mrazené plody (Jakobek a kol., 2007; Tolić

Tab. 1: Vyhodnotenie absorbancií extraktu + DPPH

Vzorka	Absorbancia pri λ= 517 nm			Priemer	Smerodajná odchýlka	Min.	Max.
	1. meranie	2. meranie	3. meranie				
arónia čiernoplodá	0,105	0,105	0,104	0,105	0,0006	0,104	0,105
metanol + DPPH	0,126	0,126	0,126	0,126	0	0,126	0,126

Tab. 2: Vyhodnotenie antiradikálovej aktivity plodov arónie

Vzorka	Redukcia DPPH (%)			Priemer	Smerodajná odchýlka	Min.	Max.
	1. meranie	2. meranie	3. meranie				
arónia č. plod	16,666	16,666	17,460	16,931	0,4584	16,666	17,460

Tab. 3: Vyhodnotenie absorbancií vodného roztoku arónie čiernoplodej

	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Priemerná hodnota
Vodný extrakt arónia čiernoplodá	0,180	0,185	0,186	0,184

a kol., 2015; Thi, Hwang, 2016; Dedić a kol., 2019).

Martinková (2019) uvádza, že na množstvo vyextrahovaných látok s antioxidačnou aktivitou významne vplýva objem extrakčného činidla pri extrakcii. Zistila, že najvhodnejším extrakčným činidlom bol etanol-voda v pomere 1:1 s množstvom 60 ml. V extrakte zo sušených výliskov pri množstve 60 ml extrakčného činidla etanol-voda bola stanovená antioxidačná aktivita na 0,66 ± 0,005 mmol.l^{-1} TEAC a v extrakte z práškových výliskov bola stanovená aktivita na 1,11 ± 0,04 mmol.l^{-1} TEAC. U oboch foriem výliskov s použitím extrakčného činidla s množstvom 100 ml stanovila antioxidačnú aktivitu na 0,45 ± 0,01 mmol.l^{-1} TEAC.

Stanovenie obsahu celkových polyfenolov Folin-Ciocalteuovou metódou

Koncentráciu celkových polyfenolov vo vodnom extrakte arónie sme prepočítali pomocou kalibračnej krivky na štandard kvercetín. Z tabuľky 3 vyplynulo, že vodný roztok arónie mal absorbanciu 0,184.

Na základe rovnice kalibračnej priamky y = 2,8x + 0,0566 (R^2 0,9364) bola vypočítaná koncentrácia našej vzorky x = 0,0455 µg.ml^{-1} pri nameranej absorbancii 0,184. Keďže sme vzorku 5-násobne riedili, museli sme výsledok vynásobiť piatimi a získali sme hodnotu 0,2275 µg.ml^{-1} (0,1 g sušených plodov/50 ml extraktu). Výslednú hodnotu sme prepočítali na 1 g vzorky arónie čiernoplodej odrody „Nero“ a dostali sme celkový obsah polyfenolov 11,37 µg.g^{-1} alebo 1137,5 µg.100g^{-1} suchých plodov prepočítaných na kvercetín.

Juriková a kol., (2017); Ćujić a kol. (2016) tak isto ako my analyzovali odrodu „Nero“ a stanovili celkový obsah polyfenolov v rozmedzí 3440 – 3760 mg.100g^{-1} sušiny. Naše výsledky sú nižšie ako uvádzajú autori.

Ochmian a kol. (2012) namerali u odrody „Hugist“ celkový obsah polyfenolov 23,4 mg GAE.g^{-1} FW (na g hmotnosti čerstvého ovocia). U odrody „Aron“ bola

detegovaná najnižšia hodnota celkových polyfenolov (15,86 mg GAE. g^{-1} FW).

Obsah celkových polyfenolov bobúľ rôzneho druhu ovocia závisí od genetických vlastností (genotyp, odroda), podmienok pestovania (pestovateľsky región, poveternostné podmienky, kultivačné techniky, štádium zrelosti), spracovania a skladovania (Jakobek, 2012; Wangensteen a kol., 2014).

Pri porovnávaní arónie čiernoplodej s čučoriedkami, malinami, červenou ríbezľou, jahodami a černicami bol nameraný najvyšší obsah celkových polyfenolov v rozmedzí 690 –2560 mg ekvivalentov kyseliny gálovej (GAE) v 100 g FW (Benvenuti a kol., 2004; Jakobek a kol., 2007; Rop a kol., 2010).

Hupková (2011) stanovila celkový obsah polyfenolov vo vzorke arónie čiernoplodej 1435,4 mg.kg^{-1} vzorky. Skoczyňska a kol. (2007) namerali v extraktoch z výliskov arónie čiernoplodej celkový obsah polyfenolov v rozmedzí 5040 – 6280 mg GAE.100g^{-1} DW, čo je v súlade s hodnotami, ktoré sa uvádzajú v literatúre (3440 – 7465 mg GAE.100g^{-1}).

Hudec a kol. (2009) stanovili v arónii čiernoplodej obsah celkových polyfenolov 78,16 mg.l^{-1} prepočítaných na tanín.

Pri porovnávaní našich výsledkov (1137,5 µg.100g^{-1}) prepočítaných na kvercetín s dostupnou literatúrou sme zistili, že autori najčastejšie robili prepočty celkového obsahu polyfenolov na kyselinu galovú a iné merné jednotky. Na extrakciu používali iné formy arónie ako my (výlisky, šťavu,) ale aj iné extrakčné činidlá a spôsoby extrakcie (Jakobek a kol., 2007; Dedić a kol., 2019).

Na obsah polyfenolických látok v extraktoch má rozhodujúci vplyv extrakčný proces, rozpúšťadlo a jeho koncentrácia, hodnota pH, veľkosť častíc rastlinného materiálu, čas extrakcie. Optimálne podmienky pre extrakciu boli vytvorené pri macerácii bobúľ veľkosti 0,75 mm s 50 % etanolu, s pomerom tuhých látok a rozpúšťadiel 1:20 (Ćujić a kol., 2016; Jurikova a kol., 2017). Taktiež Martinková (2019) zistila, že extrakčné činidlo etanol-voda v pomere 1:1 s množstvom 60 ml je najoptimálnejšie činidlo pre extrakciu polyfenolických látok z aróniových výliskov.

K najdôležitejších polyfenolov arónie čiernej patria fenolové kyseliny a flavonoidy, ako sú antokyány, flavanoly, flavonoly a proantokyanidíny. Najvýznamnejšie fenolové zlúčeniny boli identifikované zo skupiny fenolových kyselín, hydroxyškoricových kyselín, najmä kyseliny neochlórogénovej, z antokyánov to boli kyanidín-3-galaktozid a kyanidín-3-arabinozid; z proantokyanidínov prokyanidín B_1, flavanoly (epikatechín) a flavonoly (hlavne glyceridy kvercetínu) patria k minoritným zložkám plodov arónie čiernej (Jakobek a kol., 2012; Hwang a kol., 2014).

Významným prínosom plodov arónie čiernoplodej je, že obsahové látky majú antioxidačný účinok a pôsobia preventívne pri vzniku ochorení spôsobených vplyvom voľných radikálov (Gao a kol., 2018; Denev a kol., 2019). U plodov arónie čiernoplodej bola potvrdená aj schopnosť inhibovať bunkovú proliferáciu, obmedziť adhéziu a migráciu buniek, inhibovať expresiu MMP-2 a MMP-9, a taktiež zastaviť bunkový cyklus G2/M fázy (Thi, Hwang, 2018).

Taktiež bolo preukázané, že fermentovaná šťava dokáže inhibovať proliferáciu nádorových buniek prsníka a redukovať expresiu CSC markerov nádoru prsníka a cytotoxicky pôsobiť na HeLa cervikálne nádorové bunky (Choi a kol., 2018; Cvetanović a kol., 2018).

Obsahové látky v plodoch sa podieľajú na poklese ALT a AST hodnôt, pôsobia hepatoprotektívne proti vplyvu ťažkých kovov a xenobiotík (Valcheva-Kuzmanova, 2015; Kondeva-Burdina, 2015; Borowska, Brzóska, 2016). Plody pôsobia aj antidiabeticky, dochádza k poklesu hladiny glukózy, inhibície DPP-4 a ochrane β buniek pankreasu pred oxidačným stresom indukovaným H_2O_2 (Lipińska, Jóźwik, 2017; Yamane a kol., 2017). Flavonoidy arónie pôsobia kardioprotektívne, pozitívne regulujú lipidový metabolizmus a znižujú hladiny prozápalových cytokínov (Yamane a kol., 2017; Zhao a kol., 2017; Milutinović a kol., 2019; Xu a

kol., 2019). Polyfenoly významne znižujú hodnoty TAG, TC, LDL a napomáhajú predchádzať vzniku samotnej aterosklerózy (Sidor a kol., 2019; Gajic a kol., 2020). Extrakty arónie čiernoplodej inhibujú agregáciu krvných doštičiek a redukujú škodlivé účinky homocysteínu (Malinowska a kol., 2012).

ZÁVER

Plody arónie čiernoplodej patria medzi ovocie s vysokým obsahom polyfenolových zlúčenín, najmä antokyánov. Z našich výsledkov stanovenia antioxidačnej aktivity vyplýva, že sušené plody arónie čiernoplodej odrody „Nero“ disponujú antiradikálovou aktivitou a sú bohaté na polyfenoly. Vo vodnom extrakte arónie čiernoplodej sme namerali obsah celkových polyfenolov 1137,5 $\mu g.100g^{-1}$ suchých plodov, prepočítaných na kvercetín. Antiradikálová aktivita metanolových extraktov arónie čiernoplodej stanovená ako % redukcie DPPH bola 16,9 % ± 0,46 %. Obsah polyfenolov v arónii čiernoplodej závisí od odrody, stupňa zrelosti malvičiek, lokality pestovania a klimatických podmienok. Zistili sme, že je potrebné pokračovať v danom experimente, pretože obsah polyfenolických látok v extraktoch ovplyvňuje extrakčný proces, rozpúšťadlo a príprava rastlinného materiálu. Z dosiahnutých výsledkov vyplynulo, že čerstvé, sušené plody, extrakty a šťava z arónie čiernoplodej patria k zdrojom antioxidantov a môžeme ich odporučiť pre podporu zdravia. Pre užívanie arónie čiernoplodej je potrebné vykonať aj klinické štúdie, aby sa určila bezpečnosť, účinnosť a mechanizmy účinku v organizme.

ZOZNAM LITERATÚRY

Borowska, S., Brzóska, M. M.: Chokeberries (*Aronia melanocarpa*) and their products as a possible means for the prevention and treatment of noncommunicable diseases and unfavorable health effects due to exposure to xenobiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2016, 15 (6), 982 – 1017.

Benvenuti, S., Pellati, F., Melegari, M., Bertelli, D.: Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus, Ribes*, and *Aronia. J. Food Sci.*, 2004, 69 (3), 164 – 169.

Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., Ibrić, S.: Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry*, 2016, 194, 135 – 142.

Cvetanović, A., Zengin, G., Zeković, Z., Švarc-Gajić, J., Ražić, S., Damjanović, A., Mašković, P., Mitić, M.: Comparative *in vitro* studies of the biological potential and chemical composition of stems, leaves and berries *Aronia melanocarpa's* extracts obtained by subcritical water extraction. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 121, 458 – 466.

Dedić, S., Makić, H., Bakrač, A., Džaferović, A., Jogić, V.: Antioxidant activity and reduction ability of juice from aronia. In *12th International Scientific Conference on Production Engineering Development And Modernization Of Production*, 2019, 1 – 5.

Denev, P. N., Kratchanov, Ch. G., Číž, M., Lojek, A., Kratchanova, M. G.: Bioavailability and antioxidant activity of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols: *in vitro* and *in vivo* evidences and possible mechanisms of action: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2012, 11 (5), 471 – 489.

Denev, P. N., Číž, M., Kratchanova, M., Blazheva, D.: Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities. *Food Chemistry*, 2019, 284, 108 – 117.

Gajic, D., Saksida, T., Koprivica, I., Vujicic, M., Despotovic, S., Savikin, K., Jankovic, T., Stojanovic, I.: Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruit extract modulates immune response *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Functional Foods*, 2020, 66, 1 – 12.

Gao, N., Wang, Y., Jiao, X., Chou, S., Li, E., Li, B.: Preparative purification of polyphenols from *Aronia melanocarpa* (chokeberry) with cellu-

lar antioxidant and antiproliferative activity. *Molecules*, 2018, 23 (1), p. 139.

Gralec, M., Wawer, I., Zawada, K.: *Aronia melanocarpa* berries: phenolics composition and antioxidant properties changes during fruit development and ripening. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2019, 31 (3), 214 – 221.

Hudec, J., Kochanová, R., Burdová, M., Kobida, L., Kogan, G., Turianica, I., Chlebo, P., Hanácková, E., Slamka, P.: Regulácia fenolického profilu bobúľ môže zvýšiť ich antioxidačnú aktivitu [Regulation of the phenolic profile of berries can increase their antioxidant activity]. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 2022 – 2029.

Hwang, S. J., Yoon, W. B., Lee, O.-H., Cha, S. J., Dai Kim, J.: Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated Korea. *Food Chem.*, 2014, 146, 71 – 77.

Choi, H. S., Kim, J. H., Kim, S. L., Deng, H. Y., Lee, D., Kim, C. S., Yun, B. S.; Lee, D. S.: Catechol derived from aronia juice through lactic acid bacteria fermentation inhibits breast cancer stem cell formation via modulation stat3/IL-6 signaling pathway. *Molecular Carcinogenesis*, 2018, 57 (11), 1467 – 1479.

Jakobek, L., Šeruga, M., Kosanovič, M., Novak, I.: Antioxidant activity and polyphenols of *Aronia* in comparison to the berry species. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 2007, 72 (4), 301 – 306.

Jakobek, L., Drenjančević, M., Jukić, V., Šeruga, M.: Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of "Nero", „Viking", „Galicianka" and wild chokeberries. *Sci. Horticult.*, 2012, 147, 56 – 63.

Juriková, T., Mlcek, J., Škrovanková, S., Sumczynski, D., Sochor, J., Hlaváčová, I., Snopek, L., Orsavová, J.: Fruits of black chokeberry *Aronia melanocarpa* in the prevention of chronic diseases. *Molecules*, 2017, 22 (6), 2 – 3.

Kondeva-Burdina, M., Valcheva-Kuzmanova, S., Markova, T., Mitcheva, M., Belcheva, A.: Effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice on isolated rat hepatocytes. *Pharmacognosy Magazine*, 2015, 11 (4), 592 – 597.

Lipińska, P., Jóźwik, A.: Hepatoprotective, hypoglycemic, and hypolipidemic effect of chokeberry pomace on Polish Merino lambs. *Animal Biotechnology*, 2017, 29 (4), 1 – 6.

Malinowska, J., Babicz, K., Olas, B., Stochmal, A., Oleszek, W.: *Aronia melanocarpa* extract suppresses the biotoxicity of homocysteine and its metabolite on the hemostatic activity of fibrinogen and plasma. *Nutrition*, 2012, 28 (7 – 8), 793 – 798.

Martinková, P.: *Extrakce anthokyanových barviv z aroniových výlisků* [Extraction of anthocyanin dyes from the chokeberry moldings], 2018, DP- FCH-Dip1225/2017. Brno: VUT, FCH, Ústav Chemie potravin a biotechnologií. https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=170318. [cit. 15.2.2021].

Milutinović, M., Branković, S., Šaviki, K., Zdunić, G., Kostić, M., Miladinović, B., Kitić, D.: Hypotensive and antioxidant effects induced by polyphenol rich black chokeberry (*Aronia Melanocarpa* (Michx. Elliot) juice. *Acta Medica Medianae*, 2019, 58 (2), 70 – 76.

Ochmian, I., Grajkowski, J., Smolik, M.: Comparison of some morphological features, quality and chemical content of four cultivars of chokeberry fruits (*Aronia melanocarpa*). *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca*, 2012, 40, 253 – 260.

Oszmiański, J., Lachowicz, S.: Effect of the production of dried fruits and juice from chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the content and antioxidative activity of bioactive compounds. *Molecules*, 2016, 21 (1098), 1 – 14.

Rop, O., Mlcek, J., Jurikova, T., Valsikova, M., Sochor, J., Rezníček, V., Kramárová, D.: Phenolic content, antioxidant capacity, radical oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibiting activities of extracts of five black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) cultivars. *J. Med. Plants Res.*, 2010, 22, 2432 – 2437.

Sidor, A., Drozdzyńska, A., Gramza-Michalowska, A.: Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and its products as potential health-promoting factors – An overview. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 89, 45 – 60.

Skoczyñska, A., Jędrychowska, I,, Poręba, R., Turczyn, B., Wojakowska, A., Andrzejak R.: Influence of chokeberry juice on arterial bloodpressure and lipid parameters in menwith mild hypercholesterolemia. *Pharmacological Reports*, 2007, 59 (1), 177 – 182.

Šnebergrová, J., Čížková, H., Neradová, E., Kapci, B., Rajchl, A., Voldřich, M.: Variability of characteristic components of aronia. *Czech Journal of Food Sciences*, 2014, 32 (1), 25 – 30.

Thi, N. D., Hwang, E. S.: Effects of black chokeberry extracts on metastasis and cell-cycle arrest in SK-Hep1 human liver cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2018, 8 (6), 285 – 291.

Thi, N. D., Hwang, E.-S.: Effects of drying methods on contents of bioactive compounds and antioxidant activities of black chokeberries (*Aronia melanocarpa*). *Food Science and Biotechnology*, 2016, 25 (1), 55 – 61.

Tian, Y., Liimatainen, J., Alanne, A.-L., Lindstedt, A., Liu, P., Sinkkonen, J., Kallio, H., Yang, B.: Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food Chemistry*, 2017, 220, 266 – 281.

Tolić, M. T., Jurčević, I. L., Krbavčić, I. P., Marković, K., Vahčić, N.: Phenolic content, antioxidant capacity and quality of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *Food Technology and Biotechnology*, 2015, 53 (2), 171 – 179.

Tolić, M., T., Krbavčić, I. P., Vujević, P., Milinović, B., Jurčević, I. L., Vahčić, N.: Effects of weather conditions on phenolic content and antioxidant capacity in juice of chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2017, 67 (1), 67 – 74.

Valcheva-Kuzmanova, S.: Comparative study of the protective effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice and quercetin in a model of paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Biomedical and Clinical Research*, 2015, 8 (2), 118 – 123.

Wangensteen, H., Bräunlich, M., Nikolic, V., Malterud, K. E., Slimestad, R., Barsett, H.: Anthocyanins, proanthocyanidins and total phenolics in four cultivars of *Aronia*: Antioxidant and enzyme inhibitory effects. *J. Funct. Foods*, 2014, 7, 746 – 752.

Werner, M. R., Winterhalter, P., Esatbeyoglu, T.: Phenolic composition, radical scavenging activity and an approach for authentication of *Aronia melanocarpa* berries, juice, and pomace. *Journal of food science*, 2019, 84 (7), 1791 – 1798.

Xu, D., Yang, J., Yu, W., Wei, J.: Anthocyanins from black chokeberry delayed ageing-related degenerative changes in the heart. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2019, 53 (1), 112 – 116.

Yamane, T., Kozuka, M., Imai, M., Yamamoto, Y., Ohkubo, I., Sakamoto, T., Nakagaki, T., Nakano, Y.: Reduction of blood pressure by aronia berries through inhibition of angiotensin converting enzyme activity in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Functional Foods in Health and Disease*, 2017, 7 (4), 280 – 290.

Zhao, C.-N., Meng, X., Li, Y., Li, S., Liu, Q., Tang, G.-Y., Li, H.-B.: Fruits for prevention and treatment of cardiovascular diseases. *Nutrients*, 2017, 9 (6), p. 598.

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** alebo **zuzana.holeckova@uvlf.sk**. Ak rukopis nespĺňa pokyny pre autorov, redakčná rada si vyhradzuje právo vrátiť rukopis autorom pred jeho posúdením recenzentmi.

Pri písaní príspevku (včítane grafov, tabuliek a pod.) je potrebné zachovávať jednotný štýl a formát práce (**Times New Roman**, veľkosť písma 12 bodov, riadkovanie 1,5, okraje 2,5 cm, zarovnanie podľa okrajov).

Pri zasielaní rukopisu autori pripájajú prehlásenie, že ich článok je pôvodný, nebol publikovaný ani zaslaný na publikáciu inde.

Ak štúdia hodnotí farmaceutický produkt, lekárske alebo vedecké zariadenie/pomôcku, alebo iný komerčný výrobok, autori informujú vydavateľa dôverným listom o akomkoľvek finančnom zainteresovaní, ktoré existuje v rámci spoločnosti, ktorá takýto produkt vyrába, alebo prípadnej konkurenčnej spoločnosti.

Používanie jednotiek. V texte sa zásadne používa medzinárodný systém jednotiek (SI). Iné jednotky je nevyhnutné vysvetliť a definovať.

Skratky a symboly. Pri voľbe fyzikálnych alebo fyzikálno-chemických symbolov je záväzný IUPAC Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units (Pergamon Press, Oxford, 1993). Používajú sa len štandardné skratky. Odporúča sa vyhýbať sa skratkám v názve a v abstrakte. Skratky by sa mali používať len pri ich častom opakovaní. Pri prvom použití skratky v texte sa pripojí jej vysvetlenie v zátvorke, pokiaľ sa

nejedná o štandardnú jednotku merania.

Názvoslovie a terminológia. V texte je potrebné používať štandardné slovenské názvoslovie v zmysle platných odporúčaní IUPAC. Detailné inštrukcie pre anglicky písaný text sa nachádzajú v publikáciách IUPAC *Brief Guide to the Nomenclature of Inorganic Chemistry IUPAC 2015, Pure App. Chem. 87, 1039-1049,* © IUPAC & De Gruyter 2015 and *Nomenclature of Organic Chemistry, IUPAC Recommendations and Preferred Names 2013,* Royal Society of Chemistry, Cambridge 2014. Je vhodné vyhnúť sa novým triviálnym názvom. Nové zlúčeniny musia byť pomenované systémovým názvoslovím podľa IUPAC.

Pri uvádzaní látok izolovaných z prírodných zdrojov sa latinsky uvedie názov zdroja (napr. rodový a druhový názov rastliny) a príslušná čeľaď. Liečivá sa uvádzajú INN názvom v slovenskej, českej, resp. v anglickej mutácii a to podľa jazyka, v ktorom je rukopis napísaný. Ak je známy liekopisný názov, tak sa uprednostní, resp. prípustné sú obidva.

Príklady: paracetamol (nie acetaminofén), bisfosfonát (nie bifosfonát), adrenalín/liekopis (nie epinefrín/INN), hydroxykarbamin (nie hydroxyurea), kromoglykán (nie chromoglykán), cholestyramín (nie colestyramín, kolestyramín), lítium (lithium), manitol (nie mannitol).

Latinské termíny sa píšu kurzívou.

V texte treba rozlišovať pojmy „liečivo“ a „účinná látka“. „Účinná látka“ je látka alebo zmes použitá ako vstupná surovina pri výrobe lieku, ktorá sa po skončení výrobného procesu lieku stane liečivom. „Liečivo“ je chemicky jednotná alebo nejednotná látka ľudského, rastlinného, živočíšneho alebo chemického pôvodu, ktorá je nositeľom biologického účinku využiteľného na ochranu pred chorobami, na diagnostiku chorôb, liečenie chorôb alebo na ovplyvňovanie fyziologických funkcií.

Pre lieky sa uvádza firemný názov a držiteľ registrácie, resp. výrobca a krajina (pri ich prvom použití), *Príklad:* Panadol Junior (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare Czech Republic s.r.o., Česká republika), IMMODIN (IMUNA PHARM, a.s., Slovensko), Azibiot (KRKA, d.d., Novo mesto, Slovinsko).

Fotografie, obrázky, grafy. Aby sa vyhlo prípadným nepresnostiam či chybám, odporúčame umiestniť fotografie, obrázky a grafy priamo do textu článku a v texte uviesť odkaz na príslušnú fotografiu, obrázok a graf, napr. (viď obr. 1). 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 (Times New Roman 10). Obrázky, fotografie a grafy majú byť orámované, priebežne očíslované a má k nim byť pripojený príslušný text týkajúci sa obsahu a prípadne aj zdroja. Číslo a text nemá byť súčasťou fotografie/obrázku/grafu. Číslo a názov obrázku, fotografie a grafu sa má umiestniť nad a príslušný text týkajúci sa obsahu a prípadne aj zdroja (legenda) sa má umiestniť pod nimi. Pri mikrofotografiách text obsahuje aj údaje o mierke a technike farbenia. Hlavné objekty, zmeny a zistenia sa v mikrofotografiách označujú šípkou alebo iným symbolom, ktorý je vysvetlený v legende.

Ak sa nejedná o vlastný obrázok/fotografiu, pre každý obrázok/fotografiu sa v legende uvádza zdroj.

Tabuľky 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 sa uvedie názov v jazyku anglickom, ktorý má byť stručný a výstižný (veľké tučné písmená, veľkosť písma 14, zarovnanie na stred). Pod názvom sa uvádzajú celé mená autorov (priezvisko, krstné meno/mená), pod nimi pracovné zaradenie autorov (inštitúcia) a štát a nakoniec e-mailová adresa prvého/korešpondujúceho autora (všetko zarovnané na stred). Pri empiricky orientovaných štúdiách je potrebné dodržať usporiadanie rukopisu do nasledovných častí: **ABSTRAKT, ÚVOD, MATERIÁL A METÓDY, VÝSLEDKY, DISKUSIA, ZÁVERY, (POĎAKOVANIE), ZOZNAM LITERATÚRY**.

Každý nadpis sa uvádza na osobitnom riadku (veľké tučné písmo, veľkosť 12). Nad ním a pod ním sa vynechá voľný riadok. Každý odsek začína zarážkou

ABSTRAKT

Vyžaduje sa abstrakt v angličtine (tučné písmo, veľkosť 12). Jeho dĺžka by nemala presiahnuť 250 slov. Abstrakt stručne prezentuje cieľ a relevantnosť štúdie, základné postupy, hlavné zistenia a vyvodené závery. Zdôrazňuje nové a dôležité aspekty štúdie a pozorovaní.

Key words: Kľúčové slová (3−10) sa uvádzajú v slovenskom resp. českom a v anglickom jazyku v abecednom poradí pod abstraktom, od ktorého sú oddelené jedným voľným riadkom. Oddeľujú sa bodkočiarkou.

ÚVOD

Uvádza sa stručný prehľad problematiky. Namiesto podrobného literárneho prehľadu je vhodnejšie sústrediť sa na striktne relevantné zdroje bez zahrnutia podrobných údajov a záverov prezentovaných v týchto zdrojoch. Úvod sa má končiť cieľom, ktorý si autori vytýčili.

MATERIÁL A METÓDY

Prezentuje sa podrobný popis a charakteristika objektov pozorovania/experimentov, vrátane kontrol. Identifikujú sa použité metódy, prístroje (meno a adresa výrobcu v zátvorke) a postupy s dostatočnými podrobnosťami na to, aby ich bolo možné reprodukovať. Citujú sa zavedené metódy a ich zdroje a stručne sa opisujú metódy, ktoré boli publikované, ale nie sú veľmi známe. Poskytuje sa kompletný opis nových alebo podstatne modifikovaných metód, dôvody ich použitia a ich prípadné obmedzenia. Presne sa identifikujú všetky použité liečivá a chemikálie vrátane ich generického názvu, dávky a spôsobu podávania.

Poskytujú sa kompletné informácie o štatistických metódach a opatreniach použitých vo výskume.

VÝSLEDKY

Pri uvádzaní výsledkov sa používa medzinárodný systém jednotiek (SI).

Prezentácia výsledkov má byť výstižná, s logickou nadväznosťou a využívaním tabuliek a názorných grafov. V tabuľkách a grafoch je potrebné vyhnúť sa duplicite prezentovaných výsledkov. V texte sa zdôrazňujú a sumarizujú len dôležité pozorovania. Tam, kde je to vhodné/potrebné, tabuľky majú obsahovať výsledky štatistickej analýzy (hladiny významnosti

DISKUSIA

Zdôrazňujú sa nové a dôležité aspekty štúdie,

ktoré vedú ku konečným záverom. Je potrebné sa vyhnúť podrobnému opakovaniu údajov už spomenutých v častiach Úvod a Výsledky. Diskusia má obsahovať zhrnutie prezentovaných zistení, relevantné obmedzenia a význam týchto zistení pre ďalší výskum. Výsledky štúdie sú porovnávané s publikovanými výsledkami iných autorov.

ZÁVERY

Dávajú sa do súvislosti závery s cieľom štúdie. Je potrebné sa vyhnúť nekvalifikovaným vyhláseniam a záverom, ktoré nie sú plne podporované získanými údajmi. Tam, kde je to vhodné, môžu sa uvádzať odporúčania.

POĎAKOVANIE

(Kurzívou) Ak je to potrebné, uvádza sa poďakovanie (grant, špeciálne analýzy, technická podpora...).

ZOZNAM LITERATÚRY

Všetky zdroje uvedené v zozname musia byť citované v texte.

Použité zdroje sa v zozname uvádzajú v abecednom poradí (podľa priezviska prvého autora), a každý z nich sa začína písať na nový riadok s odsadením. Zdroje musia obsahovať priezviská a iniciály všetkých autorov. Neodporúča sa použiť nadmerný počet citácií na podporu jedného vyhlásenia.

Od autorov sa vyžaduje použitie iba overiteľných a recenzovaných zdrojov z celosvetovo akceptovaných vedeckých databáz.

V texte sa cituje/ú autor/i priezviskom a rok publikovania. V slovenskom a českom jazyku sa používajú spojky „a“ a „a kol.“, ak je rukopis v anglickom jazyku spojky „and“ a „et al.“. Viacnásobné citácie sa uvádzajú v chronologickom poradí (od najstaršej po najnovšiu).

Pri písaní zdrojov štýl a interpunkcia má zodpovedať príkladom uvedeným nižšie:

Časopis (vedecký/odborný): Priezvisko/á a iniciála/y autora /ov. Celý názov článku, názov časopisu (kurzívou), rok publikácie, ročník a príslušné strany. Číslo časopisu sa uvedie (v zátvorke) len vtedy, keď sa v časopise neuvádza ročník. Možno uviesť skrátený názov časopisu, ak sa takýto nachádza v štandardnom ISO zozname skrátených názvov časopisov. ISSN číslo sa nevyžaduje:

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

Vetulani, J.: Drug addiction, part II. Neurobiology of addiction. *Pol. J. Pharmacol.*, 2001, 53 (4), 303 – 317.

Pri zdrojoch v slovenskom alebo českom jazyku je potrebné do hranatej zátvorky uviesť názov článku/ knihy a i.

Zummerová, A., Kolesárová, M.: Adherencia pacientov k liečbe reumatoidnej artritídy [Adherence of patients to the therapy of rheumatoid arthritis]. *Folia Pharmaceutica Cassoviensia*, 2020, 2 (3), 69 – 78.

Kniha (editovaná, needitovaná):

Mená a iniciály autorov citovanej časti knihy, autori/editori knihy, názov knihy (kurzívou), miesto vydania, vydavateľ, rok vydania, celkový počet strán alebo citované strany (ISBN sa nevyžaduje):

Choi, C. K., Dong, M. W.: Chapter 5 – Sample preparation for HPLC analysis of drug products. In Ahuja, S., Dong, M. W. (Eds.). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. United Kingdom: Elsevier, 2005. 123–144.

Podczeck, F., Jones, B. E.: Pharmaceutical Capsules, 2nd edn., *Pharmaceutical Press*, 2004. 66–67.

Zborník z konferencie: Mená a iniciály autorov. Celý názov článku. Názov zborníka/konferencie, miesto a dátum konania, rok publikácie, celkový počet strán alebo citované strany:

Canganella, F., Balsamo, R.: Isolation and selection of probiotic microorganisms with antagonistic activity against *Paenicibacillus larvae* and *Paenicibacillus alvei*. In *Proceedings of the International Probiotic Conference: Probiotics for the 3rd Millenium, High Tatras*, Slovakia, June 4 – 7, 2008, 28 – 29.

Online časopis:

Simon, J. A., Hudes, E. S.: Relationship of ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA* 1999, 281, 2289 – 2293. http://url. Accessed July 11, 2009.

Pri zdroji v slovenskom/českom jazyku sa uvádza [cit. 2021-01-30].

Online website:

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

PREHĽADOVÉ ČLÁNKY

Publikujú sa aj články, ktoré prezentujú súhrnné informácie o významných aspektoch vo farmácii a medicíne s relevantnou historickou perspektívou. Odporúčaná štruktúra prehľadových článkov je nasledovná:

NÁZOV/AUTORI – názov (aj v angličtine) má byť stručný a informatívny.

ABSTRAKT (v angličtine) – uvádza ciele a výsledky prehľadu s kľúčovými slovami (3-10).

ÚVOD – poskytuje informácie o kontexte, indikuje motiváciu autora/autorov prehľadu, definuje príslušné zameranie a otázky pre výskum a vysvetľuje štruktúru textu.

MATERIÁL A METÓDY – opisuje/sumarizuje metódy použité pre lokalizáciu, získavanie, selekciu a syntetizovanie údajov.

Hlavná časť prehľadového článku – pre prehľadnosť sa používajú relevantné podnadpisy.

ZÁVER – Zodpovedanie otázok pre výskum, položených v úvode.

ZOZNAM LITERATÚRY – Potvrdzuje práce iných vedcov – zabraňuje obvineniam z plagiátorstva. Neodporúča sa použiť viac ako 100 literárnych zdrojov.

KAZUISTIKY

Publikujú sa aj články, ktoré prezentujú správy o výnimočnom prípade určitého liečiva, resp. substancie či zmesi a jej neobvyklého účinku alebo opis zaujímavého klinického prípadu, choroby a pod. Odporúčaná štruktúra kazuistík je nasledovná:

NÁZOV/AUTORI – názov (aj v angličtine) má byť stručný a informatívny.

ABSTRAKT (v angličtine) – skrátená verzia celého textu s kľúčovými slovami (3-10)

ÚVOD – vysvetľuje dôvody, pre ktoré bol daný prípad opísaný

OPIS PRÍPADU/PRÍPADOV – hlavná časť kazuistiky - uvádza sa priebeh, liečba, prognóza a ukončenie prípadu

DISKUSIA – zdôrazňujú sa zaujímavé aspekty prípadu

ZÁVER – opisujú sa súvislosti medzi hlavnými zisteniami/pozorovaniami a cieľom práce

ZOZNAM LITERATÚRY

RECENZIA

Publikujú sa aj kritické rozbory odborného diela (napr. knihy, článku), ktoré obsahujú odôvodnené hodnotenie. Odporúčaná štruktúra recenzie je nasledovná:

ZÁKLADNÉ INFORMÁCIE – uvádza sa názov knihy (článku, časopisu), mená autorov (priezvisko, iniciály), miesto vydania a názov vydavateľstva, rok vydania, počet strán, odporúčaná cena, ISBN

OBSAH KNIHY (ČLÁNKU, ČASOPISU) – opisujú sa dôležité informácie, napr. čím kniha (článok, časopis) recenzenta zaujala/sklamala.

VÝZNAM KNIHY (ČLÁNKU, ČASOPISU) – uvádza sa jej využitie pre odbornú verejnosť.

Redakčná rada