

FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis
UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609

ISSN 2729-790X



1
IV • 2022



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

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

Šéfredaktorka/Editor-in-Chief:

Výkonná redaktorka/Deputy/Managing Editor:

Redakčná rada/Editorial Board:

Jana Mojžišová

Zita Faixová

Abu-Darwish, M. S. (Shoubak, Jordan), Boknik, P. (Münster, Germany), Castejon, A. M. (Fort Lauderdale, Florida, USA), Csöllei, J. (Brno, Czech Republic), Deelman, L. E. (Groningen, Netherlands), Devinyak, O. (Uzhhorod, Ukraine, El Naggari, El M. B. A. (Damanhour, Egypt), Getova, D. (Plovdiv, Bulgaria), Kyselovič, J. (Bratislava, Slovak Republic), Leddy, J. J. (Ottawa, Canada), Mojžiš, J. (Košice, Slovak Republic), Klimas, J. (Bratislava, Slovak Republic), Mučaji, P. (Bratislava, Slovak Republic), Opatřilová, R. (Brno, Czech Republic), Pirník, Z. (Bratislava, Slovak Republic), Pistl, J. (Košice, Slovak Republic), Şekeroğlu, N., (Turkey, Kilis), Šimůnek, T. (Hradec Králové, Czech Republic), Zitterl, K. (Vienna, Austria)

Vydavateľ/Publisher:

© Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2019

Adresa redakcie/Editor Address:

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

Technická redaktorka/Technical Editor:

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

Grafická úprava/graphic design:

Báštiová, I.

ISSN: 2585-9609

EVČ: EV 5741/18

IČO: 00 397 474

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

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

VYDÁVA
UNIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE V KOŠICIACH
SLOVAKIA



FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA
IV., 1, 2022

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

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, IV., 1, 2022

O B S A H

Massarová, Petra; Žigová, Lucia; Vranecová, Katarína; Hrubá, Orsolya; Faixová, Dominika; Faixová, Zita; Gažová, Andrea:	
INOVATÍVNY PRÍSTUP K VÝVOJU NOVÝCH LIEČIV AN INNOVATIVE APPROACH TO THE DEVELOPMENT OF NEW DRUGS.....	5
Hudáková, Nikola; Beňová, Katarína; Špalková, Michaela:	
THE EFFECT OF <i>HUMULUS LUPULUS</i> ON <i>ARTEMIA FRANCISANA</i>	15
Čierna, Barbara; Čonková, Eva; Kičinko, Milan:	
SÚČASNÉ TRENDY V LIEČBE UROLITIÁZY (KAZUISTIKA) CURRENT TRENDS IN THE PHARMACOTHERAPY OF UROLITHIASIS (CASE STUDY).....	22
Pániková, Zuzana; Ungvarská Maľučká, Lucia:	
CORDYCEPS SPP: IZOLÁCIA, IDENTIFIKÁCIA A BIOLOGICKÁ AKTIVITA POLYSACHARIDOV CORDYCEPS SPP: ISOLATION, IDENTIFICATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF POLYSACCHARIDES.....	31
Semanová, Radoslava; Eftimová, Jarmila; Megyesy Eftimová, Zuzana:	
VPLYV BIOAKTÍVNYCH LÁTKOV Z <i>TRIBULUS TERRESTRIS</i> L. NA HLADINU CHOLESTEROLU THE EFFECT OF BIOACTIVE SUBSTANCES FROM <i>TRIBULUS TERRESTRIS</i> L. ON CHOLESTEROL LEVEL.....	40
Podobník, František; Bačkorová, Miriam:	
SÚČASNÉ TRENDY FARMAKOTERAPIE ÚZKOSTNÝCH STAVOV A PORÚCH SPÁNKU CURRENT TRENDS IN PHARMACOTHERAPY OF ANXIETY AND SLEEP DISORDERS.....	56
Bartko Ničová, Kristína; Schwarzbacherová, Viera:	
ANALÝZA CYTOTOXICKÝCH A GENOTOXICKÝCH ÚČINKOV INSEKTICÍDU ACETAMIPRIDU V BOVINNÝCH LYMFOCYTOCH <i>IN VITRO</i> ANALYSIS OF CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF ACETAMIPRIDE INSECTICIDE IN BOVINE LYMPHOCYTES <i>IN VITRO</i>	66
Kudrová, Daniela Lejla; Váczi, Peter:	
BIOCHEMICKÉ PARAMETRE KRVÍ U ŽIEN PODSTUPUJÚCICH HORMONÁLNU SUBSTITUČNÚ TERAPIU BLOOD BIOCHEMICAL PARAMETERS IN WOMEN UNDERGOING HORMONE REPLACEMENT THERAPY.....	74
Zavod'ančíková, Katarína; Maková, Zuzana:	
FARMAKOLOGICKÁ TERAPIA ACNE VULGARIS PHARMACOLOGICAL THERAPY OF ACNE VULGARIS	82
Ferko, Dávid; Eftimová, Jarmila; Kolesárová, Mária:	
FARMAKOTERAPEUTICKÝ POTENCIÁL KANABIDIOLU PRI VYBRANÝCH EXTRAPYRAMÍDOVÝCH PORUCHÁCH PHARMACOTHERAPEUTIC POTENTIAL OF CANNABIDIOL IN SELECTED EXTRAPYRAMIDAL DISORDERS	95
Pokyny pre autorov.....	105



INOVATÍVNY PRÍSTUP K VÝVOJU NOVÝCH LIEČIV

AN INNOVATIVE APPROACH TO THE DEVELOPMENT OF NEW DRUGS

**Massarová, Petra¹; Žigová, Lucia¹; Vranecová, Katarína¹; Hrubá, Orsolya¹;
Faixová, Dominika²; Faixová, Zita³; Gažová, Andrea¹**

¹Ústav farmakológie a klinickej farmakológie,

Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Špitálska 24, 813 72, Bratislava

²Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky

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

³Katedra biológie a fyziológie

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

pmassarova@gmail.com

ABSTRAKT

Vývoj a vývin nových liečiv sa v posledných rokoch odklonil od štandardného vývojového postupu, teda od syntézy liečiva po predklinické skúšanie, ale plne sa v tomto procese uplatňuje inovatívny prístup, a to molekulové modelovanie za využitia dostupných počítačových programov. Tento technologický vzostup zmenil celú koncepciu hľadania nových potenciálnych liečiv. Kľúčovú rolu vo vývoji zohrávajú metódy počítačom podporovaného vývoja liečiv (computer-aided drug design – CADD). Sľubnou cestou sa zdá byť hľadanie nových biologických cieľov pre virtuálny skrining založený na štruktúre, a teda nových mechanizmov účinku. Jedna z problematických oblastí nových liečiv je oblasť

vývoja a vývinu nových skupín antimikrobiálnych látok. Antimikrobiálna rezistencia je v súčasnosti jedným z najnaliehavejších problémov svetového zdravotníctva. Rýchlosť jej šírenia sa nedarí pribrzdiť ani napriek intenzívnemu vývoju, ktorý posledné dekády nepriniesol žiadnu novú skupinu látok účinných proti gramnegatívnym baktériám. V prípade zotrvania terajšieho trendu hrozí, že do roku 2050 sa antimikrobiálna rezistencia bude podieľať na 10 miliónoch úmrtiach ročne. Zapojenie inovatívneho prístupu k možnému identifikovaniu nových cieľových štruktúr, s cieľom vyhnúť sa známym mechanizmom rezistencie otvára nielen lacnejšiu, ale aj rýchlejšiu a efektívnejšiu podobu vývoja liečiv.

Kľúčové slová: antimikrobiálna rezistencia; počítačom podporovaný vývoj liečiv; virtuálny skrining; vývoj nových liečiv

ABSTRACT

The development of new drugs has deviated in recent years from the standard development procedure, i. e. from drug synthesis to preclinical testing, but the innovative approach of molecular modeling using available computer programs is fully applied in this process. This technological advancement has changed the whole concept of finding new potential drugs. Computer-aided drug design (CADD) methods play a key role in the development. The search for new biological targets for structure-based virtual screening, and thus new mechanisms of action, seems promising. One of the problematic areas of new drugs is the development of new groups of antimicrobials. Antimicrobial resistance is currently one of the most urging issues in global healthcare. The speed of its spread is not slowing down, despite the intensive development, which has not brought any new groups of antimicrobials in the recent decades. If the current trend continues, antimicrobial resistance risks accounting for 10 million deaths per year by 2050. Involving an innovative approach to the possible identification of new target structures, in order to avoid the known mechanism of resistance, opens up not only a cheaper form of drug development, but also faster and more efficient.

Key words: antimicrobial resistance; computer-aided drug design; new drugs development; virtual screening

ÚVOD

Tradičné metódy vývoja liečiv sú v stále väčšej miere dopĺňané o techniky *in silico* a dá sa očakávať, že ich prínos sa v budúcnosti bude ešte zvyšovať.

Uplatňujú sa najmä v prvých štádiách procesu, pri identifikácii biologických cieľov a potenciálne účinných molekúl. Takzvané metódy počítačom podporovaného vývoja liečiv (computer-aided drug design – CADD) zohrávajú kľúčovú úlohu v oblasti farmaceutického výskumu už niekoľko desiatok rokov a neustále zvyšujú efektivitu objavovania liečiv. Nenahraditeľnú pozíciu si držia vďaka výraznému šetreniu finančných prostriedkov, času a ekologizácii procesov. Za najvýznamnejší nástroj CADD sa považuje virtuálne preverovanie, ktoré automaticky vyhodnotí obrovské súbory molekúl pri molekulovom modelovaní a následne selektuje kandidátov pre ďalšiu optimalizáciu a experimentálne skúšanie.

Virtuálny skrining (VS) je limitovaný kvalitou, kvantitou a diverzitou vstupných dát. Podľa dostupnosti informácií o biologickom ciele sa rozlišuje VS založený na ligande (z angl. ligand-based VS) a VS založený na štruktúre (z angl. structure-based VS). Výstupom VS s využitím molekulového dokovania je predikcia orientácie ligandov po väzbe na bielkovinu a ich väzbovej afinity, ktorá vypovedá o stabilite vytvoreného komplexu. Uplatnením ďalších filtrov (rutinne Lipinského pravidla piatich) sa môže výber skriningových ligandov ešte zúžiť na tie, ktoré disponujú výhodnými farmakokinetickými vlastnosťami. V prípade Lipinského pravidla piatich ide konkrétne o hodnoty molekulovej hmotnosti $M [g \cdot mol^{-1}] < 500$, logaritmus rozdeľovacieho koeficientu $\log P < 4,15$; počet akceptorov vodíkových väzieb < 5 a počet donorov vodíkových väzieb < 10 .

Metódy CADD sa stali dominantnými aj pri hľadaní nových antiinfektív. Odborníci veria, že sofistikované technológie umožnia objavenie aj takých nových mechanizmov účinku, ktoré by obišli už známe mechanizmy rezistencie mikroorganizmov. Šíriaca sa rezistencia voči antimikrobiálnym liečivám je najnaliehavejším problémom celosvetového zdravotníctva a náročný vývoj nových liečiv nestíha zamedziť tomuto nepriaznivému trendu a nástupu post-antibiotickej éry.

Virtuálny skrining

Definícia pojmu počítačom podporovaný vývoj liečiv (voľný preklad z anglického zaužívaného computer-aided drug design – CADD) podľa IUPAC zahŕňa všetky počítačové metódy aplikované pri objavovaní, vývoji a optimalizovaní biologicky aktívnych zlúčenín s predpokladaným uplatnením ako liečivá (Gold, 2019). Aplikácia technológie CADD vo farmácii zvyšuje efektívnosť vývoja liečiv drastickým znížením finančných i časových nákladov v porovnaní s tradičnými laboratórnymi experimentmi (Cerqueira a kol., 2015). Významnou výhodou je aj ekologizácia procesu (Chatterjee, 2020); vrátane redukcie testovania na zvieratách (Kapetanovic, 2008). CADD zohráva významnú rolu pri vývoji liečiv už viac než tri desaťročia. Medzi schválenými liečivami vyvinutými pomocou CADD sú kaptopril, sachinavir, dorzolamid, indinavir, ritonavir, tirofiban, zanamivir, oseltamivir, raltegravir či aliskirén (Sliwoski a kol., 2014; Dar a kol., 2018).

Aj toto sú dôvody, prečo sa nástroje CADD považujú za kľúčové pre vývoj nových liečiv. Prudký rozmach implifikácie metód CADD do vývoja liečiv je možný vďaka rýchlemu napredovaniu počítačových technológií. Okrem toho sa neustále zväčšuje objem a súčasne zvyšuje kvalita dostupných informácií o proteínoch a nukleových kyselinách, teda o základných biologických cieľoch (Cerqueira a kol., 2015).

Mnohé zdroje jednotne uvádzajú, že najvýznamnejšou z metód CADD je virtuálny skrining (VS). Samotný vznik VS prirodzene vychádza z potreby automatizácie procesu vyhodnocovania veľmi veľkých knižníc zlúčenín pri molekulovom modelovaní. Pri VS dochádza k prehľadávaniu komerčných, verejných alebo vlastných databáz malých molekúl (Kapetanovic, 2008) a selekcii obmedzeného počtu sľubných kandidátov na ďalší vývoj a optimalizáciu (Andricopulo a kol., 2008). Cieľom je vyfiltrovať molekuly s požadovanými vlastnosťami a naopak, vynechať z výberu zlúčeniny disponujúce nežiaducimi vlastnosťami ako je

inaktivita, toxicita, reaktivita, či vo všeobecnosti nevyhovujúce farmakokinetické parametre (Kapetanovic, 2008; Cerqueira a kol., 2015). Ak kandidáti prekonajú všetky filtre, následne sa ich biologická aktivita môže preveriť experimentálne (Gimeno a kol., 2019). Samozrejme, nie všetky takto vyhodnotené molekuly budú vykazovať biologickú aktivitu aj v skutočnosti, no pravdepodobnosť ich objavu touto cestou je výrazne vyššia. Ak by aj priamym výstupom z VS neboli hneď silno účinné látky, dôležitým výsledkom môže byť napríklad rozmanitosť ich štruktúr. Takéto informácie môžu byť nápomocné pre pochopenie pôvodu aktivity ligandov na molekulárnej úrovni a sú smerodajné pri ich následnej optimalizácii (Gimeno a kol., 2019).

Kritickým faktorom pri VS je schopnosť implementovaných technológií extrahovať nové poznatky z už existujúcich informácií vstupných dát. Preto je podmieňujúca kvalita, kvantita a diverzita vstupných dát (Sliwoski a kol., 2014). Rozlišujeme VS založený na ligande hľadanej molekuly a VS založený na štruktúre molekuly.

K VS založenému na ligande sa pristupuje v prípade, že nie je k dispozícii dostatok informácií o štruktúre biologického cieľa. Pri tomto type VS sa využívajú ligandy so známou štruktúrou, o ktorých sa zároveň vie, že na danom biologickom cieľi s neznámou štruktúrou vykazujú, respektíve nevykazujú aktivitu. Na základe informácií, ktoré poskytnú tieto ligandy, ako chemická štruktúra, fyzikálno-chemické vlastnosti, väzbová afinita, je možné určiť pravdepodobnosť s akou sa budú na biologický cieľ viazať iné molekuly. Vychádza sa z predpokladu, že spoločné znaky štruktúry znamenajú podobný efekt na biologický cieľ (Gimeno a kol., 2019). Pri VS založenom na ligande dochádza k vyfiltrovaní zlúčenín vykazujúcich podobnosť s referenčnými ligandami. Model receptoru sa potom formuje výhradne podľa stavby ligandov. Pomocou „teórie zámky a kľúča“ sa dá VS založený na ligande ilustratívne opísať ako zisťovanie tvaru zámky len prostredníctvom kľúčov, ktoré do nej pasujú, respektíve nepasujú (Cerqueira a kol., 2015).

Výhodou VS založenom na ligande sú menšie nároky na výpočtové technológie vzhľadom na to, že vo výpočtoch nie sú zahrnuté obrovské makromolekuly (Gimeno a kol., 2019). Nevýhodou, v porovnaní s VS založenom na štruktúre, je tendencia k nízkej diverzite novo selektovaných molekúl, keďže táto metóda čerpá zo vzťahov medzi štruktúrou a aktivitou (Danishuddin a Khan, 2015).

Napriek všeobecnej platnosti princípu, že podobné zlúčeniny vykazujú podobný účinok, môžu nastať situácie, kedy malé zmeny v štruktúre molekuly vedú k výraznej zmene alebo až úplnej strate aktivity. S tým súvisí riziko chybných predikcií a následné inkompatibility medzi molekulami a biologickým cieľom. Týmto problémom sa dá vyhnúť zohľadnením štruktúry makromolekuly, teda uplatnením druhého menovaného prístupu – VS založenom na štruktúre (Gimeno a kol., 2019). V kontraste k VS založenom na ligande, pri tomto druhom type VS sú molekuly potenciálne kompatibilné s väzobným miestom biologického cieľa rozpoznávané na základe informácie o jeho štruktúre (Li, 2020). V tomto prípade sa uplatňuje teória, že možnosť vyvolať biologickú odpoveď závisí od schopnosti a „ochoty“ molekuly interagovať na väzbovom mieste (Sliwoski a kol., 2014). VS založený na štruktúre predstavuje molekulové dokovanie (Kapetanovic, 2008); pri ktorom skrining prebieha dokovaním každej molekuly v knižnici do väzbového miesta cieľovej štruktúry (Kukol, 2011; Cerqueira a kol., 2015).

Molekulové dokovanie pozostáva z dvoch zásadných krokov. Prvým krokom je vlastné dokovanie, čiže vyhľadávanie možných energeticky výhodných konformácií ligandu. Zároveň ligand musí geometricky zapadnúť do väzbového miesta zohľadňujúc stérické vlastnosti a povrch molekuly proteínu. Druhým krokom je potom tzv. skórovanie, čiže hodnotenie interakcií ligandu s proteínom v jednotlivých väzbových módoch. Nakoniec sú ligandy zoradené podľa získaného skóre. Výstupom VS je predpoveď orientácie ligandu po väzbe na proteín a väzbová afinita, ktorá vyjadruje mieru kvality väzby (Kukol, 2011; Cerqueira a kol., 2015;

Chen, 2015). Čím je hodnota väzbovej afinity nižšia, tým je komplex ligand-proteín teoreticky stabilnejší (Kapetanovic, 2008; Ke a kol., 2014; Cerqueira a kol., 2015; Danishuddin a Khan, 2015; Chen, 2015; Gimeno a kol., 2019; Li a kol., 2020).

Na zúženie výberu zodpovedajúcich zlúčenín pri VS sa môžu použiť pre- alebo post-skriningové filtre. Bežne sa napríklad z výberu vyradzujú molekuly, ktoré nespĺňajú Lipinského pravidlo piatich. Konkrétne ide o dodržanie hodnôt molekulovej hmotnosti $M [g.mol^{-1}] < 500$, logaritmus rozdeľovacieho koeficientu $\log P < 4,15$; počet akceptorov vodíkových väzieb < 5 a počet donorov vodíkových väzieb < 10 (Lipinski a kol., 2001). Porušením pravidla Lipinského sa znižuje pravdepodobnosť, že molekula bude mať dobrú schopnosť absorpcie a permeability (Lipinski a kol., 2001). Je to najvýznamnejší filter pri odhadovaní potenciálu molekuly stať sa liečivom po perorálnom podaní (Daina a kol., 2017).

VS založený na štruktúre je otvorenejšou metódou než VS založený na ligande. Umožňuje objavenie nielen nových štruktúr vykazujúcich podobné interakcie ako už známe ligandy, ale aj nové interakcie v iných častiach väzbového miesta. Je považovaný za úspešnejšiu metódu a je aj častejšie používaný (Danishuddin a Khan, 2015). Výhodami sú presnejšie a spoľahlivejšie výsledky a dostupnosť stále väčšieho počtu 3D štruktúr cieľových proteínov, ľudských aj patogénnych (Sliwoski a kol., 2014; Cerqueira a kol., 2015). Podľa Kokula (2011) je výhodou aj vyššia špecifickosť nájdených ligandov zásluhou zohľadňovania štruktúry či dokonca konkrétnej konformácie receptora.

Antimikrobiálna rezistencia a vývoj antimikrobiálnych liečiv

Antimikrobiálne liečivá sú piliermi modernej medicíny podmieňujúce jej rozvoj (Dadgostar, 2019). Rezistencia voči nim je jedným z najpálčivejších problémov v zdravotníctve na celom svete, v rozvinutých i rozvojových krajinách. Spolupodiel sa na približne 700-tisíc úmrtiach

ročne a ak nebudú prijaté efektívne opatrenia, toto číslo môže do roku 2050 narásť až na 10 miliónov (de la Fuente-Nunez a kol., 2017; Dadgostar, 2019; Niu a Li, 2019; Torres a de la Fuente-Nunez, 2019). Spomaliť šírenie rezistencie sa zatiaľ nepodarilo napriek najrozmanitejším iniciatívam (Dadgostar, 2019) a odborníci sa zhodujú na prudkom nástupe tzv. post-antibiotickej éry. V snahe zvrátiť tento trend je nutné pochopiť mechanizmus rezistencie a vyvinúť nové antimikrobiálne liečivá (Niu a Li, 2019). Šírenie rezistencie postupuje rýchlejším tempom než zavádzanie nových liečiv do klinickej praxe (Spellberg a Shlaes, 2014). Hoci aktívnych zlúčenín existuje veľký počet, spektrum cieľov, na ktoré pôsobia, je obmedzené (Belete, 2019). Účinnok dosiahnutý prostredníctvom dosiaľ málo využívaných cieľov alebo postupmi vzdialenými od dnes bežných stratégií terapie by znamenal aj obídenie známych mechanizmov rezistencie (Kim a kol., 2011; Rana a kol., 2020).

Od druhej polovice 90. rokov prinášali nádej pokroky v analýze mikrobiálneho genómu, vďaka ktorým boli identifikované práve nové biologické ciele, respektíve nové príležitosti pre výskum metódou virtuálneho skríningu založenom na štruktúre. K štyrom či piatim dovtedy využívaným mechanizmom účinku pribudlo viac než sto nových potenciálnych mechanizmov (Moellering, 2011; Baker a kol., 2018; Belete, 2019). Znalosť ľudského genómu, a teraz už i mnohých bakteriálnych genómov, umožňuje hľadať zlúčeniny pôsobiace špecificky na bakteriálne štruktúry nevyskytujúce sa v ľudskom organizme (Moellering, 2011). Väčšina patogénnych baktérií má 4 000 až 5 000 génov a približne len 10 % z nich je esenciálnych. Deaktivácia esenciálnych génov by ohrozila životaschopnosť patogénu. Po vlnе genetického výskumu, kedy bolo množstvo patogénov plne sekvenovaných, sa veľké farmaceutické spoločnosti pustili do skríningu enzýmov a do hľadania ich nových inhibítorov. Výsledky však boli oveľa menším úspechom, než sa očakávalo (Datta, 2021). Záujem farmaceutických firiem o vývoj v tejto oblas-

ti klesá aj z dôvodu nízkej návratnosti prostriedkov kvôli krátkodobým liečebným režimom typickým pre antiinfektíva (Spellberg a Shlaes, 2014). Waseem a kol. (2020) uvádzajú, že posledných 30 rokov výskum nepriniesol prakticky žiadny úspech pri hľadaní nových antimikrobiálnych liečiv. Žiadna nová skupina látok účinných proti gramnegatívnym baktériám nebola schválená už viac ako 45 rokov (de la Fuente-Nunez a kol., 2017; Baker a kol., 2018). Neuspokojivé čísla sú dôsledkom obťažnosti dosiahnutia vyvážených farmakodynamických a farmakokinetických vlastností a vyhovujúcich bezpečnostných profilov, čo častokrát predstavuje väčšiu výzvu než samotné nachádzanie zlúčenín vykazujúcich účinok (Baker a kol., 2018). Na konci roku 2019 bolo v prvej, druhej alebo tretej fáze klinického skúšania 41 antibiotík. Ak sa kandidát na liečivo dostane do prvej fázy, šanca na jeho schválenie je približne 20 % a v tretej fáze sa pravdepodobnosť zvyšuje na 60 % (Antibiotics currently in global clinical development/The Pew Charitable Trusts. <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/data-visualizations/2014/antibiotics-currently-in-clinical-development>).

Mnohé spoločnosti sa zameriavajú prednostne na optimalizovanie zlúčenín patriacich do už osvedčených tried liečiv, na úkor menej úspešného, no potrebného hľadania nových mechanizmov účinku (Baker a kol., 2018). Súčasne, Torres a de la Fuente-Nunez (2019) predpokladajú, že v prírode sa nevyskytuje oveľa viac veľkých molekúl s antimikrobiálnou aktivitou než tých, ktoré už boli objavené. A podobne skepticky aj Johnson a Fung (2020) uvádzajú, že odmlka v objavovaní nových antibiotík vedie k presvedčeniu odborníkov o vyčerpaní všetkých ľahšie dostupných zdrojov. Metódy CADD sa tak stali dominantnou a najslubnejšou cestou aj vo vývoji antibiotík. Torres a de la Fuente-Nunez (2019) navyše veria, že pokročilé technológie môžu priniesť výsledky v podobe látok menej náchylných na vznik rezistencie.

Enzým FabI ako biologický cieľ

Príťažlivým predmetom skúmania je komplex enzýmov zabezpečujúci bakteriálnu biosyntézu mastných kyselín, FAS-II (fatty acid synthesis-II) (Rana a kol., 2020). Tento proces je fundamentálnou súčasťou metabolizmu bakteriálnych buniek (Kim a kol., 2011). Je esenciálny pre rast, integritu a celkovú životaschopnosť buniek, keďže ich zásobuje prekursorami pre stavbu ďalších komponentov ako fosfolipidy, lipoproteíny, lipopolysacharidy a mykolové kyseliny (Rana a kol., 2020).

FAS-II disponuje niekoľkými výhodnými atribútmi, je relatívne málo využívaný v klinickej praxi, pričom teoreticky, každý z enzýmov komplexu by sa mohol stať biologickým cieľom chemoterapeutík (Kim a kol., 2015; Yao a Rock, 2016; Rana a kol., 2020). Na druhej strane, účinnosť inhibície enzýmov FAS-II je osvedčený úspešným dlhodobým používaním triklozán a izoniazidu (Schiebel a kol., 2012; Kim a kol., 2015); čo iniciovalo hľadanie príbuzných zlúčenín (Belete, 2019). Bakteriálna (protozoálna a rastlinná) FAS-II sa výrazne líši od FAS-I cicavčích (eukaryotických) buniek (Schiebel a kol., 2012; Kim a kol., 2015; Rana a kol., 2020).

Najintenzívnejšie skúmaný z komplexu FAS-II je kľúčový a regulačný enzým FabI (enoyl-[acyl-carrier-protein] reduktáza, EC 1.3.1.9) (Kim a kol., 2011; Schiebel a kol., 2012; Rana a kol., 2020). Tento enzým, z rodiny dehydrogenáz/reduktáz FabI, v poslednom kroku každého cyklu elongácie mastnej kyseliny katalyzuje stereospecifickú redukciu dvojitej väzby v polohe 2 v *trans*-2-enoyl-ACP za vzniku acyl-ACP v prítomnosti kofaktora NADH (Kim a kol., 2010; 2011; Yao a Rock, 2016; Rana a kol., 2020). Vyskytuje sa v podobe homo-tetramérov a ako dimér bola zatiaľ nájdená u dvoch výnimiek – *Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus* (Kim a kol., 2017). U mykobaktérií sa vyskytuje ako homológny enzým InhA. InhA je s FabI identická s výnimkou veľkosti aktívneho miesta, ktoré má rôzne varianty v závislosti od konkrétneho druhu mikroorganizmu (Kalia a kol., 2019). FabI bola prvýkrát objavená v modelovom organizme *Escherichia coli* (Moe-

llering, 2011). Dnes sa už vie, že sa vyskytuje (vrátane izoformami FabK, FabL, FabV a InhA) v mnohých baktériách a zároveň významných patogénoch, z ktorých niektoré sú alebo sa stávajú multirezistentnými (Rana a kol., 2020).

U novo objavených inhibítorov sa očakáva širokospektrálny účinok vzhľadom na rozšírenosť enzýmu (Rana a kol., 2020). Pochybnosti môže vyvolávať fakt, že za „úspešnejšie“ sa považujú tie antibiotiká (užívané v monoterapii), ktoré disponujú viacerými mechanizmami účinku a pôsobia na viac cieľov. Voči látkam s jednoduchým mechanizmom účinku si baktéria ľahšie vybuduje rezistenciu. Inhibítory FabI tiež pôsobia len na jeden osobitný, aj keď rozhodujúci stupeň metabolickej dráhy. Avšak vďaka skúsenostiam s používaním starších inhibítorov FabI sú v súčasnosti známe niektoré vlastnosti zlúčenín, ktorých optimalizáciou sa riziko nástupu rezistencie môže zredukovať (Yao a Rock, 2016). V porovnaní so širokospektrálnymi antibiotikami sú však inhibítory FabI zvýhodnené šetrnosťou voči črevnej mikróflóre. Zdá sa totiž, že v dôležitých druhoch črevných baktérií je izoforma FabI neprítomná a prevláda v nich FabK (Yao a Rock, 2016; Johnson a Fung, 2020).

Jediným inhibítorom FabI v klinickom hodnotení je v súčasnosti látka afabicín (Debio-1452). Afabicín sa dostal do fázy 2 v indikáciách infekcie kostí a kĺbov a akútnych bakteriálnych infekcií kože a kožných štruktúr spôsobených stafylokokmi (prevažne *Staphylococcus aureus*, vrátane MRSA). Je aplikovaný intravenózne, ale je dostupná aj jeho perorálna forma (Theuretzbacher a kol., 2020).

DISKUSIA

Metódy CADD nie sú len teoretickými postupmi. Napríklad farmaceutická spoločnosť GlaxoSmith-Kline uskutočnila v roku 2011 obrovský skrining 1,9 milióna molekúl. 1,3,4-tiadiazolové deriváty boli pri tomto skriningu identifikované práve ako potenciálne inhibítory enzýmu FabI. Tým bol odštartovaný ich intenzívny výskum. Samozrejme, obdoba veľkého

skrínungu sa dá zrealizovať aj v bežných laboratórnych podmienkach v rámci študentského výskumu farmaceutov. Demonstráciou uplatnenia vyššie popísaných metód CADD, konkrétne virtuálneho skrínungu s využitím molekulového dokovania, je napríklad hľadanie potenciálnych inhibítorov FabI vo vlastnej malej knižnici obsahujúcich 486 navrhnutých 1,3,4-tiadiazolových derivátov (Massarová, 2020).

Štruktúry dokovaných ligandov boli navrhnuté obmieňaním niekoľkých základných skeletov, zvolených v chemickom laboratóriu (prihliadajúc na ich syntetickú dostupnosť) na základe literárnej rešerše. Kryštalová štruktúra enzýmu FabI v komplexe s jeho dlhodobu klinicky využívaným inhibítorom triklozánom bola získaná z databázy RCSB PDB (Schiebel a kol., 2012). Triklozán bol z komplexu vyňatý a do jeho väzbového miesta boli dokované všetky navrhnuté ligandy. Pre VS bol využitý software PyRx (Dallakyan a Olson, 2015) vo verzii 0.8, ktorý na molekulové dokovanie používa software AutoDock Vina (Trott a Olson, 2009). Software je dostupný bezplatne a jeho obsluha nie je zložitá.

V dokovacej štúdii dosiahli molekuly hodnoty väzbovej energie v rozmedzí $-7,3$ až $-12,1$ kcal.mol⁻¹, čo vo všeobecnosti zodpovedá ich vysokej afinite k biologickému cieľu. Samotný triklozán vo vlastnom väzbovom mieste dosiahol hodnoty väzbovej energie spravidla $-8,9$ kcal.mol⁻¹. Aby mohli byť identifikovaní kandidáti na syntézu a ďalšie *in vitro* skúšanie, pre všetky navrhnuté ligandy boli stanovené farmakokinetické parametre, najmä kvôli vyhodnoteniu porušenia Lipinského pravidla piatich. Výber skrínungových ligandov sa tak zúžil na 113, ktoré bez porušenia Lipinského pravidla piatich dosiahli nízke hodnoty väzbovej energie $< -9,5$ kcal.mol⁻¹. Týchto 113 molekúl možno považovať za „najúspešnejšie“ ligandy v skrínungu, ktoré by sa potenciálne mohli stať kandidátmi pre vývoj nových inhibítorov FabI (Massarová, 2020).

ZÁVER

Aj napriek snahe obmedziť používanie antiinfektív bez potvrdenej nutnosti, problémom naďalej ostáva ich subterapeutický príjem v strave a prítomnosť v životnom prostredí. Výskum a vývoj nových antimikrobiálnych liečiv sa z málo motivovaných farmaceutických spoločností presúva do akademického prostredia a menších startupových spoločností. Tu však zatiaľ nedosahuje také obrovské rozmery, hoci virtuálny priestor by to teoreticky umožňoval. Potreba aplikácie metód CADD na všetkých pracoviskách pri vývoji liečiv je zrejmá a efektívnosť výskumu sa bude spoľahlivo zvyšovať.

ZOZNAM LITERATÚRY

Andricopulo, A., Guido, R., Oliva, C.: Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Current Medicinal Chemistry*, 2008, 15 (1), 37 – 46. Doi:10.2174/092986708783330683.

Antibiotics currently in global clinical development/The Pew Charitable Trusts. <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/data-visualizations/2014/antibiotics-currently-in-clinical-development>. Accessed October 15, 2021.

Baker, S. J., Payne, J. D., Rappuoli, R., De Gregorio, E.: Technologies to address antimicrobial resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115 (51), 12 887 – 12 895. Doi:10.1073/pnas.1717160115.

Belete, T. M.: Novel targets to develop new antibacterial agents and novel alternatives to antibacterial agents. *Human Microbiome Journal*, 2019, 11, 100 052. Doi:10.1016/j.humic.2019.01.001.

Cerqueira, N. M. F. S. A., Gesto, D., Oliveira, E. F., Santos-Martins, D., Brás, N. F., Sousa, S. F., Fernandes, F. A., Ramos, M. J.: Receptor-based virtual screening protocol for drug discovery. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, 582, 56 – 67. Doi:10.1016/j.abb.2015.05.011.

- Dadgostar, P.: Antimicrobial resistance: Implications and costs. *Infection and Drug Resistance*, 2019, 12, 3903 – 3910. Doi:10.2147/IDR.S234610.
- Daina, A., Michielin, O., Zoete, V.: SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1), 42 717. Doi:10.1038/srep42717.
- Dallakyan, S., Olson, A. J.: Small-molecule library screening by docking with PyRx. In Hempel, J. E., Williams, Ch. H., Hong, Ch. C. (Eds.). *Chemical Biology*. New York, NY: Springer New York, Methods in Molecular Biology, 243 – 250. Doi:10.1007/978-1-4939-2269-7_19.
- Danishuddin, M., Khan, A. U.: Structure based virtual screening to discover putative drug candidates: Necessary considerations and successful case studies. *Methods*, 2015, 71, 135 – 145. Doi:10.1016/j.ymeth.2014.10.019.
- Dar, K. B., Bhat, A. H., Amin, S., Hamid, R., Anees, S., Anjum, S., Reshi, B. A., Zargar, M. A., Masood, A., Ganie, S. A.: Modern computational strategies for designing drugs to curb human diseases: A prospect. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2018, 18 (31), 2702 – 2719. Doi: 10.2174/1568026619666190119150741.
- Datta, S.: Learnings from past failures: Future routes of antimicrobial drug discovery. *Drug Discovery Today*, 2021, 26 (9), 2105 – 2107. Doi:10.1016/j.drudis.2021.07.017.
- De La Fuente-Nunez, C., Torres, M. D. T., Mojica, F. J. M., Lu, T. K.: Next-generation precision antimicrobials: towards personalized treatment of infectious diseases. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 37, 95 – 102. Doi:10.1016/j.mib.2017.05.014.
- Gimeno, A., Ojeda-Montes, M., Tomás-Hernández, S., Cereto-Massagué, A., Beltrán-Debón, R., Mulero, M., Pujadas, G., Garcia-Vallvé, S.: The light and dark sides of virtual screening: What is there to know? *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (6), 1375. Doi:10.3390/ijms20061375.
- Gold, V. (Ed.): *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book*, 2019. 4. vyd. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Doi:10.1351/goldbook.
- Chatterjee, A.: 2020. Computational methods and tools for sustainable and green approaches in drug discovery. In *Green Approaches in Medicinal Chemistry for Sustainable Drug Design*. B. m.: Elsevier, 2020. 965 – 988. Doi:10.1016/B978-0-12-817592-7.00027-7.
- Chen, Y.-Ch.: Beware of docking! *Trends in Pharmacological Sciences*, 2015, 36 (2), 78 – 95. Doi:10.1016/j.tips.2014.12.001.
- Johnson, M. E., Fung, L. W.-M.: Structural approaches to pathway-specific antimicrobial agents. *Translational Research*, 2020, 220, 114 – 121. Doi:10.1016/j.trsl.2020.02.001.
- Kalia, M., Yadav, V. K., Singh, P. K., Dohare, S., Sharma, D., Narvi, S. S., Agarwal, V.: Designing quorum sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* utilizing FabI: an enzymic drug target from fatty acid synthesis pathway. *3 Biotech*, 2019, 9 (2), 40. Doi:10.1007/s13205-019-1567-1.
- Kapetanovic, I. M.: Computer-aided drug discovery and development (CADD): In silico-chemico-biological approach. *Chemico-Biological Interactions*, 2008, 171 (2), 165 – 176. Doi:10.1016/j.cbi.2006.12.006.
- Ke, Y.-Y., Coumar, M. S., Shiao, H.-Y., Wang, W.-Ch., Chen, Ch.-W., Song, J. S., Chen, Ch.-H., Lin, W.-H., Wu, S.-H., Hsu, J. T. A., Chang, Ch.-M., Hsieh, H.-P.: Ligand efficiency based approach for efficient virtual screening of compound libraries. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 83, 226 – 235. Doi:10.1016/j.ejmech.2014.06.029.
- Kim, H. T., Kim, S., Na, B. K., Chung, J., Hwang, E., Hwang, K. Y.: Structural insights into the dimer-tetramer transition of FabI from *Bacillus anthracis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 493 (1), 28 – 33. Doi:10.1016/j.bbrc.2017.09.084.
- Kim, K.-H., Ha, B. H., Kim, S. J., Hong, S. K., Hwang, K. Y., Kim, E. E. K.: Crystal Structures

of Enoyl-ACP Reductases I (FabI) and III (FabL) from *B. subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 406 (3), 403 – 415. Doi:10.1016/j.jmb.2010.12.003.

Kim, S. J., Ha, B. H., Kim, K.-H., Hong, S. K., Shin, K.-J., Suh, S. W., Kim, E. E. K.: Dimeric and tetrameric forms of enoyl-acyl carrier protein reductase from *Bacillus cereus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 400 (4), 517 – 522. Doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.083.

Kim, Y. G., Seo, J. H., Kwak, J. H., Shin, K. J.: Discovery of a potent enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI) inhibitor suitable for antistaphylococcal agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015, 25 (20), 4481 – 4486. Doi:10.1016/j.bmcl.2015.08.077.

Kukol, A.: Consensus virtual screening approaches to predict protein ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 46 (9), 4661 – 4664. Doi:10.1016/j.ejmech.2011.05.026.

Li, J., Song, Y., Li, F., Zhang, H., Liu, W.: FWA-Vina: A novel optimization algorithm for protein-ligand docking based on the fireworks algorithm. *Computational Biology and Chemistry*, 2020, 88, 107363. Doi:10.1016/j.compbiolchem.2020.107363.

Li, Q.: Virtual screening of small-molecule libraries. In *Small Molecule Drug Discovery*. B. m.: Elsevier, 103 – 125. Doi:10.1016/B978-0-12-818349-6.00004-2.

Lipinski, Ch. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X (96) 00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3 – 25. 1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 46 (1 – 3), 3 – 26. Doi:10.1016/S0169-409X(00)00129-0.

Massarová, P.: *Virtuálny screening s využitím molekulového dokovania* [Virtual screening using molecular docking]. Bratislava. Diplomová práca. Univerzita Komenského, 2020. 76 s.

Moellering, R. C.: Discovering new

antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011, 37 (1), 2 – 9. Doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.08.018.

Niu, G., Li, W.: Next-generation drug discovery to combat antimicrobial resistance. *Trends in Biochemical Sciences*, 2019, 44 (11), 961 – 972. Doi:10.1016/j.tibs.2019.05.005.

Rana, P., Ghouse, S. M., Akunuri, R., Madhavi, Y. V., Chopra, S., Nanduri, S.: FabI (enoyl acyl carrier protein reductase) – A potential broad spectrum therapeutic target and its inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 208, 112757. Doi:10.1016/j.ejmech.2020.112757.

Schiebel, J., Chang, A., Lu, H., Baxter, M. V., Tonge, P. J., Kisker, C.: *Staphylococcus aureus* FabI: inhibition, substrate recognition, and potential implications for *in vivo* essentiality. *Structure*, 2012, 20 (5), 802 – 813. Doi:10.1016/j.str.2012.03.013. Accessed October 15, 2021.

Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., Lowe, E. W.: Computational methods in drug discovery. *Pharmacological Reviews*, 2014, 66 (1), 334 – 395. Doi:10.1124/pr.112.007336.

Spellberg, B., Shlaes, D.: Prioritized current unmet needs for antibacterial therapies. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2014, 96 (2), 151 – 153. Doi:10.1038/clpt.2014.106.

Theuretzbacher, U., Bush, K., Harbarth, S., Paul, M., Rex, J. H., Tacconelli, E., Thwaites, G. E.: Critical analysis of antibacterial agents in clinical development. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18 (5), 286 – 298. Doi:10.1038/s41579-020-0340-0.

Torres, M. D., De La Fuente-Nunez, C.: Toward computer-made artificial antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 2019, 51, 30 – 38. Doi:10.1016/j.mib.2019.03.004.

Trott, O., Olson, A. J.: AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 2009, NA-NA. Doi:10.1002/jcc.21334.

Waseem, T., Zargaham, M. K., Shahid, F., Rajput, T. A., Ibrahim, B., Babar, M. M.: 2020.

New approaches to antimicrobial discovery: Current development and future prospects. *In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. B. m.: Elsevier, 67–77. Doi:10.1016/B978-0-12-820528-0.00006-5.

Yao, J., Rock, CH. O.: Resistance mechanisms and the future of bacterial enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI) antibiotics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2016, 6 (3), a027045. Doi:10.1101/cshperspect.a027045.



THE EFFECT OF *HUMULUS LUPULUS* ON *ARTEMIA FRANCISANA*

Hudáková, Nikola¹; Beňová, Katarína²; Špalková, Michaela²

¹Centre of Experimental and Clinical Regenerative Medicine
University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice

²Department of Biology and Physiology
University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice
The Slovak republic

nikola.hudakova@student.uvlf.sk

ABSTRAKT

Hops is a plant that has a wide range of applications in pharmacy due to its sedative, antibacterial, and antioxidant qualities, thanks to various structures and secondary metabolites. Envirototoxicity, environmental pollution and pollutants in the food chain are important factors that threaten human health. The aim of the presented study was to investigate the effect of aqueous extracts of hops (*Humulus lupulus* L.) on shrimp (*Artemia francisana* Kellogg). We used aqueous extracts in our experiments, specifically aqueous extracts of fresh drug of hops – *Lupuli flos*, dried drug of hops – *Lupuli flos*, and hop powder in concentrations of 2.5 and 5 g.l⁻¹. Subsequently, we used a five-day biotest to study the behaviour of the model organism *Artemia francisana* Kellogg and observed lethality after 24, 48, 72, and 96 hours. Our findings indicate that the toxicity of the tested aqueous extracts increases with concentration; after 48,

72, and 96 hours we observed 100 % lethality at all concentrations tested. When we compared the lethality of *Artemia francisana* Kellogg after exposure to extracts from fresh and dried plants, we discovered no significant differences in toxicity.

Key words: hops; pharmacy; phytopharmaceuticals; shrimp

INTRODUCTION

Humulus lupulus L. is a plant that contains a number of phytochemical compounds that are vital for human health and can also be used to treat certain disorders (Jurková et al., 2011). Hops has long been used to treat anorexia, cramps, menopause, and as a diuretic in traditional medicine. Its sedative properties have long been used to treat insomnia, depression, hysteria, and other nerve irritations. Hops have been used to cleanse and regenerate the skin, as an adjuvant to healing ointments, and for inflammation of the urinary tract due to its antiseptic properties

(Chadwick, Pauli, Farnsworth, 2006a).

Active substances of hops consist of a combination of dimers, trimers, and antioxidants derived from catechin and epicatechin (oligomeric proanthocyanogens – OPC) and prenylated flavonoids, with xanthohumol being the most common (0.25 – 1.1 per cent by weight). All of the substances described can help prevent the onset of certain diseases and have a therapeutic effect on human health (Jurková et al., 2011). In the *European Pharmacopoeia* 5 (2005), dried, whole female hop strobiles are included. They are also mentioned in the ESCOP monograph (2003). Therapeutic indications are similar to those of valerian roots, e. g. tension, restlessness and sleep disorders. *Humulus lupulus* L. are included in the monograph in DAB 10 (Deutsches Arzneibuch, 1991), PF 10 (Pharmacopée Française, 1989) and the British Herbal Pharmacopoeia (1983) (EMA, 2020). It is usually combined with other sedative herbs including *Valeriana officinalis* L., *Passiflora incarnata* L. and *Melissa officinalis* L. to treat sleep disorders. Hop extracts are also believed to be useful as antioxidants, anti-inflammatory agents, antimicrobial agents (antibacterial and antifungal agents), and cytotoxic agents. The dried strobiles are pulverized and used in tea blends or made into an infusion. Bath oils are made with lipophilic extracts, while hydroalcoholic liquid extracts are used as sedatives internally (Chadwick, Pauli, Farnsworth, 2006b; EMA, 2014; EMA, 2020).

MATERIALS AND METHODS

In the experiments we used aqueous extracts from fresh drug of *Humulus lupulus* L. (*Lupuli flos*), dried drug *Lupuli flos* and so-called hop flour (lupulin). The strobiles were dried in a drier immediately after harvesting for 24 hours at a temperature of 50 – 60 °C. Hop flour was prepared by grinding to the desired size. In our study, we used an extraction method of a single step maceration at elevated temperature. According to the European Medicines Agency, only aqueous extract groups were considered when

deciding the method of preparation and quantities based on traditional techniques of preparation in European Union countries, as ethanol and ether extracts can have an adverse effect on shrimp. The lowest specified concentration, 2.5 g.l⁻¹, was chosen (see Tab. 1). The hops used in our experiments were from the cultivar Žatecký poloranný červeňák, which has α-bitter acid concentration of about 10 %. The Agricultural Cooperative PD Vlára Nemšová provided us with fresh as well as dried plants.

Sample preparation:

Tab. 1: Sample preparation

Experimental group	Concentration (g.l ⁻¹)	Preparation method
P1	2.5	5 minute boiling of dried strobiles
P2	5	5 minute boiling of dried strobiles
P3	2.5	5 minute boiling of fresh strobiles
P4	5	5 minute boiling of fresh strobiles
P5	2.5	5 minute boiling of hop flour
P6	5	5 minute boiling of hop flour
K – control	0	–

In our experiment, *Artemia franciscana* cysts hatched in seawater with the following composition: NaCl 23.900 g.l⁻¹, MgCl₂ x 6H₂O 10.830 g.l⁻¹, CaCl₂ x 6H₂O 2.250 g.l⁻¹, KCl 0.680 g.l⁻¹, Na₂SO₄ x 10H₂O 9.060 g.l⁻¹, NaHCO₃ 0.200 g.l⁻¹, SrCl₂ x 6H₂O 0.040 g.l⁻¹, KBr 0.099 g.l⁻¹, H₃BO₃ 0.027 g.l⁻¹, pH – 8.31. The hatching process took 24 hours. We used a vibrating diaphragm compressor to achieve optimal conditions for hatching.

10 freshly hatched nauplii were placed in polystyrene Petri dishes with a diameter of 60 mm and a total seawater volume of 10 ml (including the sample). After disinfecting the thermostat, petri dishes were placed at a temperature of 20 °C (Kočišová, 2005). In the experiment, aqueous extracts from dried

Tab. 2: Lethality (%) of *Artemia franciscana* after the effect of aqueous extracts of hops

Experimental group	24 hrs			48 hrs			72 hrs			96 hrs		
	x	n	s	x	n	s	x	n	s	x	n	s
P ₁	94*	5	4.3	100*	5	0	100*	5	0	100*	5	0
P ₂	98*	5	4.3	100*	5	0	100*	5	0	100*	5	0
P ₃	74*	5	12.9	100*	5	0	100*	5	0	100*	5	0
P ₄	96*	5	8.6	100*	5	0	100*	5	0	100*	5	0
P ₅	88*	5	8.6	100*	5	0	100*	5	0	100*	5	0
P ₆	94*	5	4.3	100*	5	0	100*	5	0	100*	5	0
K	0	5	0	0	5	0	0	5	0	2	5	4.3

x – average lethality in %

n – number of groups tested

s – standard deviation

* statistical significance demonstrated with the control group (p = 0.05)

hops, fresh hops, and hop flour were used. Aqueous extracts were prepared by boiling dried, fresh hops, and hop flour for 5 minutes, followed by cooling to room temperature and filtration.

During the test, we examined a total of 350 individual brine shrimps divided into seven groups, each with 50 shrimps (5 petri dishes). For the experiment, we counted the number of dead ones after 24, 48, 72 and 96 hours and observed the movement of the live ones and possible changes. The observation was performed with the naked eye against a dark background or with a magnifying glass and lighting against a dark background.

As the presence of dead individuals does not adversely affect the results, we did not remove these individuals. We considered a dead brine shrimp to be an individual in whom we did not observe any movement for 10 seconds. We recorded the results for the duration of the experiment and subsequently we compared the results against the control group and statistically evaluated them. We used the Dean-Dixon test to exclude outliers (Dvořák, 1995). We tested differences between groups using significant differences in probability (Hayes, Laws, 2001).

Statistical analysis of results

The arithmetic mean of the 5 tested dishes within one experimental group was calculated as the mean mortality value in the individual groups. The rate of variation was the standard deviation of one measurement s, which is calculated according to the formula, which is determined for a range of less than 8:

$$s = R \times k_n$$

R – variation range ($x_{\max} - x_{\min}$)

k_n – coefficient with a value of 0.430 for five dishes

Then we tested the differences between the averages of the individual groups of experimental objects using significant differences in probability (Wayland, Hayes, 1991; Hayes, Laws, 2001).

RESULTS AND DISCUSSION

The effect of aqueous extracts from *Humulus lupulus* L. on the model organism *Artemia franciscana* Kellogg is presented in this paper. The effects of extracts from mashed dried drug, fresh drug, and

Tab. 3: Lethality (%) of *Artemia franciscana* after the effect of aqueous extracts prepared from fresh plants at lower (P3) and higher (P4) concentrations

Experimental group	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
P ₃	74	100	100	100
P ₄	96	100	100	100

Tab. 4: Lethality (%) of *Artemia franciscana* after the effect of macerates prepared from fresh (P3) plants, dried plants (P1) and hop flour (P5) at a concentration of 2.5 g.l⁻¹

Experimental group	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
P ₁	94	100	100	100
P ₃	74	100	100	100
P ₅	88	100	100	100

hop flour at 2.5 g.l⁻¹ and 5 g.l⁻¹ concentrations were studied (see Tab. 2).

Lethality was statistically significantly higher in groups P1, P2, P3, P4, P5, and P6, i. e. in all observed groups, when compared to the control group (see Tab. 2). Thus, we observed a statistically significant increase in lethality in the groups containing aqueous extract from dried hops at a lower 2.5 g.l⁻¹ (P1) and higher 5 g.l⁻¹ (P2) concentration, in the groups containing the extract fresh hop cones at a lower 2.5 g.l⁻¹ (P3) and a higher concentration of 5 g.l⁻¹ (P4), and also for samples with the extract from hop flour at a lower concentration of 2.5 g.l⁻¹ (P5) and a higher concentration of 5 g.l⁻¹ (P6) at all observed time intervals, i. e. after 24, 48, 72 and 96 hours.

In terms of movement, we noticed the following differences compared to the control group. In groups P2 (5 g.l⁻¹ concentration of extract from dried drug *Lupuli flos*) and P6 (5 g.l⁻¹ concentration of hop flour extract) the brine shrimps had a slightly slowed motion, in group P3 (2.5 g.l⁻¹ concentration of extract from fresh drug *Lupuli flos*) we recorded that the shrimps moved significantly slower and in the group of fresh hops extract at a higher concentration

(P4) some of them moved solely in one place, their mobility was also significantly slowed down.

We observed a statistically significant increase in lethality compared to P3 – a sample containing a concentration of 2.5 g.l⁻¹ fresh drug extract – and P4 – a sample containing a concentration of 5 g.l⁻¹ fresh drug extract after 24 hours when comparing the test group of fresh drug extract with a lower concentration of 2.5 g.l⁻¹ after 48 hours compared to the effect after 24 hours (see Tab. 3). When observing lower (P1 – dried drug extract, P5 – hop flour extract) and higher (P2 – dried drug extract, P6 – hop flour extract) concentrations of samples with the extracts from dried drug and hop flour, we did not find a statistically significant increase in lethality.

When comparing the effect of fresh vs. dried drug of *Lupuli flos* (see Tab. 4), statistically significant increase in lethality was observed in group P1 – 2.5 g.l⁻¹ concentration of dried drug extract compared to group P3 – 2.5 g.l⁻¹ concentration of fresh drug extract after 24 hours. There was no statistically significant increase in lethality of fresh drug extract (samples P3, P4) when compared to hop flour extract (samples P5, P6), nor was there a significant increase in lethality of the aqueous extract from dried drug (samples P1, P2) when compared to hop flour extract (samples P5, P6).

The use of embryonic stages of fish is one of the possible candidates for an alternative to acute toxicity tests and biotests on adult fish; not only for this reason it is necessary to deal with this experiments, try to put it into practice and compare the results with others. In 1995, a 5-day test for *Artemia franciscana* was introduced, the experiment was terminated by the death of control groups due to starvation (Dvořák, 1995). In the last few years, all *Artemia franciscana* tests have become extremely important in pharmacology (Sklenář et al., 2006) and toxicology (Sklenář et al., 2006; Nováková et al., 2007).

This study examined the effect of aqueous extracts of *Humulus lupulus* L. dried drug, fresh drug, and hop flour at 2.5 g.l⁻¹ and 5 g.l⁻¹ concentrations on the model organism *Artemia franciscana* Kellogg. We observed statistically significant increase in lethality

in all experimental groups as compared to the control group (see Tab. 2). After 24 hours, we observed a statistically significant increase in lethality in group P4 (5 g.l⁻¹) compared to group P3 (2.5 g.l⁻¹) in samples containing the extracts from fresh hops, in groups of dried hops and hop flour, samples with lower concentrations of lower lethality as in the experimental groups with higher concentrations, and samples with lower concentrations of lower lethality as well as in the experimental groups with higher concentrations. Therefore, we can assume that the release of a larger amount of active substances into the macerate prepared at an elevated temperature also increases the effect. We also compared the effect of the drying, in Table 4 we can see a statistically significant increase in lethality in the observation group P1 (2.5 g.l⁻¹) of dried hops extract compared to the group P3 (5 g.l⁻¹) of fresh hops extract after 24 hours, indicating that the drying process also affects the effect and lethality. Thus, not only the active substances found in the extract from fresh hops, but also their metabolic products may be responsible for the effect. Hänsel et al. and later Wohlfart et al. investigated the degradation product of bitter acids, humulons and lupulons, the five carbon alcohol, 2'-methyl-3-buten-2-ol, which showed active depression of the central nervous system after intraperitoneal administration to mice at high doses (Hänsel, Wohlfart et al., 1983). This alcohol is present in fresh hops only in small amounts, it reaches a higher concentration by the metabolism of bitter acids, the maximum after gentle storage after two years at room temperature (EMA, 2014; Krofta et al., 2018). In the experimental groups containing aqueous extracts from dried hops and hop flour, we observed a slight slowdown in the movement of gills, while in the groups containing fresh drug extracts the movement was significantly slower and at higher concentrations some shrimps moved only in one place in a circle. We can therefore assume that the sedative effect of hops is not only caused by bitter acids, but also by their combination with other substances and essential oils, which are present in the fresh plant in larger quantities due to their volatility.

According to Hänsel and Wohlfart (Hänsel, Wohlfart et al., 1983), in addition to 2'-methyl-3-buten-2-ol (a degradation product of bitter acids), silica myrcene was responsible for the sedative effect of hops in mice. Nevertheless, Benkherouf et al. demonstrate humulone's ability in modulating of GABAA receptor function (Benkherouf et al., 2020). On the other hand, Bravo et al. (EMA, 2014) described the attenuation of laboratory mice after intraperitoneal administration of three different hop extracts (aqueous, alcoholic and etheric). This effect was observed only at high doses of ether extract, which completely inhibited the motor activity of the mice 20 minutes after injection. In the aqueous extraction of hops, the effect was minimal, so this study showed that the sedative effect of hops significantly depended on the type of solvent used for the extraction. In our experiment, we observed 100 % lethality after 48, 72 and 96 hours. As we used the lowest concentrations for the preparation of the sample groups described by the European Medicines Agency for traditional use in Europe, we can assume that this lethality may be due to the high content of α , β -bitter acids in the variety used and their antimicrobial, antibacterial and antifungal effect.

β -acids have a long-standing reputation as antibacterial agents (especially against gram-positive bacteria), which has led to some applications of acid-rich hop products as preservatives. The three prenyl groups present in lupulin appear to disrupt the construction and functioning of bacterial cell walls, leading to the escape of cellular contents. Antimicrobial activity has been reported on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Enterococcus* sp. and *Mycobacterium tuberculosis* (Kermanshahi et al., 2009; Bartmańska et al., 2018). However, antifungal activity has been documented for the genera *Trichophyton*, *Candida*, *Fusarium* and *Mucor* (EMA, 2014; Bartmańska et al., 2018).

CONCLUSION

This article was aimed at observing the effect of aqueous extracts from *Humulus lupulus* L. on the model organism *Artemia franciscana* Kellogg (brine shrimp) using a five-day biotest.

Our findings suggest that hops toxicity increases with concentration. However, when we compared the lethality of *Artemia* following exposure to extracts from fresh and dried plants, we found no significant differences in toxicity.

We observed slower movement in the experimental group compared to the control group. We saw a modest slowdown in the groups with a higher concentration (5 g.l⁻¹) of dried strobiles extracts and hop flour extracts. At lower concentration (2.5 g.l⁻¹) and higher concentration (5 g.l⁻¹) of fresh drug extracts, we observed a considerable slowing in movement. Some shrimps only moved in one direction, and their movement was noticeably restricted.

REFERENCES

Bartmańska, A. et al.: Antimicrobial properties of spent hops extracts, flavonoids isolated therefrom, and their derivatives. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 2018, 23 (8), 2059. <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/8/2059>. Accessed August 20, 2021.

Benkherouf, A.Y., Eerola, K., Soini, S. L., Uusi-Oukari, M.: Humulone modulation of GABAA receptors and its role in hops sleep-promoting activity. *Frontiers in Neuroscience*, 2020, 0. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2020.594708/full>. Accessed August 22, 2021.

Dvořák, P.: Modifikovaný test s *A. salina* pro sledování vlivu interakcí cizorodých látek [Modified test with *A. salina* to monitor the effect of foreign substance interactions]. Toxicita a biodegradabilita odpadu a látek významných ve vodním prostředí. *Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický a Aqachemie*, 1995, 25 – 29.

European Medicines Agency (EMA):

Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC): *Final assessment report on Humulus lupulus L., flos*. London, 2014, 38. https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-humulus-lupulus-l-flos_en.pdf. Accessed August 15, 2021.

European Medicines Agency (EMA): Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC): *Final assessment report on Valeriana officinalis L., radix and Humulus lupulus L., flos – Revision 1*. Amsterdam, 2020. 67. https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-valeriana-officinalis-l-radix-humulus-lupulus-l-flos-revision-1_en.pdf. Accessed August 15, 2021.

Hayes, W. J., Laws, E. P.: *Handbook of Pesticide Toxicology*. 3rd edn. United Kingdom: Elsevier, 2010, 1908.

Hänsel, R., Wohlfart, R., Coper, H.: Sedative-hypnotic compounds in the exhalation of hops, II. *Zeitschrift Fur Naturforschung. Section C. Biosciences*, 1980, 35 (11 – 12), 1096 – 1097.

Chadwick, L. R., Pauli, G. F., Farnsworth, N. R.: The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 2006a, 13 (1 – 2), 119 – 131. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16360942/>. Accessed September 2, 2021.

Jurková, M., Kellner, V., Culik, J.: Hops – an abundant source of antioxidants. Methods to assessment of antioxidant activity of hop matrix. *Kvasny Prumysl*, 2011, 57, 366. http://kvasnyprumysl.cz/en/artkey/kpr-201110-0001_Chmel_-_bohaty_zdroj_antioxidantu_Metody_k_posouzeni_antioxidacni_aktivity_chmelove_matrice.php. Accessed August 22, 2021.

Kermanshahi, K. R., Esfahani, B. N., Pour Babaie, A. A., Asghari, Gh. R., Serkani, J. E.: The study of antibacterial effect of *Humulus lupulus* on some of gram positive & gram negative bacteria. *Journal of Medicinal Plants*, 2009, 8, 92 – 97, 164. <http://www.cabdirect.org/abstracts/20093286681.html;jsessionid=0F41CC0CE78BE0293D010>

D6D18264ABC. Accessed August 22, 2021.

Kočišová, A.: Dezinfekcia prostredia – súčasť preventívnych opatrení pri infekčných chorobách a parazitózach v chovoch zvierat [Environmental disinfection – part of preventive measures for infectious diseases and parasitosis in animal husbandry]. *Dezinfekce, Dezinsekce, Deratizace*, 2005, 4, 149 – 153.

Krofta, K., Houška, M., Mikyška, A., Čermák, P.: Changes in the composition of hop secondary metabolites induced by high hydrostatic pressure. *Journal of the Institute of Brewing*, 2018, 124 (2), 158 – 172. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jib.481>. Accessed August 28, 2021.

Nováková, J., Daňová, D., Strišková, K., Hromada, R., Mičková, H., Rabišková, M.: Zinc and cadmium toxicity using a biotest with *Artemia franciscana*. *Acta Veterinaria Brno*, 2007, 76 (4), 635 – 642. https://www.researchgate.net/publication/250175005_Zinc_and_Cadmium_Toxicity_Using_a_Biotest_with_Artemia_franciscana. Accessed July 25, 2021.

Sklenář, Z., Dvořák, P., Beňová, K.: Možnosti využití biotestu s *Artemia salina* při studování toxikologických účinků inhibitorů cyklin-dependentních kináz [Possibilities of using the bioassay with *Artemia salina* in the study of toxicological effects of cyclin-dependent kinase inhibitors]. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2006, 20 (2), 59. https://www.solen.cz/artkey/far-200602-0002_Moznosti_vyuziti_biotestu_s_Artemia_salina_pri_studovani_toxikologickych_ucinku_inhibitoru_cyklin-d.php. Accessed September 15, 2021.

Wohlfart, R., Wurm, G., Hänsel, R., Schmidt, H.: Detection of sedative-hypnotic active ingredients in hops. 5. Degradation of bitter acids to 2-methyl-3-buten-2-ol, a hop constituent with sedative-hypnotic activity. *Archiv Der Pharmazie*, 1983, 316 (2), 132 – 137. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6847343/>. Accessed August 9, 2021.



SÚČASNÉ TRENDY V LIEČBE UROLITIÁZY (KAZUISTIKA)

CURRENT TRENDS IN THE PHARMACOTHERAPY OF UROLITHIASIS (CASE STUDY)

Čierna, Barbara¹; Čonková, Eva¹; Kičinko, Milan²

¹Katedra farmakológie a toxikológie

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

²Urologická ambulancia, Námestie Svätého Cyrila a Metoda 1751/77, 078 01 Sečovce
Slovenská republika

eva.conkova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Urolitiáza je multifaktoriálnym ochorením, ktoré označuje prítomnosť močových konkrementov v močovom systéme. U väčšiny pacientov je možné ju definovať ako metabolické ochorenie s urologickými prejavmi. Zistenie príčiny je nevyhnutné pre správnu diagnostiku a následné určenie terapeutického postupu. Jedná sa o ochorenie s tendenciou častých recidív, preto liečba nekončí odstránením konkrementu, ale je potrebné pokračovať v prevencii recidív. Výber liečby je individuálny pre každého pacienta. V súčasnosti je možné úspešne predchádzať recidívam užívaním dvoch prípravkov BLEMAREN N a ROWATINEX, ktoré napomáhajú rozpúšťať močové konkrementy.

Cieľom tejto štúdie bolo poukázať na aktuál-

ne trendy v liečbe urolitiázy analýzou kazuistík u troch vybraných pacientov. Prezentované kazuistiky poukazujú na nevyhnutnosť zmeny životosprávy a zodpovednú spoluprácu pacienta počas liečby. U dlhodobo liečených pacientov došlo po absolvovaní liečby a dodržiavaní diétnych opatrení k priaznivým zmenám zdravotného stavu.

V prípade pacientky 1 dochádzalo k opakovaným bakteriálnym infekciám a liečbe antibiotikami. Podstúpila extrakorporálnu litotripsiu, avšak potom odmietla spolupracovať, nedodržiavala indikovanú liečbu BLEMARENOM N a nedostavila sa ani na kontrolné vyšetrenia. Po pretrvávajúcich nefralgiách jej bola endoskopicky vykonaná nefroskopia a boli odstránené močové konkrementy. Pacient 2 podstúpil nefroskopiu a extrakorporálnu litotripsiu,

opakovane spontánne vymočil početné konkrémenty a dodržiaval diétne opatrenia vzhľadom na potvrdené metabolické poruchy, ktoré vznik urolitiázy vyvolali. Úspešná liečba pacienta sa dosiahla dlhodobým užívaním ROWATINE-XU. Pacientka 3 mala podobný priebeh ochorenia ako pacient 2, podstúpila operačné zákroky na odstránenie konkrémentov, opakovane spontánne vymočila konkrémenty. Kvôli pretrvávajúcim bakteriálnym infekciám jej boli indikované aj antibiotiká. Indikácia BLEMARENU N pomohla pri rozpúšťaní močových konkrémentov.

Kľúčové slová: diagnostika; liečba; prevencia; urolitiáza

ABSTRACT

Urolithiasis is a multifactorial disease that confirms the presence of urinary stones in the urinary system. In most patients, it can be defined as a metabolic disease with urological manifestations. Detection of cause is necessary for the correct diagnosis and subsequently specifying the therapeutic procedure. It is a disease with a tendency for frequent recurrences, so its treatment does not end with the removal of the stones, but it is necessary to continue the prevention of recurrences. The suitability of the treatment is determined individually for each patient. Currently, it is possible to successfully prevent relapses by using two products, BLEMAREN N and ROWATINEX, which help to dissolve urinary stones.

The aim of the study was to point out current trends in the treatment of urolithiasis by analyzing case reports in three selected patients. The created case reports also underlined the necessity of a change in lifestyle and responsible cooperation of the patient in the treatment. In long-term treated patients, there were salutary changes in the health status after treatment.

In the case of Patient 1 there were recurrent

bacterial infections and antibiotic treatment was indicated. She underwent extracorporeal lithotripsy, but then refused to cooperate, did not follow the indicated treatment with BLEMAREN N, and did not attend follow-up examinations. After persistent nephralgias, she underwent endoscopic nephroscopy and urinary calculi were removed. Patient 2 underwent nephroscopy and extracorporeal lithotripsy, repeatedly spontaneously urinated numerous stones, and followed dietary measures due to confirmed metabolic disorders that induced urolithiasis. Successful treatment of the patient was achieved with long-term use of ROWATINEX. Patient 3 had a similar course of the disease as Patient 2, underwent surgical procedures to remove stones, repeatedly spontaneously urinated stones. Antibiotics have also been indicated due to persistent bacterial infections. The indication of BLEMAREN N helped to dissolve urinary stones.

Key words: diagnosis; prevention; treatment; urolithiasis

ÚVOD

Urolitiáza postihuje v priebehu života približne 10 % populácie. Je relatívne často sa vyskytujúcim ochorením a len vo výnimočných prípadoch sa vyskytuje iba raz za život bez recidívy (Křížek a Sadílek, 1989).

Močové konkrémenty (kamene) samé o sebe nie sú ochorením, sú následkom celkového ochorenia na podklade metabolickej poruchy, infekcie močových ciest alebo morfológických a funkčných zmien uropoetického systému. V diagnostike a liečbe urolitiázy bol zaznamenaný výrazný pokrok, ale aj napriek tomu stále predstavuje významný medicínsky problém. K recidívam urolitiázy dochádza u pomerne vysokého percenta pacientov, čo podstatne zvyšuje morbiditu, a to môže potenciálne viesť k vážnym chronickým obličkovým ochoreniam. Racionálny postup pri diagnostike a lieč-

be umožňuje čo najefektívnejšie dosiahnutie terapeutického cieľa, a to zbavenie pacienta ťažkostí, uvoľnenie močovej obštrukcie a odstránenie konkrementov (Nagy, 2015).

V liečbe urolitiázy sú ako lieky prvej voľby používané liečivá na rozpúšťanie konkrementov BLEMAREN N (Aristo Pharma GmbH, Nemecsko) a ROWATINEX (Rowa Pharmaceuticals Ltd., Írsko). Účinnými látkami v lieku BLEMAREN N sú citrónan sodný, hydrogenuhličitan draselný a bezvodá kyselina citrónová. Obsahuje zásadité citráty, ktoré znižujú kyslosť moču, čím zabezpečujú rozpúšťanie kameňov v močových cestách. Je určený aj na zabránenie novotvorby močových konkrementov, ako adjuvans pri liečbe hyperurikémie a môže účinne podporiť liečbu alopurinolom pri hyperurikémii (BLEMAREN N, www.adc.sk, 2021).

ROWATINEX patrí medzi fytofarmaká a zaraduje sa do skupiny diuretik a spazmolytik. Je indikovaný na liečbu urolitiázy, nefrolitiázy, na podporu rozpadu, rozpustenia a vyplavovania obličkových konkrementov. Zvyšuje sekréciu moču, uvoľňuje spazmy močových ciest a tým podporuje vylučovanie konkrementov. Pôsobí aj preventívne proti tvorbe nových kameňov, pomáha eliminovať zvyšky konkrementov vznikajúcich následkom litotripsie. Má aj hyperemický účinok a zmierňuje zápal. Je účinný aj na grampozitívne a gramnegatívne baktérie. Liečivá obsiahnuté v tomto prípravku sú terpeny: alfa-pinén, beta-pinén, kamfén a ďalšie organické zlúčeniny ako cineol, fenchón, borneol a anetol (ROWATINEX, www.adc.sk, 2021).

Liečba urolitiázy nekončí odstránením konkrementov, ani ich deštrukciou a následnou elimináciou. Významnou je najmä prevencia (metafylaxia), kedy vďaka jej dôslednej realizácii sa výskyt recidív výrazne znižuje. Pri liečbe a prevencii recidív urolitiázy má veľký význam dôsledné zhodnotenie typu urolitiázy. Najdôležitejším krokom v diagnostike a liečbe je vypracovanie komplexného klinického obrazu, poznanie všetkých rizikových faktorov, diagnostických aj liečebných

metód a postupov brániacich recidíve ochorenia, ktoré spočívajú v náročnej úprave metabolických porúch, ktoré spôsobili vznik konkrementov.

Táto štúdia sa zaoberá analýzou súčasných trendov v liečbe urolitiázy. Pri riešení danej problematiky sme sa zamerali predovšetkým na porovnávanie diagnostických a terapeutických postupov použitých pri liečbe troch vybraných pacientov s rôznym typom urolitiázy.

MATERIÁL A METÓDY

V spolupráci so súkromnou urologickou ambulanciou v Sečovciach bola vykonaná analýza troch kazuistík na základe zdravotných záznamov pacientov, u ktorých bola diagnostikovaná a dlhodobo liečená urolitiáza. V rámci analýzy kazuistík sme sa zamerali predovšetkým na priebeh ochorenia, terapeutické postupy a porovnanie rôznych typov urolitiáz. Pri získavaní a spracovaní dát zo zdravotnej dokumentácie pacientov bol rešpektovaný zákon o ochrane osobných údajov.

VÝSLEDKY

• Kazustika 1

Anamnestické údaje: žena, narodená v roku 1962, u ktorej bola potvrdená diagnóza podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb 10 (MKCH 10) N20.0 Konkrement obličky. Okrem toho sa lieči na arteriálnu hypertenziu, srdcové ochorenia a chronickú obštrukčnú chorobu pľúc.

Priebeh ochorenia a liečba:

V júli 2007 bola pacientka prijatá do urologickej ambulancie po odporúčaní všeobecného lekára za účelom odborného vyšetrenia z dôvodu zvýšenej hladiny erytrocytov v moči. Bol jej vykonaný odber moču cievkou, následne bola zistená a mikroskopicky potvrdená hematuria a nefrolitiáza. Pacientke bol odporúčaný dostatočný príjem tekutín a diétne opatrenia.

V novembri 2011 došlo k zhoršeniu zdravotného

Obr. 1: USG snímka obličky s konkrementom u pacienta 1



Zdroj: Kičinko, 2018

stavu spojeného s častým močením, únikom moču a noktúriou, 2 – 4-krát za noc. Stav pacientky bol uzavretý ako nestabilný hyperaktívny dráždivý močový mechúr (N31.0.) a neuromuskulárna dysfunkcia močového mechúra (N31.8.). Indikovaná jej bola liečba liekom trospiumchloridom (SPASMED tbl. 5 mg), ktorý užívala 2 x denne (ráno a večer). Opätovne jej bolo doporučené dodržiavanie diétného a pitného režimu.

Pri návšteve pacientky v urologickej ambulancii v novembri 2015 výsledky vyšetrenia moču potvrdili infekciu močovej sústavy s pozitívnym nálezom baktérie *Klebsiella pneumoniae*. Pacientke bolo indikované antibiotikum zo skupiny cefalosporínov: cefixim (SUPRAX tbl. 400 mg), 1 tableta každých 24 hodín v trvaní 7 dní.

Pri kontrolnom vyšetrení v auguste 2016 bol pacientke odobratý moč. Mikrobiologické vyšetrenie moču potvrdilo prítomnosť baktérie *Escherichia coli*, preto jej bola znovu nasadená antibiotická liečba. Indikované jej bolo cefalosporínové an-

tibiotikum cefadroxil (CEDROX tbl. 1000 mg) každých 12 hodín na 10 dní.

Začiatkom roku 2018 bola pacientka hospitalizovaná na chirurgickom oddelení, kde bola prijatá s abdominálnou kolikou. Po podaní liekov bolesti ustúpili. Vykonané bolo vyšetrenie moču a USG. Na základe vyšetrení bola stanovená diagnóza – nešpecifikovaná hydronefróza (N13.3), vyšetrenie bolo potrebné doplniť RTG snímkou. Pacientke bola vypísaná žiadanka na CT vyšetrenie s intravenóznou vylučovacou urografiou (IVU).

Vo februári 2018 pacientka prišla na kontrolné vyšetrenie s popisom z CT: pravá oblička je ľahko nad obvyklú veľkosť, na pyeloureterálnom prechode je prítomný kontrastný konkrement v dĺžke 13,6 mm a šírke 6,4 mm. Keďže bol potvrdený konkrement v obličkovej panvičke (pyelolitíáza), bola jej doporučená konzultácia v konziliárnej urologickej ambulancii, za účelom odstránenia konkrementu metódou extrakorporálna litotripsia (ESWL). Kvôli pretrvávajúcim kolikovitým bolestiam jej bol

predpísaný ALGIFEN NEO gto por (metamizol, pitofenón), ktorý mala užívať v prípade potreby (25 kvapiek 3 x denne).

13.2.2018 pacientka podstúpila ESWL, po ktorej sa cítila dobre, bez ťažkostí. Pri CT vyšetrení bol objavený konkrement vo veľkosti 15 x 10 mm, viditeľný aj pri USG vyšetrení (viď obr. 1) a zistená hydronefróza. Doporučená bola ureterorenoskopia (URS), dodržiavanie diétnych opatrení a liečba BISEPTOLOM (sulfametoxazol, trimetoprim *p.o.*) 1 x 1 tbl.

23.9.2020 bola pacientka hospitalizovaná na urologickom oddelení za účelom derivácie pravej obličky. CT urografia preukázala hydronefrózu vpravo, ktorej príčinou bol veľký hrboľatý konkrement s priemerom 11 mm, ktorý kompletne obturoval ureter. Pacientka podstúpila endoskopicky nefroskopiou, ktorou jej boli odstránené obličkové konkrementy.

Napriek opakovaným odporúčaniam užívanie liekov na rozpúšťanie konkrementov (BLEMAREN N alebo ROWATINEX) pacientka niekoľko rokov odmietala.

• **Kazustika 2**

Anamnestické údaje: muž, narodený v roku 1984, ktorému bola potvrdená diagnóza podľa MKCH 10 N20.0 Konkrement obličky. Okrem toho sa lieči na arteriálnu hypertenziu.

Priebeh ochorenia a liečba:

V decembri 2007 bol pacient hospitalizovaný na urologickom oddelení v Košiciach, kde mu bola diagnostikovaná urolitiáza v ľavej oblasti, následne pacientovi vykonali nefroskopiou cez dolný kalich. CT vyšetrenie v máji 2008 ukázalo, že obidve obličky sú bez ložiskových tumorotvorných zmien, potvrdila sa nefrolitiáza v ľavej oblasti a dilatácia ľavej obličkovej panvičky. K ústupu kolikovitých bolestí došlo po intramuskulárnom podaní ANALGINU inj. (metamizol, pitofenón, fempiverín). Pacientovi bola odporúčaná konzultácia na litiatickej ambulancii v Košiciach, kde bola predtým realizovaná operácia,

za účelom ďalšieho terapeutického postupu.

V marci v roku 2011 bol predložený nález z nefrologickej ambulancie, ktorý potvrdil zvýšenú funkčnú glomerulárnu filtráciu (GF) a chronické ochorenie obličiek (CKD) 1. štádia. Pacient bol nefrológom poučený o svojom zdravotnom stave, bola mu odporúčaná zvýšená diuréza a tiež nočné pitie tekutín. Nefrológ mu indikoval liečbu alopurinolom (MILURIT tbl. 300 mg) ½ tbl. denne a zníženie purínov v strave. Vzhľadom na obezitu pacienta mu bola doporučená redukcia váhy, obmedzenie príjmu kuchynskej soli a zvýšená pohybová aktivita. V urologickej ambulancii bolo pacientovi vykonané USG vyšetrenie, ktoré ukázalo prítomnosť konkrementu (veľkosť 4 mm) v pravej obličke na rozhraní strednej a hornej tretiny. Pri USG vyšetrení bola zistená drobná parenchýmová cysta v hornej tretine pravej obličky, preto mu bol indikovaný intramuskulárne ANALGIN inj. (metamizol, pitofenón, fempiverín). Bolo mu odporúčané užívanie výživového doplnku ROWATINEX, 3 x denne 1 kapsulu a kontrolné vyšetrenie u nefrológa na zhodnotenie metabolického stavu.

V septembri 2019 mu bolo vykonané laboratórne vyšetrenie moču a krvi, ktoré ukázalo výrazné zvýšenie hladiny C-reaktívneho peptidu (CRP) 22,97 mg.l⁻¹ (fyziologická hodnota 0 – 5 mg.l⁻¹). Chemický rozbor potvrdil prítomnosť konkrementov typu: kalciumoxalát-dihydrát (weddelit) 40 %, kalciumoxalát-monohydrát (whewellit) 30 %, hydroxyapatit (apatit) 30 %. U pacienta bola znova potvrdená urolitiáza obličky (viď obr. 2), hypocitraturia a hypomagneziúria. Bol mu doporučený zvýšený príjem tekutín, zníženie príjmu soli a živočíšnych bielkovín, dostatok pohybu a zvýšenie príjmu magnézia a citrátov.

V septembri 2020 pacient podstúpil extrakorporálnu litotripsiu, bol mu odstránený konkrement s veľkosťou 7 mm. Pri kontrolnom vyšetrení v decembri 2020 pacient neuvádzal problémy a USG vyšetrenie nepreukázalo prítomnosť konkrementov. Nadalej mu bolo odporúčané dodržiavať diétne opatrenia a užívať ROWATINEX 2 x 1 cps.

Obr. 2: USG snímka obličky s konkrementom u pacienta 2



Zdroj: Kičinko, 2018

• Kazustika 3

Anamnestické údaje: žena, narodená v roku 1974, ktorej bola potvrdená diagnóza podľa MKCH 10 N20.0 Konkrement obličky.

Priebeh ochorenia a liečba:

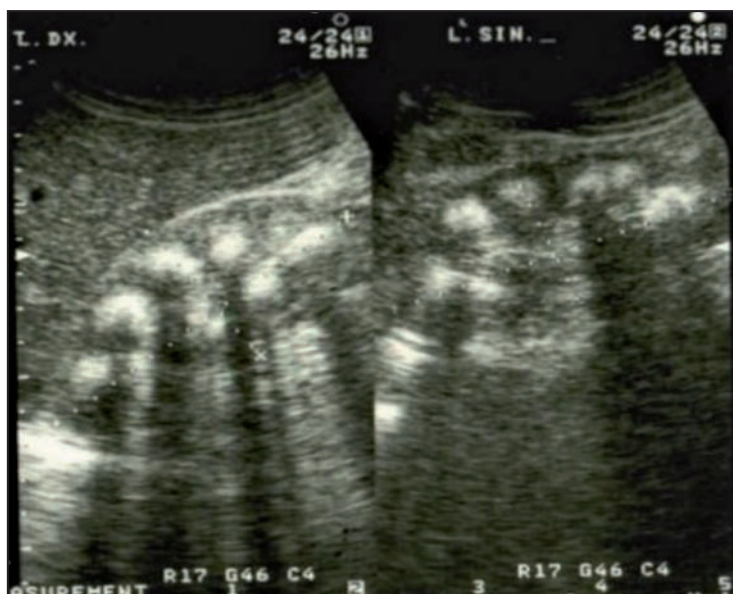
V októbri 2001 bola pacientke diagnostikovaná nefrolitiáza. Kompletné metabolické vyšetrenia potvrdili prítomnosť hypokaliémie a hypokalcémie. V júni 2003 bola vyšetrená v nefrologickej ambulancii. USG vyšetrenie obličiek ukázalo odliatkové kamene koralovitého typu, bola jej doporučená i.v. urografia. Urografia však nebola zrealizovaná pre nedostatok kontrastu a preto bola pacientka odporúčaná k vykonaniu extrakorporálnej litotripsie.

V januári 2004 bola pacientka hospitalizovaná v nemocnici v Košiciach, kde jej bola vykonaná ESWL v pravej obličkovej oblasti. Pacientke bol indikovaný liek BLEMAREN N, 3x denne 1 šumivá tableta a odporúčaný pitný a diétny režim.

Pacientka bola v júli 2004 prijatá v pohotovostnej ambulancii so silnou renálnou kolikou, podaný jej bol ANALGIN inj. (metamizol, pitofenón, fempiverín). Na urologickú ambulanciu prišla so silnými kolikovitými bolesťami v ľavej lumbálnej oblasti s pridruženou zvýšenou teplotou do 38 °C a nauzeou. Spontánne vymočila početné konkrementy, ktoré boli odoslané na rozbor, obsahovali Mg, P, CaCO₃. Bola potvrdená znížená funkcia obličiek, tvarové a veľkostné rozdiely konkrementov. Návrh na hospitalizáciu pacientka odmietla. Bol jej vykonaný odber moču a krvi a indikovaný ALGIFEN NEO gto por (metamizol, pitofenón) na uvoľnenie bolesti a kŕčov. Opätovne jej lekár predpísal BLEMAREN N, ktorý mala užívať 2 x denne podľa pH moču a AMOKSIKLAV 375 mg tbl. (amoxicilín, kyselina klavulanová) á 8 hod. 1 tbl. a odporučil užívať vhodné probiotiká.

Pacientka v máji 2005 prišla na vyšetrenie kvôli pobolievaniu v pravej obličkovej oblasti a vymоче-

Obr. 3: Dve USG snímky obličiek s konkrementom u pacienta 3



Zdroj: Kičinko, 2018

niu početných konkrementov (približne 12), rôznej veľkosti a tvaru. Vykonané laboratórne vyšetrenie preukázalo zvýšené hodnoty glomerulárnej filtrácie, Na^+ : 146 mmol.l^{-1} (fyziologická hodnota $134 - 145 \text{ mmol.l}^{-1}$), Ca^{2+} : $7,52 \text{ mmol/deň}$ (fyziologická hodnota $2,4 - 6,2 \text{ mmol.l}^{-1}$). Pacientke bol opakovane počas niekoľkých mesiacov podávaný ambulantne *i.m.* BUSCOPAN inj. (*butylskopolamín*) a indikovaný ALGIFEN NEO gto por (metamizol, pitofenón) kvôli pretrvávajúcim renálnym kolikám.

Od júna 2008 do mája 2009 pretrvávali u pacientky silné renálne koliky, s následným spontánnym vymočením konkrementov. Chemická analýza zachytených konkrementov potvrdila struvitové močové konkrementy. Pacientka močila moč ružového kontrastu, pridružená bola nauzea, pálenie a rezanie počas mikcie a bolestivosť v podbruší. Diagnostikovaná bola pretrvávajúca sekundárna renálna tubulárna acidóza (RTA) I. typu so sekundárnou hypokaliémiou a s rozvíjajúcim sa renálnym zlyhávaním. Ďalšie chemické analýzy

potvrdili prítomnosť konkrementov (vid' obr. 3) Brushit 54 % a Ca-oxalát 46 %. Indikované bolo užívanie drotaverínu (NO-SPA forte 80 mg tbl.) 1 tbl. (pri bolestiach) a antibiotikum ciprofloxacín (MEDOCIPRIN tbl. 250 mg), každých 12 hod. 1 tbl. po dobu 5 dní.

V novembri 2012 bola pacientka na kontrolnom vyšetrení po niekoľkonásobnom spontánnom vymočení početných konkrementov, pričom uvádzala silné kolikové bolesti, ktoré po užití spazmolytík a analgetík vymizli. Pacientka užívala metamizol (NOVALGIN tbl. 500 mg), 1 tbl. pri bolesti a drotaverín (NO-SPA forte 80 mg tbl.), 1 tbl. na uvoľnenie kŕčov. V období rokov 2013 – 2019 bol stav pacientky nezmenený, vyskytovali sa opakujúce sa recidívy s liečbou podobnou v prechádzajúcich rokoch.

V novembri 2020 bolo vykonané kontrolné vyšetrenie s odberom moču a krvi, ktoré nepotvrdilo žiadnu infekciu alebo zápalové zmeny. Na USG vyšetrení boli viditeľné obličky normálneho tvaru a

veľkosti. Pacientke bol doporučený naďalej diétny a pitný režim a užívanie ROWATINEXU, 2 x 1 cps.

DISKUSIA

Väčšina pacientov, u ktorých je diagnostikovaná urolitiáza, má priaznivú prognózu. Konkrementy menšie ako 5 – 6 mm sa zvyčajne vyplavia spontánne močom. Pri asymptomatických alebo non-struvitových konkrementoch nie je potrebný akútny zásah a je možné ich potvrdiť rutinnými USG a RTG vyšetreniami. Prípadné problémy a bolesti je možné zvládnuť ambulantnou lekárskou starostlivosťou (spazmolytiká, analgetiká, antiemetiká, zvýšený príjem tekutín, diétny režim). Pacienti, u ktorých sa vyskytujú malé konkrementy, musia byť dostatočne poučení o rizikových faktoroch, aby sa zabránilo recidíve ochorenia. Väčšie konkrementy si vyžadujú často invazívne zákroky, ako je extrakorporálna litotripsia (LERV), perkutánna nefrolitotómia (PNL) alebo ich kombinácia. Pri infekčných konkrementoch je potrebné indikovať včasnú liečbu antibiotikami, zabezpečiť hemodynamickú stabilizáciu a čo najskôr konkrement odstrániť (Thakore a Liang, 2020).

Katsuhiro a kol. (2020) porovnávali výsledky ureteroskopie (URS) a ESWL pri močových konkrementoch s veľkosťou do 15 mm. Vyhodnotili 789 pacientov, ktorí podstúpili URS (n = 301) alebo ESWL (n = 488), ako primárnu terapiu urolitiázy. Výsledky analýzy preukázali až 97,3 % úspešnosť odstránenia konkrementov po vykonaní URS a 93,9 % úspešnosť po ESWL.

Epidemiologická štúdia vykonaná v 7 krajinách odhalila výskyt urolitiázy u 114 – 720 na 100 000 osôb a mieru prevalencie 1,7 – 14,8 %. Podľa údajov prieskumu National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) sa prevalencia obličkových kameňov v Spojených štátoch zvýšila takmer trojnásobne; z 3,2 % v rokoch 1976 – 1980 na 8,8 % v období rokov 2007 – 2010. Prevalencia obličkových kameňov sa vo Veľkej Británii medzi rokmi 2000 a 2010 zvýšila o 63 % (7,14 – 11,62 %).

Sklon k tvorbe konkrementov sa líši v závislosti na pohlaví, veku, zemepisnej polohe a etnickom pôvode. Aj keď výskyt močových kameňov bol v minulosti 3-krát častejší u mužov ako u žien, posledné údaje naznačujú, že sa tieto rozdiely výrazne menia. V Minnesote (USA) pomer výskytu urolitiázy u mužov a žien klesol medzi rokmi 1970 – 2000 z 3,1 % na 1,3 %. Na Floride analýza odhalila, že v rokoch 1998 – 2004 stúpol výskyt urolitiázy najmä u žien. Príčina nárastu urolitiázy u žien nie je presne známa, niektorí autori uvádzajú, že by to mohlo súvisieť so zmenami v životnom štýle a stravovaní, ktoré majú za následok zvýšený výskyt obezity u žien, čo je významný rizikový faktor pre tvorbu konkrementov (Khan a kol., 2016).

V retrospektívnej, randomizovanej štúdii, ktorá sa uskutočnila na 87 pacientoch s ureterolitiázou, bol hodnotený účinok prípravku Rowatinex na liečbu urolitiázy. Rowatinexom bolo liečených 43 pacientov a placebom 44 pacientov. Celková miera vyplavenia močových kameňov bola výrazne vyššia (81 %) v skupine pacientov liečených Rowatinexom v porovnaní so skupinou užívajúcou placebo. Vyššia miera vylučovania kameňov súvisí zrejme s vymiznutím dilatácie močovodu pred liečbou. Iba sedem pacientov v skupine liečenej Rowatinexom malo mierne až stredne závažné gastrointestinálne poruchy. Počas liečby neboli v žiadnej skupine zaznamenané ďalšie významné vedľajšie účinky. Autori štúdie dospeli k záveru, že liečba Rowatinexom u pacientov s urolitiázou je vhodnou indikáciou pred nasadením agresívnejších opatrení (Engelstein a kol., 1992).

Napriek veľkému počtu štúdií a výskumov, ktoré sa venujú liečbe urolitiázy, stále neexistuje účinná liečba, ktorá by natrvalo zabránila jej recidíve. Významnú úlohu v terapii zohráva zodpovednosť pacienta, pravidelné lekárske kontroly, dodržiavanie odporúčaných diétnych opatrení a užívanie predpísaných liečiv. Až 80 % pacientov liečených na urologickej ambulancii, s ktorou sme spolupracovali, má recidivujúcu urolitiázu s častými komplikáciami.

ZÁVER

Výsledky tejto štúdie poukazujú na rozdiely terapie urolitiázy v klinickej praxi, ktorú ovplyvňujú rôzne faktory. Ku každému pacientovi je potrebné pristupovať individuálne, vzhľadom na jeho zdravotný stav a prípadné komorbidity. Močové konkrémenty je potrebné podrobne identifikovať a nastaviť v rámci liečby správne diétne opatrenia, aby sa v čo najväčšej miere podarilo predísť recidíve ochorenia.

Cieľom tejto štúdie bolo analyzovať súčasné trendy a dostupné možnosti liečby rôznych typov urolitiázy s odlišným priebehom ochorenia a rozdielnou metódou liečby.

Liečba urolitiázy prebieha dlhodobo, pretože patrí medzi ochorenia s veľmi častými recidívami. Z výsledkov kazuistik vyplýva, že zodpovednosť pacienta je kľúčová pre dosiahnutie požadovaného výsledku liečby. Pri pravidelnom užívaní odporúčaných liečivých preparátov a dodržiavaní diétného režimu je možné dosiahnuť požadovaný terapeutický efekt.

ZOZNAM LITERATÚRY

Blemaren N. ADC portál. Bratislava: PharmINFO, rev. textu jún 2019. <https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/blemaren-n-526831.html>. [cit. 2020-10-18].

Engelstein, D., Kahan, E., Servadio, C.: Rowatinex for the treatment of ureterolithiasis. *Journal D'urologie*, 1992, 98 (2), 98 – 100.

Katsuhiko, I., Toshifumi, T., Toru, K., Takashi, O., Yoshihito, H., Hitoshi, Y.: Decreased recurrence of urolithiasis after simultaneous ureteroscopic surgery for ureter and ipsilateral renal calculi: Comparison to shockwave lithotripsy for ureter calculi alone. *Endourology and Stones*, 2020, 147, 74 – 80.

Khan, S., Pearle, M. S., Robertson, W. G., Gambaro, G., Canales, B. K., Doizi, S., Traxer, O., Tiselius, H.: Kidney stones. *Nat. Rev. Dis. Primers* 2, 2016, <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.8>. Accessed December 04, 2020.

Křížek, V., Sadílek, L.: *Urolitiáza: etiopatogeneze, konzervativní terapie a prevence* [Urolithiasis: etiopathogenesis, conservative therapy and prevention]. Praha: AVICENUM, 1989. 200 s.

Nagy, V.: *Urolitiáza* [Urolithiasis]. 1.vyd. Košice: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, 2015. 126 s.

Rowatinex cps mol 1 x 50 ks. ADC portál. Bratislava: PharmINFO, rev. textu marec 2013. <https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/rowatinex-466043.html>. [cit. 2020-10-17].

Thakore, P., Liang, T. H.: *Urolithiasis*. Florida: StatPearls Publishing, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559101/>. Accessed December 6, 2020.



CORDYCEPS SPP: IZOLÁCIA, IDENTIFIKÁCIA A BIOLOGICKÁ AKTIVITA POLYSACHARIDOV

CORDYCEPS SPP: ISOLATION, IDENTIFICATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF POLYSACCHARIDES

Pániková, Zuzana; 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

Práca sa zaoberá skúmaním extraktov získaných z huby *Cordyceps sinensis*. V Číne je tento druh nazývaný DongChongXiaCao (zimný červ, letná tráva), nakoľko je prípravok čoraz populárnejší v laickej, ako aj vedeckej spoločnosti. Z tejto huby – parazita bolo extrahovaných veľa bioaktívnych zložiek vrátane nukleozidov, polysacharidov, sterolov, proteínov, aminokyselín a polypeptidov. V mnohých štúdiách sú preukázané pozitívne farmakologické účinky týchto zložiek na ľudský organizmus. Experimentálna časť štúdie sa venuje polysacharidom izolovaným z *Cordyceps sinensis*, ktoré vykazujú rozmanité biologické účinky, ako sú imunomodulačné, protinádorové, antivírusové a antioxidantné. Zaoberá sa aj extrakčnými metó-

dami, ktoré sa využívajú pri izolácii chemických zlúčenín. Zameriava sa na stanovenie antioxidantnej aktivity alkoholových extraktov (najvyššia antioxidantná aktivita $IC_{50} = 2,09 \text{ mg.ml}^{-1}$ bola zistená u vzorky 1, *Cordyceps sinensis*, kultivovaný na *Orzya sativa* var. *japonica*), kvalitatívnu analýzu obsahových látok extraktov pomocou ^1H NMR spektroskopie (dôkaz prítomnosti D-manitolu, tyrozínu, polysacharidov, mastných kyselín) a stanovením antimikrobiálnej aktivity na kmene baktérií *Escherichia coli* (najúčinnjším extraktom, ktorý inhiboval rast baktérií bol extract vzorky 2, *P. hepiali*, substrát *Oryza sativa* var. *indica*) a *Staphylococcus aureus*.

Kľúčové slová: antimikrobiálna aktivita; antioxidantná aktivita; *Cordyceps sinensis*, ^1H NMR spektroskopia

ABSTRACT

The work deals with the study of the extracts of the fungus *Cordyceps sinensis*. *Cordyceps sinensis*, in China also called DongChongXiaCao (winter worm, summer grass), is becoming more and more popular as a preparation in lay as well as scientific society. Many bioactive components have been extracted from this fungus including nucleosides, polysaccharides, sterols, proteins, amino acids and polypeptides. Many studies have shown positive pharmacological effects of these components on the human body. The experimental part of the study is devoted to polysaccharides isolated from *Cordyceps sinensis*, which exhibit a variety of biological effects including immunomodulatory, antitumor, antiviral and antioxidant. It also deals with extraction methods. The study deals with the determination of the antioxidant activity of alcohol extracts (the highest antioxidant activity $IC_{50} = 2.09 \text{ mg.ml}^{-1}$ was found in sample 1, *Cordyceps sinensis*, cultivated on *Orzya sativa* var. *japonica*), qualitative analyses of extracts by ^1H NMR spectroscopy (presence of D-mannitol, tyrosine, polysaccharides, fatty acids) and determination of antimicrobial activity on strains of *Escherichia coli* (the most effective extract that inhibited bacterial growth was extract of sample 2, *P. hepiali*, substrate *Oryza sativa* var. *indica*) and *Staphylococcus aureus*.

Key words: antioxidant activity; antimicrobial activity; *Cordyceps sinensis*; ^1H NMR spectroscopy

ÚVOD

Po tisíce rokov je rod *Cordyceps* v Číne veľmi cenený ako tonikum a bylinné liečivo. Donedávna bola táto huba dostupná iba v prírode, pretože rastie – parazituje v tele húsenice. Táto huba bola vzácna a veľmi drahá. Dnes sa silný kmeň *Cordyceps* označovaný ako CS-4 pestuje v kvapalnom médiu za

sterilných podmienok, čo ho robí bezpečným, cenovo dostupným a umožňuje jeho použitie ako výživového doplnku v rámci terapie rôznych chorôb (Tang a kol., 2010). *Cordyceps sinensis* parazituje na hubách triedy *Ascomycetes*, ktoré sa nachádzajú vo vysokých nadmorských výškach na Qinghai-tibetskej náhornej plošine. Táto huba žije primárne v larvách konkrétneho druhu molí, *Hepialus armoricanus*. V Číne sa už dlhé stáročia používa ako bylinný liek a doplnok stravy. Novšie štúdie poukazujú, že *Cordyceps* vykazuje imunomodulačné, antiproliferatívne, antifibrotické a proapoptické účinky (Zhang a kol., 2008).

Rovnako ako u iných liečivých húb, za protinádorové účinky *Cordyceps* sú zodpovedné polysacharidy, steroly, lipidy, nukleozidy, a najmä deoxynukleozidy. Mnoho vedeckých štúdií preukázalo schopnosť tohto druhu stimulovať a modulovať imunitný systém a zvyšovať počet červených krviniek. Z vedeckých štúdií uskutočnených v Číne vyplynulo, že *Cordyceps* má protinádorový účinok v prípade rakoviny pľúc pri myšiach a v ľudskej populácii. V mnohých klinických štúdiách sa v tradičnej čínskej medicíne ukázalo, že *Cordyceps* zlepšuje funkciu pečene, obličiek, kardiovaskulárneho a dýchacieho systému (Yang a kol., 2010).

Cordyceps je druh liečivých húb patriacich do čeľade *Clavicipitaceae*. V rámci rodu *Cordyceps* bolo doteraz opísaných viac ako 400 druhov, z ktorých *Cordyceps sinensis* (*C. sinensis*), nazývaný tiež „zimný červ, letná tráva,“ je uznávaný ako najznámejšia tonická bylina v Tradičnej čínskej medicíne (Ng a kol., 2005; Shrestha a kol., 2005).

Aj keď všetky medicínske aktívne zlúčeniny *C. sinensis* stále nie sú známe, najmenej dve chemické zlúčeniny, kordycepín a kyselina kordycepová, boli purifikované a identifikované ako medicínske dôležité účinné látky. Kyselina kordycepová je v skutočnosti D-manitol a kordycepín, teda 3-deoxyadenozín, purínový alkaloid (Zhou a kol., 2009).

MATERIÁL A METÓDY

Vzorky húb

Vzorky 1, 2 a 3 boli kultivované na Technickej univerzite vo Zvolene a upravené do konečnej práškovej podoby nasledujúcim spôsobom: kmene *C. sinensis* a *P. hepiali* boli 14 dní kultivované pri 22 °C v tmavej miestnosti v Petriho miskách obsahujúcich médium zložené z 20 g sladového extraktu, 2 g kvasinkového extraktu a 20 g agaru na liter destilovanej vody (Biolife Italiana s. r. l., Taliansko). Ako substráty sa použili dva poddruhy ryže *Oryza sativa* var. *japonica* a *Oryza sativa* var. *indica*. 100 g ryže sa najprv prevarilo, potom scentrifugovalo, čím sa získalo 180 g substrátu, substráty boli inokulované 3 ml inokulačného roztoku obsahujúceho 3 g glukózy, 3 g sacharózy (Merck, Slovenská republika), 1 g sójového peptónu; 2,5 g kvasinkového extraktu (Biolife, Taliansko), 1 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 1 mg $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Slovenská republika); 0,1 g tiamín hydrochloridu (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri) a 3 kusky (4 x 4 mm) kmeňa *C. sinensis* alebo *P. hepiali* zo spomínanej kultúry v Petriho miske. Substrát, ktorý obsahoval 200 ml živného média, bol následne spracovaný pri 120 rpm, 22 °C v 500 ml Erlenmeyerovej banke, po dobu 7 dní. Potom bol inkubovaný pri teplote 22 °C 30 dní, pri 12-hodinovom striedaní svetla a tmy. Nakoniec boli vzorky vysušené v sušiarňi APT Line (Binder GmBH, Tuttlingen, Nemecko) a rozdrvené v mlyne SM-100 (Retch Co., Haan, Nemecko). Vzorky sa uskladňovali v chladničke pri teplote 8 °C.

Vzorka č. 1: kmeň *C. sinensis*, substrát *Oryza sativa* var. *japonica*

Vzorka č. 2: kmeň *Paecilomyces hepiali* (*P. hepiali*), substrát *Oryza sativa* var. *indica*

Vzorka č. 3: kmeň *C. sinensis*, substrát *Oryza sativa* var. *japonica*

Príprava extraktov

Vzorky 1, 2 a 3 boli kultivované na Technickej univerzite vo Zvolene a upravené do konečnej práškovej podoby nasledujúcim spôsobom: na digitálnej váhe sa navážilo 5,000 g práškových vzoriek 1, 2 a 3. Navážené množstvo vzoriek 1, 2 a 3 sa vložilo do varných bánk a pridalo sa 25 ml etanolu a 25 ml destilovanej vody v pomere 1 : 1. Po 5-hodinovom refluxe sa extrakty prefiltrovali a odparili do sucha na rotačnej vákuovej odparke (IKA RV 10 digital, Nemecko) a vypočítala sa percentuálna výťažnosť vzoriek.

DPPH metóda

Na stanovenie antioxidačnej aktivity sa využila DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) metóda. DPPH vykazuje najvyššiu absorpciu pri vlnovej dĺžke 517 nm. Pre výpočet antioxidačnej aktivity je najčastejšie používanou metódou percentuálna redukcia aktivity roztoku DPPH radikálu meraním absorbancie pri λ_{max} 517 nm. Pre výpočet antioxidačnej aktivity sa použil vzťah (1) definovaný ako: $I (\%) = (A_{\text{SL}} - A_{\text{VZ}}/A_{\text{SL}}) \times 100$, kde I predstavuje inhibíciu aktivity radikálu DPPH v percentách (%), A_{SL} je označenie absorbancie slepého roztoku DPPH, A_{VZ} je nameraná absorbancia vzorky po 30-minútovej inkubácii v tme pri laboratórnej teplote od pridania roztoku DPPH radikálu (Chen a kol., 2013). Výsledky meraní sú kvôli lepšiemu porovnaniu uvádzané ako hodnoty IC_{50} .

NMR analýza

NMR-nukleárna magnetická rezonancia je spektrálnou metódou, ktorá na základe absorpcie rádiových frekvencií žiarenia vzorkou umiestnenou v silovom magnetickom poli poskytuje informáciu o štruktúre skúmanej látky. Protónové spektrá extraktov 1, 2 a 3 boli merané na 600 MHz spektrometri Varian VNMR (Palo Alto, Kalifornia, USA). Extrakty (25 mg) sa rozpustili v 0,6 ml deuterovaného dimetylsulfoxidu $\text{DMSO}-d_6$.

Antimikrobiálna aktivita

Na stanovenie antimikrobiálnej aktivity extraktov 1 – 3 bola použitá diskovo difúzna metóda. Vzorky boli testované na agarových platniach v Petriho miskách podľa metodiky Rojasa (2006). Testované baktérie – *Staphylococcus aureus* (SA) a *Escherichia coli* (EC) boli získané z Českej zbierky mikroorganizmov, Brno. Baktérie boli kultivované v BHI bujóne (Brain Heart Infusion broth, Oxoid) pri 37 °C po dobu 20 hodín. Po kultivácii boli baktérie nariadené vo fosfátovom fyziologickom roztoku na koncentráciu 0,5 – 1,0 McFarlandovej zákalovej stupnice. Táto stupnica udáva počet kolónie tvoriacich jednotiek (CFU) na 1 ml. Pri koncentrácii 0,5 až 1,0 sa v 1 ml suspenzie nachádza cca $1,5 - 3 \times 10^8$ baktérií. 1 ml tejto suspenzie bol inokulovaný do 100 ml vytemperovaného tekutého agaru (Standard plate count agar, Oxoid). Do Petriho misiek s priemerom 9 cm bol vyliaty agar (20 ml). Po stuhnutí boli do agaru vyrezané jamky s priemerom 0,5 cm a do nich bolo aplikovaných 50 µl vzorky 1 – 3. Ako pozitívna kontrola bol použitý vodný roztok 25 µg.ml⁻¹ gentamicín-sulfátu a ako negatívna kontrola DMSO. Platne boli inkubované pri 37 °C po dobu 24 hodín. Antibakteriálny účinok extraktov bol prepočítaný podľa vzorca:

$$RIZD = \frac{IZD_{vzorka} - IZD_{negatívna kontrola}}{IZD_{pozitívna kontrola}} \times 100 \%$$

RIZD = % priemernej relatívnej inhibičnej zóny

IZD = priemer inhibičnej zóny v mm

VÝSLEDKY

Príprava extraktov

Najvyššia výťažnosť bola zistená pri vzorke 2 (10,14 %); ktorá bola kultivovaná na ryži *Oryza sativa* var. *indica* kmeň *P. hepiali* a najnižšia pri vzorke 1 (7,68 %); ktorá bola kultivovaná na ryži *Oryza sativa* var. *japonica* kmeň *C. sinensis*, a to kombináciou rozpúšťadiel etanol a voda. Rozdiel medzi najvyššou a najnižšou výťažnosťou predstavuje 2,46 %.

DPPH metóda

Absorbancie vzoriek boli merané trikrát (viď tab. 1). Z vypočítaných hodnôt antioxidačných aktivít bol zostavený graf (viď graf 1), závislosť antioxidačnej aktivity od hmotnostnej koncentrácie extraktu. U vzorky 1 bola vylúčená koncentrácia 10 mg.ml⁻¹ a 5 mg.ml⁻¹, pretože vzorka bola pri tejto koncentrácii ťažko rozpustná. Antioxidačná aktivita vzorky 2 bola určená rovnako ako pri vzorke 1. Hodnoty nameranej absorbancie pri koncentrácii 10 mg.ml⁻¹ boli tiež zanedbateľné, pretože pri tejto koncentrácii bol extrakt zle rozpustený (rovnako ako aj vzorka 3).

Z rovnice priamky pre grafickú závislosť antioxidačnej aktivity na hmotnostnej koncentrácii boli určené hodnoty IC₅₀ pre jednotlivé vzorky. Vzorka 1 (IC₅₀ = 2,09 mg.ml⁻¹), vzorka 2 (IC₅₀ = 2,89 mg.ml⁻¹) a vzorka 3 (IC₅₀ = 5,50 mg.ml⁻¹).

NMR analýza

Analýzou ¹H NMR spektier sa vo všetkých troch extraktoch v rovnakej oblasti 3,20 – 3,45 ppm nachádzali pomerne zložené multipletové signály, ktoré patria sacharidom, polysacharidom. Rovnako sa pri všetkých troch extraktoch nachádzajú aj dva tripletové signály ležiace v oblasti 0,84 – 0,87 ppm, ktoré patria CH₃ skupinám z dlhých reťazcov či už nasýtených, resp. nenasýtených mastných kyselín. Vo všetkých troch vzorkách sa nachádza aj signál pri 2,73 ppm typický pre -CH₂- skupinu viazanú na karboxylovú kyselinu. V oblasti 3,43 – 3,27 ppm sa nachádzajú pri dvoch extraktoch (1 a 3) aj signály typické pre chemickú štruktúru D-manitolu. Výrazný rozdiel v chemickom zastúpení je medzi extraktmi 1, 2 a 3. V extrakte 2 sa v aromatickej časti 8,50 – 6,10 ppm nachádza pomerne veľký počet singletových, dubletových a multipletových signálov.

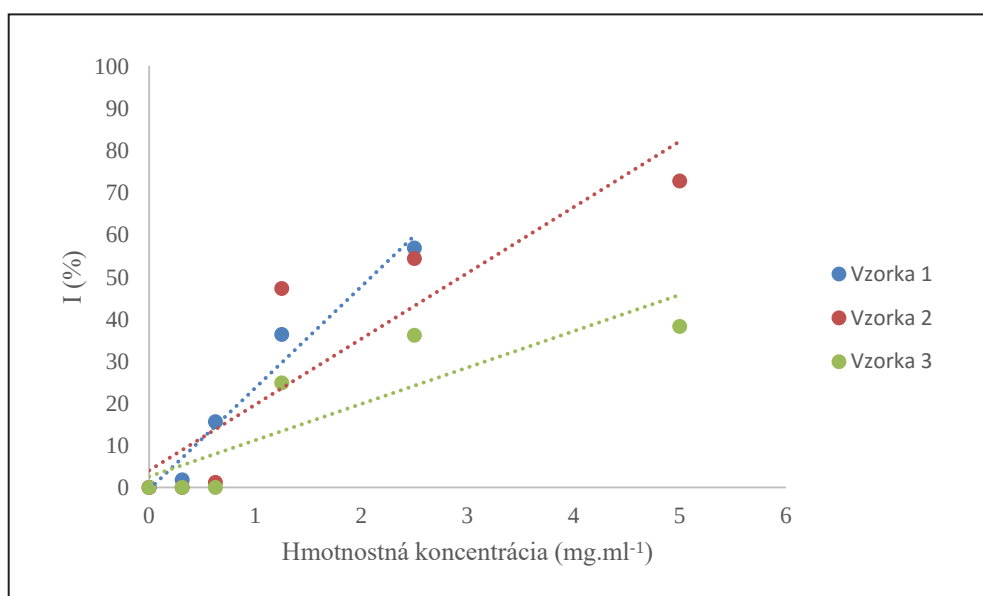
Antimikrobiálna aktivita

Extrakt 1, 2 a 3 nevykazovali antimikrobiálnu aktivitu (viď tab. 2) na kmeň baktérií *Staphylococcus aureus*. Na druhej strane extrakt 2 a 3 pri testovaní citlivosti na kmene baktérií *Escherichia*

Tab. 1: Antimikrobiálna aktivita vzoriek 1 – 3

Koncentrácia (mg.ml ⁻¹)	Priemerná absorbancia A vzoriek 1 – 3			Antioxidačná aktivita I (%) vzoriek 1 – 3		
	1	2	3	1	2	3
10,000	–	–	–			
5,000	–	0,195 ± 0,007	0,442 ± 0,007	–	72,7	38,2
2,500	0,309 ± 0,010	0,327 ± 0,011	0,457 ± 0,010	56,8	54,3	36,1
1,250	0,456 ± 0,011	0,472 ± 0,008	0,673 ± 0,007	36,3	47,2	24,8
0,625	0,604 ± 0,007	0,707 ± 0,050	–	15,6	1,2	–
0,312	0,703 ± 0,010	–	–	1,80	–	–
0,156	–	–	–	–	–	–

Graf 1: Závislosť antioxidačnej aktivity na hmotnostnej koncentrácii pre vzorky 1 – 3



Tab. 2: Antimikrobiálna aktivita vzoriek 1 – 3 testovaná na kmene baktérií SA a EC

Vzorky	Aktivita na SA	Aktivita na EC	IZD (mm) ^a	IZD (mm)	% RIZD
1	–	–	–	–	
2	–	áno	10,0	5,0	35,7
3	–	áno	7,0	2,0	14,3
Gentamicín	áno	áno	19,0	14,0	100,0
DMSO	–	–	0	0	0

^ahodnota IZD v mm aj s pripočítaním dierky (5,0 mm)

coli vytvorili inhibičné zóny. Priemer inhibičnej zóny (IZD) pre vzorku 2 bol 10,0 mm a pre vzorku 3 bol 7,0 mm (odčíta sa veľkosť dierky 5 mm). Pri pozitívnej kontrole – gentamicíne bola nameraná IZD 14,0 mm (po odčítaní veľkosti dierky v agare) a negatívna kontrola – DMSO neinhibovala rast baktérií, čiže hodnota IDZ bola 0 mm. Hodnoty IZD sa následne dosadili do vzorca a vypočítala sa hodnota % RIZD.

Najúčinnejším extraktom na kmeň baktérií *E. coli* sa ukázal extrakt 2, na základe ktorého bola stanovená hodnota IC_{50} .

DISKUSIA

Medzi obsahové látky prítomné v *C. sinensis* patria nasledujúce chemické zlúčeniny: kordycepín (3'-deoxyadenozín) a jeho deriváty, ergosterol, polysacharidy, glykoproteíny a peptidy. Tieto látky majú protinádorové, antimetastatické, imunomodulačné, antioxidačné, protizápalové, insekticídne, antimikrobiálne, hypolipidemické, hypoglykemické, neuroprotektívne a renoprotektívne vlastnosti (Ng a kol., 2005). V *Cordyceps* sa vyskytuje aj široká škála ďalších látok vrátane rôznych druhov esenciálnych aminokyselín (lyzín, kyselina glutámová, prolín, treonín a iné), vitamínov (B1, B2, B12 a K), stopových prvkov, monosacharidov, oligosacharidov a nenasýtených mastných kyselín (Tuli a kol., 2014).

Veľké množstvo štúdií týkajúcich sa extraktov *C. sinensis* zredukovalo výber rozpúšťadiel na kritické množstvo, ktoré sa ukázalo ako účinné pri extrakcii požadovaných zlúčenín. Z dôvodu zvýšenia polarít sú medzi najčastejšie používanými rozpúšťadlami na extrakciu etylacetát, etanol, metanol a voda. Polysacharid (CSP) bol extrahovaný z prírodného *C. sinensis* a získal sa extrakciou horúcou vodou a následným vyzrážaním etanolom (Wang a kol., 2017).

Extrahovali sa celkovo 3 vzorky z kmeňa *C. sinensis* a jeden z *P. hepiali*. Oba boli kultivované na dvoch rôznych substrátoch ryže *Oryza sativa* var. *japonica* a *Oryza sativa* var. *indica*. Ako rozpúšťadlo

bola použitá zmes etanol/voda. Z vypočítaných výťažností vyplýva, že najvyššia výťažnosť bola zaznamenaná pri vzorke 2 pestovanej na *Oryza sativa* var. *indica*, kmeň *P. hepiali*, a najnižšia výťažnosť bola zistená pri vzorke 1 kultivovanej na *Oryza sativa* var. *japonica*, kmeň *C. sinensis*. Rozdiel medzi týmito dvoma vzorkami predstavuje 2,46 %. Vzorka 3 kultivovaná na *Oryza sativa* var. *japonica*, kmeň *C. sinensis* vykazovala len minimálny rozdiel od vzorky 1, rozdiel vo výťažnosti predstavoval len 0,72 %. Rozdielna výťažnosť mohla byť spôsobená v pestovaní na rôznom substráte a v rozdielnom druhu húb.

Niekoľko štúdií uvádza, že vodné extrakty a frakcie *Cordyceps* majú silné antioxidačné aktivity *in vitro*, zachytávajú radikály, inhibujú peroxidáciu lipidov a zabráňujú oxidačnému poškodeniu v bunkách (Li a Tsim, 2004). Ako hlavné zložky vodných extraktov boli identifikované polysacharidy (Li a kol., 2003). Izolované extrakty 1 – 3 vykazovali antioxidačnú aktivitu. Všetky extrakty vychytávali voľné DPPH radikály. Z nameraných hodnôt vyplýva, že najnižšiu hodnotu IC_{50} a zároveň najlepšiu antioxidačnú aktivitu mala vzorka 1. To znamená, že táto vzorka by mala obsahovať najviac látok s antioxidačnou aktivitou. Najvyššiu hodnotu IC_{50} a zároveň najnižšiu antioxidačnú aktivitu vykazovala vzorka 3. Vzorka by mala obsahovať najmenej látok s antioxidačnou aktivitou. Li, Dong a Tsim (2001) študovali antioxidačnú aktivitu vodných extraktov z prírodnej *C. sinensis* a myceliálnej biomasy *Cordyceps sinensis* pomocou xantínoxidázy, indukcie hemolýzy a peroxidácie lipidov. Ich výsledky preukázali silnú antioxidačnú aktivitu vo všetkých skúmaných metódach v rámci kultivovanej a prírodnej huby. Hlavnými zložkami v prírodnom a kultivovanom myceliu druhu *C. sinensis* sa uvádzajú kordycepín a manitol (Zhang a kol., 2015) a najmä polysacharidy (Li a kol., 2002). D-manitol obsahovali aj nami pripravené extrakty vo vzorkách 1 a 3. Štúdie poukazujú na prítomnosť manitolu v extraktoch, ktorý zvyšuje antioxidačnú aktivitu (Adrees a kol., 2015). Antioxidačná aktivita vodných

extraktov z prírodných a kultivovaných *C. sinensis* bola testovaná okrem DPPH metódy aj FRAP metódou a taktiež aj využitím hydroxylového radikálu. Z nasledovných metód sa DPPH metóda ukázala ako pomerne rýchla a spoľahlivá pre stanovenie antioxidačnej aktivity *in vitro* (Chattopadhyay a kol., 2010).

Antimikrobiálna aktivita bola testovaná *in vitro* u látok izolovaných z *Cordyceps*, a to: kordycepínu, ophiokordínu, adenoínových derivátov a proteínu CSAP (Zheng a kol., 2006). Podporou fagocytárnej aktivity testovanej *in vivo* bolo zistené, že extrakty izolované z *C. sinensis* pôsobia antibakteriálne. Ako bolo zistené, za túto podporu sú zodpovedné hlavne polysacharidy. Kordycepín inhibuje rast baktérií *Clostridium paraputrificum* a *Clostridium perfringens* (Ahn a kol., 2000). Z mycélia *C. sinensis* sa podarilo izolovať aj antibakteriálne pôsobiaci proteín označený ako CSAP. Ukázalo sa, že tento inhibuje rast grampozitívnych G^+ a gramnegatívnych G^- baktérií. Pri koncentrácii $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ výrazne inhibuje rast najmä *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* a *Salmonella typhi*, slabšie inhibuje rast *Bacillus subtilis* a *Escherichia coli* (Zheng a kol., 2006). Antimikrobiálna aktivita extraktov bola stanovená na grampozitívnom G^+ kmeni baktérií *Staphylococcus aureus* a gramnegatívnom kmeni baktérií *Escherichia coli*. Z testovaní extraktov 1 – 3 vyplynulo, že extrakty 1, 2 a 3 nevykazovali žiadnu aktivitu na grampozitívny kmeň baktérií *S. aureus* a naopak extrakty 2 a 3 vykazovali antimikrobiálnu aktivitu na gramnegatívny kmeň baktérií *E. coli*. Najúčinnjším extraktom bol extrakt vzorky 2 (kmeň *P. hepiali*, substrát *Oryza sativa* var. *indica*) na kmeň baktérií *E. coli* s hodnotou 35,7 % RIZD. Po kultivácii sme u vzorky 2 zaznamenali najväčšie inhibičné zóny, v priemere 10 mm. Antimikrobiálne testy poukazujú na to, že CSAP (*Cordyceps sinensis* antibakteriálny proteín) môže inhibovať rast grampozitívnych G^+ a gramnegatívnych G^- baktérií. Vyznačoval silnú účinnosť proti baktériám kmeňa *Staphylococcus aureus*. Avšak CSAP izolovaný z *Cordyceps sinensis* vyznačoval okrem antibakteriálneho účinku aj

bakteriostatický účinok, hlavne na gramnegatívny kmeň *E. coli* (Zheng a kol., 2006). Bolo opísaných množstvo bioaktívnych zložiek izolovaných z *C. sinensis*, vrátane niektorých antimikrobiálnych látok, ako sú napr. kordycepín, ophiokordín, deriváty adenoínu (Zheng a kol., 2006).

Nie a kol. (2013) vo svojej štúdii venovali pozornosť hube *Cordyceps sinensis*, z ktorej izolovali a popísali bioaktívne polysacharidy. Na základe NMR spektier môžeme skonštatovať, že vo všetkých troch extraktoch sa nachádzajú sacharidy-polysacharidy, čo sa prejavilo aj antioxidačným účinkom týchto extraktov. Taktiež sa podarilo dokázať na základe NMR spektroskopie multipleťový signál pri cca 2,15 – 2,17 ppm vo všetkých troch extraktoch, ktorý dokazoval prítomnosť mastných kyselín (nasýtených, resp. nenasýtených). V extrakte 2 a 3 sa nachádzal jeden takýto signál – jedna mastná kyselina, na rozdiel od extraktu 1, kde boli prítomné dva takéto triplety – dve mastné kyseliny. V extrakte 2 sa nachádzal ešte aj tyrozín. V extraktoch 1 a 3 sa zistila prítomnosť D-manitolu, vzorky vykazovali antimikrobiálnu aktivitu. D-manitol, tiež známy ako kyselina kordycepová, je hlavnou zložkou *Ophiocordyceps sinensis* a predstavuje viac ako 3,4 % (Li a kol., 2006) a dokonca až 8 % v sušenej forme (Zhang a kol., 2015). V alkoholových extraktoch *C. sinensis* bolo pomocou NMR spektroskopie identifikované množstvo aminokyselín (alanín, tyrozín, izoleucín, valín, fenylalanín) a rovnako bola dokázaná aj prítomnosť mastných kyselín, ako sú kyselina linolová, olejová a laurová (Zacharová a Ungvarská Maľučká, 2020). Na základe 1D a 2D NMR analýzy a zrýchlených experimentov bolo v extraktoch z prírodných *Cordyceps* identifikovaných 24 zložiek vrátane aminokyselín, organických kyselín, glycerolu a nukleozidov (Lu a kol., 2019). 14 druhov aminokyselín bolo kvantifikovaných NMR spektroskopiou v extraktoch prírodných *Cordyceps*. Kyselina citrónová, kyselina fumarová, α/β -glukóza a glycerol neboli v predchádzajúcich štúdiách kvantifikované v extraktoch prírodných produktov *Cordyceps*. Uridín,

adenozín a kordycepín boli pozorované NMR spektroskopiou bez akejkoľvek separácie. Adenozín je typická chemická zlúčenina zastúpená v extraktoch *C. sinensis* (Basheer a kol., 2004).

Oficiálne je *C. sinensis* v Čínskom liekopise klasifikovaný ako liek od roku 1964. Trhový dopyt po *C. sinensis* v mnohých krajinách prudko rastie pre jeho farmakologické účinky (Dong a Yao, 2007).

ZÁVER

Štúdia zahŕňa komplexné informácie o druhu *Cordyceps sinensis*, extrakčných metódach a venuje sa identifikácii a biologickej aktivite polysacharidov. V štúdiu boli analyzované tri vzorky húb: vzorka 1: kmeň *C. sinensis*, substrát *Oryza sativa* var. *japonica*, vzorka 2: kmeň *P. hepiali*, substrát *Oryza sativa* var. *indica*, vzorka 3: kmeň *C. sinensis*, substrát *Oryza sativa* var. *japonica*. Z daných vzoriek sa refluxovaním v zmesi etanol/voda pripravili extrakty, z ktorých sa následne skúmala ich antioxidačná a antimikrobiálna aktivita. Najvyššiu výťažnosť po extrakcii získala vzorka 2 kultivovaná na ryži *Oryza sativa* var. *indica*, kmeň *P. hepiali* a najnižšia výťažnosť bola uvedená pri vzorke 1 kultivovanej na ryži *Oryza sativa* var. *japonica* kmeň *C. sinensis*. Pri alkoholovo/vodných extraktoch sa stanovila antioxidačná aktivita pomocou stabilného DPPH radikálu. Z nameraných výsledkov antioxidačnej aktivity sa stanovili hodnoty IC_{50} pre vzorky 1 – 3. Ako vyplýva z výsledkov, najnižšiu hodnotu IC_{50} (najvyššiu antioxidačnú aktivitu $IC_{50} = 2,09 \text{ mg.ml}^{-1}$) mala vzorka 1 a najvyššiu IC_{50} (najnižšiu antioxidačnú aktivitu $IC_{50} = 5,50 \text{ mg.ml}^{-1}$) mala vzorka 3. Antimikrobiálnu aktivitu na kmeň baktérií *S. aureus* nevykazoval ani jednej z troch extraktov. Pri vzorke 2 a 3 sa pozorovala antimikrobiálna aktivita na kmeň baktérií *E. coli* a stanovili sa hodnoty % RIZD: vzorka 2 – 35,7 % a vzorka 3 – 14,3 %. Z výsledkov vyplýva, že najúčinnnejším extraktom, ktorý inhiboval rast baktérií kmeňa baktérií *E. coli*, bol extrakt 2. Následne sa stanovila aj jeho hodnota IC_{50} , ktorá bola 55,2 mg. Pomocou ^1H NMR

spektroskopie sa podarilo vo všetkých vzorkách extraktov identifikovať sacharidy-polysacharidy, nasýtené, resp. nenasýtené mastné kyseliny a u vzoriek 1 a 3 sa stanovila aj prítomnosť D-manitolu. Vo vzorke 2 sa zistila ešte prítomnosť tyrozínu.

ZOZNAM LITERATÚRY

- Adrees, M., Ali, S., Iqbal, M., Bharwana, S. A., Siddiqi, Z., Farid, M., Ali, Q., Saeed, R., Rizwan, M.: Mannitol alleviates chromium toxicity in wheat plants in relation to growth, yield, stimulation of anti-oxidative enzymes, oxidative stress and Cr uptake in sand and soil media. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2015, 122, 1 – 8.
- Ahn, Y. J., Park, S. J., Lee, S. G., Shin, S. C., Choi, D. H.: Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. *J. Agr. Food Chem.*, 2000, 48 (7), 2744 – 2748.
- Basheer, R., Strecker, R. E., Thakkar, M. M., McCarley, R. W.: Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog. Neurobiol.*, 2004, 73, 379 – 396.
- Dong, C. H., Yao, Y. J.: In vitro evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts from natural and cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. *LWT, Food Sci. Technol.*, 2007, 41 (4), 669 – 677.
- Chattopadhyay, N., Ghosh, T., Sinha, S., Chattopadhyay, K., Karmakar, P., Ray, B.: Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: structural features and antioxidant capacity. *Food Chem.*, 2010, 118 (3), 823 – 829.
- Chen, Z., Bertin, R., Foldi, G.: EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH• assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 2013, 138 (1), 414 – 420.
- Li, S. P., Yang, F. Q., Tsim, K. W.: Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, 41 (5), 1571 – 1584.
- Li, S. P., Zhao, K. J., Ji, Z. N., Song, Z. H., Dong, T. T. X., Lo, C. K., Cheung, J. K. H., Zhu, S. Q., Tsim, K. W. K.: A polysaccharide isolated from

Cordyceps sinensis, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury. *Life Sci.*, 2003, 73, 2503 – 2513.

Li, S. P.: The nucleosides contents and their variation in natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia*. *J. Chin. Pharm. Sci.*, 2001, 10, 175 – 179.

Li, S. P., Zhang, G. H., Zeng, Q.: Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps mycelia*. *Phytomed.*, 2006, 13 (6), 428 – 433.

Lu, Y., Zhi, Y., Miyakawa, T., Tanokura, M.: Metabolic profiling of natural and cultured *Cordyceps* by NMR spectroscopy. *Sci. Rep.*, 2019, 9, 7735.

Ng, T. B., Wang, H. X.: Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2005, 57 (2), 1509 – 1519.

Nie, S. P., Cui, S. W., Xie, M., Phillips, A. O., Phillips, G. O.: Bioactive polysaccharides from *Cordyceps sinensis*: isolation, structure features and bioactivities. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre*, 2013, 1, 38 – 52.

Shrestha, B., Sung J. M.: Notes on *Cordyceps* species collected from the central region of Nepal. *Mycobiology*, 2005, 33 (4), 235 – 239.

Tang, J., Tian, D., Liu, G.: Immunosuppressive effect of *Cordyceps* CS-4 on human monocyte-derived dendritic cells *in vitro*. *Am. J. Chin. Med.*, 2010, 38 (5), 961 – 972.

Tuli, H. S., Sandhu, S. S., Sharma, A. K.: Pharmacological and therapeutic potential of *Cordyceps* with special reference to Cordycepin. *3 Biotech.*, 2014, 4 (1), 1 – 12.

Wang, J., Nie, S., Cui, S., Wang, W., Phillips, Z., Phillips, A. O., Glyn, O., Yajing, L., Mingyong, X.: Structural characterization and immunostimulatory activity of a glucan from natural *Cordyceps sinensis*. *Food Hydrocoll.*, 2017, 423 (67), 139 – 147.

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.

Zacharová, J., Ungvarská Maľučká, L.: Biologically active substances in *Cordyceps* (Fr.) Link medicinal mushrooms. *Folia Pharmaceutica Cassoviensia*, 2020, 2 (2), 70 – 78.

Zhang, J., Zhong, X., Li, S., Zhang, G., Liu, X.: Metabolic characterization of natural and cultured *Ophicordyceps sinensis* from different origins by H-1 NMR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015, 115, 395 – 401.

Zhang, W., Li, J., Qiu, S., Chen, J., Zheng, Y.: Effects of the exopolysaccharide fraction (EPSF) from a cultivated *Cordyceps sinensis* on immunocytes of H22 tumor bearing mice. *Fitoterapia*, 2008, 79 (3), 168 – 173.

Zheng, H., Maoqing, Y., Liqiu, X., Wenjuan, T., Liang, L., Guolin, Z.: Purification and characterization of an antibacterial protein from the cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Wuhan Univ. J. Nat. Sci.*, 2006, 11, 709 – 714.

Zhou, X., Gong, Z., Su, Y., Lin, J., Tang, K.: *Cordyceps* fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2009, 61 (3), 279 – 291.



VPLYV BIOAKTÍVNÝCH LÁTOK Z *TRIBULUS TERRESTRIS* L. NA HLADINU CHOLESTEROLU

THE EFFECT OF BIOACTIVE SUBSTANCES FROM *TRIBULUS TERRESTRIS* L. ON CHOLESTEROL LEVEL

Semanová, Radoslava¹; Eftimová, Jarmila²; Megyesy Eftimová, Zuzana³

¹Lekárň VÚSCH, Ondavská 8, 040 11 Košice

²Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach Komenského 73, 041 81 Košice

³Stredná zdravotnícka škola, Farská 23, 950 50 Nitra
Slovenská republika

jarmila.eftimova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Častým sprievodným javom pri farmakoterapii dyslipoproteinémií je výskyt nežiaducich účinkov, ktorý môže viesť k prerušeniu liečby a non-compliance zo strany pacienta. Cieľom komparačnej štúdie bolo u pacientov s dyslipoproteinémiou počas 8 mesiacov sledovať, ako ovplyvňuje hladiny lipidového profilu liečba hypolipidemikami v skupine HYP a pravidelné užívanie záparu z kotvičníka zemného (*Tribulus terrestris* L.) v skupine KOT. Do štúdie boli zaradení 30 probandi, klasifikovaní ako pacienti s nízkym kardiovaskulárnym rizikom, dispenzarizovaní a liečení pre ochorenie štítnej žľazy v súkromnej endokrinologickej a internej ambulancii v Košiciach. V každej skupine HYP a KOT bolo 15 probandov (13 žien a 2 muži) s

priemerným vekom 61 rokov. Probandom sa raz mesačne stanovil celkový a LDL cholesterol, HDL cholesterol, triacylglyceroly, a hodnoty sa medzi skupinami navzájom porovnávali. Na stanovenie jednotlivých parametrov boli použité enzymatické farebné testy na kvantitatívne stanovenie cholesterolu, LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a triacylglycerolov v ľudskom sére a plazme pomocou analyzátoru Beckamb Coulter AU-analysinstrument. V skupine HYP došlo u pacientov liečených hypolipidemikami k poklesu hladín celkového cholesterolu o 20,87 %; LDL cholesterolu o 25,9 %; HDL cholesterolu o 0,23 % a triacylglycerolov o 24,94 %. Z 15 pacientov sme iba u 8 zaznamenali zvýšenie hladín antiaterogenného HDL cholesterolu o 15,75 %. V skupine probandov KOT, ktorí užívali zápar z kotvičníka zemného, poklesli hodnoty

priemerných hladín celkového cholesterolu o 9,09 %; LDL cholesterolu o 11,05 %; HDL cholesterolu o 3,04 % a triacylglycerolov o 18,97 %. Pokles hodnôt celkového a LDL cholesterolu, TG môžeme hodnotiť pozitívne a poukazuje na pozitívny účinok záparu z kotvičníka zemného na faktory, ktoré ovplyvňujú hypercholesterómiu. Naopak, pokles priemernej hladiny HDL cholesterolu nie je pre pacienta žiaduci. Z hľadiska aterogenity môžeme u 6 pacientov v skupine pozitívne hodnotiť nárast priemerných hladín HDL cholesterolu o 8,39 %; aj keď porovnaním so skupinou HYP nie je nárast výrazný. Práve nárast HDL cholesterolu má významnú úlohu pri inhibícii procesov aterogenézy, pri reverznom transporte cholesterolu z periférnych buniek do pečene a ochraňuje cievy. Aj napriek tomu, že v našej štúdii išlo len o malý súbor pacientov, sú dosiahnuté výsledky s ohľadom na využitie rastliny *Tribulus terrestris* povzbudivé. Dôležité je zistenie, že u pacientov sme nezaznamenali nežiaduce účinky. Využitie čajoviny, extraktu alebo výživového doplnku z kotvičníka zemného ako adjuvans môže byť vhodnou voľbou v kombinácii k liečbe statínmi a fibrátmi.

Kľúčové slová: dyslipoproteinémia; celkový cholesterol; HDL cholesterol; LDL cholesterol; triacylglycerol; *Tribulus terrestris*

ABSTRACT

A frequent concomitant of dyslipoproteinemia pharmacotherapy is the occurrence of adverse effects, which can lead to discontinuation of therapy and non-compliance by the patient. The aim of the comparative study was to observe in patients with dyslipoproteinaemia for 8 months how the treatment with hypolipidaemic drugs in the HYP group and regular use of *Tribulus terrestris* L. in the KOT group affects lipid profile levels. The study included 30 probands, classified as patients with low cardiovascular risk, dispensed

and treated for thyroid disease in a private endocrinology and internal medicine outpatient clinic in Košice. There were 15 probands in each HYP and KOT group (13 women and 2 men) with an average age of 61 years. Total and LDL cholesterol, HDL cholesterol, and triacylglycerols were determined to each proband once a month, and the values were compared between the groups. Enzymatic colour assays were used to quantify individual parameters using a Beckamb Coulter AU-analyzer to quantify cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol and triacylglycerols in human serum and plasma. In the HYP group, patients treated with hypolipidemics experienced a decrease in total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol and triacylglycerol levels by 20.87 %, 25.9%, 0.23% and 24.94%, respectively. Out of 15 patients, only 8 patients showed an increase in antiatherogenic HDL cholesterol levels by 15.75 %. In the group of KOT probands taking anemone bitterroot infusion, the mean total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol and triacylglycerol levels decreased by 9.09 %, 11.05 %, 3.04 % and 18.97 %, respectively. The decrease in the values of total and LDL cholesterol, TG can be evaluated positively and indicates the positive effect of the ground anemone infusion on the factors that affect hypercholesterolemia. On the contrary, the decrease in the mean HDL cholesterol level is not desirable for the patient. From the point of view of atherogenicity, we can positively evaluate the increase in mean HDL cholesterol levels by 8.39 % in 6 patients in the group, although comparing with the HYP group the increase is not significant. It is the increase in HDL cholesterol that has an important role in inhibiting the processes of atherogenesis, in the reverse transport of cholesterol from the peripheral cells to the liver, and in the protection of the blood vessels. Even though our study involved only a small set of patients, the results obtained are encouraging with regard to the use of *Tribulus terrestris*. An important

finding is that we did not observe adverse effects in the patients. The use of a tea plant, extract or nutritional supplement of St. John's wort as an adjuvant may be an appropriate choice in combination with statin and fibrate therapy.

Key words: dyslipoproteinemia; total cholesterol; HDL cholesterol; LDL cholesterol; triacylglycerol; *Tribulus terrestris*

ÚVOD

V správe o zdravotnom stave obyvateľstva Slovenska za roky 2015 – 2020 sa ako najčastejšie príčiny smrti uvádzajú choroby obehovej sústavy, nádorové ochorenia, choroby dýchacej sústavy, vonkajšie príčiny chorobnosti, úmrtnosti a choroby tráviacej sústavy. Miera revidovanej štandardizovanej úmrtnosti na choroby obehovej sústavy v roku 2019 dosiahla u mužov hodnotu 434,9 na 100 000 obyvateľov a u žien hodnotu 488,6 na 100 000 obyvateľov (URL1, 2021).

V rozvinutých štátoch sveta patria kardiovaskulárne ochorenia (KVO) k hlavným príčinám úmrtnosti. Jedným z najdôležitejších rizikových faktorov KVO je dlhodobý vysoký príjem cholesterolu prostredníctvom potravín (Kolarič, Šimko, 2021). Nadmerná akumulácia cholesterolu v rôznych tkanivách a orgánoch zohráva rozhodujúcu úlohu aj v patogeneze cukrovky, chronického ochorenia obličiek, chorôb pečene, Alzheimerovej choroby, osteoporózy, osteoartritídy, dysfunkcie hypofýzy a štítnej žľazy, poruchy imunity a COVID-19 (Song a kol., 2021).

Celosvetový nárast epidémie obezity je sprevádzaný výrazným nárastom aterosklerotických kardiovaskulárnych ochorení. K hlavným rizikovým faktorom kardiovaskulárnych ochorení patrí hypercholesterolémia. Rozhodujúcu úlohu vo vývoji a progresii aterosklerózy majú poruchy metabolizmu lipidov, oxidačný stres, chronický zápal a endoteliálna dysfunkcia (Rong a kol., 2017).

Lipoproteíny v plazme transportujú lipidy do

tkanív na využitie ako zdroja energie, produkciu steroidných hormónov a tvorbu žľových kyselín. V plazme je šesť hlavných lipoproteínov: chylomikróny, lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou (VLDL), lipoproteíny so strednou hustotou (IDL), LDL, Lp(a) a HDL. V klinickej praxi sa v štandardnom sérovom lipidovom profile meria koncentrácia TC a HDL-C, ako aj TG. Na základe týchto hodnôt možno odhadnúť koncentráciu LDL-C (Smernice ESC/EAS 2019; Mach a kol., 2020).

Kľúčovú úlohu pri aterogenéze zohráva retencia cholesterolu s nízkou hustotou (LDL), cholesterolu (LDL-C) a iných lipoproteínov bohatých na cholesterol (Apo)B v arteriálnej stene (FERENCE a kol., 2017). Najvyššia koncentrácia LDL-receptorov sa nachádza v pečeni, nadobličkách a gonádach, kde je metabolizmus cholesterolu najintenzívnejší. Nadbytočný, neutilizovaný cholesterol sa transportuje HDL, za spolupôsobenia proteínu transportujúceho estery cholesterolu (CETP) späť do pečene. Porucha LDL-receptorov vedie k poruche regulácie metabolizmu cholesterolu a jeho hromadeniu v plazme a zohráva kľúčovú úlohu v procese aterogenézy. Lp(a) čiastočne súťaží s LDL o väzbu na LDL-receptory, čím bráni katabolizmu LDL-receptorovou cestou a zvyšuje ich aterogenitu ako rizikového faktora v plazme (Oravec, 2011).

Z mnohých klinických štúdií vyplynulo, že čím sú nižšie hodnoty LDL-C, tým sa znižuje riziko budúcich kardiovaskulárnych (KV) príhod. Zvýšené hodnoty LDL-C sú kauzálne spojené s aterosklerotickou kardiovaskulárnou chorobou (ASCVD). Najviac znižuje KV príhody znižovanie LDL častíc a iných lipoproteínov obsahujúcich ApoB. U ľudí s vysokou hladinou TG, *Diabetes mellitus* (DM), obezitou, metabolickým syndrómom a veľmi nízkou hladinou LDL-C sa na posúdenie rizika odporúča analýza ApoB. Plazmatická koncentrácia TG odráža koncentrácie cirkulujúcich lipoproteínov bohatých na TG obsahujúcich ApoB (ESC/EAS 2019; Mach a kol., 2020).

Ľudia s vyššími koncentraciami lipoproteínov obsahujúcich ApoB v plazme zadržiavajú viac častíc

a rýchlejšie hromadia lipidy, čo má za následok rýchlejšiu rast a progresiu aterosklerotických plakov (Boren, Williams, 2016).

HDL je protektívny faktor, ktorý bráni rozvoju koronárnej insuficiencie, degeneratívnemu aterosklerotickému poškodeniu ciev a antagonizuje účinky aterogénnych lipoproteínov LDL, β -VLDL, VLDL a Lp(a). HDL tvorí súčasť transportného systému s CETP pre transport EC z periférie (bunky arteriálnej steny, lipoproteínové membrány) do pečene ako reverzný transport cholesterolu (Oravec, 2011).

Pravidelná pohybová aktivita zvyšuje hladinu HDL cholesterolu a súčasne znižuje koncentráciu celkového cholesterolu a triacylglycerolov. Z diétnych opatrení sa odporúča obmedziť celkový príjem tukov, menej ako 300 mg cholesterolu denne, sacharidov, zvýšiť dennú spotrebu vlákniny na 25 – 40 g, alkoholu 20 – 30 g u mužov a 10 – 20 g u žien (Souček, 2016).

Na hodnotenie celkového kardiovaskulárneho rizika sa odporúča používať systém SCORE (Systematic Coronary Risk Estimation), ktorý je založený na veľkých, reprezentatívnych európskych kohortách a súboroch údajov, a pretože je relatívne jednoduché ho rekalibrovať na použitie v rôznych populáciách úpravou o sekulárne zmeny v úmrtnosti na KVO a prevalencie rizikových faktorov. Systém odhadu rizík SCORE môže pomôcť pri prijímaní logických manažérskych rozhodnutí a môže pomôcť vyhnúť sa nedostatočnej alebo nadmernej liečbe (URL2, 2021).

Aterosklerózu dokážeme ovplyvniť medikamentóznou liečbou, hlavne hypolipidemická liečba vedie k nižšiemu počtu klinických príhod u pacientov už s rozvinutou aterosklerózou (Townsend a kol., 2015). Najčastejšie sa na liečbu hypercholesterolémie používajú lieky zo skupiny statínov, ktoré vykazujú vysokú účinnosť pri znižovaní sérovej koncentrácie celkového a LDL cholesterolu. Statíny sú pacientami dobre tolerované, s nízkym výskytom klinicky závažných nežiaducich účinkov. Riziko interakcií a závažných nežiaducich účinkov

(poškodenie pečene a periférna neuropatia) vzniká u pacientov polymorbidných, starších, s metabolickým syndrómom, diabetom a hepatálnym poškodením (Lašanová a kol., 2007).

Vzhľadom k tomu, že pri farmakoterapii dyslipoproteinémií sa vyskytujú nežiaduce účinky, hľadajú sa alternatívne spôsoby adjuvantnej terapie pomocou liečivých rastlín. V experimentálnej štúdií sme si ako modelovú liečivú rastlinu vybrali kotvičník zemný (*Tribulus terrestris* L.) (*Zygophyllaceae*), jednoročnú plazivú bylinu rastúcu v Číne, Indii, Japonsku a Kórei. Obsahuje saponíny, alkaloidy a flavonoidy (Zheng, 2017; Tian a kol., 2019; 2021). Z rastliny bolo izolovaných 108 druhov steroidných saponínov (Zhu a kol., 2017). *Tribulus terrestris* L. sa používa na liečbu zápalov, kardiovaskulárnych a cerebrovaskulárnych ochorení, rakoviny, oxidačného stresu, hormonálnej nerovnováhy, poškodenia svalov a iných ochorení (Tian a kol., 2019; 2021).

Cieľom komparačnej štúdie bolo sledovať vplyv pravidelného užívania záparu z kotvičníka zemného (*Tribulus terrestris* L.) na hladinu celkového cholesterolu, LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a triacylglycerolov u pacientov s dyslipoproteinémiou a porovnať ich so skupinou pacientov, ktorí boli liečení hypolipidemikami.

MATERIÁL A METÓDY

Do komparačnej štúdie sme zaradili 30 pacientov, ktorí boli dispenzarizovaní a liečení pre ochorenie štítnej žľazy v súkromnej endokrinologickej a internej ambulancii v Košiciach. Na základe vstupného vyšetrenia internistom boli pacienti klasifikovaní ako pacienti s nízkym kardiovaskulárnym rizikom. U jedincov s nízkym rizikom sa môže zväžiť cieľová hodnota LDL-C $< 3,0 \text{ mmol.l}^{-1}$ ($< 116 \text{ mg.dl}^{-1}$). U nefajčiarov má byť celkový cholesterol (TC) $< 4 \text{ mmol.l}^{-1}$ ($< 155 \text{ mg.dl}^{-1}$), tlak $< 120 \text{ mmHg}$ (Smernice ESC/EAS 2019; Mach a kol., 2020). Všetci probandi mali celkový cholesterol vyšší ako 5 mmol.l^{-1} a boli rozdelení do dvoch skupín. Do štúdie sme nezaradili tehotné ženy, dojčiace matky, pacientov s hepatálnou

insuficienciou a pacientov s ťažkými metabolickými ochoreniami. Počas sledovaného obdobia (október 2017 až máj 2018) probandi nezmenili stravovacie návyky a ani životný štýl.

Prvú skupinu „HYP“ tvorilo 15 pacientov vo veku od 45 – 68 rokov, ktorí boli liečení hypolipidemikami (statínmi, fibrátmi resp. ich kombináciou). Z celkového počtu probandov bolo 13 žien a 2 muži a ich priemerný vek bol 61 rokov.

Druhú skupinu „KOT“ tvorili 15 probandi vo veku 47 – 76 rokov, ktorí nesúhlasili s farmakologickou liečbou hyperlipoproteinémie a preferovali nefarmakologický postup. Z celkového počtu bolo 13 žien a 2 muži a ich priemerný vek bol 61 rokov. Z navrhovaných alternatívnych možností (Arterin, hľiva ustricovitá, omega 3-mastné kyseliny, kotvičník zemný a iné) si probanti zvolili užívanie záparu (čaju) z kotvičníka zemného („Kotvičník“ výrobca SOLIA, spol. s r. o., Česká republika) po dobu 8 mesiacov. Podľa odporúčaní uvádzaných v príbalovom letáku užívali probandi 1x denne zápar pripravený z 1g drogy zaliatej 250 ml vriacej vody a vylúhovaný 10 minút.

Odber krvi a príprava séra

Odber žilovej krvi sa vykonával raz mesačne v období október 2017 až máj 2018 v endokrinologickej a internej ambulancii v Košiciach. Odber sa realizoval vždy ráno nalačno za štandardných podmienok (deň pred odberom ľahká strava s vylúčením príjmu živočíšnych tukov a odporúčalo sa 12 až 14-hodinové lačnenie). Pacienti mohli užiť iba vodu alebo bezkalorickú tekutinu. Žilová krv sa odoberala z kubitálnej jamky pomocou ihly v množstve 10 ml do sterilných vacutainerových skúmaviek. Krvné vzorky sa následne pri izbovej teplote centrifugovali. Sérum sa oddelilo od sedimentu a následne sa analyzovalo.

V rámci hodnotených laboratórnych parametrov sa stanovoval celkový cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol a triacylglyceroly. Na stanovenie jednotlivých parametrov boli použité enzymatické farebné testy na kvantitatívne stanovenie cholesterolu, LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a

triacylglycerolov v ľudskom sére a plazme pomocou analyzátora Beckamb Coulter AU-analysinstrument.

Pomocou tabuľkového procesora Microsoft Excel 2003 sme vypočítali priemerný vek pacientov, priemerné hladiny celkového cholesterolu, LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a triacylglycerolov pri vstupnom a výstupnom vyšetrení.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky získané z osemmesačnej komparačnej štúdie, ktorá sa vykonávala na 30 dispenzarizovaných pacientoch, liečených pre ochorenie štítnej žľazy v súkromnej endokrinologickej a internej ambulancii v Košiciach uvádzame v tabuľkách (viď tab. 1 – 2) a grafoch (viď graf 1 – 4). Hladiny celkového cholesterolu, LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a triacylglycerolov vyjadrené v mmol.l⁻¹, pred liečbou a po liečbe hypolipidemikami v skupine pacientov HYP uvádzame v tabuľke 1.

Z tabuľky 1 vyplynulo, že po liečbe hypolipidemikami poklesli priemerne hodnoty hladín celkového a LDL cholesterolu, triacylglycerolov. Hodnoty hladín HDL cholesterolu zostali nezmenné (1,48 mmol.l⁻¹). Pri hodnotení výstupných hodnôt jednotlivých ukazovateľov pacientov jednotlivo sme zistili, že v dvoch prípadoch došlo k nárastu hodnôt celkového a LDL cholesterolu. V dvoch prípadoch došlo k nárastu hodnôt iba triacylglycerolov. V siedmych prípadoch došlo k poklesu hodnôt HDL, čo je z hľadiska úspešnosti liečby nežiaduce. Naopak, u ôsmich pacientov došlo k zvýšeniu hladín HDL cholesterolu z 1,46 na 1,62 mmol.l⁻¹, čo predstavuje nárast o 15,75 %. Keďže HDL inhibuje procesy aterogenézy, môžeme jeho nárast hodnotiť pozitívne.

Hladiny celkového a LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a triacylglycerolov v skupine KOT pred a po užívaní záparu z kotvičníka zemného uvádzame v tabuľke (viď tab. 2).

V skupine pacientov KOT došlo k poklesu priemerných hodnôt hladiny celkového cholesterolu, LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a

Tab. 1: Hladiny cholesterolov a triacylglycerolov v skupine HYP

PACIENT	CELKOVÝ CHOLESTEROL* (mmol.l ⁻¹)		LDL CHOLESTEROL* (mmol.l ⁻¹)		HDL CHOLESTEROL* (mmol.l ⁻¹)		TRIACYL - GLYCEROLY* (mmol.l ⁻¹)	
	vstupné vyšetr.	výstupné vyšetr.	vstupné vyšetr.	výstupné vyšetr.	vstupné vyšetr.	výstupné vyšetr.	vstupné vyšetr.	výstupné vyšetr.
Žena, 52 rokov (Simvastatín)	7,11	4,39	4,55	2,29	1,36	*0,93	2,99	2,58
Žena, 64 rokov (Atorvastatín)	7,04	4,6	4,18	2,48	2,10	1,8	0,99	0,7
Žena, 68 rokov (Atorvastatín)	7,04	5,35	4,36	2,86	1,96	**1,99	1,59	1,09
Žena, 59 rokov (Atorvastatín)	7,51	4,89	5,23	3,16	1,33	*1,34	2,1	0,86
Muž, 64 rokov (Atorvastatín)	6,58	4,49	4,24	2,68	1,62	1,48	1,59	0,72
Muž, 54 rokov (kombinácia)	5,79	4,97	3,44	2,57	1,65	**2,13	1,55	1,25
Žena, 58 rokov (Atorvastatín)	5,3	4,9	3,8	3,4	1,13	**1,18	0,85	0,79
Žena, 61 rokov (Atorvastatín)	6,1	*6,3	4,4	*4,5	0,98	**1,27	1,56	1,42
Žena, 66 rokov (Atorvastatín)	7,2	5,2	4,8	3,2	1,61	**1,79	1,58	1,37
Žena, 64 rokov (fenofibrát)	6,3	4,7	4,4	3,2	1,17	1,05	2,09	2,32
Žena, 45 rokov (Atorvastatín)	6,6	4,2	4,3	2,5	1,57	1,42	1,61	0,84
Žena, 61 rokov (Atorvastatín)	7,0	6,8	4,9	4,7	1,46	1,41	1,38	1,40
Žena, 66 rokov (Atorvastatín)	5,8	4,7	3,9	3,3	1,24	1,19	2,94	1,28
Žena, 68 rokov (Atorvastatín)	7,2	5,45	4,42	2,42	1,85	**1,93	1,88	1,61
PRIEMERNÁ HLADINA	6,52	5,16	4,31	3,20	1,48	**1,48	1,75	1,31
POKLES V %		20,87		25,90		0,23		24,94
PRIEMERNÁ HLADINA					1,46	**1,62		
NÁRAST V %						**15,75		

* červenou sú zvýraznené hodnoty vo všetkých hodnotených parametroch po liečbe hypolipidikami, ktoré vykazujú zhoršenie

** modrou sú zvýraznené hodnoty HDLcholesterolu po liečbe hypolipidikami, ktoré vykazujú zlepšenie

Tab. 2: Hladiny cholesterolov a triacylglycerolov v skupine KOT

PACIENT	CELKOVÝ CHOLESTEROL* (mmol.l ⁻¹)		LDL CHOLESTEROL* (mmol.l ⁻¹)		HDL CHOLESTEROL* (mmol.l ⁻¹)		TRIACYL - GLYCEROLY* (mmol.l ⁻¹)	
	vstupné vyšetr.	výstupné vyšetr.	vstupné vyšetr.	výstupné vyšetr.	vstupné vyšetr.	výstupné vyšetr.	vstupné vyšetr.	výstupné vyšetr.
Muž, 63 rokov	4,4	10,3	2,7	3,3	0,7	*0,92	7,95	*19,7
Muž, 76 rokov	7,1	5,9	5,4	4,3	1,22	1,02	2,06	2,06
Žena, 47 rokov	7,3	6,9	4,6	4,3	1,63	**1,87	3,42	2,95
Žena, 64 rokov	6,3	4,3	4,5	2,7	1,42	**1,42	0,84	1,05
Žena, 52 rokov	6,9	8,2	5,3	6,1	1,25	**1,32	1,90	1,51
Žena, 60 rokov	6,8	6,9	4,6	4,8	1,73	1,60	1,29	1,12
Žena, 61 rokov	6,2	6,8	4,2	4,7	1,32	**1,41	1,72	1,40
Žena, 61 rokov	6,1	6,1	4,1	4,1	1,59	**1,47	1,56	1,83
Žena, 74 rokov	6,3	6,4	4,4	4,6	1,37	**1,43	1,40	1,10
Žena, 69 rokov	8,0	5,3	5,4	3,3	1,88	1,61	2,61	1,10
Žena, 66 rokov	6,5	5,9	4,5	3,8	1,49	1,38	2,73	2,00
Žena, 58 rokov	6,8	7,1	4,9	5,2	1,36	1,35	1,93	1,57
Žena, 63 rokov	7,2	5,1	5,0	3,0	1,83	1,73	1,82	1,41
Žena, 49 rokov	5,48	5,50	2,76	3,2	1,59	**1,82	2,48	1,65
Žena, 47 rokov	6,19	4,30	3,59	2,16	2,02	1,61	1,28	1,16
PRIEMERNÁ HLADINA	6,66	6,05	4,52	4,02	1,55	1,50	1,93	1,57
POKLES V %		9,09		11,05		3,04		18,97
PRIEMERNÁ HLADINA					1,43	**1,55		
NÁRAST V %						**8,39		

* červenou sú zvýraznené výsledky po užívaní záparu, ktoré v porovnaní s výsledkami pred liečbou vykazujú zhoršenie

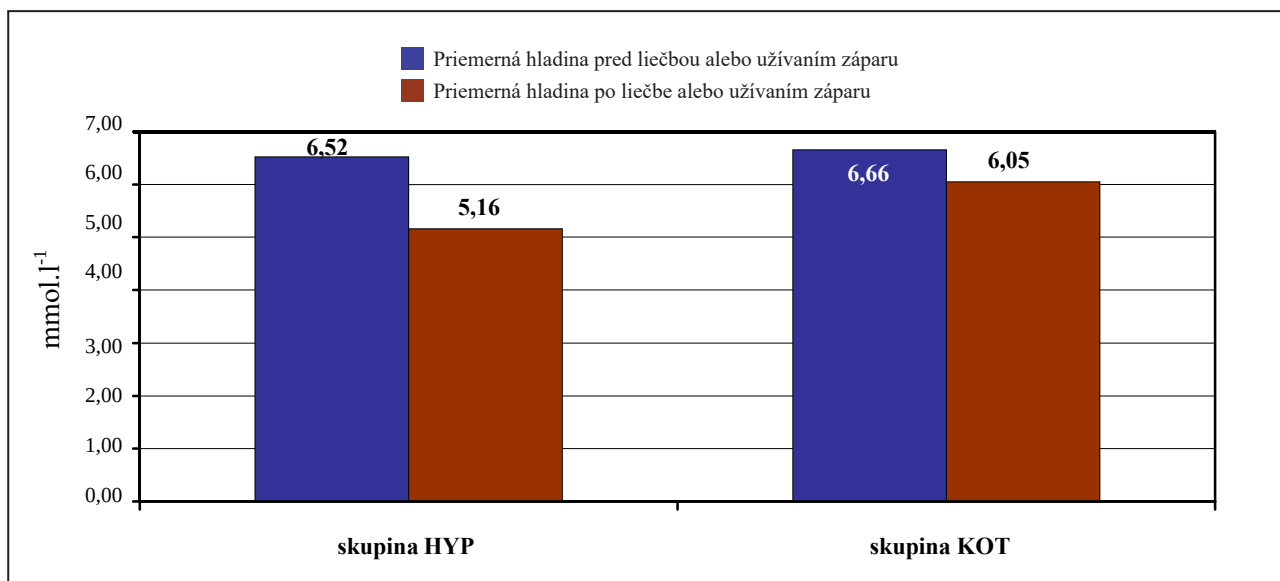
x pacient po užívaní čaju nebol zahrnutý do hodnotenia kvôli výraznému zvýšeniu hladín sledovaných faktorov

** modrou sú zvýraznené výsledky pred a po užívaní čaju, ktoré v porovnaní s výsledkami pred liečbou vykazujú zlepšenie

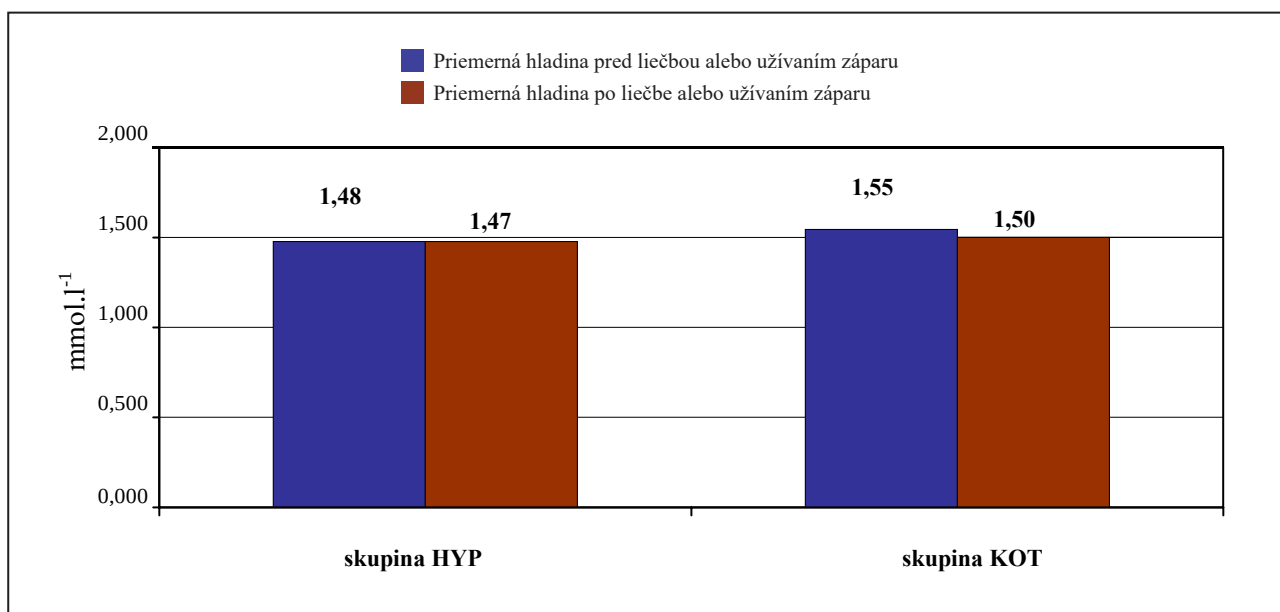
triacylglycerolov (viď tab. 2). Z hľadiska úspešnosti liečby dyslipoproteinémie nie je pokles hladiny antiaterogenného HDL u pacienta žiaduci. Ak hodnotíme vstupné a výstupné hodnoty sledovaných ukazovateľov pacientov samostatne, potom u niektorých pacientov došlo k nárastu niektorých hodnôt. Do hodnotenia sme nezahrnuli probanda,

u ktorého došlo k výraznému zvýšeniu hladín celkového a LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a triacylglycerolov. V šiestich prípadoch došlo k zvýšeniu priemerných hladín HDL cholesterolu z 1,43 mmol.l⁻¹ na 1,55 mmol.l⁻¹, čo je nárast o 8,39 %. Z hľadiska inhibície procesu aterogenézy môžeme nárast HDL cholesterolu hodnotiť pozitívne.

Graf 1: Priemerné hladiny celkového cholesterolu u oboch sledovaných skupín



Graf 2: Priemerné hladiny HDL cholesterolu u oboch sledovaných skupín



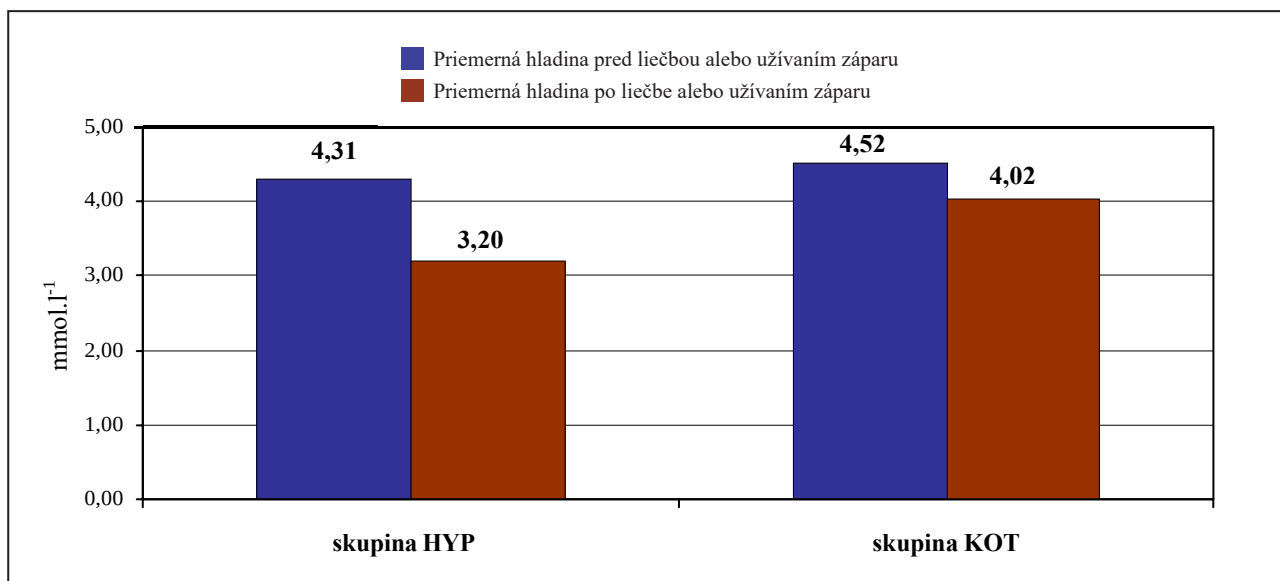
Komparácia hodnôt laboratórnych parametrov medzi skupinami HYP a KOT

Sérová hladina celkového cholesterolu

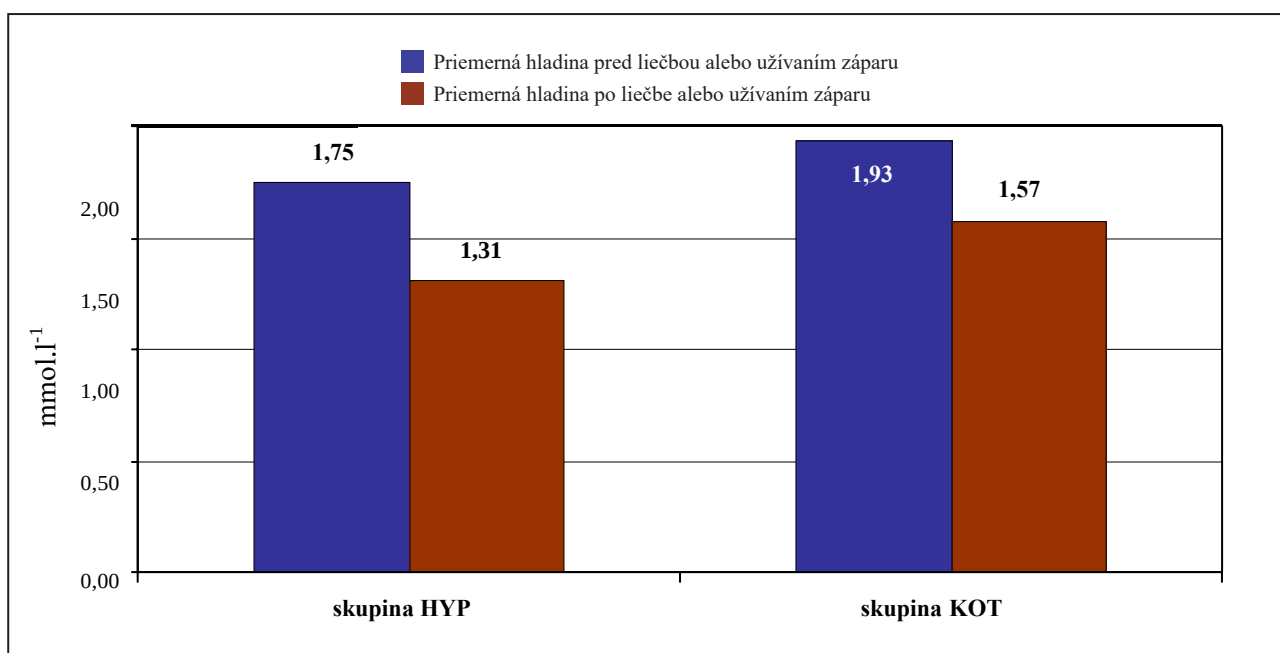
Sérová hladina celkového cholesterolu je podľa referenčného rozmedzia laboratória v rozmedzí 2,8 mmol.l⁻¹ – 5,2 mmol.l⁻¹. V skupine HYP bola

priemerná hladina celkového cholesterolu pred liečbou 6,52 mmol.l⁻¹ a po liečbe hypolipidematikami došlo k poklesu hodnoty na 5,16 mmol.l⁻¹, čo je pokles o 22,87 %. V skupine KOT sme zaznamenali priemernú hladinu celkového cholesterolu pred užívaním záparu z kotvičníka zemného 6,66 mmol.l⁻¹ a po pravidelnom užívaní 6,05 mmol.l⁻¹, čo je pokles

Graf 3: Priemerné hladiny LDL cholesterolu u oboch sledovaných skupín



Graf 4: Priemerné hladiny triacylglycerolov u oboch sledovaných skupín



o 9,09 % (vid' graf 1). Ak porovnávame pokles priemernej hladiny celkového cholesterolu medzi skupinami HYP a KOT, potom výraznejší pokles nastal v skupine HYP.

Sérová hladina HDL cholesterolu

Podľa referenčného rozmedzia laboratória je sérová hladina HDL cholesterolu väčšia ako 1,04 mmol.l⁻¹. V skupine HYP bola priemerná hladina HDL cholesterolu pred liečbou 1,48 mmol.l⁻¹ a po liečbe hypolipidemikami poklesla na 1,47 mmol.l⁻¹;

čo je pokles o 0,23 %. V skupine KOT bola priemerná hladina HDL cholesterolu pred užívaním záparu z drogy kotvičníka zemného 1,55 mmol.l⁻¹ a po ukončení štúdie bola 1,50 mmol.l⁻¹; čo je pokles o 3,04 % a predstavuje zdravotné riziko pre pacienta (viď graf 2). Ak porovnávame pokles priemernej hladiny HDL cholesterolu medzi skupinami HYP a KOT, potom výraznejší pokles nastal v skupine KOT.

Sérová hladina LDL cholesterolu

Sérová hladina LDL cholesterolu je podľa referenčného rozmedzia laboratória < 3,0 mmol.l⁻¹. V skupine HYP bola priemerná hladina LDL cholesterolu pred liečbou 4,31 mmol.l⁻¹ a po liečbe hypolipidemikami došlo k poklesu hodnôt na 3,2 mmol.l⁻¹ ; čo znamená pokles o 25,9 %. V skupine KOT bola vstupná priemerná hladina LDL cholesterolu pred užívaním záparu z kotvičníka zemného 4,52 mmol.l⁻¹ a po ukončení štúdie bola priemerná hladina LDL cholesterolu 4,02 mmol.l⁻¹; čo predstavuje pokles o 11,05 % (viď graf 3). Pri porovnávaní hodnôt priemernej hladiny LDL cholesterolu medzi skupinami HYP a KOT sme zaznamenali výraznejší pokles v skupine HYP.

Sérová hladina triacylglycerolov

Sérová hladina triacylglycerolov je podľa referenčného rozmedzia laboratória menšia ako < 1,7 mmol.l⁻¹. V skupine HYP bola priemerná hladina TAG pred liečbou 1,75 mmol.l⁻¹ a po liečbe hypolipidemikami 1,31 mmol.l⁻¹; čo predstavuje pokles o 24,94 %. V skupine KOT bola priemerná hladina TAG pred užívaním záparu z kotvičníka zemného 1,93 mmol.l⁻¹ a po ukončení štúdie bola priemerná hladina TAG v tejto skupine 1,57 mmol.l⁻¹; čo je pokles o 18,97 % (viď graf 4). Pri porovnávaní hodnôt priemernej hladiny TAG medzi skupinami HYP a KOT sme zaznamenali výraznejší pokles v skupine HYP.

Ak porovnávame navzájom úspešnosť farmakologickej liečby v skupine HYP a adjuvantnej liečby v skupine KOT, poklesom priemernej hladiny celkového a LDL cholesterolu, TAG, potom

výsledky nasvedčujú tomu, že v skupine HYP došlo k ich výraznému poklesu. V skupine KOT oproti skupine HYP došlo k výraznejšiemu poklesu hodnôt priemernej hladiny HDL cholesterolu, čo z hľadiska inhibície procesov aterogenézy nie je žiaduce (viď tab.1 a grafy 1 – 4).

Hodnoty celkového a HDL cholesterolu, LDL cholesterolu a triacylglycerolov sú ovplyvňované rizikovými faktormi. Vek, pohlavie a niektoré genetické faktory sú neovplyvniteľné faktory. Výrazný vplyv na hodnoty cholesterolu majú ovplyvniteľné faktory ako hyperlipoproteinémia (hypercholesterolémia, hypertriacylglycerolémia), fajčenie a arteriálna hypertenzia (Oravec, 2011).

Systematická tabuľka odhadu koronárneho rizika pre európske populácie s vysokým rizikom kardiovaskulárnych ochorení (SCORE) udáva desaťročné riziko smrteľných kardiovaskulárnych ochorení v populácii na základe rizikových faktorov: vek, pohlavie, fajčenie, systolický krvný tlak a celkový cholesterol. Najsilnejším faktorom celkového KV rizika je vek, ktorý možno považovať za „čas vystavenia“ rizikovým faktorom. Zároveň platí, že u ľudí, ktorí prestanú fajčiť, sa kumulatívne riziko zníži na polovicu za relatívne krátky čas (Smernice ESC/EAS 2019; Mach a kol., 2020).

Z probandov sme vytvorili dve skupiny HYP a KOT tak, aby sme čiastočne eliminovali pohlavie a vek. V každej skupine bolo po 15 pacientov (13 žien a 2 muži) s priemerným vekom 61 rokov. V skupine HYP boli pacienti vo veku 45 – 68 rokov a KOT boli vo veku 47 – 76 rokov. Aj keď vekový priemer bol v oboch skupinách rovnaký, v druhej skupine boli dvaja probandi viac ako 70-roční.

V skupine HYP v rámci hodnotených laboratórnych parametrov došlo u pacientov liečených hypolipidemikami k poklesu hladín celkového cholesterolu o 20,87 %; LDL cholesterolu o 25,9 %; HDL cholesterolu o 0,23 % a triacylglycerolov o 24,94 % (viď tab. 1 a grafy 1 – 4). V súčasnosti existuje dostatočné množstvo štúdií, ktoré potvrdzujú pozitívny vplyv hypolipidemík na celé spektrum lipidov, a preto sme tento pokles hladín očakávali.

Z 15 pacientov sme iba u 8 pacientov znamenali zvýšenie hladín antiaterogenného HDL cholesterolu o 15,75 % (viď tab. 1).

Práve HDL cholesterol má významnú úlohu pri inhibícii procesov aterogenézy a zohráva hlavnú úlohu pri reverznom transporte cholesterolu z periférnych buniek do pečene. Ochraňuje cievy pred presýtením cholesterolom za pomoci CETP a LCAT (lecitín : cholesterol acyltransferázy), s ktorými vytvára funkčné komplexy. Významný je vplyv HDL na endotelovú bunku, tvorbu vazoaktívnych hormónov, hlavne prostaglandínov. Stimuluje tvorbu prostacyklínu (PGI₂), ktorý svojim vazodilatačným, antiagregačným a antiaterogenným vplyvom zabezpečuje homeostázu v cieve. Tlmí proces aterosklerózy, uvoľňovania tromboxanu A₂ z endotelových buniek, ktorý má vasokonstrikčné, tromboagregačné a aterogenné účinky (Oravec, 2011).

V klinickej praxi sa v primárnej a sekundárnej prevencii kardiovaskulárnych ochorení najčastejšie používajú statíny. Vyznačujú sa vysokou účinnosťou pri znižovaní sérovej hladiny celkového a LDL cholesterolu, zvyšujú hladiny HDL, vykazujú pleiotropné, antiflogistické účinky a priaznivo ovplyvňujú endotelovú dysfunkciu (Lašanová a kol., 2005).

Statíny znižujú syntézu cholesterolu v pečeni tým, že inhibujú enzým HMG-CoA reductázu, ktorá obmedzuje rýchlosť biosyntézy cholesterolu. Zníženie intracelulárneho cholesterolu podporuje zvýšenú expresiu LDL receptora na povrchu hepatocytov, čo vedie k zvýšenému príjmu LDL z krvi a zníženiu plazmatických koncentrácií LDL a iných lipoproteínov obsahujúcich ApoB, vrátane lipoproteínov bohatých na TG častíc (Smernice ESC/EAS, 2019; Mach a kol., 2020).

Klinické štúdie a *post hoc* analýzy potvrdili zníženie hladiny cholesterolu a zápalu po liečbe statínmi (Bohula a kol., 2015).

Z metaanalýzy randomizovaných štúdií vyplynulo, že účinky liečby statínmi závisia od absolútneho zníženia LDL-C, od východiskového rizika ASCVD

a sú nezávislé od všetkých známych rizikových faktorov vrátane veku. Liečba statínmi sa odporúča na primárnu prevenciu podľa miery rizika u starších ľudí vo veku menej ako 75 rokov. U pacientov s T2 DM s veľmi vysokým rizikom sa odporúča zníženie LDL-C o ≥ 50 % oproti východiskovej hodnote a cieľová hodnota LDL-C $< 1,4 \text{ mmol.l}^{-1}$ ($< 55 \text{ mg.dl}^{-1}$). U pacientov s T2 DM s vysokým rizikom sa odporúča zníženie LDL-C o ≥ 50 % oproti východiskovej hodnote a cieľová hodnota LDL-C $< 1,8 \text{ mmol.l}^{-1}$ ($< 70 \text{ mg.dl}^{-1}$). Statíny sa odporúčajú u pacientov s T1 DM s vysokým alebo veľmi vysokým rizikom. Ak sa cieľ nedosiahne, mala by sa zvážiť kombinácia statínu s ezetimibom. U jedincov s vysokou hladinou TG by sa mal ApoB vždy považovať za alternatívny rizikový marker. U jedincov s nízkym rizikom sa môže zvážiť cieľová hodnota LDL-C $< 3,0 \text{ mmol.l}^{-1}$ ($< 116 \text{ mg.dl}^{-1}$) (Smernice ESC/EAS 2019; Mach a kol., 2020).

Statíny sú určené na dlhodobú liečbu pacienta, preto sa musí zohľadňovať otázka liekovej bezpečnosti a tolerancie. Najčastejšie nežiaduce účinky sú bolesti hlavy, brucha a nespavosť. Niekedy sa objavuje zvýšená aktivita transamináz bez poškodenia pečene. Častý je vzostup hladiny kreatinkinázy, sprevádzaný myozitídou. U pacientov s diabetom môže dôjsť k zníženiu inzulínovej senzitivity a prodiabetogénemu efektu (Oleárová, 2015).

Fibráty sú agonistami peroxizómových proliferátorom aktivovaných receptorov (PPAR- α , ktoré pôsobia prostredníctvom transkripčných faktorov regulujúcich okrem iného rôzne kroky v metabolizme lipidov a lipoproteínov. V dôsledku čoho majú fibráty dobrú účinnosť pri znižovaní hladín TG nalačno, ako aj postprandiálnych TG a zvyškov lipoproteínov bohatých na TG (TRL) častíc (Smernice ESC/EAS 2019; Mach a kol., 2020).

Fibráty znižujú triacylglyceroly (TAG) o 20 – 30 % (podstatnejšia redukcia u pacientov s vyššou TAG pred liečbou), postprandiálne TAG remnantné lipoproteínové častice a zvyšujú koncentráciu HDL cholesterolu o 5 – 10 %. Fenofibrát znižuje hladinu LDL cholesterolu, vedie k redukcii malých denzných

LDL-častíc o 50 % (Krahulec a kol., 2013).

Ezetimib inhibuje črevnú absorpciu cholesterolu z potravy a biliárneho cholesterolu na úrovni okraja čreva [interakciu s proteínom podobným Niemann-Pickovmu C1 1 (NPC1L1)], bez ovplyvnenia absorpcie živín rozpustných v tukoch. Inhibíciou absorpcie cholesterolu ezetimib znižuje množstvo cholesterolu dodávaného do pečene. Ako odpoveď na zníženú dodávku cholesterolu reaguje pečeň zvýšeným vylučovaním LDL z krvi (Smernice ESC/EAS 2019; Mach a kol., 2020).

Ezetimib pridaný k prebiehajúcej liečbe statínom znižuje hladinu LDL-C o ďalších 21 – 27 % v porovnaní s placebom u pacientov s hypercholesterolémiou s alebo bez zistenej CHD (Coronary heart disease). U pacientov s kombinovanou liečbou statínu s ezetimibom došlo k približne 15 % väčšiemu zníženiu LDL-C v porovnaní s rovnakými statínmi a dávkami v monoterapii (Morrone a kol., 2012).

Ezetimib sa ukázal ako účinný u pacientov s DM, pričom relatívne zníženie rizika bolo o 15 % a absolútne riziko znížením o 5,5 % (Gliugliano a kol., 2018).

Pomerné zníženie rizika ASCVD dosiahnuté znížením LDL-C (napr. statínom, ezetimibom alebo inhibítorom PCSK9) závisí od absolútneho zníženia LDL-C, pričom každé zníženie o 1 mmol.l⁻¹ zodpovedá zníženiu ASCVD približne o jednu pätinu. Nie sú známe žiadne nežiaduce účinky veľmi nízkych koncentrácií LDL-C [napr. < 1 mmol.l⁻¹ (40 mg.dl⁻¹)] (Smernice ESC/EAS 2019; Mach a kol., 2020).

Okrem manažmentu farmakologickej liečby dyslipidémií sú pre pacienta dôležité odporúčania ohľadom zavedenia zdravého životného štýlu – ako môže zlepšiť hladiny lipidov v plazme znížením množstva nasýtených mastných kyselín, ako zvýšiť množstvo funkčných potravín, rastlinných sterolov a rozpustnej vlákniny (Berry a kol., 2012).

V skupine pacientov, ktorí si zvolili užívanie záparu z kotvičníka zemného (KOT), poklesli hodnoty priemerných hladín celkového cholesterolu o 9,09 %; LDL cholesterolu o 11,05 %; HDL

cholesterolu o 3,04 % a triacylglycerolov o 18,97 %. Pokles hodnôt celkového a LDL cholesterolu, TG môžeme hodnotiť pozitívne a poukazuje na to, že zápar z kotvičníka zemného pozitívne pôsobil na faktory, ktoré ovplyvňujú hypercholesterolémiu. Naopak, pokles priemernej hladiny HDL cholesterolu predstavuje riziko pre pacienta (viď tab. 2 a grafy 1 – 4). Z hľadiska aterogenity je významné zistenie, že u 6 pacientov v skupine KOT došlo k nárastu priemerných hladín HDL cholesterolu o 8,39 %; aj keď porovnaním so skupinou HYP nie je nárast tak výrazný (viď tab. 2).

Za účinné obsahové látky v kotvičníku zemnom sú považované steroidné saponíny, hlavne diosgenín, ktorý má dôležitú úlohu pri zlepšovaní aterosklerotickej progresie v srdci a potláčaní zápalových mediátorov v pečeni a mozgu potkana Wistar upreguláciou TNF- α , COX-2 a NF- κ Bp65. Flavonoidy majú antioxidantný, antibakteriálny, analgetický, kardiovaskulárny účinok (Tian a kol., 2021).

Chhatre a kol. (2014) uvádzajú, že vodný extrakt z plodov kotvičníka zemného v dávke 580 g.kg⁻¹ znižuje hladinu cholesterolu, triacylglycerolov, LDL cholesterolu, znižuje aterogénny index a zvyšuje hladinu HDL cholesterolu v krvi.

Klinickými štúdiami u 265 žien s DM sa potvrdilo, že podávanie kapsúl obsahujúcich 500 mg práškoveho extraktu z rastliny *Tribulus terrestris* L. viedlo k zníženiu glukózy v krvi a k poklesu celkového cholesterolu a HDL cholesterolu. Zároveň nebol zistený signifikantný rozdiel v hladinách HDL cholesterolu a triacylglycerolov (Samani a kol., 2016).

Kotvičník zemný zabraňuje rozvoju aterosklerózy a má výrazný vplyv na kardiovaskulárny systém. Spomaľuje srdcovú činnosť, predlžuje diastolu, zlepšuje krvnú výmenu, rozširuje cievy a znižuje krvný tlak. Má antikoagulačné vlastnosti, spomaľuje zrážanie krvi a znižuje antitrombínový index. Stimuláciou sekrécie žalúdočných štiav zlepšuje peristaltiku čriev a vylučovanie žlče a znižuje obsah cholesterolu v krvi. Na základe experimentov bolo

potvrdené, že extrakt z kotvičníka znižuje aktivitu angiotenzín konvertujúceho enzýmu v aorte, srdci, pľúcach a v obličkách a spôsobuje zníženie krvného tlaku. Kotvičník zemný zvyšuje uvoľňovanie oxidu dusnatého (NO) z endoteliálnych buniek a nervových zakončení a uvoľňuje hladkú svalovinu ciev, čo vedie k zníženiu krvného tlaku (Navrátilová a Patočka, 2013).

Metanolvý extrakt *Tribulus terrestris* L. bol účinný proti srdcovej ischémii u potkanov, čo bolo potvrdené EKG a analýzami rôznych srdcových biomarkerov. Extrakt pôsobí prostredníctvom mitogénom aktivovanej signálnej dráhy vedúcej k prevencii apoptózy počas ischemického poškodenia (Reshma a kol., 2019).

U citlivejších osôb môže kotvičník zemný vyvolať problémy s dýchaním, pocit ťažoby a bolesť na hrudníku, kožné vyrážky, svrbenie, sčervenanie a pálenie kože, pokles krvného tlaku (Košťálová a kol., 2012).

V skupine pacientov HYP dosiahlo 9 pacientov po liečbe cieľové hladiny celkového cholesterolu, čo predstavuje 60 % liečených pacientov a 7 pacientov po liečbe cieľové hladiny LDL cholesterolu, čo predstavuje takmer 47 % odliečených pacientov.

V skupine pacientov KOT dosiahli 2 pacienti po liečbe cieľové hladiny celkového cholesterolu, čo predstavuje 14 % liečených pacientov a 3 pacientov po liečbe cieľové hladiny LDL cholesterolu, čo predstavuje takmer 21% liečených pacientov. V porovnaní s užívaním hypolipidémik nie sú poklesy jednotlivých parametrov až také výrazné, ale nie sú ani zanedbateľné. Na druhej strane, zaznamenali sme aj nárast hodnôt hladín HDL, čo je pozitívne zistenie.

Z výsledkov našej komparačnej štúdie vyplynulo, že pri všetkých sledovaných faktoroch došlo k poklesu vstupných parametrov a zároveň došlo aj k zvýšeniu HDL. Aj napriek tomu, že v našej štúdii išlo len o malý súbor pacientov, sú dosiahnuté výsledky s ohľadom na budúcnosť používania *Tribulus terrestris* povzbudivé. Dôležité je zistenie, že u pacientov sme nezaznamenali nežiaduce účinky. Využitie čajoviny, extraktu alebo výživového doplnku z kotvičníka

zemného ako adjuvans môže byť vhodnou voľbou v kombinácii s liečbou statínmi a fibrátmi. V závere je potrebné podotknúť, že pri celkovom znížení KV rizika musíme brať do úvahy existujúcu individuálnu variabilitu pacientov na diétu, medikamentóznú liečbu ako aj na užívanie fytofarmák. Preto je dôležité uplatňovať individuálny prístup k liečbe na základe komunikácie medzi lekárom a pacientom.

ZÁVER

Poruchy metabolizmu lipidov sú jedným z najdôležitejších a ovplyvniteľných faktorov ich vzniku. Farmakologická liečba hyperlipoproteinémie je v súčasnosti veľmi dobre prepracovaná a na vysokej úrovni. Napriek tomu veľa pacientov stále častejšie preferuje nefarmakologické prístupy. Z našich výsledkov vyplynulo, že ďalšou modalitou v liečbe porúch metabolizmu lipidov by mohol byť aj kotvičník zemný ako adjuvans k liečbe statínmi a fibrátmi. Okrem vplyvu na hladiny lipidov (pokles celkového cholesterolu, LDL cholesterolu, triacylglycerolov a vzostup HDL cholesterolu) sa nezanedbateľný javí aj vplyv na hladinu glukózy (spôsobuje jej pokles) a jeho pleiotropné účinky.

ZOZNAM LITERATÚRY

Berry, J. D., Dyer, A., Cai, X., Garside, D. B., Ning, H., Thomas, A., Greenland, P., Van Horn, L., Tracy, R. P., Lloyd-Jones, D. M.: Lifetime risks of cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.*, 2012, 366, 321 – 329.

Boren, J., Williams, K. J.: The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2016, 27, 473 – 483.

Bohula, E. A., Giugliano, R. P., Cannon, C. P., Zhou, J., Murphy, S. A., White, J. A., Tershakovec, A. M., Blazing, M. A., Braunwald, E.: Achievement of dual low-density lipoprotein cholesterol and high-sensitivity C-reactive protein targets more frequent

with the addition of ezetimibe to simvastatin and associated with better outcomes in IMPROVE-IT. *Circulation*, 2015, 132, 12 241 233.

Catapano, A. L., Graham, I., De Backer, G., Wiklund, O., Chapman, M. J., Drexel, H., Hoes, A. W., Jennings, C. S., Landmesser, U., Pedersen, T. R., Reiner, Z., Riccardi, G., Taskinen, M. R., Tokgozoglu, L., Verschuren, W. M. M., Vlachopoulos, C., Wood, D. A., Zamorano, J. L., Cooney, M. T.: ESC Scientific Document Group. 2016 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *Eur. Heart. J.*, 2016, 37, 29 993 058.

Ference, B. A., Ginsberg, H. N., Graham, I., Ray, K. K., Packard, C. J., Bruckert, E., Hegele, R. A., Krauss, R. M., Raal, F. J., Schunkert, H., Watts, G. F., Boren, J., Fazio, S., Horton, J. D., Masana, L., Nicholls, S. J., Nordestgaard, B. G., van de Sluis, B., Taskinen, M. R., Tokgozoglu, L., Landmesser, U., Laufs, U., Wiklund, O., Stock, J. K., Chapman, M. J., Catapano, A. L.: Lowdensity lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart. J.*, 2017, 38, 24 592 472.

Giugliano, R. P., Cannon, C. P., Blazing, M. A., Nicolau, J. C., Corbalan, R., Spinar, J., Park, J. G., White, J. A., Bohula, E. A., Braunwald, E.: IMPROVE-IT (Improved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial) Investigators. Benefit of adding ezetimibe to statin therapy on cardiovascular outcomes and safety in patients with versus without *diabetes mellitus*: results from IMPROVE-IT (Improved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial). *Circulation*, 2018, 137, 1571 – 1582.

Chhatre, S., Nesari, T., Somani, G., Kanchan, D., Sathaye, S.: Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris*. *Pharmacognosy Reviews*, 2014, 8 (15), 45 – 51. DOI:10.4103/0973-7847.125530. <http://www.phcogrev.com/text.asp?2014/8/15/45/125530>. Accessed December 17, 2021.

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

Krahulec, B., Fábryová L., Holéczy, P., Klimeš I.: *Klinická obezitológia* [Clinical obesityology]. Brno: Facta Medica, 2013, 336 s. ISBN 978-80-904731-7-1.

Kolarič, L., Šimko, P.: Application of β -cyclodextrin in the production of low-cholesterol milk and dairy products. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 119, 13 – 22. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.023>. Accessed December 15, 2021.

Laššánová, M., Tisoňová, J., Kriška M.: Môžu byť problémy pri liečbe statínmi? [Could any problems arise with statin treatment?]. *Klin. Farmakol. Farm.*, 2005, 19, 160 – 164. <https://www.internimedicina.cz/pdfs/far/2005/03/07.pdf>. Accessed December 12, 2021.

Mach, F., Baigent, C., Catapano, A. L., Koskinas, K. C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M. J., De Backer, G. G., Delgado, V., Ference, B. A., Graham, I. M., Halliday, A., Landmesser, U., Mihaylová, B., Pedersen, T. R., Riccardi, G., Richter, D. J., Sabatine, M. S., Taskinen, M.-R., Tokgozoglu, L., Wiklund, O., Mueller, C., Drexel, H., Aboyans, V., Corsini, A., Doehner, W., Farnier, M., Erratum: 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk: The task force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *European Heart Journal*, 2020, 41 (44), 4255. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz455. Accessed December 17, 2021.

Morrone, D., Weintraub, W. S., Toth, P. P., Hanson, M. E., Lowe, R. S., Lin, J., Shah, A. K., Tershakovec, A. M.: Lipid-altering efficacy of ezetimibe plus statin and statin monotherapy and identification of factors associated with treatment response: a pooled analysis of over 21,000 subjects from 27 clinical trials. *Atherosclerosis*, 2012, 223, 251 – 261.

Navrátilová, Z., Patočka, J.: *Tribulus Terrestris* – diskutované fytofarmakum [*Tribulus Terrestris* – discussed phytopharmakon]. *Kontakt*, 2013, 15 (4), 470–477. <<http://casopis-zsfju.zsf.jcu.cz/kontakt/administrace/clankyfile/20131217082909499069.pdf>>. Accessed December 12, 2021.

Oravec, S.: *Lipoproteíny plazmy* [Plasma lipoproteins]. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2011, 71s. https://www.fmed.uniba.sk/fileadmin/lf/sluzby/akademicka_kniznica/PDF/Elektronicke_knihy_LF_UK/Lipoproteiny_plazmy2011_.pdf. Accessed December 12, 2018.

Reshma, P. L., Binu, P., Anupama, N., Vineetha, R. C., Abhilash, S., Harikumar, N. R., Raghu, K. G.: Pretreatment of *Tribulus terrestris* L. causes anti-ischemic cardioprotection through MAPK mediated anti-apoptotic pathway in rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 111, 1342 – 1352. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.033>. Accessed December 12, 2018.

Rong, S., Zhao, S., Kai, X., Zhang, L., Zhao, Y., Xiao, X., Bao, W., Liu, L.: Procyanidins extracted from the litchi pericarp attenuate atherosclerosis and hyperlipidemia associated with consumption of a high fat diet in apolipoprotein-E knockout mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 97, 1639 – 1644. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.139>. Accessed December 12, 2021.

Samani, N. B., Jokar, A., Soveid, M., Heydari, M., Mosavat, S. H.: Efficacy of the hydroalcoholic extract of *Tribulus terrestris* on the serum glucose and lipid profile of women with *diabetes mellitus*. A double-blind randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 2016, 21 (4), 91 – 97. DOI: 10.1177/2156587216650775. Accessed December 14, 2021.

Song, Y., Liu, J., Zhao, K., Gao, L. Zhao, J.: Cholesterol-induced toxicity: An integrated view of the role of cholesterol in multiple diseases, *Cell Metabolism*, 2021, 33 (10), 1911 – 1925. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.09.001>. Accessed December 15, 2021.

Souček, M.: Arterin, doplnok stravy v liečbe dyslipidémie [Arterin – a nutritional supplement in the treatment of dislipidemia]. *Medikom*, 2016, 6 (3), 24 – 26. <https://lekom.sk/upload/medikom/2016/3_2016_MEDIKOM.pdf> Accessed December 14, 2018.

Townsend, N., Nichols, M., Scarborough, P., Rayner, M.: Cardiovascular disease in Europe – epidemiological update 2015. *Eur. Heart J.*, 2015, 36, 26 962 705.

Tian, C., Chang, Y., Wang, R., Kang, Z., Wang, Q., Tong, Z., Zhou, A., Cui, C., Liu, M.: Optimization of ultrasound extraction of *Tribulus terrestris* L. leaves saponins and their HPLC-DAD-ESI-MSⁿ profiling, anti-inflammatory activity and mechanism *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 278, 114 225. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114225>. Accessed December 17, 2021.

Tian, C., Chang, Y., Liu, X., Zhang, Z., Guo, Y., Lan, Z., Zhang, P., Liu, M.: Anti-inflammatory activity *in vitro*, extractive process and HPLC-MS characterization of total saponins extract from *Tribulus terrestris* L. fruits. *Industrial Crops and Products*, 2020, 150, 112 343. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112343>. Accessed December 17, 2021.

Tian, Ch., Chang, Y., Zhang, Z., Wang, H., Xiao, S., Cui, C., Liu, M.: Extraction technology, component analysis, antioxidant, antibacterial, analgesic and anti-inflammatory activities of flavonoids fraction from *Tribulus terrestris* L. leaves. *Heliyon*, 2019, 5 (8), e02234. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02234>. Accessed December 17, 2021.

URL1: *Pozitívne zmeny vo vybraných indikátorov zdravotného stavu obyvateľstva SR – 2015 – 2019* [Positive changes in the selected indicators of health status of the inhabitants of Slovak republic 2015 – 2019]. https://www.uvzsr.sk/index.php?option=com_content&view=article&id=4606%3Apozitivne-zmeny-vo-vybranych-indikatorov-zdravotneho-stavu-obyvatestva-sr--2015-2019&catid=106%3Aaktualne&Itemid=1. [cit. 14-12-2021].

URL2: *The interactive tool for predicting and managing the risk of heart attack and stroke*. <http://www.heartscore.org>. Accessed December 18, 2021.

Wang, Y., Guo, W., Xie, S., Liu, Y., Xu, D., Chen, G., Xu, Y.: Multi-omics analysis of brain tissue metabolome and proteome reveals the protective effect of gross saponins of *Tribulus terrestris* L. fruit against ischemic stroke in rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 278, 114 280. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114280>. Accessed December 17, 2021.

Zheng, W., Wang, F. X., Zhao, Y., Sun, X. G., Kang, L. P., Fan, Z. Q., Qiao, L. R. ., Yan, R. Y, Liu, S. C., Ma, B. P.: Rapid characterization of constituents in *Tribulus terrestris* from different habitats by UHPLC/Q-TOF MS. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2017, 28 (11), 2302 – 2318. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1761-5>. Accessed December 18, 2021.



SÚČASNÉ TRENDY FARMAKOTERAPIE ÚZKOSTNÝCH STAVOV A PORÚCH SPÁNKU

CURRENT TRENDS IN PHARMACOTHERAPY OF ANXIETY AND SLEEP DISORDERS

Podobník, František; Bačkorová, Miriam

Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 081 41 Košice
Slovenská republika

miriam.backorova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Úzkostné stavy a poruchy spánku patria medzi závažné ochorenia, ktorých prevalencia v posledných rokoch čoraz viac narastá. V súčasnej dobe existujú nové terapeutické postupy v liečbe úzkostných stavov a porúch spánku, ktoré sa vyznačujú vyššou efektívnosťou, nižším výskytom nežiaducich účinkov a celkovo pozitívnejšou odozvou na terapiu. Cieľom predloženej štúdie bolo vyhodnotiť preskripciu liečivých preparátov používaných v terapii úzkostných ochorení v 4 lekárňach Karlovarskeho kraja za referenčné obdobie dvanásť mesiacov. Z analýzy vyplýva, že najčastejšie predpisovaným liečivom bol alprazolam (36,64 %); ktorý patrí do skupiny benzodiazepínových anxiolytík (41,91 %). V terapii úzkostných ochorení sa najviac vyskytovali diagnózy F41.1 Generalizovaná úzkostná po-

rucha a F40.9 Fóbická úzkostná porucha. V terapii porúch spánku mali najvyššie zastúpenie preparáty s obsahom liečiva zolpidemi tartras (85,72 %). Včasná diagnóza, správne stanovená liečba a dodržiavanie terapeutického režimu sú základnými faktormi určujúcimi úspešnosť terapie. V budúcnosti je nevyhnutné hľadať stále novšie a perspektívnejšie liečebné postupy v terapii pacientov so spomínanými ochoreniami v každodennej klinickej praxi.

Kľúčové slová: poruchy spánku; preskripcia; úzkostné stavy; Z-látky; zolpidemi tartras

ABSTRACT

Anxiety and sleeping disorders belong among serious diseases, the prevalence of which has been increasing in recent years. Currently, there are

new therapeutic approaches in the treatment of anxiety and sleeping disorders, which are characterized by higher efficacy, lower incidence of side effects and an overall more positive response to the therapy. The objective of the study was to evaluate the prescription of medical preparations used in the therapy of anxiety diseases in 4 pharmacies in the Karlove Vary region for the reference period of twelve months. The analysis showed the most frequently prescribed active substance was alprazolam (36.64 %), which belongs to the group of benzodiazepine anxiolytics (41.91 %). In the treatment of anxiety disorders, the most frequently recorded diagnoses were F41.1 Generalized Anxiety Disorder and F40.9 Phobic Anxiety Disorder. In the treatment of sleeping disorders the highest representation had the preparations containing the active substance zolpidem tartrate (85,72 %). An early diagnosis, well-established treatment and adherence to a therapeutic regimen are the essential factors determining the success of the therapy. In the future, it is necessary to look for ever newer and more promising treatments in the therapy of patients with these diseases in every day clinical practice.

Key words: anxiety; sleeping disorders; prescription; Z-substances; zolpidem tartrate

ÚVOD

V súčasnej dobe trpí úzkostnými stavmi a poruchami spánku čoraz väčšie percento populácie. Hlavnou príčinou stúpajúcej tendencie je najmä stresujúci a nezdravý životný štýl. Vznik úzkostných stavov a porúch spánku spôsobuje viacero faktorov, ako sú vrodená predispozícia, psychická a sociálna záťaž, neustály stres, telesné ochorenia, či hormonálna nerovnováha (Pompeli a kol., 2016).

Pre úzkostné poruchy je typický výskyt nadmerného strachu a následné vyhýbanie sa nadmerne stresovým situáciám, ktoré sa viažu na určitý objekt

alebo dianie. Úzkostné poruchy môžu mať rôznu intenzitu, od miernej nepokojnosti až po rôzne stavy paniky. Pokiaľ sa ich výskyt prejaví nečakane, hovoríme o spontánnej úzkosti, či o spontánnej panike. V inom prípade je možné ich predvídať, a vtedy hovoríme o situačnej alebo fobickej úzkosti, či panike. Prevalencia úzkostných porúch sa pohybuje na úrovni dvanásť mesiacov, no môže mať aj celoživotné trvanie (Kessler a kol., 2010).

Primárnym cieľom farmakoterapie úzkostných ochorení je snaha eliminovať úzkostnú symptomatológiu, teda zameranie sa na psychické a somatické zložky úzkosti. Prvým krokom liečby je zahájenie psychoterapie, tzv. kognitívne-behaviorálnej terapie, ktorá sa využíva u pacientov v dospelosti, ale aj v detskom veku. V prípadoch, kedy nedochádza k zlepšeniu príznakov ani zdravotného stavu pacienta po tejto terapii, býva často kombinovaná s farmakoterapiou. Z fyziologického hľadiska vedie k príznakom úzkosti a nástupu úzkostných stavov nadmerná aktivita serotonínového a noradrenergického systému. Naopak, stimuláciou GABA-ergného systému dochádza k zníženiu stupňa úzkosti (Kosová a kol., 2010; Kulhan a kol., 2012).

Po správnom určení diagnózy sú liečivom prvej voľby inhibítory spätného vychytávania serotonínu SSRI (3. generácia antidepresív). Farmakoterapia týmito liečivami vykazuje vysokú účinnosť pri liečbe úzkostných porúch a bezpečnosť z hľadiska závislosti. Pri začatí terapie sa javí dôležitá postupná titrácia dávky, aby sa eliminovalo riziko výskytu nežiaducich účinkov. Titrácia by mala prebiehať približne do dvoch týždňov, kedy dôjde k dosiahnutiu odporúčanej terapeutickej dávky. Terapeutický účinok medikácie by sa mal začať prejavovať niekedy v období štyroch až šiestich týždňov. Pri nadmernom výskyte nepriaznivých vedľajších účinkov alebo pri nezaznamenaní účinku je možnosť zmeny medikácie (Williams a kol., 2017).

Po dosiahnutí remisie sa odporúča nadväzovať na zavedenú liečbu ďalších 12 až 18 mesiacov od jej aplikácie. Pri neuspokojivej odpovedi na liečbu je potrebné v pôvodnej terapii pokračovať zvýšením

maximálnej odporúčanej dávky liečiva. V prípade neúspešnej medikácie sa volí možnosť vymeniť dané antidepresívum za iné (Praško a kol., 2008; Kosová a kol., 2010).

V niektorých prípadoch, pri nedostatočnej alebo chýbajúcej odozve, sa zavádza kombinácia liečiv tej istej alebo inej kategórie (tricyklické antidepresíva, benzodiazepíny, thymostabilizátory, betablokátory) s cieľom zosilnenia terapeutického účinku, či eliminovania nežiaducich účinkov (Williams a kol., 2017).

Poruchy spánku sú dôsledkom nedostatočného alebo naopak prehnaného množstva spánku. Na rozvoj porúch má vplyv aj dlhodobá nedostatočná kvalita spánku (Piško a kol., 2012). Spánok tvoria dva základné typy, a to REM spánok (Rapid Eye Movement) a non-REM spánok. Fyziologicky počas spánku prebieha najprv non-REM fáza, po nej nasleduje REM fáza, ktorá za fyziologických podmienok tvorí 25 % výslednej doby spánku. Vyznačuje sa aktivitou porovnateľnou bdelému stavu, živými snami, rýchlymi pohybmi očí a sporadickými záškľbmi určitých svalových skupín. REM fáza spánku má veľký význam pre fixáciu informácií do dlhodobej pamäte. Non-REM fáza spánku sa podľa jej intenzity a hĺbky zaraďuje do štyroch štádií (Plchová a kol., 2012; Šebela a kol., 2019).

V súčasnej praxi sa na terapiu porúch spánku využívajú tri základné metódy. Prvá sa zaoberá edukáciou o spánkovom cykle, relaxačnými metódami, úpravou spánkového režimu a celkovou psychickou a spánkovou hygienou. Tieto metódy sa používajú buď samostatne alebo súčasne s druhou metódou zameranou na psychoterapiu. Pri neúspechu oboch metód dochádza k využitiu samotnej farmakoterapie, ktorá závisí predovšetkým od typu a závažnosti insomnie alebo iného spánkového ochorenia (Neubauer a kol., 2018).

V rámci farmakoterapie sa najčastejšie indikujú hypnotiká. Základ úspešnej terapie predpokladá precízne určenie anamnézy. Pri terapii hypnotikami je potrebné zvážiť dôležitosť výberu správneho

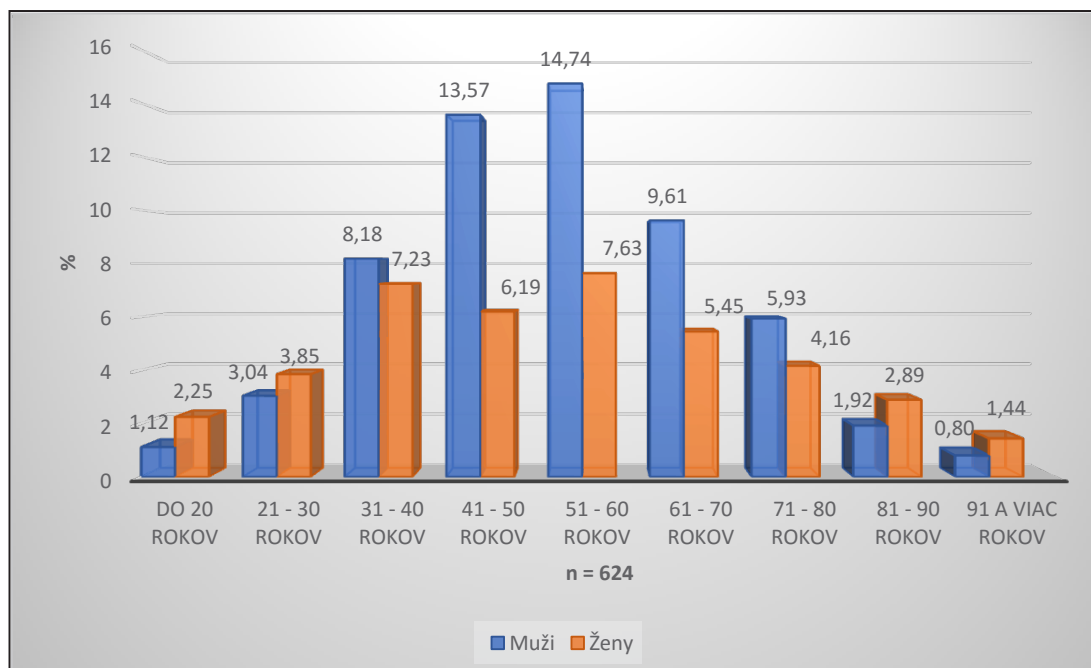
liečiva. V súčasnej dobe zatriedujeme hypnotiká do troch generácií. Do prvej generácie patria predovšetkým barbituráty a niektoré ďalšie hypnotiká z iných farmakoterapeutických skupín. Druhú generáciu predstavujú benzodiazepíny a tretiu generáciu zastupujú tzv. Z-hypnotiká (Vašutová, 2009; Neubauer a kol., 2018). V posledných rokoch sa od užívania hypnotík prvej generácie dostalo odstúpiť, z dôvodu výskytu rady nežiaducich účinkov, intoxikácie, či psychickej a fyzickej závislosti. Indikujú sa už len pri torpídnej nespavosti, najmä u pacientov trpiacich nádorovým ochorením, alebo pri niektorých psychických ochoreniach prepojených s ťažkou formou insomnie. Z hypnotík druhej generácie sa v terajšej dobe preferuje najmä midazolam. Z tretej generácie sú v terapeutickej praxi najviac indikované liečivá zolpidem, zopiklón a zaleplón (McCleery a kol., 2016; Neubauer a kol., 2018).

Zolpidem sa používa na terapiu krátkodobej nespavosti, pri narušení procesu zaspávania alebo častom prebúdzaní sa v priebehu noci. Celkovo skracuje latenciu spánku a výrazne zlepšuje jej kvalitatívnu stránku bez narušenia REM-fázy spánku. Mechanizmus účinku spočíva v špecifickej väzbe na Ω_1 podtyp omega receptorov, a tým ho odlišuje od účinku benzodiazepínov, ktoré sa viažu na všetky podtypy týchto receptorov. Zolpidem je kontraindikovaný u pacientov s poruchami pečene, pri akútnych a ťažkých formách respiračných ochorení, *myasthenia gravis* a hypersenzitivite na dané liečivo. Taktiež je nevhodné jeho užívanie u jedincov mladších ako 18 rokov, u tehotných žien a v období laktácie. Kombinácia s alkoholom vyvoláva zrýchlenie a zvýšenie jeho sedatívneho efektu (Whyte a kol., 2014; Bomalaski a kol., 2017).

METODIKA

Analýza preskripcie vybraných liekových skupín indikovaných pri úzkostných ochoreniach bola monitorovaná z preskripčných záznamov predpísaných pacientom pri úzkostných ochore-

Graf 1: Percentuálne zastúpenie mužov a žien vo vekových kategóriách



niach v období od 1.1.2019 do 31.12.2019 v 4 lekárňach v Karlovarskom a Plzenskom kraji. Zadané kritériá spĺňalo 3 769 prevažne elektronických receptov u pacientov s diagnózou F00 – F99 podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb 10 (MKCH-10) (ICD – 10 Version: 2016). Analýza dát bola spracovaná a vyhotovená na základe súboru údajov z lekárenského informačného systému Mediox. Prostredníctvom tohto systému boli na základe sprístupnených dát a preskripčných záznamov pre zdravotnú poisťovňu vypracované a vyhodnotené údaje o počte, veku a pohlaví pacientov. Do analýzy boli zaradené tiež početnosti preskripcie jednotlivých liekových skupín indikovaných v liečbe úzkostných ochorení a informácie o počte diagnóz viažucich sa k terapii úzkostných ochorení.

Analýzou a spracovaním lekárskeho predpisov sprístupnených vybranými štyrmi lekárňami v Karlovarskom kraji boli získané informácie a údaje o preskripcii najfrekvencovanejšie používaných liečivých prípravkov používaných v terapii porúch spánku. Informácie a dáta boli získané za obdobie

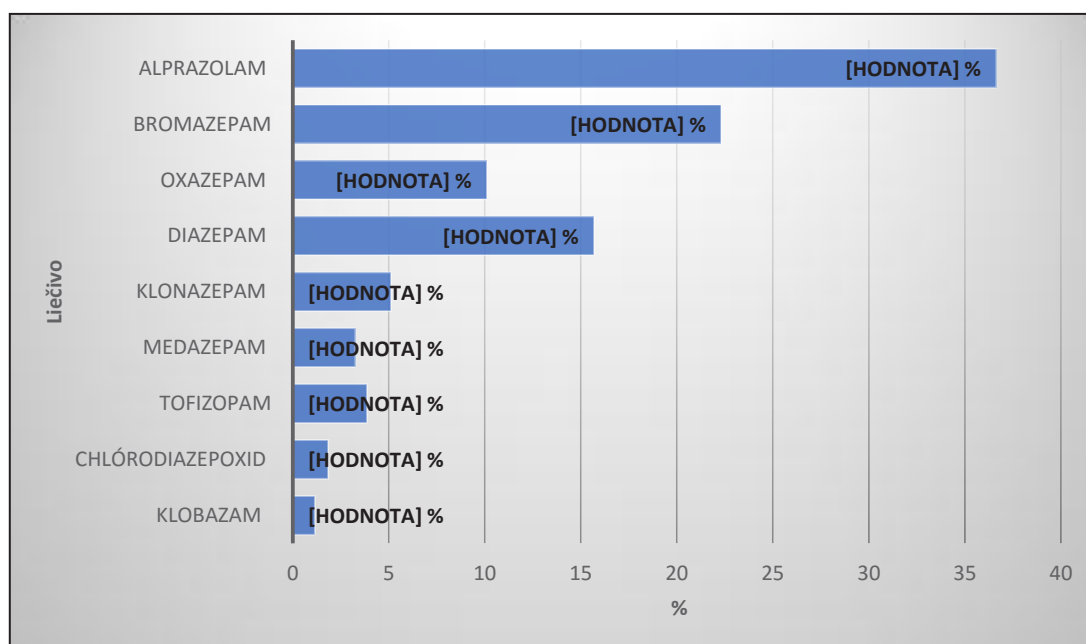
5 rokov (od 1.1. 2015 do 1.1. 2019). Do analýzy boli zaradené lieky s obsahom liečiv zolpidemi tartras, zopiklón, melatonín a výživový doplnok s rastlinným extraktom valeriány lekárskej (*Valeriana officinalis*). Výsledky vychádzali z 16 232 preskripčných záznamov získaných a spracovaných prostredníctvom lekárenského informačného systému Mediox.

Spracované výsledky boli následne prezentované vo forme tabuliek a grafov prostredníctvom programu Microsoft Excel. Pri spracovaní a vyhodnotení získaných dát sa postupovalo v zmysle zákona o ochrane osobných údajov.

VÝSLEDKY

Z celkového počtu 112 842 lekárskeho predpisov bolo za sledované obdobie spoločne v štyroch lekárňach vyexpedovaných 3,34 % (3 769) lekárskeho predpisov s diagnózou F00 – F99. Najvyšší počet receptov 78,32 % (2 952) zaznamenala lekáreň v Chebe, sídliaca v rovnakej budove ako ambulancia

Graf 2: Percentuálne zastúpenie jednotlivých benzodiazepínových anxiolytík vo vyhodnocovaných preskripčných záznamoch



psychiatrie. Naopak, najmenej preskripčných záznamov evidovali lekárne Hraničná a Potůčky, ležiace na pohraničí s Nemeckom. Do analýzy preskripcie bolo dohromady zaradených 624 pacientov, z ktorých tvorili muži 58,81 % (367) a ženy 41,19 % (257). Najväčšie zastúpenie mali muži vo vekových kategóriách 41 – 50 rokov a 51 – 60 rokov (viď graf 1). Naopak, najmenšie zastúpenie tvorili muži vo veku do 20 rokov a 91 rokov a viac. Vo vekových kategóriách 41 – 50 rokov a 51 – 60 rokov je výrazne viditeľný vyšší percentuálny podiel v preskripcii u mužov ako u žien.

Najfrekvencovanejšie predpisovanou skupinou liečiv používaných v terapii úzkostných porúch boli benzodiazepínové anxiolytiká v počte 41,91 % (1 430) preskripčných záznamov. Benzodiazepínové anxiolytiká boli indikované 213 pacientom (64,32 % mužov a 35,68 % žien). Inhibitory spätného vychytávania serotonínu (SSRI) boli indikované 104 pacientom v počte receptov 691 (20,24 %). Ďalším 69 pacientom bola indikovaná skupina tricyklických

antidepresív v počte 493 (14,45 %) preskripčných záznamov. Medzi najmenej predpisované skupiny liečiv patria RIMA (reverzibilné inhibitory monoaminoxidázy) (1,16 %) a nebenzodiazepínové anxiolytiká (1,92 %). Okrem monoterapie bola v terapii úzkostných ochorení indikovaná aj kombinovaná liečba (5,64 %). Najčastejšie išlo o kombinovanú preskripciu liečiv zo skupín SSRI a benzodiazepínových anxiolytík.

V rámci terapie úzkostných porúch boli pacientom najčastejšie predpisované benzodiazepínové anxiolytiká (41,91 %) (viď graf 2). Z tejto skupiny bol najviac indikovaný alprazolam (36,64 %); najčastejšie v dávke 0,5 mg. Ďalej nasledoval bromazepam (22,31 %) s najfrekvencovanejšou dávkou 3 mg a diazepam (15,69 %) najčastejšie v dávke 10 mg. V najmenších množstvách boli predpisované aj klobazam (1,15 %) a chlórdiazepoxid (1,85 %).

Celkovo bolo v rámci všetkých sledovaných lekární evidovaných 1 430 lekárske predpisy

Tab. 1: Vývoj liekov s obsahom liečiva zolpidemi tartras vo vybraných lekárňach

Lekáreň	2015	2016	2017	2018	2019	Celkový priemer
Hraničná	94,62 %	93,58 %	94,41 %	91,25 %	89,18 %	92,61 %
Potůčky	89,56 %	87,62 %	84,27 %	78,33 %	74,92 %	82,94 %
Cheb	89,96 %	88,69 %	90,51 %	84,22 %	80,47 %	86,77 %
Mariánské Lázně	90,24 %	90,32 %	81,68 %	74,22 %	66,28 %	80,55 %

Tab. 2: Vývoj liekov s obsahom liečiva zopiklón vo vybraných lekárňach

Lekáreň	2015	2016	2017	2018	2019	Celkový priemer
Hraničná	3,14 %	3,26 %	3,08 %	5,02 %	5,89 %	4,08 %
Potůčky	7,28 %	8,13 %	9,72 %	13,46 %	16,21 %	10,96 %
Cheb	5,24 %	5,07 %	4,96 %	8,61 %	11,12 %	7,00 %
Mariánské Lázně	3,22 %	3,47 %	9,65 %	14,98 %	21,47 %	10,56 %

s preskripciou benzodiazepínových anxiolytík s diagnózou F00 – F99. V rámci spracovania výsledkov boli vybraté najčastejšie sa vyskytujúce diagnózy indikované v terapii benzodiazepínových anxiolytík, čo predstavovalo 1 114 lekárske predpisy. Najvyššiu početnosť z celkového počtu lekárske predpisov dosiahla diagnóza F41.1 Generalizovaná úzkostná porucha (19,65 %) u 67 pacientov. Ďalšie najpočetnejšie skupiny tvorili diagnózy F40.9 Fóbická úzkostná porucha (14,78 %); F40.1 Sociálna fobia (11,32 %) a F32.1 Epizódy stredne ťažkej depresie (8,68 %). Najnižšiu početnosť spracovaných diagnóz zaznamenala diagnóza F13.3 Porucha psychiky a správania zapríčinená užívaním sedatív alebo hypnotík: abstinenčný syndróm (1,26 %) u 4 pacientov, ďalej to boli diagnózy F50.02 Mentálna bulímia (1,98 %); F50.0 Mentálna anorexia (2,64 %) a F45.2 Hypochondrická porucha (2,73 %).

V priebehu sledovaného obdobia 5 rokov bolo vydaných vo všetkých lekárňach spolu 16 232 receptov, s obsahom účinnej látky zolpidemi tartras

(95,4 % nemeckých; 4,6 % českých) a 2 689 receptov s obsahom účinnej látky zopiklón (97,2 % nemeckých; 2,8 % českých). Najviac preskripčných záznamov s obsahom liečiv zolpidemi tartras a zopiklón bolo expedovaných v lekárňach situovaných v blízkosti pohraničia s Nemeckom (Potůčky, Hraničná). Preskripcia spomínaných liečiv v priebehu obdobia narastala, pričom je viditeľný nárast nenávykových a prírodných liečivých látok oproti zaužívaným vysoko návykovým liečivám. Celkovo vo všetkých lekárňach došlo za sledované obdobie k zvýšenej expedícii najmä nenávykových prípravkov s obsahom melatonínu.

V preskripcii liekov používaných na terapiu porúch spánku sa v najvyššej miere vyskytovali návykové prípravky s obsahom liečiva zolpidemi tartras. Najvyšší celkový percentuálny podiel spomínaného liečiva (viď tab. 1) vykazuje lekáreň Hraničná (92,61 %). Naopak, najnižší celkový percentuálny podiel lekáreň v Mariánskych Láznach (80,55 %). Preskripcia liekov s týmto liečivom

za sledované obdobie vykazovala vo všetkých sledovaných lekárňach mierny pokles, najvýraznejší v lekárňach v Mariánskych Láznach a Potůčkach.

Za sledované obdobie došlo k postupnému zvyšovaniu spotreby preparátov s obsahom liečiva zopiklón (viď tab. 2), pričom najvýraznejší nárast zaznamenala lekáreň v Mariánskych Láznach. Najnižšie percento expedovaných prípravkov so spomínaným liečivom zaznamenala lekáreň Hraničná (4,08 %).

Na štatistiku preskripcie spomínaných prípravkov má výrazný vplyv poloha lekární, prítomnosť konkurujúcich lekární v blízkom okolí, no predovšetkým lokalita lekární v prihraničnej oblasti s Nemeckom.

DISKUSIA

Úzkostné ochorenia sa zaraďujú k najčastejším psychickým poruchám. Z klinických štúdií je preukázateľné, že pri ich liečbe sa odporúča kombinácia farmakoterapie a psychoterapie. Analýzou údajov o preskripcii liečiv používaných v terapii úzkostných ochorení za sledované obdobie (rok 2019) sa zistil prehľad o možnostiach farmakoterapie úzkostných ochorení. Z celkového počtu vyhodnocovaných lekárske predpisov (3 769) bolo až 78,32 % (2 952) vyexpedovaných v lekárni v Chebe, sídliacej v rovnakej budove ako ambulancia psychiatra. Táto lekáreň tak mohla poskytnúť najrozsiahlejší obraz o liečbe úzkostných ochorení, o charakteristike a diagnózach pacientov. V ostatných lekárňach sa počet lekárske predpisov pohyboval na omnoho nižšej úrovni, najmenej v prihraničných lekárňach ležiacich v tesnej blízkosti s Nemeckom (253; 6,72 %). Jedným z dôvodov mohla byť absencia psychiatrických ambulancií v blízkosti týchto lekární. Terapia úzkostných ochorení by mala byť prioritne záležitosťou lekárov v odbore psychiatria, no liečivá používané v terapii úzkostných ochorení môžu predpisovať aj všeobecní lekári na odporúčanie špecialistu. Tento fakt mohol za-

príčina výrazne nižšie percento lekárske predpisov v ostatných nami vybraných lekárňach. V pozorovanej skupine pacientov trpelo úzkostným ochorením väčšie percento mužov (58,81 %) ako žien (41,19 %). Zaujímavosťou tohto zistenia je, že podľa ÚZIS (Ústav zdravotníckych informácií a štatistiky) z roku 2019 sa v posledných rokoch zastúpenie mužov a žien liečených na toto ochorenie v Českej republike pohybovalo skoro na presne opačnej úrovni. Franchi a kol. (2019) vo svojej štúdii potvrdili, že pomer pacientov liečených na úzkostné ochorenia bol vyšší u žien (61,7 %) oproti mužom (38,3 %). U oboch pohlaví najväčšie zastúpenie zaznamenala veková kategória od 51 do 60 rokov. V klinickej štúdii Huerta a kolektív (2016) sa preskripcia a spotreba u oboch pohlaví s vekom zvyšuje, pričom najvyšší nárast zaznamenáva veková kategória nad 50 rokov. V sledovanej vzorke pacientov bolo najmladšou pacientkou 16-ročná dievča a najstaršou pacientkou 93-ročná žena.

Spotreba anxiolytík v Českej republike za obdobie 4 rokov (2016 – 2019) klesla o 6,6 % (Rod, 2020). Príčina tohto klesajúceho trendu súvisí so zámenou anxiolytík za iné farmakoterapeutické skupiny indikované v terapii úzkostných ochorení, alebo súvisí so zvýšením úrovne kauzálnej liečby. Spotreba antidepresív za rovnako sledované obdobie v Českej republike (ČR) naopak vzrástla až o 12,7 % (NCZI – Štatistické výstupy, 2019; Rod, 2020). Z hľadiska dlhodobého pozorovania spotreby anxiolytík za obdobie 2010 – 2018 došlo v ČR k výraznému poklesu ich spotreby až o 27 %, v porovnaní so Slovenskou republikou (SR) s poklesom spotreby 0 %. V rámci spotreby antidepresív je nárast za rovnaké časové obdobie v oboch krajinách približne rovnaký (ČR + 48 %, SR + 42 %) (WHO, 2019; Rod, 2020). Spotreba anxiolytík v Nemecku za obdobie 2006 – 2016 zaznamenala taktiež mierny pokles o 1,5 % (Buth a kol., 2019). Najčastejšie predpisovanou skupinou liečiv u pacientov trpiacich úzkostným ochorením sa stali benzodiazepínové anxiolytiká. Pacienti ich užívali z dôvodu rýchleho potlačenia a spomalenia príznakov

úzkostných atakov (Williams a kol., 2017). V štúdií Franchi a kol. (2019) boli benzodiazepínové anxiolytiká v najvyššej miere indikované v liečbe depresí a úzkostných porúch najčastejšie pacientom vo vekovej kategórii 75 – 84 rokov. Z antidepresív sa v sledovanej vzorke najčastejšie vyskytovali SSRI (20,24 %). Pri akútnych stavoch sa (5,64 %) kombinovali s benzodiazepínovými anxiolytikami, z dôvodu oneskoreného nástupu účinku. Výrazne šlo o kombináciu escitalopramu s alprazolamom alebo bromazepamom. Z benzodiazepínových anxiolytík bol najviac predpisovaný alprazolam. Tento údaj sa zhoduje aj so štúdiou skupiny talianskych pacientov, sledovaných v období rokov 2010 – 2018, kde sa zastúpenie alprazolamu v preskripcii pohybovalo na podobnej úrovni ako v sledovanej vzorke. Medzi ďalšie najčastejšie predpisované benzodiazepínové anxiolytiká patrili bromazepam a diazepam. V štúdií Buth a kol. (2019), ktorí skúmali problematiku preskripcie anxiolytík a hypnotík v Nemecku, patrili medzi najviac predpisované benzodiazepínové anxiolytiká diazepam (24,4 %); oxazepam (19,9 %) a bromazepam (18,2 %). Vývoj preskripcie preparátov s obsahom diazepamu sa pohyboval za sledované obdobie 2006 – 2016 približne na rovnakej úrovni, prípravky s obsahom oxazepamu a bromazepamu zaznamenali výraznejší pokles spotreby zhruba o tretinu.

Spánok je dôležitou súčasťou života ľudí a nášho denného rytmu. Mnohé štúdie a experimenty ukázali, že pri jeho nedostatku dochádza k zhoršeniu a zníženiu celkovej výkonnosti všetkých funkcií organizmu. Pacienti s poruchami spánku najčastejšie trpia nespavosťou, problémami so zaspaním a opakovaným alebo častým prebúdzaním sa. Pri diagnostike týchto ochorení je potrebné sa zameriavať na hľadanie základnej príčiny ich vzniku a na správny výber terapie, aby nedošlo k rozvoju chronicity a zbytočne zvýšenej spotrebe hypnotík a sedatív (Kosová a kol., 2010; Xie a kol., 2017). Informácie a údaje o preskripcii najčastejšie používaných liekov v terapii porúch spánku rôzne-

ho pôvodu boli získané zo 4 lekární v Karlovarskom kraji v blízkosti hraníc s Nemeckom za obdobie 5 rokov (2015 – 2019). Preskripcia v jednotlivých lekárnach vykazovala značnú odlišnosť nielen v počte, ale aj v rozmanitosti výrobcov uvedených preparátov indikovaných v terapii porúch spánku. Do analýzy preskripcie bolo zaradených vo všetkých lekárnach spolu 16 232 receptov s obsahom liečiva zolpidemi tartras a 2 689 receptov s obsahom liečiva zopiklón. V štúdií sa sledoval aj vývoj expedície voľne predajných nenávykových prírodných liečivých prípravkov s obsahom melatonínu a valerjánu lekárskej. Z celkového počtu receptov v priebehu sledovaného obdobia vo vybraných lekárnach bolo zaznamenaných až 96,3 % nemeckých preskripčných záznamov. Získané výsledky výrazne ovplyvnila skutočnosť, že preskripcia prebiehala v lekárnach situovaných v blízkosti hraníc s Nemeckom. Spotreba hypnotík v Českej republike v období 4 rokov (2016 – 2019) stúpila o 7,1 % (Rod, 2020). Z hľadiska dlhodobého pozorovania spotreby hypnotík za obdobie 2010 – 2018 došlo v ČR k výraznému nárastu ich spotreby až o 25 %. V porovnaní so Slovenskou republikou má tento údaj veľmi negatívny charakter, pričom na Slovensku za rovnaké analyzované obdobie spotreba hypnotík klesla o 1 % (WHO, 2019). Ešte omnoho výraznejší pokles spotreby hypnotík až o 46 % za obdobie 2010 – 2018 dosiahlo Nemecko, pričom v lekárnach ležiacich v tesnej blízkosti hraníc s Nemeckom bol v analýze zaznamenaný najvyšší podiel preskripcie týchto preparátov (Schmalstieg-Bahr a kol., 2019; Rod, 2020). Jedným z dôvodov bola rozdielna cena týchto liekov na českom a nemeckom trhu. Na českom trhu sa tieto preparáty distribuujú za približne trojnásobne nižšie ceny ako na nemeckom trhu.

Výsledky štúdie dokazujú zvýšenú expedíciu nenávykových a prírodných liečivých prípravkov používaných v terapii porúch spánku, ako aj ustálený vývoj preskripcie preparátov s obsahom liekov zolpidemi tartras a zopiklón v priebehu analyzovaného obdobia.

ZÁVER

Úzkostné stavy a poruchy spánku patria medzi závažné ochorenia, ktorých prevalencia v posledných rokoch čoraz viac narastá. Z analýzy lekárskech predpisov v priebehu obdobia jedného roka vyplýva, že najčastejšie predpisovanými liečivami indikovanými v terapii úzkostných ochorení boli benzodiazepínové anxiolytiká, ktoré sa v značnej miere vyskytovali v preskripcii súčasne s antidepresívami zo skupiny SSRI. Zo skupiny benzodiazepínových anxiolytík boli najviac predpisované liečivá alprazolam, bromazepam a diazepam. Úzkostné ochorenia sa vo vyššej miere vyskytovali u mužov (58,81 %) ako u žien (41,19 %); pričom ich najväčšia prevalencia bola zaznamenaná u mužov vo veku 51 – 60 rokov a 41 – 50 rokov. Medzi najčastejšie zaznamenané diagnózy v terapii úzkostných ochorení patrili F41.1 Generalizovaná úzkostná porucha a F40.9 Fóbická úzkostná porucha. Výsledky nadobudnuté z pozorovania vývoja preskripcie liečivých prípravkov používaných v terapii porúch spánku potvrdili nárast ich preskripcie a spotreby. Do analýzy boli zaradené liečivá s obsahom syntetických účinných látok zolpidemi tartras a zopiklón, ako aj preparáty s obsahom nenávykových a prírodných účinných látok melatonín a valeriána lekárska. Najčastejšie predpisovanými prípravkami indikovanými v terapii porúch spánku sa stali preparáty s obsahom liečiva zolpidemi tartras. Za sledované obdobie došlo vo všetkých lekárnach k postupnému zvyšovaniu expedovania prírodných nenávykových liečivých prípravkov používaných v terapii porúch spánku.

ZOZNAM LITERATÚRY

Bomalaski, M. N., Claflin, E. S., Townsend, W., Peterson, M. D.: Zolpidem for the treatment of neurologic disorders: a systematic review. *Jama Neurology*, 2017, 74 (9), 1130 – 1139.

Buth, S., Holzbach, R., Martens, M. S., Neumann-Runde, E., Meiners, O., Verthein, U.:

Problematic medication with benzodiazepines, “Z-drugs”, and opioid analgesics: An analysis of National Health Insurance prescription data from 2006 – 2016. *Deutsches Ärzteblatt International*, 2019, 116 (37), 607.

Franchi, C., Rossio, R., Ardoino, I., Mannucci, P. M., Nobili, A.: Inappropriate prescription of benzodiazepines in acutely hospitalized older patients. *European Neuropsychopharmacology*, 2019, 29 (7), 871 – 879.

Huerta, B., Margiotta-Casaluci, L., Rodríguez-Mozaz, S., Scholze, M., Winter, M. J., Barceló, D., Sumpter, J. P.: Anti-anxiety drugs and fish behavior: Establishing the link between internal concentrations of oxazepam and behavioral effects. *Environmental toxicology and chemistry*, 2016, 35 (11), 2782 – 2790.

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

Kessler, R. C., McLaughlin, K. A., Green, J. G., Gruber, M. J., Sampson, N. A., Zaslavsky, A. M., Williams, D. R.: Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO World Mental Health Surveys. *The British journal of psychiatry*, 2010, 197 (5) 378 – 385.

Kosová, J.: Co opravdu funguje u úzkostných poruch: k terapeutickým kombináciám pridáme cvičení [What really works in anxiety disorders: we'll add an exercise to the therapeutic combinations]. *Psychiatrie pro praxi*, 2010, 11 (1), 11 – 14.

Kulhan, T., Ondrejka, I., Ordaz, J. A., Šnircová, E., Nosál'ová, G.: Nové trendy vo farmakoterapii úzkostných porúch [New trends in the pharmacotherapy of anxiety disorders]. *Nové trendy vo farmakoterapii III.*, 2012, 22.

Mccleery, J., Sharpley, A. L.: Pharmacotherapies for sleep disturbances in dementia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016, 11.

NCZI – *Štatistické výstupy, 2019* [NHIC – Statistical outputs, 2019]. http://www.nczisk.sk/Statisticke_vystupy/Zdravotnicka_rocenka/Pages/default.aspx. [cit. 18.11.2020].

Neubauer, D. N., Pandi-Perumal, S. R., Spence, D. W., Buttoo, K., Monti, J. M.: Pharmacotherapy of insomnia. *Journal of central nervous system disease*, 2018, 10, 117 957 351 877 0672.

Piško, J.: Chronická insomnia a psychické poruchy [Insomnia and mental disorders]. *Psychiatrie pro praxi*, 2012, 13 (1), 10 – 12.

Plchová, L.; Příhodová, I.; Šonka, K.: Porucha chování v REM spánku – opomíjená diagnóza [behavioral disorder in REM sleep – the overlooked diagnosis]. *General Practitioner/Praktický Lekar*, 2012, 92 (5), 272 – 275.

Praško, J.: Posttraumatická stresová porucha. In Seiffertová, D., Praško, J., Horáček, J., Höschl, C. (Eds.). *Postupy v léčbě psychických poruch*. Praha: Medical Tribune, Amepra, 2008. 187 – 211.

Rod, A.: *Spotřeba psychoaktivních léků v České republice* [Consumption of psychoactive drugs in the Czech republic]. CETA – Centrum ekonomických a tržních analýz, z. ú. https://www.vlada.cz/assets/ppov/protidrogova-politika/koordinace/II_04_Rod_Ales-Spotreba-psychoaktivnich-leku-fin.pdf. [cit. 11.10.2019].

Schmalstieg-Bahr, K., Müller, Ch. A., Hummers, E.: General practitioners' concepts on issuing out-of-pocket prescriptions for hypnotics and sedatives in Germany. *Family practice*, 2019, 36 (6), 785 – 790.

Šebela, M. A., Hanka, M. J., Mohr, M. P.: Duševní onemocnění v poporodním období: specifika a farmakoterapie Část I: deprese, úzkostné poruchy, poruchy spánku a ADHD [Postpartum mental disorders: specifics and pharmacotherapy. Part One: depression, anxiety disorders, sleep disorders, and ADHD]. *Psychiatrie pro praxi*, 2019, 20 (1), 21 – 25.

ÚZIS ČR. Psychiatrická péče 2018, 2019 [Psychiatric Care 2018, 2019]. <https://www.uzis.cz/index.php?pg=record&id=8308>. [cit. 2019-10-21].

Vašutová, K.: Spánek a vybrané poruchy spánku a bdění [Sleep and selected sleep-wake disorders]. *Praktické lékařství*, 2009, 1, 17 – 20.

Whyte, J., Rajan, R., Rosenbaum, A., Katz, D., Kalmar, K., Seel, R., Kaelin, D.: Zolpidem and restoration of consciousness. *American journal of physical medicine & rehabilitation*, 2014, 93 (2), 101 – 113.

WHO: *Svetová zdravotnícka organizácia* [World Health Organization], 2019. <https://www.who.int/>. [cit. 16.11.2019].

Williams, T., Hattingh, C. J., Kariuki, C. M., Tromp, S. A., van Balkom, A. J., Ipser, J. C., Stein, D. J.: Pharmacotherapy for social anxiety disorder (SAnD). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017, 10.

Xie, Z., Chen, F., Li, W. A., Geng, X., Li, C., Meng, X.: A review of sleep disorders and melatonin. *Neurological research*, 2017, 39 (6), 559 – 565.



ANALÝZA CYTOTOXICKÝCH A GENOTOXICKÝCH ÚČINKOV INSEKTICÍDU ACETAMIPRIDU V BOVINNÝCH LYMFOCYTOCH *IN VITRO*

ANALYSIS OF CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF ACETAMIPRIDE INSECTICIDE IN BOVINE LYMPHOCYTS *IN VITRO*

Bartko Ničová, Kristína; Schwarzbacherová, Viera

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

viera.schwarzbacherova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Acetamiprid je širokospektrálne používaný neonicotinoidový insekticíd na kontrolu výskytu rôznych škodcov v poľnohospodárstve, ale aj v domácnostiach proti hmyzu. Skúmali sme potenciálny cytotoxický a genotoxický účinok acetamipridu *in vitro* na boviné lymfocyty použitím analýzy chromozómových aberácií (CA) a farbenia akridín oranž/etídium bromid (AO/EtBr). Lymfocyty od 2 donorov boli exponované insekticídu v koncentráciách 1,5; 3,0; 6,0; 12,0 a 25,0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ na 4 h. U donora 1 sme zistili štatisticky významné zvýšenie % CA ($p < 0,05$) a pokles % mitotického indexu (MI) pri koncentráciách 12 a 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. U donora 2 sme zistili štatisticky významnú indukciu CA od najnižšej testovanej koncentrácie ($p < 0,05$; $p < 0,01$) a súčasne významný pokles % MI pri

koncentracii 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ($p < 0,05$). Pri farbení AO/EtBr sme u oboch donorov nezistili štatisticky významné zmeny v jednotlivých kategóriách buniek, t. j. živých, a bunkách v štádiu skorej a neskorej apoptózy. Na základe získaných výsledkov predpokladáme genotoxický účinok, cytotoxický účinok nebol preukázaný.

Kľúčové slová: acetamiprid; apoptóza; cytotoxicita; genotoxicita; chromozómové zlomy; lymfocyty

ABSTRACT

Acetamiprid is a neonicotinoid insecticide that is widely used mainly in agriculture to control various pests, but also in domestic areas against a wide range of insects. We investigated the potential cytotoxicity and genotoxicity of ace-

tamiprid to bovine lymphocytes *in vitro* using chromosome aberration (CA) analysis and the acridium orange/ethidium bromide (AO/EtBr) staining. Lymphocyte cells were exposed to insecticide at concentrations of 1.5; 3.0; 6.0; 12.0; 25.0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ for 4 h separately from two donors. We found a statistically significant increase in % CA ($p < 0.05$) and a decrease in % mitotic index (MI) at concentrations of 12 and 25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ in donor 1. In the second donor, we found a statistically significant induction of CA from the lowest concentration ($p < 0.05$, $p < 0.01$) tested and at the same time the significant decrease of % MI at the concentration of 25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ($p < 0.05$). In the AO/EtBr staining, we did not detect statistically significant changes in individual cell categories in both donors, e. i. living cells and cells in the early and late apoptosis stage. Based on the obtained results, we assume a potential genotoxic effect; cytotoxic effect was not confirmed.

Key words: acetamiprid; apoptosis; cytotoxicity; genotoxicity; chromosomal break; lymphocytes

ÚVOD

Neonikotinoidy sú novou triedou insekticídov, ktoré sa používajú vo veterinárnej medicíne a v rastlinnej výrobe. K neonikotinoidným insekticídum patrí imidakloprid, acetamiprid, tiakloprid, dinotefuran, tiamethoxam a klotianidin. Majú relatívne nízke riziko pre cieľové organizmy a životné prostredie a vysokú cieľovú špecifickosť pre hmyz.

Viac ako storočie prebieha výskum pôvodu, dôsledkov a významu chromozómových aberácií (CA). CA sa označuje ako akákoľvek nepravidelnosť alebo abnormalita distribúcie, počtu, štruktúry alebo usporiadania chromozómov, ktorá môže byť ďalej spojená s genetickými chorobami alebo s druhovými rozdielmi. CA sú obzvlášť dôležité, pretože ich je možné ľahko detegovať v prvom postexpozíčnom delení buniek, a preto umožňujú

hlbší pohľad na zahrnuté základné mechanizmy.

Apoptóza je dobre kontrolovaný, prísne regulovaný fyziologický proces, v ktorom sa bunky zúčastňujú sebazničenia. Keďže apoptóza sa podieľa na veľkom počte fyziologických a patologických procesov, spoľahlivé metódy na detekciu bunkovej smrti (apoptóza a nekróza) sú nevyhnutné. V našej štúdii sme na detekciu použili metódu AO/EtBr. Ide o dvojité farbenie akridín oranž (AO)/etidium bromidom (EtBr). AO je absorbovaný životoschopnými aj neživotoschopnými bunkami a emituje zelenú fluorescenciu, ak je interkalovaný do dvojvláknovej nukleovej kyseliny (DNA) alebo červenú fluorescenciu, ak je viazaný na jednovláknovú nukleovú kyselinu (RNA). Et/Br je absorbovaný iba neživotoschopnými bunkami a emituje červenú fluorescenciu interkaláciou do DNA.

Pomocou týchto dvoch metód sme skúmali potenciálne cytotoxický a genotoxický účinok acetamipridu na boviné lymfocyty.

MATERIÁL A METÓDY

Izolácia a kultivácia boviných lymfocytov

Odobrali sme vzorku venóznej krvi od 2 zdravých býčkov (križanec Holstein, 1 rok) do striekačky s heparínom. Lymfocyty sme ďalej izolovali od ostatných krvných buniek. Krv sme zriedili v pomere 1 : 1 predhriatym PBS (pH = 7,4) v nádobe; následne sme ju navrstvili na roztok Histopaque-1077 (Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA) v pomere 1 : 1. Po centrifugácii (4000 ot/min, 30 min) sme odsali prstenec lymfocytov, ktorý sme 2-krát premyli v PBS. Počet buniek sme stanovili v Burkerovej komôrke a pre ďalšiu kultiváciu použili lymfocyty koncentrácií $2 \times 10^5.\text{ml}^{-1}$.

Kultivačné médium je zložené z: RPMI 1640 s obsahom L-glutamínu (GE Healthcare Hyclone Lab, UT, USA); 15 % fetálne teľacie sérum (BoFeS, Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA); zmes antibiotík a antimykotík (100 U. ml^{-1} , penicilín, 0.1 mg. l^{-1} streptomycín a 0.25 mg. l^{-1} amfotericín B); lektín z *Phytolacca americana* (0,3 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$; Sigma,

Chemical Co. St. Louis, MO, USA).

Testovanú látku MOSPILAN® 20SP s obsahom acetamipridu 20,2 % (CAS 135410-20-7), (Gazelle, ACETGUARD, Nemecko) sme rozpustili vo vode na koncentrácie 25, 12, 6, 3 a 1,5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; ktoré sme pridali do kultivačného média na posledné 4 h inkubácie. Voda bola použitá aj ako negatívna kontrola pri oboch testoch.

Metóda chromozómových aberácií

Kultivácia lymfocytov trvala 72 h v termostate pri teplote 37 °C.

Ako pozitívnu kontrolu sme použili etyl-metánsulfonát (EMS, Sigma, St. Louis, MO, USA, 250 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), ktorý bol do skúmaviek pridaný po 24 h od začiatku kultivácie.

Kolchicín sme použili ako mitotický jed a pridali 90 min pred koncom kultivácie v koncentrácii 5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Nemecko).

Následne sme spracovali kultúry lymfocytov. Po centrifugácii (10 min pri 1000 ot/min) sme k sedimentu pridali roztok KCl (0,075 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$; pH 7,4) o teplote 37 °C $\pm$ 1°C na 15 min. Potom sme kultúry opäť centrifugovali (10 min, 1000 ot/min). Lymfocyty, ktoré sa nachádzali v sedimente, sme fixovali studeným Carnoyovým roztokom a zmes sme premiešali na vortexe; tento krok sme opakovali 2-krát. Tento studený roztok tvorí metanol a kyselina octová v pomere 3 : 1. Takto pripravené lymfocyty v objeme asi 0,5 ml sme odložili do mrazničky do ďalšieho spracovania.

Na zviditeľnenie a ofarbenie metafáz sme použili 2 % roztok Giemsovho farbiva (Merck, Darmstadt, Nemecko) v Sörensenovom roztoku, pH=6,9) po dobu 5 min. Po opláchnutí destilovanou vodou sme pripravené preparáty nechali uschnúť pri izbovej teplote a následne pozorovali vo svetelnom mikroskope, kde sme hodnotili počet metafáz na 1000 buniek, čiže mitotický index, a zároveň sme vyhodnocovali poškodenie chromozómov insekticídmi, čiže chromozómové aberácie v 100 metafázach na každého donora a koncentráciu (Galdíková a kol., 2015).

Metóda akrídium oranž/etídium bromid

Kultivácia lymfocytov trvala 24 h v termostate pri teplote 37 °C. Následne sa lymfocyty dvakrát premyli v PBS, scentrifugovali (3500 ot/min) a sediment obsahujúci bunky sa použil na farbenie. K bunkám bola pridaná zmes akrídínovej oranžovej (100 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a etídiumbromidu (100 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) v pomere 1 : 1. Potom boli bunky analyzované pomocou fluorescenčného mikroskopu Nikon Eclipse vybaveného CCD kamerou a softvérom LUCIA FISH®.

Bunky so svetlozeleným jadrom bez kondenzácie chromatínu boli hodnotené ako živé, bunky so svetlozeleným jadrom a tmavozelenými inklúznymi telieskami chromatínu boli včasne apoptotické. Apoptotické mali oranžové jadro s tmavo oranžovými inklúznymi telieskami chromatínu. Analyzovalo sa celkom 100 buniek z troch nezávislých kultúr na koncentráciu a donora (Schwarzbacherová a kol., 2017).

Štatistická analýza

Štatistická analýza frekvencie CA a zmien mitotického indexu sa uskutočnila pomocou testu chí kvadrát (χ^2). Pre zmeny frekvencie jednotlivých štádií apoptických buniek zistených AO/EtBr farbením bola použitá štatistická metóda analýza rozptylu (ANOVA) s Dunettovým aposteriornym testom.

VÝSLEDKY

Výsledky analýzy CA

Výsledky skúmania CA po expozícií insekticídmi u zvierat'a 1 sú zaznamenané v tabuľke 1. Zistili sme dávkovo závislý nárast % zlomov ($p < 0,05$) a zároveň pokles % MI. Štatisticky významné výsledky boli pri koncentráciách 12 a 25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, koncentrácie nižšie ako 12 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ sú bez štatistickej významnosti. Pri analýze MI sme zistili, že so zvyšujúcou koncentráciou klesá, avšak pokles pri daných koncentráciách bol bez štatistickej významnosti.

Tab. 1: Indukcia CA po expozícii bovinných lymfocytov insekticídu acetamipridu na 4 h, zviera 1

Typy CA								
	Počet metafáz	G	CB	IB	CE	IE	% zlomov (± SD)	% MI
4 h koncentrácia insekticídu (µg.ml ⁻¹)								
Kontrola	100	1	1	–	–	–	1 ± 0,099	2,5 [▲]
1,5	100	2,0	1,0	–	–	–	1 ± 0,099	2,4 [▲]
3,0	100	4,0	1,0	1,0	–	–	2 ± 0,140	2,2 [▲]
6,0	100	4,0	2,0	1,0	–	–	3 ± 0,171	2,2 [▲]
12,0	100	3,0	3,0	2,0	–	–	5 ± 0,218*	1,9 [▲]
25,0	100	7,0	3,0	2,0	–	–	5 ± 0,218*	1,6 [▲]
EMS	100	5,0	2,0	4,0	1,0	–	10 ± 0,300**	1,1**

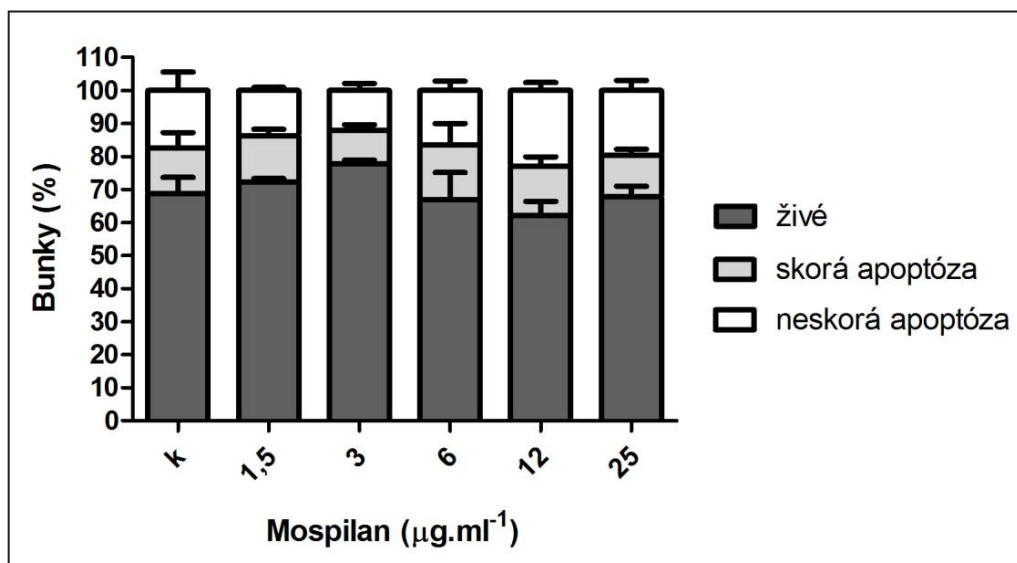
▲ – údaj bez štatistickej významnosti; *(p < 0,05); **(p < 0,01) – štatisticky významné výsledky (χ² test); EMS: etylmetylsulfonát (250 µg.ml⁻¹) – pozitívna kontrola; G – gap; CB – chromatidový zlom; IB – izochromatidový (chromozómový) zlom; CE – chromatidová výmena; IE – izochromatidová (chromozómová) výmena

Tab. 2: Indukcia CA po expozícii bovinných lymfocytov insekticídu acetamipridu na 4 h, zviera 2

Typy CA								
	Počet metafáz	G	CB	IB	CE	IE	% zlomov (± SD)	% MI
4 h koncentrácia insekticídu (µg.ml ⁻¹)								
Kontrola	100	2	–	–	–	–	0 ± 0	2,6 [▲]
1,5	100	3,0	2,0	1,0	–	–	3 ± 0,171*	2,3 [▲]
3,0	100	5,0	2,0	2,0	–	–	4 ± 0,196*	2,1 [▲]
6,0	100	7,0	2,0	1,0	–	–	3 ± 0,171*	1,9 [▲]
12,0	100	8,0	3,0	1,0	–	–	4 ± 0,196*	2,0 [▲]
25,0	100	8,0	6,0	2,0	–	–	8 ± 0,271**	1,5*
EMS	100	7,0	4,0	5,0	–	–	11 ± 0,313**	1,0**

▲ – údaj bez štatistickej významnosti; *(p < 0,05); **(p < 0,01) – štatisticky významné výsledky (χ² test); EMS: etylmetylsulfonát (250 µg.ml⁻¹) – pozitívna kontrola; G – gap; CB – chromatidový zlom; IB – izochromatidový (chromozómový) zlom; CE – chromatidová výmena; IE – izochromatidová (chromozómová) výmena

Obr. 1: Grafické znázornenie analýzy AO/EtBr; zviera 1



Výsledky CA analýzy u zvieraťa 2 sú zaznamenané v tabuľke 2. Po 4 h expozícii sme zistili štatisticky významnú indukciu zlomov už od najnižšej testovanej koncentrácie 1,5 µg.ml⁻¹ ($p < 0,05$); pričom pri najvyššej koncentrácii 25 µg.ml⁻¹ boli hodnoty dvojnásobné ($p < 0,01$). Hodnoty MI klesali v závislosti od zvyšujúcej sa koncentrácie a spočiatku bola redukcia MI štatisticky bezvýznamná. Štatisticky významná hodnota bola až pri najvyššej koncentrácii 25 µg.ml⁻¹ ($p < 0,05$).

Výsledky analýzy AO/EtBr

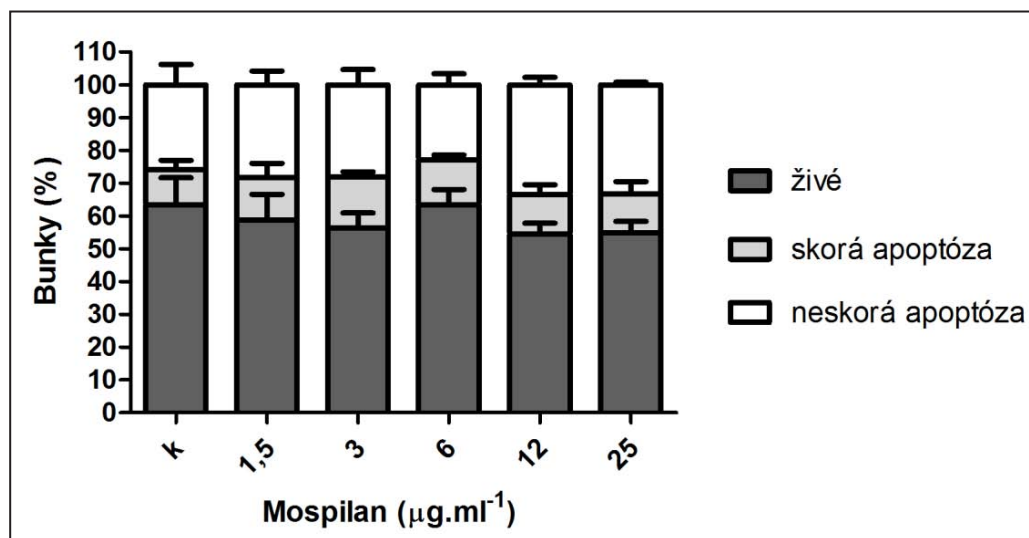
Zistili sme, že žiadna z koncentrácií nevykazovala štatisticky významne zmenené hodnoty u donora 1 (viď obr. 1). Po 4 h expozícii došlo najprv k postupnému zvýšeniu počtu živých buniek (1,5 a 3 µg.ml⁻¹; 72,23 % a 77,75 %); pri vyšších testovaných koncentráciách k postupnému znižovaniu. Frekvencia buniek v štádiu skorej apoptózy dosiahla svoje maximum pri koncentrácii 6 µg.ml⁻¹ (16,72 %); následne už len klesala. Počet buniek v štádiu neskorej apoptózy pri prvých dvoch testovaných koncentráciách klesal, ale od koncentrácie 6

µg.ml⁻¹ začal stúpať a dosiahol svoje maximum pri koncentrácii 12 µg.ml⁻¹ (22,96 %).

Podobne u donora 2 žiadna z koncentrácií nevyvolala štatisticky významne zmenené hodnoty (viď obr. 2). Napriek tomu sme zaznamenali výraznejšie poklesy počtu živých buniek a zároveň nárast frekvencie buniek v skorej aj neskorej apoptóze.

Po 4 h expozícii došlo k postupnému znižovaniu počtu živých buniek (1,5; 3; 12; 25 µg.ml⁻¹; 63,39 %; 58,81 %; 56,33 %; 54,38 %; 54,73 %); okrem koncentrácie 6 µg.ml⁻¹ (63,43 %), kde sa počet živých buniek zvýšil. Frekvencia buniek v štádiu skorej apoptózy dosiahla svoje maximum pri koncentrácii 3 µg.ml⁻¹ (15,61 %); následne už len klesala. Počet buniek v štádiu neskorej apoptózy klesal len pri koncentrácii 6 µg.ml⁻¹ (22,86 %); pri ostatných koncentráciách sme zaznamenali nárast a svoje maximum dosiahol pri koncentrácii 12 µg.ml⁻¹ (33,54 %).

Obr. 2: Grafické znázornenie analýzy AO/EtBr, zvieria 2



DISKUSIA

V tomto experimente sme skúmali účinok neonikotinoidového insekticídu s obsahom acetamipridu na lymfocyty periférnej krvi hovädzieho dobytká, a to z hľadiska jeho možného cytotoxického a/alebo genotoxického pôsobenia.

Hospodárske zvieratá, ako je dobytok, sliepky a králiky, sú najčastejšie vystavené účinku chemických látok prostredníctvom krmiva a vody, čo môže viesť k hromadeniu chemikálií v mlieku, mäse a potravinách (Michalová a kol., 2020). Niektoré pesticídy sa môžu hromadiť v tukovom tkanive roky (Rhind, 2002) a uvoľňujú sa do mlieka počas laktácie, čo môže mať za následok zvýšenú expozíciu ich potomstva a ľudí konzumujúcich toto mlieko.

Výsledky našej štúdie odhalili, že v boviných lymfocytoch vystavených acetamipridu došlo k významnému zvýšeniu štruktúrnych CA pri vyšších koncentráciách (12 – 25 µg.ml⁻¹; $p < 0,05$) pri expozičnom čase 4 h v porovnaní s kontrolnými skupinami. U druhého donora boli naše výsledky výraznejšie a zistili sme štatisticky významnú induk-

ciu zlomov už od najnižšej testovanej koncentrácie 1,5 µg.ml⁻¹ ($p < 0,05$); pričom pri najvyššej koncentrácii 25 µg.ml⁻¹ boli hodnoty dvojnásobné ($p < 0,01$); a zároveň indukciu % MI pri najvyššej koncentrácii 25 µg.ml⁻¹ ($p < 0,05$). Pri teste AO/EtBr sme zistili, že žiadna koncentrácia nemala štatisticky významné hodnoty, napriek tomu sme pozorovali poklesy frekvencie živých buniek a ich nárast vo fáze skorej aj neskej apoptózy.

Výsledky autorov Galdíková a kol. (2015) ukázali, že komerčný insekticíd na báze tiaklopridu bol schopný indukovať DNA/chromozómové lézie, ktoré môžu viesť k prerušeniu reťazca DNA a tvorbe CA. Pozitívny účinok prípravku s obsahom tiaklopridu na indukciu poškodenia DNA v boviných periférnych lymfocytoch bol pozorovaný pri koncentráciách v rozmedzí od 120 do 480 mg.ml⁻¹. Podobne výsledky, t. j. indukcia komét/produkcia zlomov DNA opísali Calderon-Segura a kol. (2012) po vystavení ľudských lymfocytov komerčným neonikotinoidovým insekticídom (tiakloprid, klotiadín a imidakloprid). Ďalšia štúdia Galdíková a kol. (2019) uvádza, že čistá účinná látka

tiakloprid vykazovala slabé poškodenie DNA pri najvyšších koncentráciách (240 a 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $p < 0,05$; $p < 0,01$).

Naopak, keď sa skúmali účinky neonikotinoidových insekticidov (tiakloprid, klotianidín a imidakloprid) na ľudské periférne lymfocyty *in vitro* pomocou kométového testu, ukázalo sa, že komerčné formulácie Jade, Gaucho, Calypso a Poncho priamo indukovali poškodenie DNA spôsobom závislým od koncentrácie. Prítomnosť adjuvans v komerčných formuláciách môže zvýšiť ich toxicitu zvýšením ich absorpcie cez bunkové membrány, pretože okrem účinnej látky obsahujú pesticídy aj rôzne inertné zložky. Výsledky mnohých predchádzajúcich štúdií toxicity naznačujú, že používanie komerčných pesticídov je často spojené s genotoxicitou vyššou ako sa pozoruje po expozícii účinnej látky (Cavas, 2011; Valencia-Quintana a kol., 2016).

Farbenie apoptotických buniek fluorescenčnými farbivami, ako je AO/EtBr sa považuje za správnu metódu hodnotenia zmenenej jadrovej morfológie (Leite a kol., 1999; Gasiorowski a kol., 2001; Savitskiy a kol., 2003). Farbenie AO/EB na základe jadrovej morfológie (perinukleárna kondenzácia chromatinu, jadrový kolaps a prípadná fragmentácia) nám umožňuje rozlíšiť niekoľko subpopulácií apoptotických buniek od životaschopných a nekrotických buniek. Navyše vzhľad týchto buniek AO/EtBr vo svetelnej mikroskopii, napríklad zaočnenie buniek, povrchové škvrny a zmrštenie, poskytuje úplný morfológický profil apoptotickej bunky (Schutte a kol., 1998; Plasier a kol., 1999).

Výsledky podľa Schwarzbacherová a kol. (2019) ukazujú, že komerčný prípravok na báze tiaklopridu v testovaných koncentráciách indukoval zmeny životaschopnosti boviných lymfocytov po 4 h exponovaní. Pomocou testu Annexin V a TUNEL zistili pokles životaschopnosti buniek (až o 29 % buniek v neskoršej apoptóze) a výskyt apoptózy v koncentráciách v rozmedzí od 30 do 240 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

ZÁVER

CA má významný prínos pri diagnostike neplodnosti, embryonálnej mortality v rôznych fázach, vývojových porúch u novorodencov a rakoviny. Fyzické mapovanie génov a prenatalné testovanie je dôležité v prevencii genetických chorôb. Medzi metódy používané na detekciu apoptózy možno ako najspoľahlivejšie odporučiť mikroskopické vyšetrenie buniek zafarbených AO/EtBr, pretože umožňuje vykonať vysokokvalitné štúdie bunkovej morfológie, dezintegrácie jadra a chromatinu, ako aj rozlíšiť životaschopné, skoré alebo neskoré apoptotické a nekrotické bunky.

Obidve metódy sme využili pri analýze cytotoxických a genotoxických účinkov boviných lymfocytov exponovaných insekticidom s obsahom acetamipridu. Metódou CA sme pri vyšších koncentráciách zistili štatisticky významné hodnoty, ktoré naznačujú jeho možné genotoxické účinky. Pri vyhodnocovaní metódou AO/EtBr sme spozorovali zmeny frekvencií buniek vo všetkých štádiách. Aj keď hodnoty neboli štatisticky významné, dané javy nám naznačujú, že daný insekticíd je potrebné ďalej skúmať metódami *in vitro* aj *in vivo*.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia vznikla vďaka podpore grantu MŠ SR VEGA 1/0166/21.

ZOZNAM LITERATÚRY

Calderon-Segura, M. E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Martínez-Valenzuela, C., Carbajal-López, Y., Calderón-Ezquerro, M. D., Cortés-Eslava, J., García-Martínez, Flores-Ramírez, R. D., Rodríguez-Romero, M. I., Méndez-Pérez, P., Bañuelos-Ruíz, E.: Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to neonicotinoid insecticides news. *J. Toxicol.*, 2012, 2012, 612 647.

- Cavas, T.: *In vivo* genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chem. Toxicol.*, 2011, 49, 1431–1435.
- Galdíková, M., Holečková, B., Šivíková, K., Schwarzbacherová, V., Koleničová, S.: Evaluating the genotoxic damage in bovine whole blood cells *in vitro* after exposure to thiacloprid. *Toxicol. in Vitro*, 2019, 61, 104 616.
- Galdíková, M., Šivíková, K., Holečková, B., Dianovský, J., Drážovská, M., Schwarzbacherová, V.: The effect of thiacloprid formulation on DNA/chromosome damage and changes in GST activity in bovine peripheral lymphocytes. *J. Environ. Sci. Health B*, 2015, 50 (10), 698 – 707.
- Gasiorowski, K., Brokos, B., Kulma, A., Ogorzalek, A., Skorkowska, K.: A comparison of the methods applied to detect apoptosis in genotoxically-damaged lymphocytes cultured in the presence of four antimutagens. *Cell. Mol. Biol Lett.*, 2001, 6, 141 – 159.
- Leite, M., Quinta-Costa, M., Leite, P. S., Guimarães, J. E.: Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death-study in a model of UV radiation of the leukemic cell line HL60. *Anal. Cell. Pathol.*, 1999, 19, 139 – 151.
- Michalová, V., Galdíková, M., Holečková, B., Koleničová, S., Schwarzbacherová, V.: Micronucleus assay in environmental biomonitoring. *Folia Vet.*, 2020, 64 (2), 20 – 28.
- Plasier, B., Lloyd, D. R., Paul, G. C., Thomas, C. R., Al-Rubeai, M.: Automatic image analysis for quantification of apoptosis in animal cell culture by annexin-V affinity assay. *J. Immunol. Methods.*, 1999, 229, 81 – 95.
- Rhind, S. M.: Endocrine disrupting compounds and farm animals: their properties, actions and routes of exposure. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 2002, 23, 179 – 187.
- Savitskiy, V. P., Shman, T. V., Potapnev, M. P.: Comparative measurement of spontaneous apoptosis in pediatric acute leukemia by different techniques. *Cytometry*, 2003, 56, 16 – 22.
- Schutte, B., Nuydens, R., Geerts, H., Ramaekers, F.: Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *J. Neurosci. Methods*, 1998, 86, 63 – 69.
- Schwarzbacherová, V., Wnuk, M., Lewinska, A., Potocki, L., Zebrowski, J., Koziorowski, M., Holečková, B., Šivíková, K., Dianovský, J.: Evaluation of cytotoxic and genotoxic activity of fungicide formulation Tango® Super in bovine lymphocytes. *Environ. Pollut.*, 2017, 220 (Part A), 255 – 263.
- Schwarzbacherová, V., Wnuk, M., Deregowska, A., Holečková, B., Lewinska, A.: *In vitro* exposure to thiacloprid-based insecticide formulation promotes oxidative stress, apoptosis and genetic instability in bovine lymphocytes. *Toxicol. In Vitro*, 2019, 61, 104 654.
- Valencia-Quintana, R., Gómez-Arroyo, S., Sánchez-Alarcón, J., Milić, M., Olivares, J. L., Waliszewski, S. M., Cortés-Eslava, J., Villalobos-Pietrini, R., Calderón-Segura, M. E.: Assessment of genotoxicity of Lannate-90® and its plant and animal metabolites in human lymphocyte cultures. *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 2016a, 67, 116 – 125.



BIOCHEMICKÉ PARAMETRE KRVI U ŽIEN PODSTUPUJÚCICH HORMONÁLNU SUBSTITUČNÚ TERAPIU

BLOOD BIOCHEMICAL PARAMETERS IN WOMEN UNDERGOING HORMONE REPLACEMENT THERAPY

Kudrová, Daniela Lejla; Váczi, Peter

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

²Katedra výživy a chovu zvierat
Slovenská republika

peter.vaczi@uvlf.sk

ABSTRAKT

V tejto publikácii sa zaoberáme hodnotením vplyvu hormonálnej substitučnej terapie (HST) na biochemické, hematologické a hemokoagulačné parametre u žien, ktoré prežívajú klimakterický syndróm. Klimakterický syndróm je súčasťou života ženy, avšak nie u každej sa prejavuje natoľko, aby sa pristúpilo k exogénnej substitúcii hormónov. Často však HST napomáha prežiť každodenný život oveľa ľahšie a udržať kvalitu života bez nepríjemných či neznesiteľných príznakov.

Cieľom našej štúdie bolo zhodnotiť účinok HST na biochemický profil krvi, krvný obraz a zrážanie krvi u žien, ktoré trpia klimakterickým syndrómom. Jednalo sa o 21 žien, ktorým bolo podávaných 8 rozličných liekov: Activelle,

Kliogest, Novofem, Angeliq, Gynovel, Femoston, Trisequens a Estrofem.

Zistili sme, že zo sledovaného súboru pacientok došlo počas terapie HST u 1 ženy k miernemu zvýšeniu hladiny glukózy v krvi a u 6 sa vyskytovala hypercholesterolémia. Nemožno však jednoznačne potvrdiť, že tieto výsledky sú pripisované len užívaniu HST, nakoľko pacientky sa nachádzajú v prechode a s ich vyšším vekom súvisia aj pridružené ochorenia. Hodnoty ostatných biochemických parametrov (koncentrácie bilirubínu a onkomarkeru C-125, aktivity alanínaminotransferázy – ALT, aspartátaminotransferázy – AST) spadali do rozmedzia referenčných hodnôt. Vo fyziologických hodnotách sa nachádzali aj hematologické parametre ako počet erytrocytov, leukocytov, trombocytov, koncentrácia hemoglobínu a

hematokrit, a to u všetkých sledovaných pacientok. Podobne aj ukazovatele krvného zrážania – koncentrácia fibrinogénu, protrombínový čas a hodnota schopnosti krvi koagulovať (International Normalized Ratio – INR) sa nachádzali vo fyziologických normách. Z tohto dôvodu a prihliadnuc k zlepšeniu kvality života sledovaných pacientok s klimakterickým syndrómom môžeme používanie HST považovať za bezpečné.

Sledovaním a vyhodnotením ukazovateľov sme však zistili, že nemôžeme objektívne zhodnotiť, či je hormonálna substitúcia väčším rizikom alebo benefitom, nakoľko množstvo štúdií si v tejto otázke odporuje a nemá jednoznačné tvrdenie o jej prospešnosti. S jednoznačnosťou však vieme povedať, že nízke dávky hormónov v kratšom čase sú bezpečnou voľbou pre všetky ženy, ktoré trpia zníženou kvalitou života v dôsledku prejavov ich klimakterického syndrómu.

Kľúčové slová: hormonálna substitučná terapia; klimakterický syndróm; klimaktérium

ABSTRACT

In this publication, we evaluate the effect of hormone replacement therapy (HRT) on biochemical, haematological and blood clotting parameters in women who suffer from menopausal syndrome. The menopausal syndrome is a part of a woman's life, but not every woman is exposed to exogenous hormone replacement. Often, HRT helps to make everyday life much easier and maintain a quality of life without unpleasant or unbearable symptoms.

The aim of the study was to evaluate the effect of HRT on biochemical, haematological and blood clotting parameters in women with menopausal syndrome. There were 21 women taking 8 different HRT preparations: Activelle, Kliogest, Novofem, Angeliq, Gynovel, Femoston, Trisequens and Estrofem.

We found that in the group of patients, 1 woman had a slight increase in blood glucose levels and 6 had hypercholesterolemia. However, it cannot be unequivocally confirmed that these results are attributed only to the use of HRT, as patients are in transition and certain diseases are associated with their older age. The values of other biochemical parameters (bilirubin and tumor marker C-125 concentrations, alanine aminotransferase – ALT, aspartate aminotransferase – AST activities) were within the reference range. Haematological parameters such as erythrocyte, leukocyte, platelet count, haemoglobin concentration and haematocrit were also included in the physiological values in all patients monitored. Similarly, blood clotting indicators – fibrinogen concentration, prothrombin time and International Normalized Ratio (INR) – were found in physiological standards. For this reason, and taking into account the improvement of patient's life quality, we can consider the use of HRT to be safe. However, by monitoring and evaluating the indicators, we found that we could not objectively assess whether hormone substitution is a greater risk or benefit, as many studies contradict this issue and do not have a clear claim about its advantage. We can state with clarity, that low doses of hormones in a shorter time period are a safe choice for all women who suffer from a reduced quality of life due to the manifestations of their menopausal syndrome.

Key words: climacteric syndrome; hormone replacement therapy; menopause

ÚVOD

Klimaktérium je prirodzené obdobie v živote ženy, ktoré sa spája s neprijemnosťami, teda klimakterickým syndrómom a vaginálnou atrofiou, čo ovplyvňuje výrazne kvalitu života súvisiacu s nedostatkom hormónov vedúceho k možnému

Tab. 1: Prehľad o užívaných liekoch v rámci odporúčanej HST

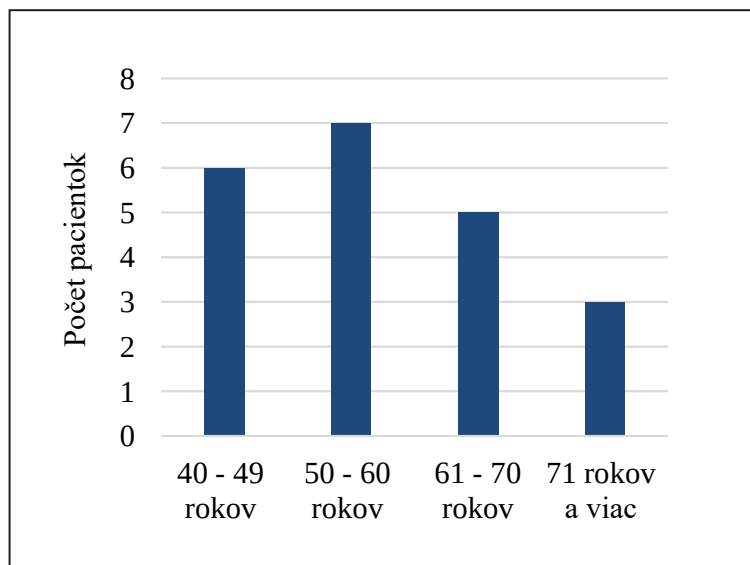
Názov lieku	Liečivá	Dávkovanie	Počet pacientok
Activelle tbl. flm. 1 x 28 ks	1 mg estradiol + 0,5 mg noretisterónacetát	1 x denne	6
Kliogest tbl. flm. 1 x 28 ks	2 mg estradiol + 1 mg noretisterónacetát	1 x denne	3
Novofem tbl. flm. 1 x 28 ks	1 mg estradiol/ 1 mg estradiol + 1 mg noretisterónacetát	16 dní červená tbl. (estrogén), 12 dní biela tbl. (estrogén + progestagén)	3
Angeliq tbl. flm. 1 x 28 ks	1 mg estradiol + 2 mg drospirenón	1 x denne	1
Gynovel tbl. 1 x 84 ks	1 mg estradiol a 0,5 mg noretisteronacetát	1 x denne	2
Femoston tbl. flm. 1 x 28 ks			
– 1/10	1 mg estradiol/ 1 mg estradiol + 10 mg dydrogesterón	14 dní biela tbl. (estrogén), 14 dní šedá tbl. (estrogén + progestagén)	1
– 2/10	2 mg estradiol/ 2 mg estradiol + 10 mg dydrogesterón	14 dní tehlovočervená tbl. (estrogén), 14 dní žltá tbl. (estrogén + progestagén)	5
– conti 1/5	1 mg estradiol a 5 mg dydrogesterón	1 x denne	1
Trisequens tbl. flm. 1 x 28 ks	(2 mg estradiol/ 2 mg estradiol + 1 mg noretisterónacetát/ 1 mg estradiol	12 dní modrá tbl. (estrogén), 10 dní biela tbl. (estrogén + progestagén), 6 dní červená tbl. (estrogén)	1
Estrofem tbl. flm. 1 x 28 ks	1 mg estradiol	1 x denne	1

rozvoju iných chorôb. Tento hypoestrogénny stav nenastáva len vplyvom fyziologickej menopauzy, približne v 50. roku života, ale aj kvôli predčasnému ovariálnemu zlyhaniu, ooferektómii – chirurgická kastrácia, chemoterapii, rádioterapii, v dôsledku použitia antiestrogénovej terapie estrogén-dependentných nádorov (Borovský a Krištúfková, 2012). Nastupujú zmeny endokrinné a biologické. Počiatočným ukazovateľom je nástup nepravidelnej menštruácie (Burger a kol., 2002). Tento stav je možné ovplyvniť nasadením HST (hormonálnej substitučnej terapie) a zvýšiť tak kvalitu života ženy. HST sa považuje za najefektívnejšiu liečbu nedostatku estrogénov. Prvým typom je použitie

estrogénov (estriol, estradiol) samotných v tzv. nízko dávkovom režime. Druhým typom je kombinácia estrogénov s gestagénmi – progestínmi (noretisterón, dydrogesterón) formou sekvenčnej, či kontinuálnej terapie (Borovský a Krištúfková, 2012).

S HST je však spojených aj viacero nežiaducich účinkov. Podávanie hormónov po menopauze znižuje riziko koronárneho ochorenia, avšak závisí od dĺžky jej podávania. Krátkodobá HST po menopauze paradoxne riziko koronárneho ochorenia srdca zvyšuje oproti dlhodobému podávaniu, ktoré riziko znižuje. Dobré známe nežiaduci účinok hormonálnej perorálnej terapie, venózna trombóza, s vekom pacientky zvyšuje riziko vzniku hlavne po-

Graf 1: Vekové zastúpenie súboru 21 pacientok užívajúcich HST



čas prvých dvoch rokov. U žien mladších ako 60 rokov sa riziko venóznej trombózy znižuje. Estrogénová terapia samotná (bez progesterónu) zvyšuje riziko vzniku karcinómu endometria u pacientok s maternicou v závislosti od dĺžky a dávky podávania. Podanie progesterónu ako opozitného hormónu toto riziko znižuje (Borovský a Krištúfková, 2012; Fauser a Genazzani, 2015). Riziko rakoviny prsníka rastie priamo úmerne s dĺžkou užívania hormónov. Zvyčajne sa mierne zvyšuje po 3 rokoch, avšak nemožno s istotou povedať, ktorá z HST – či kontinuálna alebo sekvenčná – má na toto riziko väčší vplyv. Podľa WHO štúdií sa ani po 7 rokoch užívania estrogénov riziko rakoviny prsníka nezvýšilo. Kvôli nejednoznačným výsledkom a dôkazom sa hormonálna liečba nepodáva u pacientok, ktoré už prekonali karcinóm prsníka (Borovský a Krištúfková, 2016).

Vzhľadom na kontroverznú otázku bezpečnosti užívania HST bolo hlavným cieľom štúdie zistiť, či HST výrazne ovplyvňuje biochemické a hematologické parametre krvi u žien.

MATERIÁL A METÓDY

Základné údaje o pacientkach boli získané z anonymizovanej agendy pacientov gynekologickej ambulancie v Košiciach, pričom sme sa zamerali na diagnózu klimakterický syndróm (N 95.1). Súbor obsahoval 21 pacientok. Zo zdravotných záznamov boli parametre sledované systematicky v postupnom časovom období od začiatku liečby až po poslednú kontrolu (od 2 do 9 po sebe nasledujúcich rokov). Každá pacientka bola pred terapiou vyšetrená mamograficky, v prípade, že sa počas liečby zhoršil jej stav, terapia HST jej bola vysadená a pacientka sa zaradila do dispenzarizácie onkológa.

U každej pacientky sa bez ohľadu na užívaný preparát HST sledovali nasledujúce parametre: biochemické (glukóza, bilirubín, aspartátaminotransferáza – AST, alanínaminotransferáza – ALT, celkový cholesterol, onkomarker CA 125), hematologické (počet bielych krviniek, červených krviniek, trombocytov, koncentrácia hemoglobínu, hematokrit,) a hemokoagulačné (koncentrácia fi-

Tab. 2: Priemerné hodnoty sledovaných biochemických parametrov

Užívaný liek	Glukóza (mmol.l ⁻¹)	Bilirubín (μmol.l ⁻¹)	AST (μkat.l ⁻¹)	ALT (μkat.l ⁻¹)	Cholesterol (mmol.l ⁻¹)	CA 125 (kIU.l ⁻¹)
Activelle	5,3	10	0,36	0,35	5,9	13,48
Klioges	5,1	12	0,26	0,25	5,7	11,75
Novofem	5,5	10	0,28	0,26	5,7	125,17
Angeliq	5,1	8	0,23	0,21	3,9	9,9
Gynovel	6,0	11	0,28	0,22	5,6	–
Femoston	6,7	6	0,37	0,41	5,8	–
Trisequens	4,6	11	0,32	0,35	4,9	7,1
Estrofem	4,9	5	0,22	0,24	5,4	15,38
Norma	4,0 – 6,1	0 – 20	0,1 – 0,6	0,1 – 0,6	3,1 – 5,2	2 – 35

AST – aspartátaminotransferáza, ALT – alanínaminotransferáza

Tab. 3: Výsledné priemerné hodnoty sledovaných hematologických parametrov krvi

Užívaný liek	Leukocyty (10 ⁹ .l ⁻¹)	Erytrocyty (10 ¹² .l ⁻¹)	Hemoglobín (g.l ⁻¹)	Hematokrit	Trombocyty (10 ⁹ .l ⁻¹)	PT (s)	Fibrinogén (g.l ⁻¹)	INR
Activelle	5,52	4,15	130	0,39	245	108	3,3	0,95
Kliogest	5,86	4,64	136	0,43	248	99	2,9	1,01
Novofem	5,62	4,79	141	0,43	264	93	2,8	1,05
Angeliq	5,89	4,79	121	0,38	227	95	2,2	1,04
Gynovel	6,55	4,37	133	0,39	214	92	2,9	1,00
Femoston	5,55	4,30	132	0,40	261	108	3,5	0,95
Trisequens	4,48	4,28	132	0,41	223	111	1,8	0,91
Estrofem	7,89	4,70	127	0,39	344	108	2,5	0,93
Norma	3,6 – 10	3,8 – 5,3	120 – 160	0,35 – 0,46	140 – 440	75 – 115	1,6 – 4,4	0,86 – 1,20

PT – protrombínový čas, INR – International Normalized Ratio (medzinárodný normalizovaný pomer)

brinogénu, medzinárodný normalizovaný pomer – International Normalized Ratio (INR) a protrombínový čas – PT).

Pacientky užívali prevažne lieky s obsahom estrogénu kombinovaného s progestagénom, a to buď formou kontinuálnej, alebo sekvenčnej metódy. Tabuľka 1 obsahuje prehľad o užívaných liekoch, ich zloženie, spôsob dávkovania a počet pacientok, ktoré danú terapiu absolvovali.

VÝSLEDKY

Vek pacientok

V súbore 21 pacientok s klimakterickým syndrómom najviac z nich patrilo do vekovej skupiny 50 – 60 rokov. Najvyšší vek mala 72-ročná pacientka (narodená 1948), najmladšou bola pacientka vo veku 40 rokov (narodená 1980). Presnejšie zastúpenie veku žien dokumentuje graf 1.

Hodnoty biochemických parametrov krvi

Porovnanie výsledných biochemických parametrov dokumentuje tabuľka 2 obsahujúca záznam priemerných hodnôt pre každý preparát zvlášť. Z uvedených výsledkov vyplýva, že k najvýraznejším zmenám došlo pri biochemických parametroch, kde sú červenou farbou vyznačené hodnoty nad fyziologické hladiny. Keďže sa onkomarker CA 125 nevyšetroval už ako platený výkon v rámci prevencie, nemáme dostatočné dáta na to, aby sme ich mohli vyhodnotiť, avšak je potrebné podotknúť, že onkomarker CA 125 bol zvýšený u jednej pacientky užívajúcej liek Novofem. Zvýšenie CA 125 u danej pacientky dávame do súvisu s jej rodinnou anamnézou a nie s užívaním spomínaného lieku.

Priemerná glykémia spomedzi všetkých sledovaných liekov bola pri preparáte Femoston najvyššia, a to 6,7 mmol.l⁻¹. Pri ostatných preparátoch HST boli hodnoty v norme, teda pod 6 mmol.l⁻¹. Priemerné hodnoty koncentrácie celkového cholesterolu boli nad normu pri 6 preparátoch, a to: Actiwell (5,9 mmol.l⁻¹); Kliogest (5,7 mmol.l⁻¹); Novofem (5,7 mmol.l⁻¹); Gynovel (5,6 mmol.l⁻¹); Femoston (5,8 mmol.l⁻¹); Estrofem (5,4 mmol.l⁻¹); všetky v sérovej koncentrácii nad 5 mmol.l⁻¹.

Priemerné hodnoty koncentrácie bilirubínu sa v sledovanom súbore javili v norme pri užívaní všetkých zástupcov HST. Fyziologická hladina do 20 μmol.l⁻¹ bola udržiavaná u každej z pacientok.

Priemerné hodnoty aktivity AST boli rovnako ako ALT v intervale fyziologických hodnôt (do 0,6 μkat.l⁻¹ pre AST, resp. od 0,1 μkat.l⁻¹ do 0,6 μkat.l⁻¹ pri ALT), a to pri všetkých liekoch. V prípade protrombínového času (75 – 115 s), fibrinogénu (1,6 – 4,4 g.l⁻¹) a hodnoty INR (0,86 – 1,20) nedošlo k zmene mimo fyziologické hodnoty ani pri jednom z užívaných preparátov.

Tabuľka 3 dokumentuje priemerné hematologické parametre u sledovaných pacientok. Hematologické parametre sa pri užívaní ani jedného HST preparátu nevychýlili z povolených fyziologických intervalov.

Hoci všetky priemerné hodnoty hematologických a hemokoagulačných parametrov uvedené v tabuľke 3 sa nachádzajú vo fyziologických normách, v prípade protrombínu a fibrinogénu boli mierne zvýšené pri preparáte Actiwell (u 2 pacientok – 4,76 a 4,69 g.l⁻¹); Femoston (u 1 pacientky – 4,63 g.l⁻¹) a pri lieku Novofem (u 1 pacientky – 4,41 g.l⁻¹).

DISKUSIA

Regresia pohlavných funkcií je nezvratný proces. Toto starnutie a s ním spojená znížená kvalita života by sa neoznačovala za klinický problém ľudstva, ak by sa nedoživalo vysokého veku. Z farmakoeconomického hľadiska sa metódy, ako napr. Analýza nákladovej efektívnosti (Cost effectiveness analysis – CEA) zaoberajú zlepšovaním kvality života v starnúcej populácii aj prostredníctvom lepšieho pochopenia klimaktéria. Podľa Haneya a kol. (1986) je klimaktérium obdobie, ktoré je charakterizované množstvom navzájom sa líšiacich špecifik.

Zmeny, ktoré nastávajú počas postreprodukčného obdobia majú za následok vznik osteoporózy, poruchy nastavovacieho bodu vazomotoriky vyvolávajú návaly, dochádza k narušeniu kognitívnych funkcií, poruchám spánku a dystrofii CNS (Martinický a kol., 2014). S týmto tvrdením sa zhoduje aj naša štúdia, ktorá potvrdzuje všetky sprievodné prejavy klimaktéria, kvôli ktorým sa pacientkam nasadzovala HST. Naše pacientky sa ale zväčša sťažovali na návaly tepla, nespavosť a nervozitu.

Podľa výsledkov biochemického vyšetrenia krvi sa u pacientok s predpísanou HST objavili problémy s cholesterolom, ktorého hladiny boli nad normu takmer pri všetkých použitých preparátoch okrem liekov Angeliq a Trisequens. Čo sa týka markeru CA 125, ten bol prevažne v norme okrem pacientky užívajúcej Novofem, kde hodnota CA 125 dosiahla 125,17 kIU.l⁻¹.

Obavy z používania HST vyplývajú najmä z možných nežiaducich účinkov. Podľa štúdie

Iniciatívy za zdravie žien (Women's Health Initiative – WHI) sa so samostatným estrogénom vs. placebo pozorovali nasledovné výsledky: fraktúry 503 vs. 724, karcinóm prsníka 94 vs. 124, tromboembolická choroba 101 vs. 78, náhla cievna mozgová príhoda 158 vs. 118 a koronárna choroba srdca 177 vs. 199. Podľa odporúčaní Medzinárodnej spoločnosti pre menopauzu (International Menopause Society – IMS) sa ženy mladšie ako 60 rokov nemajú čoho obávať, keďže estrogén je bežne inkorporovaný do klinických postupov pre ženy v menopauze. Podľa IMS estrogénová HST znižuje riziko rakoviny prsníka, karcinómu hrubého čreva, ochorenia srdca, fraktúr kostí. Bezpečnosť HST závisí od veku, hlavne pre ženy mladšie ako 60 rokov. Ak sa začne s liečbou skoro po menopauze a je indikovaná na konkrétnu indikáciu, riziká sú minimálne (Martinický a kol., 2014). Zvýšené hodnoty fibrinogénu a protrombínového času u 4 pacientok možno dať do súvisu s potenciálnym nábehom na kardiovaskulárne alebo tromboembolické príhody, avšak našťastie sa ani u jednej pacientky nášho súboru neobjavili tieto komplikácie, a to aj napriek zvýšeným hodnotám FBG a PT (Activelle – 2 pacientky, Femoston – 2 pacientky, Kliogest a Novofem – po 1 pacientke).

V našej štúdii sa pacientkam nasadzovali dané preparáty v najnižších dostupných dávkach, v prípade nedostatočnej odpovede im bolo liečivo zvyšované a titrované postupne. Riziko karcinómu nebolo zaznamenané, okrem jednej pacientky, ktorej bolo vyšetrenie markera CA 125 navrhnuté z dôvodu rodinnej anamnézy.

Pacientky, ktoré trpia počas prechodu hypercholesterolémiou v podobe zvýšených hladín lipoproteínu s nízkou hustotou (LDL) by mali byť liečené pomocou estrogénov a statínov. Potvrdil sa podobný účinok redukcie kardiovaskulárneho rizika v skupine s terapiou samostatne estrogénmi a samostatne medikamentmi určenými na redukciiu lipoproteínov v krvi (Borovský a kol., 2016). Keďže sme sa zameriavali len na zmeny krvných parametrov, a pre nedostatok informácií o našom

súbore, nemohli sme dospieť k záveru, že HST upravuje hypercholesterolémiu. Naopak, u väčšiny pacientok došlo k zvýšeným hodnotám celkového cholesterolu, avšak nevieme, či dané pacientky užívali aj spomínané statíny.

U nami sledovaných žien sa objavila hyperglykémia niekoľko rokov za sebou alebo jednorazovo v niekoľkých prípadoch (5 z 21). Je otázne, či tieto výkyvy hladín spôsobila práve HST, nakoľko je málo pravdepodobné, že tento stav bol vyvolaný samotnými hormónmi. Medzi 21 vzorkami sme nemali ani jednu, ktorá by trpela diabetom, alebo by sa u nej *diabetes mellitus* II. typu rozvinul počas liečby. S diabetom je úzko spojená inzulínová rezistencia, a s ňou zasa súvisí zvýšenie viscerálneho tuku v postmenopauze.

Pri hodnotení glykémie a inzulínémie u diabetických žien užívajúcich HST počas 12 mesiacov bolo zistené, že u nich došlo k štatisticky významnému poklesu glukózy a inzulínémie oproti diabetičkám, ktoré HST neužívali (Bitoska a kol., 2016). Podľa inej štúdie, ženy, ktoré trpeli cukrovkou typu II, mali riziko kardiovaskulárnych chorôb trikrát vyššie a riziko zhubných malignít šesťkrát vyššie oproti kontrolnej skupine. Z malignít ako malignity prsníkov, ovárií a endometria bolo riziko vyššie až desaťnásobne. Pozitívny účinok HST voči metabolizmu glukózy je výhodou pre zachovanie zdravia ženy po menopauze. Čím je nástup menopauzy skorší, tým sa zvyšuje aj riziko kardiovaskulárnych ochorení, pričom už existujúce metabolické ochorenia alebo samotný metabolický syndróm toto riziko ešte zvyšuje (Pereira a kol., 2015).

ZÁVER

Klimakterický syndróm patrí prirodzene k životu každej ženy. V akej miere ohrozuje alebo znižuje kvalitu života, záleží od viacerých faktorov, ktoré nemožno prirodzene zvrátiť. Pre zmiernenie nepríjemností, ako sú napr. volungy a nespavosť, ktoré súvisia s nástupom tohto obdobia je možné

bojovať, či už nasadením fyto terapie, alternatívnej terapie alebo HST. Tá by mala byť individuálne zhodnotená ešte predtým ako sa vôbec začne užívať danou pacientkou. Lekár by mal objektívne zhodnotiť benefit a riziko liečby, preto je nevyhnutné poznať a disponovať údajmi pacienta, ako je napr. jeho rodinná anamnéza a predispozícia voči určitým diagnózam. V minulosti prevládali názory nasadzovať HST okamžite pri nástupe klimaktéria za účelom prevencie osteoporózy alebo ochorení KVS, no v dnešnej dobe sa dá voči týmto ochoreniam bojovať inými spôsobmi, ktoré sú v rukách endokrinológov alebo ortopédov oveľa bezpečnejším spôsobom. HST sa nasadzuje v nevyhnutných prípadoch silne rozvinutého klimakterického syndrómu, kedy je kvalita života ženy v medziach s jej psychickým stavom a vtedy, keď je pre ženu nereálne fungovať bez problémov ako v čase pred nástupom klimaktéria. S týmto súvisí aj negatívny dopad na osobný a pracovný život pacientok.

Naším pozorovaním sme zhodnotili, že vybrané preparáty HST rapídne neovplyvnili sledované biochemické a hematologické atribúty s menšou výnimkou, ktorá sa týkala mierneho zvýšenia hladín glykémie pri preparáte Femoston a celkového cholesterolu pri preparátoch Actiwell, Kliogest, Novofem, Gynovel, Femoston a Estrofem. Tieto odchýlky nemožno pripisovať len HST, nakoľko so stúpajúcim vekom pacientky sa objavujú aj iné komorbidity ako je ateroskleróza. Najevidentnejšie zmeny biochemických parametrov pri užívaní HST sa v tejto štúdii ukázali pri zvýšených hladinách glykémie a celkového cholesterolu.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Bitoska, I., Krstevska, B., Milenkovic, T., Subeska-Stratrova, S., Petrovski, G., Mishevska, S. J., Ahmeti, I., Todorova, B.: Effects of hormone replacement therapy on insulin resistance in postmenopausal diabetic women. *Macedonian journal of medical sciences*, 2016, 4 (1), 83 – 88.

Borovský, M., Krištúfková A.: Hormonálna substitučná liečba – porovnanie prínosu a rizika v komplikovaných prípadoch [Hormone replacement therapy – benefit-risk comparison in complicated cases]. *Lekársky obzor*, 2012, 61 (2 – 3), 56 – 61.

Borovský, M., Krištúfková A.: Hormonálna substitučná liečba [Hormone replacement therapy]. In *Gynekologická endokrinológia*. Bratislava: Herba, 2016, 231 – 239.

Burger, H. G., Dudley, E. C., Robertson, D. M., Dennerstein, L.: *Hormonal changes in the menopause transition*. Australia: Prince Henry's Institute of Medical Research at Monash Medical Centre, Clayton, Victoria, Office for Gender and Health, Royal Melbourne Hospital, Parkville, Victoria, 2002. 257 – 275.

Fausser, B. C. J. M., Genazzani, A. R.: Cardiovascular prevention at the menopausal transition: Role of hormonal therapies. *Frontiers in Gynecological Endocrinology*, 2015, 2, 157 – 165.

Haney, A. F.: The „physiology“ of the climacterium. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 1986, 20 (2), 397 – 406. <https://europepmc.org/article/med/3087669>. Accessed May 28, 2021.

Martinický, D.: Sprievodca starostlivosťou v období menopauzy [Guide to menopausal care]. *Lekárske listy, Gynekológia, urológia, nefrológia*, 2014, 7 (1), 8 – 10.

Pereira, R., Casey, B., Swibas, T. A., Erickson, C. B., Wolfe, P., Van Pelt, R. E.: Timing estradiol treatment after menopause may determine benefit of harm to insuline action. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2015, 100 (12), 4456 – 4462.



FARMAKOLOGICKÁ TERAPIA ACNE VULGARIS

PHARMACOLOGICAL THERAPY OF ACNE VULGARIS

Zavodančíková, Katarína; Maková, Zuzana

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

zuzana.makova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Akné (*acne vulgaris*) je kožné ochorenie postihujúce mazové žľazy a vlasové folikuly, ktoré trápí nielen adolescentov, ale častokrát pretrváva do dospelosti a v mnohých prípadoch veľmi negatívne vplýva na kvalitu života. Prípravky používané pri terapii *acne vulgaris* obsahujú látky z rôznych farmakologických skupín, ktoré odlišným spôsobom zasahujú priamo do patogenézy ochorenia. Cieľom štúdie bolo priblížiť vznik a vývoj aknózných stavov a spracovať získané údaje o farmakologických terapeutických postupoch na príklade konkrétnych prípadov. Použitie údajov boli analyzované pomocou zdravotnej dokumentácie pacientov na základe spolupráce s dermatovenerologickou ambulanciou v Námestove. Prioritná pozornosť bola venovaná ťažkým formám ochorenia, pri ktorých je po predchádzajúcej neúspešnej lokálnej terapii nevyhnutná terapia systémová,

v podobe perorálneho izotretinoínu. Vzhľadom na variabilnosť priebehu aknózneho ochorenia, systémová terapia prebieha individuálne. Napriek nežiaducim účinkom, ktoré môže vyvolať, je v ťažkých prípadoch nenahraditeľná. Nežiaduce účinky je možné úpravou dávky liečiva minimalizovať až eliminovať. Je však nevyhnutné, aby počas celého liečebného procesu bol pacient pod lekárskeho dohľadom.

Kľúčové slová: *acne vulgaris*; izotretinoín; nežiaduce účinky; terapia akné

ABSTRACT

Acne (*acne vulgaris*) is a skin disease affecting the sebaceous glands and hair follicles that not only afflicts adolescents, but often persists into adulthood and in many cases has a very negative impact on quality of life. The preparations used in the treatment of *acne vulgaris* contain

substances from different pharmacological groups, which in different ways directly affect the pathogenesis of the disease. The aim of the study was to approach the origin and development of acne conditions and to process the obtained data about pharmacological therapeutic procedures on the example of specific cases. The used data were analyzed with the help of medical documentation of patients on the basis of cooperation with the dermatovenerological outpatient clinic in Námestovo. Priority was given to severe forms of the disease, in which systemic therapy, in the form of oral isotretinoin, is necessary after a previous unsuccessful local therapy. Due to the variability of the course of acne disease, systemic therapy is performed individually. Despite the side effects it can cause, it is irreplaceable in severe cases. Adverse effects can be minimized or eliminated by adjusting the dose of the drug. However, it is essential that the patient be under medical supervision throughout the treatment process.

Key words: acne therapy; *acne vulgaris*; adverse effects; isotretinoin

ÚVOD

Akné (*acne vulgaris*) je chronické zápalové ochorenie kože postihujúce mazové žľazy a vlasové folikuly (pilosebaceózna jednotka), ktoré sa prejavuje zvýšenou tvorbou mazu, nezápalovými (komedóny) a zápalovými (papuly, pustuly, noduly a cysty) léziami (najmä oblasť tváre, hornej časti hrudníka, ramien a chrbta) a ktorým celosvetovo trpí 9,4 % populácie. V rebríčku svetových chôrob je na 8. mieste. Toto ochorenie postihuje 85 % adolescentov, ale môže pretrvávajúť až do dospelosti. Vo veku 21 – 23 rokov postupne ochorenie ustupuje, ale stretávame sa aj s tým, že pretrvá

až do 25 roku (15 %), predovšetkým u žien, niekedy aj od 30 – 39 (43 %), až do 40 – 49 roku (3 – 5 %) (Nevoralová, Rulcová, Benáková, 2016; O'Neill a Gallo, 2018).

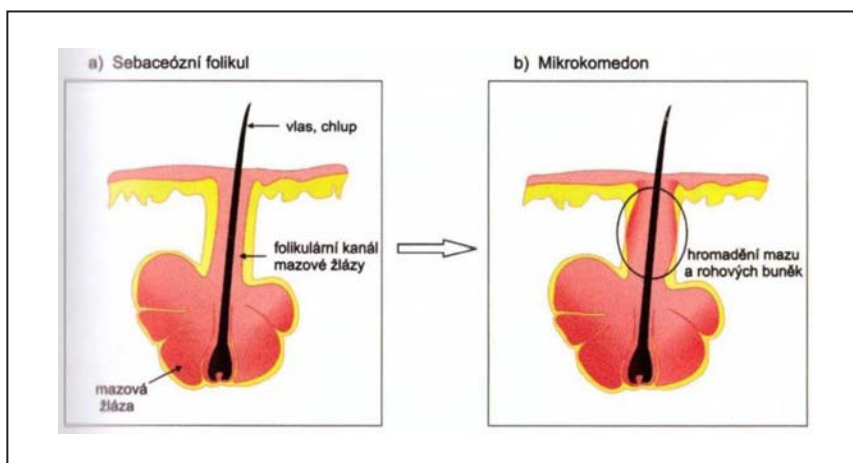
Akné je multifaktoriálne ochorenie a na jeho vzniku a vývoji sa podieľa mnoho exogénnych a endogénnych faktorov: znečistené ovzdušie, strava, stres, hyperseborea spôsobená androgénmi, hyperkeratinizácia, bakteriálna kolonizácia *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*), zápalová reakcia, obštrukcia mazových folikulov. Výsledkom je vytvorenie zápalových aknózných lézií a komedónov. U každého jedinca sa prejavuje s inou závažnosťou, taktiež existuje viacero foriem akné a preto neexistuje jednotná a striktná terapia (Julie a Harper, 2019; Sachdeva a kol., 2020). Aj keď akné nepatrí medzi život ohrozujúce ochorenie, negatívne vplýva na psychiku pacienta a znižuje kvalitu jeho života (depresia, úzkosť, pocit menejcennosti, sebadeštrukcia).

Začiatočným prejavom ochorenia je subklinický zápal a tvorba mikrokomedónov. Nadprodukciou korneocytov, ktoré sú prítomné v epitelovej výstelke pilosebaceózne jednotky, dochádza k prieniku korneocytov do vývodu, keratínovej blokáde a hyperprodukcii mazu. Vytvorí sa mikrokomedón a následné zápalové lézie (Klimas, 2016). Mikrokomedón predstavuje prvú patologickú zmenu, ktorá je zodpovedná za ďalší priebeh prejavov akné. Je to prekursor ostatných patologických aknózných lézií, charakterizovaný hyperproliferáciou folikulárneho epitelu. Proces komedogenézy začína v sebaceózných folikuloch (viď obr. 1).

Mikrokomedón prechádza do viditeľnej, nezápalovej lézie. V prípade, že proliferujúce baktérie *C. acnes* uvoľňujú prozápalové mediátory, vzniká inflamovaná lézia. Nezápalová lézia existuje vo forme otvoreného alebo uzavretého komedónu (Rasochová, 2010).

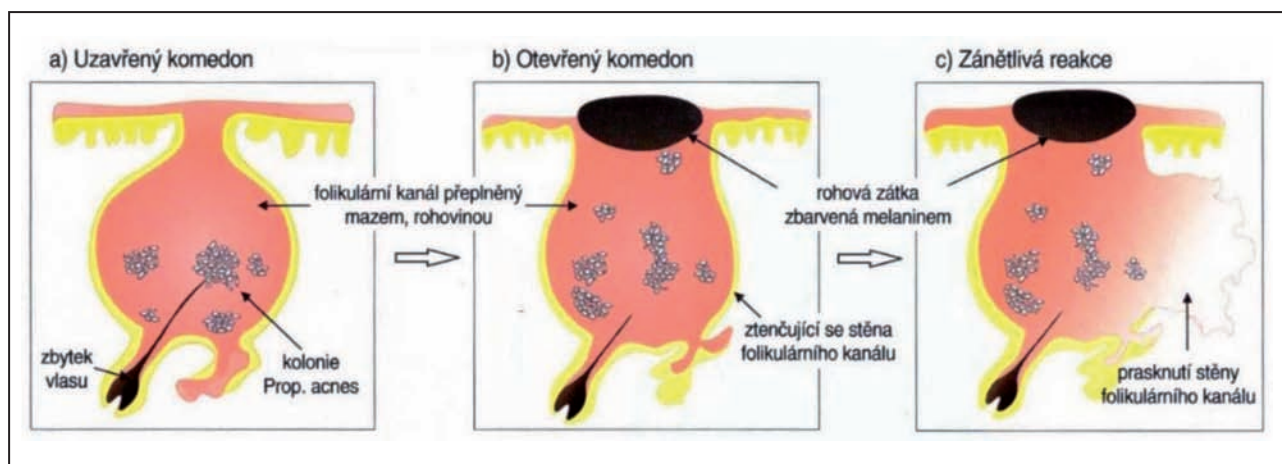
Komedóny vznikajú obštrukciou folikulov odumretými bunkami kože a rozdeľujú sa na otvorené (čierne bodky), uzavreté (biele bodky) a fistulujúce (viď obr. 2, 3). Pre uzavreté komedóny

Obr. 1: Vznik mikrokomedónu



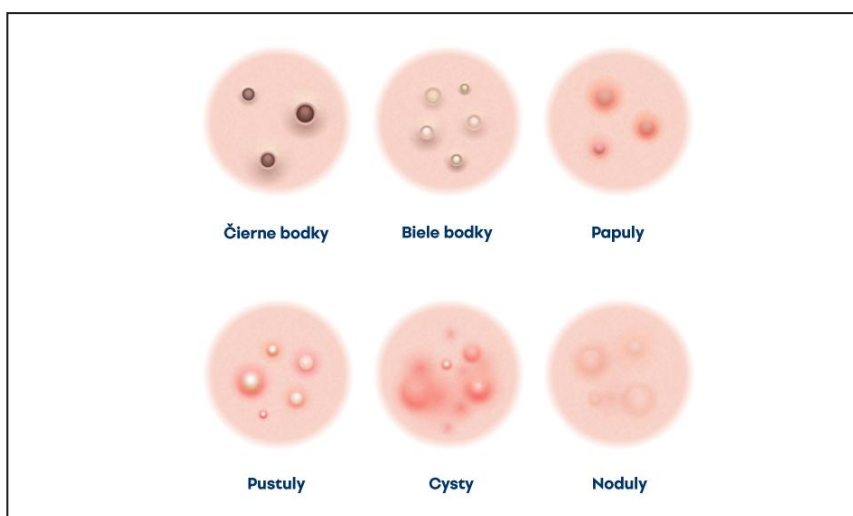
Zdroj: Rulcová, 2005

Obr. 2: Vznik komedónu a zápalu



Zdroj: Rulcová, 2005

Obr. 3: Aknézne lézie



Zdroj: Avector/Shutterstock.com

je charakteristický rozšírený sebaceózný vývod, jeho okraj nie je viditeľný voľným okom. Otvorené komedóny sa vyvíjajú až po niekoľkých týždňoch. Čierne sfarbenie uzatvorených komedónov je spôsobené oxidáciou kožného pigmentu melanínu. Výskyt otvorených a uzavretých komedónov je prvotným prejavom akné.

Medzi zápalové lézie patria papuly, pustuly, v závažných prípadoch sú to jazvy, cysty, noduly. Papuly sa vyznačujú prítomnosťou lymfocytov, rôznou veľkosťou, rôznym stupňom zápalu a rôznym stupňom indurácie. V pustulách sú prítomné polymorfonukleárne bunky s obsahom lysozomálnych enzýmov, ktoré sú účinnejšie v resorpcii zápalu oproti lymfocytom papúl. Noduly sú veľmi bolestivé, uložené hlboko, vyprázdňujú sa na povrch. Lokalizácia je na tvári, brade, chrbte a podsánkovej oblasti. Cysty sa vytvárajú zriedka, prechádzajú na povrch pokožky, navzájom sa prepájajú (viď obr. 3). Trvajú niekoľko rokov a nemajú tendenciu sa samovoľne hojiť.

Jazvy vznikajú z nodulocystických lézií usadených hlboko v *dermis*, ale aj povrchových zapálených lézií. Jazvy môžu byť atrofické, hypertrofické, na úrovni kože alebo keloidné. Hypertrofické jazvy sú presne ohraničené, neprechádzajú za hranicu poškodeného tkaniva kože, sú tvrdé a hladké, ich sfarbenie je ružovkasté, prípadne sú zhodné so sfarbením kože. Keloidné jazvy postihujú hornú časť hrudníka. Ich vývoj je rýchly, dokážu vzniknúť už za 12 týždňov. Môžu byť prítomné počas celého života alebo samovoľne vymiznú (Rasochová, 2010; Nevoralová, Rulcová, Benáková, 2016).

V súčasnej dobe neexistuje univerzálny systém, ktorý by klasifikoval *acne vulgaris*. Je to predovšetkým z dôvodu veľkej rozmanitosti klinických prejavov akné. Aj napriek mnohým existujúcim hodnotiacim metódam nebola žiadna prijatá za prioritnú, preto nie je ľahké akné vizuálne hodnotiť. Veľa metód nie je platných a z tohto dôvodu je možné vzájomné porovnávanie výsledkov. K správne hodnoteniu akné dopomáha príprava pleti pred diagnostikou, vhodná poloha pacienta, správ-

ne osvetlenie, prípadné pridanie palpačnej techniky k vizuálnej kontrole (Nast a kol., 2012; Jarrett, 2019).

Aj keď pri kategorizácii akné je opísaných veľa metód, prevláda v klasifikácii Leedsa technika. Na stanovenie počtu lézií a určenia stupňa závažnosti akné v oblasti hrudníka, tváre a chrbta sa vykonávajú dve merania. Forma akné sa hodnotí palpačne a taktiež vizuálne, prostredníctvom ilustrácií, ktoré znázorňujú jednotlivé formy akné. Sčítacia metóda zahŕňa počítanie zápalových a nezápalových lézií, papuly a pustuly na povrchu, hlboké zápalové lézie. Pri vyhodnotení sa pacient zaradi do stupňa od 0 (bez akné) do 10 (veľmi ťažké akné). Stupeň 0 až 2 sa ďalej delí po intervaloch 0,25. Pacienti, ktorí dosiahli stupne 0,25 – 1,5 majú minimálne prejavy akné, vyššie výsledky poukazujú na klinicky viditeľné akné (Rasochová, 2010; Nast a kol., 2012; Nevoralová, Rulcová, Benáková, 2016).

Ďalšou rozšírenou klasifikačnou metódou je delenie akné na ľahkú, stredne ťažkú a ťažkú formu. Vyhodnocuje sa podľa počtu zápalových lézií a neprítomnosti nodulocystických útvarov. Pacient, ktorý má veľké množstvo komedónov na tvári môže byť na tom lepšie ako pacient s pár nodulami.

Európska skupina pre tvorbu doporučených postupov (EU Guidelines Group) delí akné do 4 skupín:

- Komedonické akné – výskyt komedónu, najviac 1 papula
- Ľahké – až stredne závažné papulopustulózne akné – výskyt málo (ľahké) až mnoho (stredne) nezápalových lézií, nie viac ako 20 papúl
- Ťažké papulopustulózne akné, stredne závažné nodulocystické akné – výskyt nezápalových lézií v akomkoľvek počte, viac ako 21 papúl, málo nodúl
- Závažné nodulocystické akné, konglobátne akné – prítomné sú cysty, absedujúce noduly, zápalové infiltráty

Obr. 4: Komedonické akné



Zdroj: Nevoralová a kol., 2016

Obr. 5: Papulopustulózne akné



Zdroj: Nevoralová a kol., 2016

Z klinického hľadiska sa akné rozdeľuje na komedonické, papulopustulózne, nodulocystické, konglobátne. Komedonické akné (*acne comedonica*) je nezápalová, najľahšia forma akné (viď obr. 4). Klinický obraz predstavujú uzavreté a otvorené komedóny, zápalový proces nie je výrazný. Podľa závažnosti sa rozdeľuje na štyri stupne:

- I. Menej ako 10 komedónov na polovici tváre
- II. 10 až 25 komedónov na polovici tváre
- III. 26 až 50 komedónov na polovici tváre
- IV. Viac ako 50 komedónov na polovici tváre.

Komedonické akné sa objavuje v období puberty, väčšia časť pacientov trpiacich touto formou akné patrí do I. a II. stupňa. Dospievajúci pacienti vo vyššom veku majú tendenciu k väčšej tvorbe komedónov, preto môžu trpieť stupňom III. až IV. Lokalizácia akné je v oblasti čela, na tvári a brade. Má tendenciu vymiznúť, ale aj schopnosť rozvíjať sa do závažnejších foriem (Nevoralová, 2012b; Nevoralová, Rulcová, Benáková, 2016).

Papulopustulózne akné (*acne papulopustulosa*) patrí medzi ťažšie priebehajúcu, zápalovú formu

Obr. 6: Konglobátne akné



Zdroj: Nevoralová a kol., 2016

Obr. 7: *Acne fulminans*



Zdroj: Nevoralová a kol., 2016

akné, kde sú prítomné okrem komedónov aj papuly a papulopustuly (vid' obr. 5). Podľa počtu papúl a papulopustúl sa rozdeľuje na štyri stupne:

- I. 6 až 10 papúl, prípadne papulopustul na polovici tváre
- II. 10 až 20 papúl, alebo papulopustul na polovici tváre
- III. 21 až 30 papúl/papulopustul na polovici tváre
- IV. 30 a viac papúl/papulopustul na polovici tváre.

Veľmi dôležité je zahájiť včasnú liečbu, pretože výsledkom sú vznikajúce jazvičky v menšom alebo väčšom počte.

Nodulocystické akné má v klinickom obraze zastúpené cysty a noduly v počte menšom ako 5 na polovici tváre (Nevoralová, Rulcová, Benáková, 2016).

Konglobátne akné (*acne conglobate*) je chronická závažná forma akné. Vzniká na podklade ťažšieho priebehu akné, ale môže sa vyvinúť aj z bežnej formy akné (vid' obr. 6). Lézie sa nachádzajú okrem

tváre na pleciach a drieku. Klinický obraz tvoria hlboké cysty, zápalové infiltráty, hnisavé abscesy. Ťažký priebeh ochorenia, ktorý trvá aj niekoľko rokov, zanecháva rozsiahle hypertrofické a keloidné jazvy s výrazným fialovočerveným zafarbením (Saint-Jean a Dreno, 2016).

K najzávažnejšej forme akné patrí *acne fulminans* (viď obr. 7), vytvára sa zriedka, väčšinou u dospievajúcich mužov, ktorí trpia konglobátnym akné a môže ho vyvolať aj perorálny izotretinoín v rámci systémovej terapie. Typickým znakom *acne fulminans* sú hemoragické nekrózy v oblasti tváre, krku a chrbta. V priebehu ochorenia môže dôjsť k leukocytóze, horúčke, opuchu a bolesti iliosakrálnych, kolenných a bedrových kĺbov. Vo výnimočnom prípade sa vyskytuje zvýšený počet leukocytov a dochádza k ochoreniam obličiek. Komplikáciu predstavuje vznik aseptických nekroz kostí (Rasochová, 2010; Saint-Jean a Dreno, 2016).

Hlavným cieľom terapie je odstránenie prítomných nezápalových komedónov, zápalových lézií (papuly, pustuly, noduly, cysty) a súčasne tak zabrániť vzniku nových zápalových ložísk. Podstatným krokom je začať s liečbou už pri prvotných prejavoch tvorby komedónov. Liečba sa zameriava na redukciiu produkcie kožného mazu, elimináciu *C. acnes*, úpravu hyperkeratózy v pilosebaceózných folikuloch.

Lokálna liečba je používaná pri miernom až stredne ťažkom akné, ale môže sa využiť aj ako doplnková liečba pri komplikovaných formách akné. Má význam v preventívnej a udržovacej fáze. K liečivám používaným v lokálnej terapii patria retinoidy, kyselina azaelová, benzoylperoxid, antibiotiká (ATB) (viď tab. 1). Retinoidy a kyselina azaelová dokážu svojím pôsobením na mikrokomedóny, komedóny a mierne zápalové lézie zabrániť návratu ochorenia po vyliečení. Zatiaľ čo retinoidy sú počas gravidity a dojčenia kontraindikované, kyselina azaelová, naopak, je v týchto životných fázach vhodná na liečbu akné. Benzoylperoxid má antibakteriálne účinky proti *C. acnes*, tlmí zápal a keratolyticky účinkuje na otvorené aj zatvorené komedóny. Na rozdiel od antibiotík nevyvoláva bakteriálnu rezistenciu.

V liečbe sa kombinuje s kyselinou azelaovou a adapalénom, kombináciou s lokálnymi antibiotikami sa zvýši efektívnosť liečby. Neodporúča sa používať v monoterapii. Na začiatku liečby podávame benzoylperoxid v nízkych koncentráciách, ktoré postupne zvyšujeme. Benzoylperoxid môže vyvolať alergickú reakciu, pálenie a začervenanie pokožky. Je kontraindikovaný v gravidite a dojčení. Môže sa použiť aj pri udržovacej terapii po ukončení liečby lokálnymi retinoidmi (Plzáková, 2013; Vantuchová, 2015; Kozárová, 2020). Liečba lokálnymi antibiotikami je zahájená u zápalových foriem akné. Znižujú počet baktérií *Cutibacterium acnes* a *Staphylococcus epidermis* v sebaceóznom folikule mazovej žľazy. Nepôsobia komedolyticky, ale vyznačujú sa antiflogistickým účinkom. Nevýhodou je vznik bakteriálnej rezistencie, ktorej zabránime kombináciou s retinoidmi, kyselinou azelaovou alebo benzylperoxidom. Vhodná je kombinácia s hormonálnou antikoncepciou. Neodporúča sa kombinácia lokálneho antibiotika s celkovo podávanými antibiotikami pre zvyšujúce sa riziko mikrobiálnej rezistencie. Celková dĺžka liečby by nemala presiahnuť 3 mesiace. K používaným antibiotikám patria erytromycín, klindamycín, kyselina fusidová. Ako magistraliter sa používajú v podobe roztokov, masť, pást tertacyklíny a chlórarnfenikol. Výsledok lokálnej liečby sa dostaví približne po 6 týždňoch, skoršie ukončenie či zmena liečby sa neodporúča (Nevoralová, Rulcová, Benáková, 2016; Macháčková, 2018).

Systémová terapia je indikovaná u ťažkých až veľmi ťažkých foriem akné, prípadne u stredne ťažkých, ktoré neboli úspešne liečené lokálnou kombinovanou liečbou. Medzi hlavných zástupcov systémovej liečby patria celkovo podávané antibiotiká, izotretinoín a u žien sa využíva kombinovaná hormonálna antikoncepcia (viď tab. 2). Výsledný efekt je viditeľný po mesiaci používania (ATB, izotretinoín), pri hormonálnej antikoncepcii až po niekoľkých mesiacoch. V priebehu tejto liečby sa vyskytujú nežiaduce účinky, preto je dôležité na to pacientov upozorniť

Tab. 1: Lokálne terapeutiká

Retinoidy	Tretinoín Izotretinoín Adapalén Tazarotén
Kyselina azelaová	
Benzoylperoxid	
Antibiotiká	

Tab. 2: Systémové (celkové) terapeutiká

Antibiotiká	Tetracyklínové (doxycyklín, minocyklín) Makrolidové (azitromycín, klindamycín)
Izotretinoín	
Hormonálna antikoncepcia	

(Nevoralová, 2013).

Tetracyklínové antibiotiká sú lipofilné, čo umožňuje ich rýchlejšiu penetráciu do oblastí, ktoré sú bohaté na lipidy (mikrokomedón, sebaceózne folikuly), inhibujú bakteriálnu lipázu účinnejšie ako makrolidy, pôsobia bakteriostaticky, fotosenzibilizujúco, nie sú vhodné pri liečbe počas slnečného obdobia a nepoužívajú sa u žien v období dojčenia a tehotenstva, ani u detí do 8 rokov (Nevoralová, Rulcová, Benáková, 2016; Kozárová, 2020).

Medzi lieky 2. voľby patria makrolidové antibiotiká a používajú sa pri pacientoch, u ktorých nemôže byť zahájená liečba tetracyklínom. Azitromycín účinkuje nielen na baktérie *C. acnes*, ale aj sekundárne patogény (streptokoky, stafylokoky, anaeróby) a pôsobí imunomodulačne. Klindamycín účinkuje na grampozitívne aj gramnegatívne anaeróbne mikróby. Pri dlhodobom užívaní môžu nastať nežiaduce účinky – gastrointestinálne ťažkosti, pseudomembranózna kolitída a *diabetes mellitus* (Nevoralová, 2013).

Perorálny izotretinoín je určený k liečbe ťažkých foriem akné (závažné papulopustulózne, konglobátne a nodulocystické), prípadne miernejších foriem akné, kedy predchádzajúca terapia bola neúčinná (lokálne prípravky, perorálne antibiotiká).

Princípom hormonálnej terapie je potlačenie vplyvu androgénov na mazové žľazy. Táto liečba je určená ženám so závažnou formou akné spôsobenou nadbytkom androgénov (hirsutizmus, menštruačné poruchy) a u ťažkých foriem akné. V praxi sa používajú perorálne kontraceptíva s obsahom antiandro-

génu. Antiandrogény tlmia účinky androgénov a estrogénu (Buchvald, 2005; Elsaie, 2016).

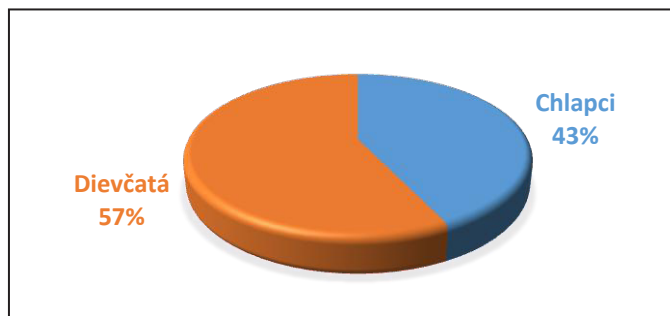
MATERIÁL A METODIKA

Údaje v predloženej štúdii boli analyzované pomocou zdravotnej dokumentácie pacientov v spolupráci s dermatovenerologickou ambulanciou v Námestove a pomocou dostupných literárnych zdrojov. Zamerali sme sa na opis ťažkých foriem akné, pri ktorých je po neúspešnej lokálnej terapii naordinovaná systémová terapia, konkrétne perorálny izotretinoín. Vzhľadom na variabilnosť priebehu ochorenia nebolo možné vytvoriť skupiny pacientov s rovnakými symptómami a preto boli terapeutické postupy prezentované pomocou piatich klinických prípadov ťažkých foriem ochorenia. Pri spracovaní zdravotnej dokumentácie pacientov všetky uvedené informácie boli použité v súlade s platnou legislatívou Slovenskej republiky a s dodržaním etických noriem a ochrany osobných údajov.

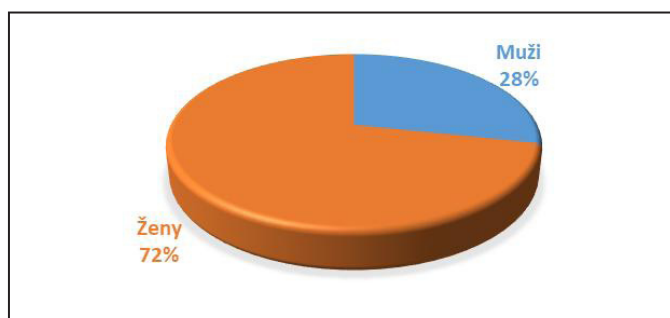
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Akné patrí medzi najrozšírenejšie dermatologické ochorenie, ktoré zasahuje pilosebaceóznou jednotku. Výskyt akné sa za posledné roky pozoroval u mladších pacientov, v dôsledku skoršieho nástupu puberty. Častejšie sa vyskytuje u dievčat vo veku od 12 rokov, ale aj u chlapcov, a to vo veku od 15 rokov. Vo väčšine prípadov akné vymizne do začiat-

Graf 1: Počet liečených pacientov (0 – 18) v roku 2017



Graf 2: Počet liečených pacientov (nad 19 rokov) v roku 2017



ku dvadsiateho roku života pacienta, ale môže pretrvávať až do dospelosti. S touto podobou akné sa stretávame častejšie u žien. Epidemiologický prieskum na Slovensku z roku 2017 potvrdzuje častosť výskytu ochorenia u dievčat a žien a tiež z neho vyplýva, že počet pacientov do a nad 19 rokov je takmer identický (viď graf 1, graf 2).

Celkový počet vyšetrených osôb s diagnózou akné vo veku od 0 do 18 rokov bol 43 159, z toho 18 470 chlapcov a 24 688 dievčat.

Pacientov trpiacich akné nad 19 rokov bolo 45 438, z toho 12 897 mužov a 32 541 žien.

Medzi vybranými klinickými prípadmi boli pacienti (1. prípad – 22 ročná ♀, papulopustulózne akné; 2. prípad – 17 ročný ♂, papulopustulózne akné so sklonom k zjazveniu; 3. prípad – 38-ročná ♀, papulopustulózne akné; 4. prípad – 17-ročná ♀, papulopustulózne akné; 5. prípad – 16-ročný ♂,

konglobátne akné), ktorí trpeli ťažkými formami akné. Začiatok ich terapie spočíval v absolvovaní lokálnej terapie, ktorá však nevedla k ústupu akné a preto boli pacienti orientovaní na perorálnu systémovú liečbu. Systémová terapia je preferovanou voľbou pri liečbe zápalových lézií. Touto liečbou je možné znížiť psychickú záťaž pacienta, depresiu a predísť sociálnym rozpakom (Nevoralová, 2012b; Fox a kol., 2016; NCZI, 2019).

Pred zahájením celkovej terapie izotretinoínom pacienti absolvujú biochemické vyšetrenie zamerané na hepatálne (AST, ALT, GGT) a lipidové parametre (celkový cholesterol, TAG), a to aj po prvom mesiaci terapie a potom v trojmesačných intervaloch. Okrem toho je nevyhnutné dôkladne oboznámiť pacienta s priebehom liečby a nežiaducimi účinkami. Terapia izotretinoínom trvá priemerne 4 – 6 mesiacov. Efektívna liečba u sledovaných pacientov v

kazuistikách trvala o niečo dlhšie (9 – 24 mesiacov). Najdlhšiu dvojročnú terapiu podstúpila 38-ročná pacientka. V prípade neúspešnej terapie je totiž možné medikáciu predĺžiť (Martinásková a Vorčáková, 2017).

Terapia prebieha vždy pod dohľadom dermatológa. Veľkou výhodou izotretinoínu je, že ovplyvňuje takmer všetky etiologické faktory akné. Má protizápalový účinok (inhibícia rastu baktérii *C. acnes*), znižuje produkciu kožného mazu (v priebehu dvoch týždňov terapie o 70 – 90 %), obnovuje folikulárnu keratinizáciu (dochádza k vyprázdneniu komedónov a potlačeniu ich novotvorby). Na rozdiel od tretinoínu (kyselina all-trans retinová) má izotretinoín minimálnu alebo žiadnu schopnosť viazať sa na bunkové proteíny viažúce retinol alebo jadrové receptory kyseliny retínovej (RAR, RXR). Pôsobí ako proliečivo, ktoré sa intracelulárne mení na metabolity, ktoré sú agonisty pre RAR a RXR nukleárne receptory (Layton, 2009; Nevoralová, Rulcová, Benáková, 2016).

Počiatočná denná dávka pri liečbe izotretinoínom je $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ a ak pacient dávku toleruje, je možné jej zvýšenie na $1 \text{ mg.kg}^{-1}/\text{deň}$ v priebehu 16 až 24 týždňov. Odporúčaná kumulatívna dávka, ktorá zabezpečí, že nedôjde k recidíve, je 120 mg.kg^{-1} izotretinoínu na liečbu. Výpočet pre kumulatívnu dávku je celková denná dávka násobená počtom dní liečby a vydelená hmotnosťou pacienta (Kozárová, 2020).

U pacientok v prípadoch 1, 3 a 4, liečených perorálnym izotretinoínom, bolo nutné kontrolovať prípadnú graviditu. Pacientky sú pred zahájením liečby vždy oboznámené s nežiaducimi účinkami izotretinoínu, podpisujú informovaný súhlas s liečbou (Program prevencie tehotenstva). Pred začiatkom terapie musí byť výsledok dvoch tehotenských testov negatívny, zakaždým sa testy opakujú v mesačných intervaloch, po poslednej dávke lieku a aj po ukončení liečby. Ak by došlo k relapsu ochorenia a opätovnému nasadeniu izotretinoínu, musí byť medzi liečebnými cyklami najmenej polročná prestávka. U žien vo fertilnom veku je

potrebné zabezpečiť účinnú antikoncepciu vzhľadom k embryotoxícite izotretinoínu. Vyberie sa vhodný hormonálny prípravok, ktorý obsahuje antiandrogén (cyproterónacetát, dienogest, drospirenón). Antikoncepciu nasadzuje gynekológ mesiace pred začatím terapie (aby sa predišlo počatiu), v priebehu celej terapie a mesiac po skončení terapie, alebo aj dlhšie, ak si pacientka neželá otehotnieť. Zlepšenie kožných prejavov sa zvyčajne dostaví do 3 mesiacov od začiatku terapie (Bienová a Kučerová, 2008; Layton, 2009; Kozárová, 2020).

Systémová terapia sledovaných pacientov prebiehala individuálne. Bežné nežiaduce účinky závisia od dávky a sú tolerované úpravou dávky izotretinoínu alebo symptomatickou liečbou. Medzi vedľajšie účinky terapie izotretinoínom patria suché pery, suchosť pokožky a slizníc, erytém, chelitída (zápal pier), bolesť kĺbov a svalov, bolesti hlavy, epistaxa (krvácanie z nosa), fotosenzitivita (Layton, 2009). Chelitída vzniká ako odozva na efektívne vstrebávanie lieku. Objavuje sa v rámci užívania lieku po 2 – 3 týždňoch terapie (Bienová a Kučerová, 2008).

Všetkým našim vybraným pacientom bol predpísaný *p.o.* izotretinoín (Isotretinoin Actavis® 20 mg) v dennej dávke 40 mg/2 tablety ráno po jedle. U 17-ročného pacienta boli po mesiaci hepatálne parametre mierne zvýšené a objavili sa nežiaduce účinky ako suchosť pokožky, krvácanie z nosa, bolesť hlavy, na základe čoho mu bola indikovaná znížená dávka izotretinoínu (20 mg). U 38-ročnej pacientky bola liečba kombinovaná s hormonálnou liečbou a lokálnym antibiotikom z dôvodu neefektívneho výsledku. V závažných prípadoch pustulózneho alebo nodulocystického akné sa môže využiť kombinácia hormonálnej liečby a lokálneho ATB (Elsaie a kol., 2016). U 17-ročnej pacientky bola z dôvodu nežiaducich účinkov (bolesť hlavy, svalov, kĺbov, krvácanie z nosa) dávka znížená na polovicu, avšak napriek zníženej dávke nežiaduce účinky pretrvávali, preto bola liečba izotretinoínom ukončená a prešla na liečbu lokálnu. U 16-ročného pacienta s konglobovaným akné bol pre rozsiahle

a bolestivé lézie na tvári aj na hrudníku pridaný kortikoid (prednison 10 mg denne), aby došlo k minimalizácii zápalu a tvorbe nových jaziev. Stav pacienta sa postupne zlepšoval, došlo k zhojeniu nodúl, papuly čiastočne vymizli a jazvy vybledli. Dávka prednisonu bola postupne znížená, v priebehu troch mesiacov došlo k jeho vysadeniu. Nevyhnutnou súčasťou terapie akné je udržiavacia terapia, ktorá je definovaná ako pravidelné užívanie vhodného liečebného prípravku k zabezpečeniu remisie akné. Liečba zabráňuje recidíve tým, že sa sústreďí na začiatkové štádiá komedogenézy a na mikrokomedón (Nevoralová, 2016).

Pretrvávajúce aknézne stavy s neúspešnou terapiou prispievajú k depresii, úzkosti pacientov. Čím závažnejšie a dlhodobejšie je ochorenie, tým viac sa zvýši stupeň úzkosti. Akné sa vyskytuje hlavne na tvári. Tvár patrí k dôležitým aspektom vnímania vzhľadu tela. Mladí ľudia sú zameraní na svoj vzhľad, sú naň viac citliví. U takých pacientov môže vzniknúť sociálna bariéra (sociálna fóbia, strach zo sociálneho kontaktu). Pri liečbe akné sa stretávame aj s pacientmi, u ktorých sa rozvinie psychiatrické ochorenie ako následok akné. Ich terapia je komplexná, využívajú sa psychoterapeutické možnosti v liečbe depresie alebo sociálnej fobie. V takom prípade dermatológ odporučí vyhľadať odbornú psychologickú alebo psychiatrickú pomoc. Dôležité je upozorniť pacientov, ktorí sú liečení perorálnymi retinoidmi na zmeny nálad a správania a ak k tomu dôjde, mali by informovať svojho ošetrojúceho lekára (Nevoralová 2012a). Pacientka opísaná v tretej kazuistike trpela pocitom menejcennosti, prispela k tomu hlavne neefektívna liečba a jej vek. K takýmto pacientom je potrebné pristupovať mimoriadne citlivo a trpezlivo vysvetliť terapeutický proces.

Efektivitu liečby pacientov zvyšuje správne ošetrovanie pleti (dermokozmetika) a dodržiavanie životosprávy (diéta, strava s množstvom vitamínov) a veľmi dôležitá je spolupráca pacienta pri terapii. Základ tvorí pravidelná šetrná starostlivosť o pleť. Pleť sa čistí vlažnou vodou, mydlom, gélom alebo

micelárnou vodou 2-krát denne. Rad najjemnejších mydiel je založený na báze syndentov (syntetické detergenty), ktoré obsahujú menej ako 10 % tenzitov s neutrálnym pH (5,5 – 7). Ich účinok u akné je založený na surfaktantoch, ktoré odstraňujú maz a prispievajú k normalizácii biofilmu pokožky. Na udržanie priaznivého stavu a podporu hojenia akné sa využíva liečebná kozmetika, ktorá je dostupná iba v lekárňach (Nevoralová, 2020). Kozmetické prípravky určené na hydratáciu pokožky by nemali byť príliš mastné, mali by byť nekomedogénne a nespôsobovať alergiu. Vhodné sú hydrofilné krémy, hydrogély a emulzie typu olej vo vode. Už pri prvotných prejavoch akné (drobné komedóny) by pacienti mali používať vhodnú dermokozmetiku, ktorú je možné kombinovať po konzultácii s lekárom lokálnymi terapeutikami (retinoidy, kyselina azelaová). Vhodná je aj aplikácia lekárskej kozmetiky s obsahom kyseliny salicylovej a kyseliny mliečnej. Kyselina salicylová má lipofilný charakter a ľahko preniká kožnou bariérou, preto zvyšuje vstrebávanie lokálne podávaných liečiv (napr. retinoidy, kortikosteroidy). V nízkych koncentráciách (1 – 2 %) má antiseptický a keratoplastický účinok. Kyselina mliečna hydratuje pokožku, pomáha udržať kyslé pH pokožky a pôsobí protizápalovo a antibakteriálne. Na postihnuté miesta vo forme gélu alebo oleja môžeme aplikovať Tea tree oil, ktorý má antimikrobiálne vlastnosti (Langerová, 2014; Obrovská, 2015). Pri ťažkých aknéznych stavoch (papulopustulózne akné, konglobátne akné) je potrebné poradiť sa s dermatológom o aplikácii medicínskych kozmetík. Dermatológ odporúča aj využitie fototerapie alebo lasera, s cieľom eliminovať množstvo jaziev po akné. Všetkým sledovaným pacientom bolo odporúčené aplikovanie vhodnej dermokozmetiky nielen v čase liečby, ale aj po jej ukončení. Aby nedošlo k návratu akné, pacienti musia absolvovať dlhodobú udržiavaciu terapiu, keď lokálne aplikujú liečivo nielen na postihnuté časti, ale aj na zdravú pokožku.

ZÁVER

Akné (*acne vulgaris*) je dermatologické ochorenie, ktoré trápi celosvetovo adolescentov, ale aj strašiu populáciu (najmä ženy). Klasifikácia akné sa u jednotlivých autorov vzájomne odlišuje, z tohto dôvodu nie je nastavený jednotný hodnotiaci systém. Dôležité je ochorenie zachytiť v počiatočnom štádiu, avšak väčšina pacientov vznik ochorenia podceňuje a spolieha sa na vlastnú pomoc. V takých prípadoch sa akné môže rozvinúť do formy, kedy vzniká zjazvenie najmä na tvári, hrudníku a chrbte. Pacient vyhľadá častokrát pomoc dermatológa, keď je už ochorenie v pokročilom štádiu. Najskôr sa správne diagnostikuje daný typ akné, aby sa liečila príčina vzniku, nielen prejavy. Následne sa posudzuje závažnosť prejavov, typ pleti, vek pacienta a jeho psychika.

Lokálna liečba sa využíva u miernej (komedonické) až stredne závažnej formy akné. K najviac využívaným prípravkom patria lokálne retinoidy, lokálne antibiotiká, kyselina azelaová. Lokálne prípravky sa aplikujú na postihnutú oblasť (tvár, hrudník, chrbát), pravidelne v priebehu niekoľkých týždňov bez prerušenia aplikácie. Majú pomalší nástup účinku, požadovaný efekt sa dostaví v priebehu niekoľkých týždňov. Táto liečba má menej nežiaducich účinkov ako systémová.

Pri závažných (papulopustulózne, konglobátne) formách akné a pri pacientoch nereagujúcich na lokálnu liečbu sa prechádza na systémovú terapiu. K systémovým prípravkom patria perorálne antibiotiká, izotretinoín a hormonálna antikoncepcia. U pacientov trpiacich závažnými formami akné je hlavným liekom perorálny izotretinoín, prípadne vysoké dávky antibiotík. U žien sa využíva antiandrogénna terapia. Pri systémovej liečbe existuje riziko nežiaducich účinkov, ktoré je však možné úpravou dávky liečiva minimalizovať až úplne odstrániť. Je ale nevyhnutné, aby bol pacient počas celého obdobia liečby pod kontrolou lekára.

Po ukončení terapie je každému pacientovi doporučená dlhodobá udržiavacia terapia z dôvodu zabezpečenia remisie akné.

ZOZNAM LITERATÚRY

Avector/Shutterstock.com. Accessed January 17, 2022.

Bienová, M., Kučerová, R.: Retinoidy v dermatológii [Retinoids in dermatology]. *Dermatologie pro praxi*, 2008, 2, 171 – 174.

Buchvald, D.: Súčasný pohľad na etiopatogenézu a liečbu akné [Current view on etiopathogenesis and acne treatment]. *Via practica*, 2005, 2, 122 – 125.

Elsaie, M. L.: Hormonal treatment of acne vulgaris: an update. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 2016, 9, 241 – 248.

Fox, L., Csongradi, C., Aucamp, M., du Plessis, J., Gerber, M.: Treatment modalities for acne. *Molecules*, 2016, 21, 1 – 20.

Jarret, P.: Acne vulgaris. *Encyklopedia of pharmacy practice and clinical pharmacy*, 2019, 699 – 712. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812735-3.00552-5>. Accessed June 12, 2020.

Julie, C., Harper, M. D.: Acne vulgaris: What's new in our 40th year. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2019, 82, 1 – 2.

Klimas, J.: Aktuálne stratégie vo farmakoterapii ochorení kože – akné a psoriáza [Current strategies in pharmacotherapy of skin diseases – acne and psoriasis]. *Praktické lékárnictvo*, 2016, 6, 90 – 92.

Kozárová, A.: Acne vulgaris – klinický obraz a terapeutické možnosti [Acne vulgaris – clinical picture and therapeutic options]. *Dermatológia pre prax*, 2020, 14, 9 – 16.

Langerová, E.: Podpŕrná liečba *acne vulgaris* – súčasť komplexnej terapie [Supportive treatment of *acne vulgaris* – part of a comprehensive therapy]. *Medicína pro praxi*, 2014, 11, 69 – 73.

Layton, A.: The use of isotretinoin in acne. *Dermato-endocrinology*, 2009, 1, 162 – 169.

Macháčková, K.: Lokálna liečba akné vulgaris [Topical therapy of acne vulgaris]. *Dermatologie pro praxi*, 2018, 12, 20 – 24.

Martinásková, K., Vorčáková, K.: Systémové retinoidy v léčbě vybraných dermatóz dětského věku [Systemic retinoids in the treatment of selected dermatoses of childhood]. *Dermatológia pre prax*, 2017, 11, 54 – 9.

Národné centrum zdravotníckych informácií. Činnosť dermatovenerologických ambulancií v SR 2017 [National health Informational centre]. Bratislava, 2019. <http://www.nczisk.sk/Documents/publikacie/2017/sp1808.pdf>. [cit. 2021-04-13].

Nast, A., Dréno, B., Bettoli, V., Degitz, K., Erdmann, R., Finlay, A. Z., Ganceviciene, R., Haedersdal, M., Layton, A., López-Estebarez, J. L., Ochsendorf, F., Oprica, C., Rosumeck, S., Rzany, B., Sammain, A., Simonart, T., Veien, N. K., Zivkovič, M. V., Zouboulis, C. C., Gollnick, H.: European Evidence-based (S3) Guidelines for the Treatment of Acne. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2012, 26, 1 – 29.

Nevoralová, Z.: Akné a psychika [Acne and psychic]. *Dermatologie pro praxi*, 2012a, 6, 131 – 134.

Nevoralová, Z.: *Izotretinoin v praxi* [Isotretinoin in practice]. Praha: Mladá fronta, 2012b, 156 s.

Nevoralová, Z.: Nové přístupy v léčbě akné [New approaches in acne treatment]. *Pediatric pro praxi*, 2013, 14, 352 – 356.

Nevoralová, Z., Rulcová, J., Benáková, N.: *Obličejové dermatózy* [Facial dermatoses]. 1 vyd. Praha: Mladá fronta a. s., 2016. 255 s.

Nevoralová, Z.: Úloha dermokosmetiky v léčbě akné [The role of dermocosmetics in the treatment of acne]. *Pediatric pro praxi*, 2020, 21, 259 – 263.

Obrovská, M.: Volně prodejná přípravky na léčbu akné [Over-the-counter acne treatment products]. *Dermatologie pro praxi*, 2015, 9, 182 – 184.

O'Neill, A. M., Gallo, R. L.: Host-microbiome interactions and recent progress into understanding the biology of *acne vulgaris*. *Microbiome*, 2018, 6, 2 – 16.

Plzáková, Z.: *Acne vulgaris* – přehled dostupných léčebných možností a zásady péče o pleť [An overview of available treatment options and skin care principles]. *Praktické lékařství*, 2013, 9, 9 – 12.

Rasochová, E.: Klinický obraz akné [Clinical picture of acne]. *Dermatológia pre prax*, 2010, 4, 62 – 64.

Rulcová, J.: *Akné: příčiny, projevy a terapeutické možnosti*. [Acne: causes, manifestations and therapeutic options] Praha: Triton, 2005, 108 s.

Sachdeva, M., Tan, J., Lim, J., Kim, M., Nadeem, I., Bismil, N.: The prevalence, risk factors, and psychosocial impacts of acne vulgaris in medical students: a literature review. *International Journal of Dermatology*, 2020. DOI:10.1111/ijd.15280.

Saint-Jean, M., Dréno, B.: Acne. *EMC – Dermatológia*, 2016, 50, 1 – 14.

Vantuchová, Y.: Lokální léčba akné [Topical acne treatment]. *Dermatológia pre prax*, 2015, 9, 88 – 91.



FARMAKOTERAPEUTICKÝ POTENCIÁL KANABIDIOLU PRI VYBRANÝCH EXTRAPYRAMÍDOVÝCH PORUCHÁCH

PHARMACOTHERAPEUTIC POTENTIAL OF CANNABIDIOL IN SELECTED EXTRAPYRAMIDAL DISORDERS

Ferko, Dávid¹; Eftimová, Jarmila¹; Kolesárová, Mária²

¹Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach,
Komenského 73, 041 81 Košice

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

jarmila.eftimova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Vstupným produktom pre výrobu oleja s obsahom kanabidiolu (CBD) je droga materskej rastliny *Cannabis sativa* L. Cieľom experimentálnej štúdie bolo pomocou liekopisných (Ph. Eur. 10.3) a experimentálnych postupov analyzovať kvalitatívne a kvantitatívne parametre troch vzoriek CBD oleja od rôznych výrobcov. Všetky vzorky obsahovali podľa výrobcu CBD v koncentrácii 10 % a ako vehikulum olivový olej. Kvalitu kanabidiolových olejov sme stanovili pomocou chromatografickej metódy TLC (Thin Layer Chromatography). Zistili sme, že vzorky kanabidiolového oleja mali nejednotné akostné ukazovatele, čo môže znížiť ich terapeutický efekt. Analyzované vzorky

vyhovovali mikrobiologickým normám, avšak nespĺňali čísla kyslosti, v dvoch prípadoch obsahovali neidentifikované znečistenie. Obsah kanabidiolu, kanabigerolu a kanabinolu sme analyzovali upravenou HPLC metódou. Vzorky obsahovali 8,9 – 10,2 % kanabidiolu, 0,91 – 5,9 % prímiesi kanabigerolu; 0 – 3,9 % kanabinolu a zanedbateľné množstvo tetrahydrokanabinolu. Výsledky analýz sú originálne a môžu rozšíriť doterajšie poznatky o využití kanabidiolu v prospech zdravia. Zároveň sa poznatky môžu využiť v oblasti správneho dávkovania a možnosti perspektívneho terapeutického využitia pri extrapyramídových ochoreniach.

Kľúčové slová: dystónia; kanabidiol; myoklonus; spastický tortikolis; tremor

ABSTRACT

The starting product for the production of cannabidiol (CBD) oil is the drug of the parent plant *Cannabis sativa* L. The aim of the experimental study was to analyze the qualitative and quantitative parameters of three CBD oil samples from different manufacturers using pharmacopoeial (Ph. Eur. 10.3) and experimental procedures. According to the manufacturer, all samples contained CBD at a concentration of 10 % and olive oil as a vehicle. The quality of the cannabidiol oils was determined by Thin Layer Chromatography (TLC). We found that the cannabidiol oil samples had inconsistent quality indices, which might reduce their therapeutic effect. The samples analyzed met microbiological standards, but did not meet acidity numbers, and in two cases contained unidentified contaminants. Cannabidiol, cannabigerol and cannabiol contents were analysed by a modified HPLC method. The samples contained 8.9 – 10.2 % cannabidiol, 0.91 – 5.9 % cannabigerol, 0 – 3.9 % cannabiol and negligible amounts of tetrahydrocannabinol. The results of the analyses are original and may add to the current knowledge on the health benefits of cannabidiol. At the same time, the findings can be used in the field of correct dosage and the possibility of prospective therapeutic use in extrapyramidal diseases.

Key words: dystonia; cannabidiol; myoclonus; spastic torticollis; tremor

ÚVOD

V súčasnosti sú na trhu voľnopredajné výživové doplnky s obsahom kanabidiolu (CBD), ktoré podľa zahraničných štúdií môžu priaznivo vplývať aj na prejavy niektorých extrapyramídových ochorení, predovšetkým na skupinu dystonických porúch (Peres a kol., 2018). Extrakty liečivých rastlín mô-

žu mať symptóm-nešpecifické účinky, keďže pôsobia na celý rad metabolických a systémových dráh, ktoré priamo ovplyvňujú klinické ukazovatele poruchy hybnosti (Richardson a kol., 2017). To predstavuje potenciál v terapii porúch, ktorých príčina nie je v jednoznačne vymedzenej jednotke orgánovej sústavy.

Najčastejším problémom pri používaní kanabidiolu vo forme voľnopredajného prípravku zostáva jeho používanie bez overeného, deklarovaného zloženia, bez predchádzajúcej odbornej konzultácie a dispenzácie. Snaha pacienta nájsť uspokojenie môže byť v konečnom dôsledku kontraproduktívna a môže viesť aj k vzniku závažnejších liekových interakcií a nežiaducich účinkov (NÚ) (Wilson-Morkeš a kol., 2019).

Konopa siata (*Cannabis sativa*, L.) je taxonomic-ky zaradená do rodu *Cannabis*, čeľaď *Cannabaceae*, rad *Urcitales*, trieda *Magnoliopsida*. Najvýznamnejšou skupinou metabolitov sú kanabinoidy s výraznou biologickou aktivitou. Semená sú bohaté na oleje (až 30 % vysychavého oleja) (Bonini a kol., 2018). Kanabinoidy vykazujú sedatívne, analgetické, antiemetické, psychotropné a myorelaxačné účinky (Jahodár, 2011). Sušená droga *Canabis* obsahuje zhruba 483 obsahových látok okrem kanabinoidov. V medicíne sa môžu využívať terpeny a steroidy. Súhrnný názov kanabinoid označuje skupinu terpenofenolických látok s počtom uhlíkov C_{21} , ktoré sú pre rastliny rodu *Canabis* typické (Oladimeji a Valan, 2020).

K majoritným kanabinoidom patria tetrahydrokanabidiol, kanabidiol, kanabinol, kanabichromén a kanabigerol. Kannabidiol, ako jeden z hlavných obsahových kanabinoidov nevykazuje na rozdiel od tetrahydrokanabidiolu psychotropnú aktivitu (Hongbo a kol., 2018). Podľa Levinsohn a kol. (2020) je kanabidiol účinný pri psychických poruchách (úzkosť, depresie, psychózy), pri extrapyramídových poruchách, hyperprolaktinémii, epilepsii, neurodegeneratívnych poruchách a pri zápalových ochoreniach. Má antikonvulzívnu a analgetickú aktivitu (Varadkar a kol., 2018). Napriek

Tab. 1: Popis vzoriek

Vzorka	1	2	2
Výrobca	Sensi Seeds	Euphoria	Cibdol
Obalový materiál	tmavá sklenená fľaštička s uzáverom so zapusteným kvapkadlom	polopriesvitná plastová nádoba zaopatrená kvapkadlom	priesvitná sklenená nádoba s uzáverom zaopatreným skleneným kvapkadlom
Popis obsahu	dekarboxylovaný kanabidiol	kanabidiol, kanabinol, kanabigerol a iné	Čistý kanabidiol
Exspirácia	05/2021	09/2021	02/2022
Iné informácie	–	Skladovať v chladničke	–
Pôvod	EÚ	EÚ	Švajčiarsko

EÚ – Európska únia

spomenutým možným účinkom je v súčasnosti podľa FDA (Food and Drug Administration) schválená indikácia CBD v Amerike len pri epileptických záchvatoch rezistentných na liečivá prvej, respektívne druhej voľby, pri Dravetovom syndróme (Pack a kol., 2019); alebo pri Lennox-Gastautovom syndróme (Varadkar, 2018; Devínsky a kol., 2018). Kanabidiol preukázateľne inhibuje izoenzýmy cytochróm P450. Klinicky je však CBD dobre tolerovaným liečivom. Má antagonistické účinky na kanabinoidné receptory CB1, receptory CB2 ovplyvňuje negatívne allosterickou moduláciou. Pôsobí ako agonista (kapsaicínový) vaniloidného receptoru TRPV1 (transient receptor potential vanilloid receptor-1) a serotínový 1H receptor 5HT1A (5-hydroxytryptamín, 5HT serotonin 1A receptor) (Levinsohn a kol., 2020).

MATERIÁL A METÓDY

Pre stanovenie kvality CBD oleja sme vybrali tri vzorky komerčne vyrábaných produktov od troch rôznych výrobcov (viď tab. 1). Všetky vzorky obsahovali podľa výrobcu CBD v koncentrácii 10 % a ako vehikulum olivový olej.

Analýza vzoriek

Pre stanovenie a porovnanie kvalitatívno-quantitatívnej akosti vzoriek CBD oleja sme si zvolili všeobecné liekopisné postupy (European Pharmacopoeia 10th edition) a postupy experimentálneho charakteru.

V rámci analýzy kvality vzoriek sme stanovili mikrobiologickú čistotu a skúšku totožnosti obsahových látok. Zrealizované skúšky vstupných vzoriek sme rozdelili na dva základné typy: v prípade liekopisných požiadaviek sme stanovovali kvalitu vehikula (olivový olej) a experimentálne metódy pre stanovenie totožnosti a kvantity pre obsiahnutý CBD.

Stanovenie mikrobiologickej akosti kanabidiolového oleja

Pre mikrobiologickú akosť rastlinných liekov určených na perorálne užívanie vydáva Európsky liekopis 10 stat' informatívneho a odporúčaného charakteru.

Mikrobiologickú akosť vzoriek CBD oleja sme stanovili podľa postupov Európskeho liekopisu platňovou metódou za použitia Saboraudovho agaru s prímiesou chloramfenikolu (pre kultivá-

ciu húb, kvasiniek a plesní) a Endovho agaru (pre stanovenie prítomnosti koliformných baktérií).

Skúška kvality

Olivový olej získaný viacnásobnou extrakciou obsiahnutých analytov sme podrobili meraniu absorbancie: 1 g oleja sme rozpustili v cyklohexáne a zriedili na 100 ml. Absorbanciu sme merali pri vlnových dĺžkach 232 a 270 nm.

Skúška totožnosti

Zo vzoriek bolo nutné prvotne kvantitatívne extrahovať prítomné kanabinoidy viacnásobným extrahovaním pomocou petroleum éteru. Pre skúšku totožnosti kanabidiolu sme zvolili metódu TLC (Thin Layer Chromatography) za použitia doštičky s vrstvou silikagélu 60_{F254s} a mobilnej fázy (roztok *hexán* : *dietyléter* v pomere 80 : 20). Zloženie mobilnej fázy bolo zvolené na základe polarita analyzovaných kanabinoidov. Tekutý éterový extrakt v objeme 10 ml sme vysušili a zriedili mobilnou fázou na pôvodný objem. Vzorky (1 – 3) boli nanosené na platničku s rovnomerným odstupom, spolu so štandardnými roztokmi kanabidiolu, tetrahydrokanabinolu, kanabinolu, a kanabigerolu. Všetky skúmané analyty boli nanosené čistými kapilármi.

Vizualizáciu analytov na TLC platničke sme realizovali pomocou nástreku azo farbiva (3,3-dimetoxý (1,1-bifenyl)-4,4'-diyl) bisbenzendiazónium dichlorid. Toto činidlo konvertuje prítomné kanabinoidy na amino-naftalénový sulfonát, ktorý je detekovateľný UV svetlom.

Kvantitatívna analýza kanabidiolu pomocou HPLC

Keďže v extrakte sa môže CBD nachádzať v karboxylovanej forme ako kyselina kanabidiolová, analýza pomocou uvedenej metódy naráža na problém rozlíšiteľnosti kritických párov, a sice kyseliny kanabidiolovej a kanabidiolu, ktoré majú veľmi podobnú štruktúru. Vzorky sme preto najprv zahrievali 2 hodiny pri teplote 100 °C, aby došlo

k úplnej dekarboxylácii kanabidiolovej kyseliny (Citti a kol., 2019). Následne sme vzorku CBD oleja rozpustili v metanole v pomere 1 : 20 a injekovali do HPLC systému. Meranie bolo vykonávané v triplikátoch a následne bol vypočítaný priemer.

Pre kvantitatívno-kvalitatívnu analýzu CBD sme zvolili metódu vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie za použitia upravenej metódy. HPLC analýza bola realizovaná pomocou Alliance Waters e2695 a Alliance Waters 2998 PDA detektora (Citti a kol., 2019). Použili sme kolónu XTerra MS C18 (veľkosť častíc 3,5 µm; dĺžka kolóny 150 mm; šírka 4,6 mm). Využili sme izokratickú mobilnú fázu vody (0,1 % kyseliny formovej) a acetonitril v pomere 3 : 7. Prietok bol 0,8 ml/min pri celkovej dobe analýzy 60 min. Teplota kolóny bola 35 °C a vzorka sa injekovala v objeme 10 µl. Detekcia sa monitorovala pri 240 nm. Prítomné zlúčeniny síce nevykazujú maximum pri uvedenej vlnovej dĺžke, vlnová dĺžka 240 nm má tendenciu vyrovnávať odozvu medzi obsahovými komponentami (Ciolino a kol., 2018). Štandardný roztok CBD (100 µg.ml⁻¹) sa pripravil rozpustením v metanole a kalibračná krivka sa vyhodnotila pomocou tohto štandardu pri koncentráciách 100, 50, 25, 12,5 a 0,5 µg.ml⁻¹. Záznamy chromatografu sme vyhodnotili programom Chromeleon Chromatography Data System.

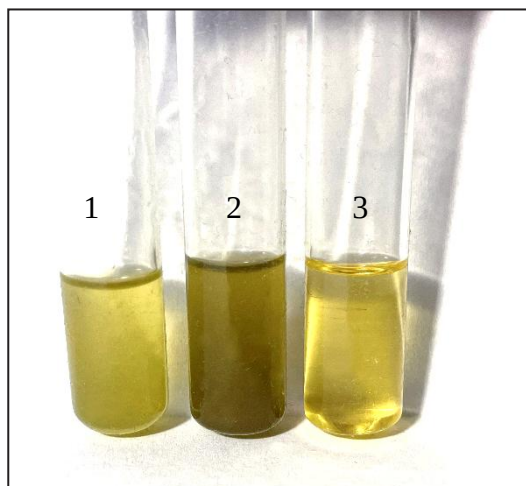
Uvedenou metódou HPLC analýzy sme získali retenčný čas kanabidiolu (16,25 min). Pre vyhotovenie kalibračnej krivky, ktorá je potrebná pre kvantitatívnu analýzu, sme použili štandardný roztok CBD s koncentráciou 1 µg.ml⁻¹ v metanole.

VÝSLEDKY

Mikrobiologická akosť kanabidiolového oleja

Mikrobiologická akosť testovaných vzoriek vyhovovala liekopisným normám pre limitné skúšky baktérií, húb a prítomnosti baktérie *Escherichia coli*. Vo vzorkách sa nenachádzali žiadne životaschopné mikroorganizmy (viď tab. 2).

Obr. 1: Vzorky CBD oleja



Senzorické skúšky

Vzorky CBD oleja boli podrobené základným senzorickým skúškam (viď obr. 1).

Vzorka 1 mala svetlo žltú farbu s prímiesou jemnej zelenej farby, bez viditeľných častíc; mierne opaleskujúca. Zakalená s nevýraznou vôňou pripomínajúcou usušené seno. Chuť bez výraznej kyslosti, mierne horká, pachuť po sene.

Vzorka 2 bola tmavšia, špinavo zeleno-hnedá, prítomné boli minoritne vyskytujúce sa zrazeniny vločkovitej štruktúry, ľahko dispergujúce, pomaly sedimentujúce. Vôňa pripomínajúca zaparené seno. Chuť intenzívna, horká, mierne trpká s výraznou pachuťou sušeného sena alebo trávy, nápadná kyslosť.

Vzorka 3 jantárovej farby, bez viditeľných častíc, bez prítomnosti zrazenín. Číra, chuť nevýrazná, jemná, pripomínajúca olivový olej s pachuťou sena, bez kyslého podtónu.

Skúška totožnosti

Na TLC platničke boli prítomné škvrny sýto oranžovo-žltej farby. Najzreteľnejšia škvrna s retenčným faktorom (R_f) 0,6 odpovedala kanabidiolu. Škvra nachádzajúca sa pod ňou

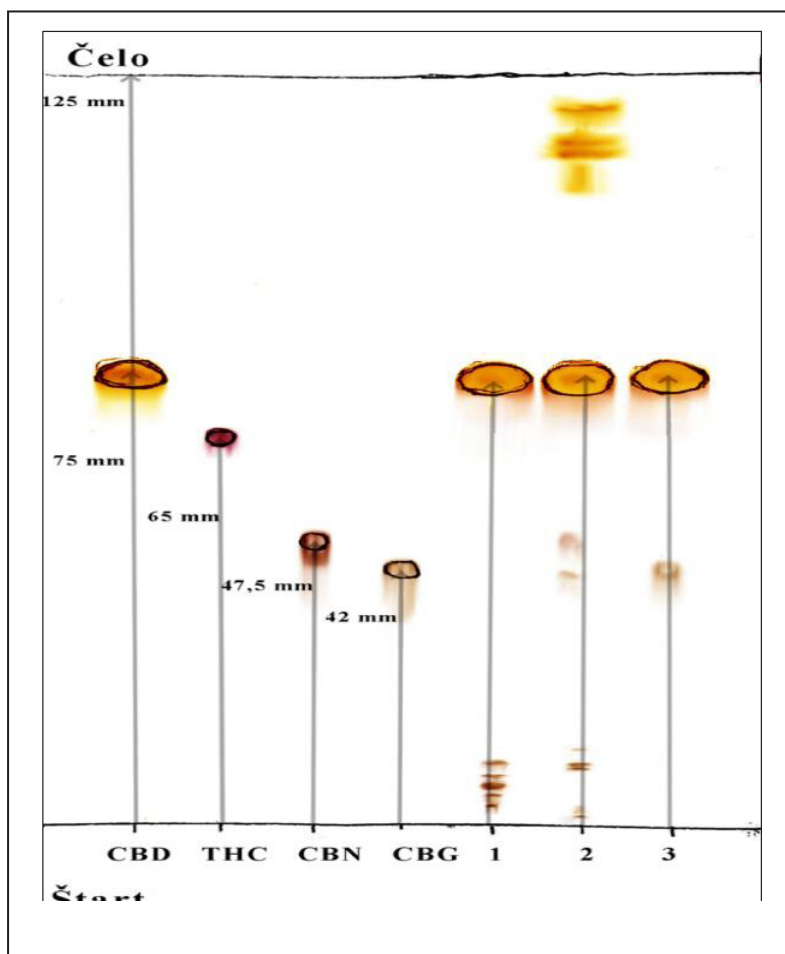
(tetrahydrokanabinol) mala jemne červeno-ružové sfarbenie a R_f 0,52. Menej viditeľné škvrny s R_f 0,38 (kanabinol) a R_f 0,34 (kanabigerol) boli viditeľné len v niektorých vzorkách (viď obr. 2).

Všetky vzorky CBD oleja podľa zhotoveného TLC obsahovali kanabidiol. Vzorka 1 obsahovala balastné látky s retenčným faktorom do 0,136; ktoré sme bližšie neskúmali. Vzorka 2 obsahovala menšie množstvo balastných látok s retenčným faktorom cca 0,136; v menšom množstve tiež kanabinol, kanabigerol a balastné látky s približným R_f = 0,82. Vzorka 3 obsahovala okrem kanabidiolu aj kanabigerol (viď tab. 1).

Skúška kvality

V rámci skúšky kvality sme merali absorbanciu pri vlnovej dĺžke 270 nm a 232 nm podľa liekopisných štandardných postupov. Absorbancia meraná pri vlnovej dĺžke 270 nm musí byť nižšia ako 0,2 a pomer absorbancií pri 232 nm k 270 nm musí byť vyšší ako 8. Všetky vzorky CBD oleja spĺňali požadované rozmedzie. Prevedená skúška vyhovovala liekopisným normám. Výsledky sú zaznamenané v tabuľke (viď tab. 2).

Obr. 2: Tenkovrstvová chromatografia/digitalizovaná TLC platnička

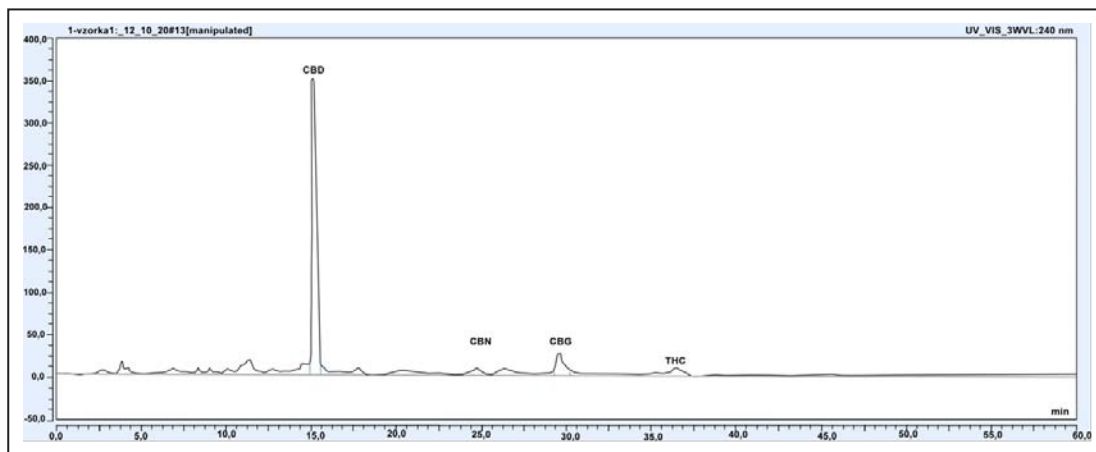


CBD kanabidiol, THC tetrahydrokanabinol, CBN kanabinol, CBG kanabigerol; 1, 2, 3 = číslo vzorky

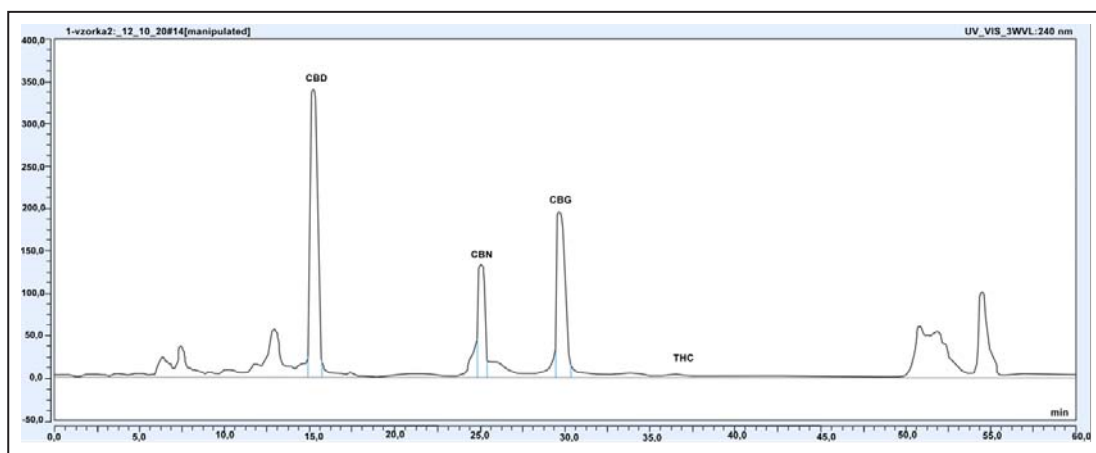
Tab. 2: Výsledky kvalitatívnej analýzy

		Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 3
Mikrobiologická akosť	Baktérie	0	0	0
	Huby	0	0	0
	<i>E-coli</i>	0	0	0
Skúška kvality	A [270]	0,122	0,187	0,099
	$\frac{A [232]}{A [270]}$	9,8	15,2	8,9
	Číslo kyslosti	1,891	2,501	0,771
Skúška totožnosti TLC		CBD, nečistoty s RT=0,136	CBD, CBN, CBG, nečistoty s RT=0,136 a 0,82	CBD, CBG

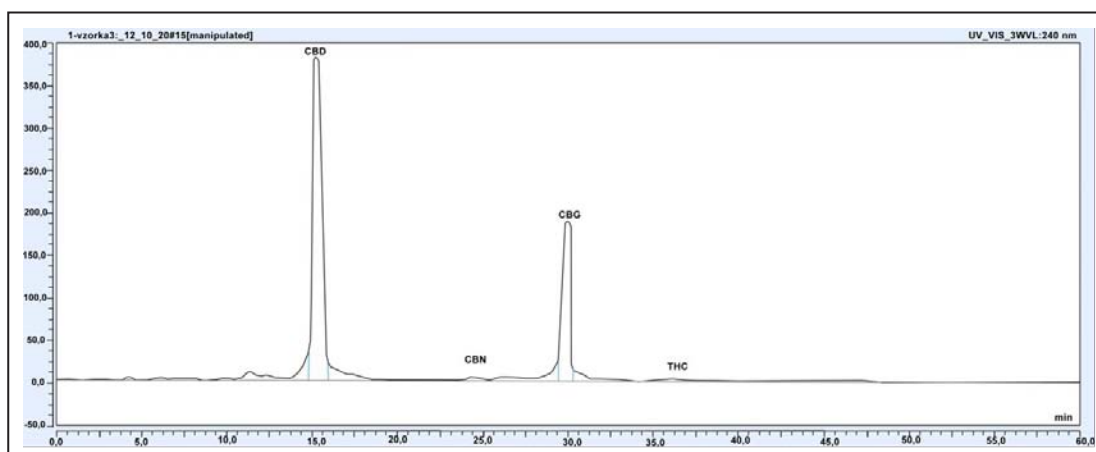
Obr. 3: HPLC analýza vzorka 1



Obr. 4: HPLC analýza vzorka 2



Obr. 5: HPLC analýza vzorka 3



Tab. 3: Obsah kanabidiolu vo vzorkách

Číslo vzorky	n	CBD		CBG		CBN	
		mg.g ⁻¹	SEM	mg.g ⁻¹	SEM	mg.g ⁻¹	SEM
1	3	102,33	0,0191	9,14	0,0251	19,01	0,0199
2	3	89,33	0,0213	58,92	0,0982	39,85	0,0215
3	3	93,66	0,0106	38,55	0,0123	0	0
Priemerný obsah vo vzorkách		9,510 %		3,553 %		1,962 %	

CBD kanabidiol, CBG kanabigerol, CBN kanabinol, n = počet meraní;
SEM = stredná smerodajná odchýlka priemeru

Číslo kyslosti olivového oleja musí byť menšie ako 2,0 pri stanovení z 5 g vzorky. Vzorky 1 a 3 spĺňali danú normu, keďže číslo kyslosti všetkých vzoriek, vypočítaných liekopisnými postupmi, bolo v rozmedzí 0,6 až 2,2. Vzorka 2 mala vysoké číslo kyslosti, vzorka teda nevyhovela skúške na kyslosť. Podľa uskutočnených liekopisných skúšok dedukujeme, že olivový olej použitý ako pomocná látka v CBD oleji je nevyhovujúci, nakoľko v ňom prebiehali oxidačné reakcie.

Kvantitatívna analýza kanabidiolu pomocou HPLC

Identifikovaný signál prislúchajúci kanabidiolu sme integrovali a pomocou kalibračnej závislosti vypočítali presnú koncentráciu analyzovanej zložky – kanabidiolu v troch komerčných produktoch, so zreteľom na štandardnú smerodajnú odchýlku. Obdobným postupom sme štandardizovali tiež kanabigerol a kanabinol.

Vzorka 1 (viď obr. 3) vykazovala mierne znečistenie (v podobe šumu s retenčným časom cca 4 až 11 minút), fundamentálny obsah kanabidiolu a minoritnú prítomnosť kanabinolu, kanabigerolu a nezistené množstvo tetrahydrokanabinolu.

Druhá vzorka CBD oleja (viď obr. 4) s makroskopicky najzreteľnejším sfarbením prímiesi, vykazovala neidentifikované znečistenie v oblasti prvej a poslednej štvrtiny priebehu analýzy, s

retenčným časom cca 7, 12, 52 a 54 minút. Oproti prvej vzorke obsahovala signifikantne väčšie množstvo kanabinolu a kanabigerolu. Tetrahydrokanabinol sme v tejto vzorke nezaregistrovali.

Tretia vzorka (viď obr. 5) komerčne vyrobeného CBD oleja neobsahovala takmer žiadne cudzie prímiesi. Podľa HPLC analýzy obsahovala len kanabidiol, zanedbateľné množstvo kanabinolu a nízky obsah kanabigerolu.

Vzorky CBD oleja obsahovali kanabidiol v množstve 89,33 – 102,33 mg.g⁻¹; pričom sa tieto hodnoty rovnali popisu produktu s priemernou odchýlkou 0,7 mg.μl⁻¹. Z troch testovaných olejov obsahovali 2 vzorky CBD v množstve 9,2 a 10,3 mg. μl⁻¹ (popis produktu deklaroval 10 % koncentráciu), jedna vzorka obsahovala CBD v množstve 8,9 mg. μl⁻¹ (popis produktu deklaroval 10 % koncentráciu). Vo všetkých prípadoch obsahoval CBD olej tiež kanabinol, kanabigerol a neidentifikované množstvo tetrahydrokanabinolu v zanedbateľnom množstve.

Vzorky 1 a 2 obsahovali značné množstvo neidentifikovaného znečistenia, ktoré sme ďalej neskúmali. Predpokladáme, že sa jednalo o metabolity extrahované pomerne nešpecifickým typom extrakcie. V takomto prípade mohlo ísť o terpeny, ktoré nie sú závadné, avšak svojou prítomnosťou značne ovplyvňujú stabilitu liečivého prípravku, ktorý môže byť náchylnejší k oxidačným procesom a môžu skrátiť jeho použiteľnosť (viď tab. 3).

DISKUSIA

Kanabidiol je hlavný fytoKANABINOID v *Cannabis sativa* L., ktorý má podľa klinických a vedeckých štúdií potenciál zmierňovať symptómy niektorých extrapyramídových a psychiatricko-neurologických ochorení. Liečivo kanabidiol je obsiahnuté v lieku Epidiolex, ktorý je registrovaný FDA (Food and Drug Administration) od roku 2018 a indikuje sa predovšetkým pri Dravetovej a Lennox-Gastautovom syndróme (detské epileptické encefalopatie). Epidiolex nie je od apríla 2020 predmetom ďalšieho skúmania a podľa klinických štúdií (Medical News Today, datované) preukázateľne redukuje množstvo epileptických záchvatov.

V Európe nie je CBD registrovaným liekom, k dispozícii sú len výživové doplnky obsahujúce kanabidiol, ktorých kvalita sa riadi potravinovým kódexom a nie prísnejšími normami pre registráciu liečiv. Pri výrobe, balení a uchovávaní, ako aj distribúcii takýchto liečiv musia byť prijaté opatrenia zabezpečujúce mikrobiologickú kvalitu (The German Pharmacopoeia, 2020). Perorálne lieky spadajú podľa noriem do tretej kategórie, určujúcej hraničné hodnoty prítomných aeróbných mikroorganizmov (baktérie v počte 10^3 , huby 10^2 a absolútnu neprítomnosť *Escherichia coli* v jednom grame reprezentatívnej vzorky).

V ostatnom čase sa kanabidiol stal predmetom záujmu mnohých ľudí nielen pre jeho liečivé vlastnosti, ale aj pre propagáciu výrazných antioxidačných vlastností. Výrobcovia uvádzajú rôzne dávkovanie kanabidiolu v závislosti od požadovaného účinku. V rámci predloženej štúdie sme analyzovali kvalitu troch CBD olejov od rôznych výrobcov, avšak ani v jednom prípade to neboli CBD oleje, ktoré by obsahovali čistý a s deklarovaným množstvom korelujúci CBD. K podobným výsledkom dospeli niektoré zahraničné štúdie, zaoberajúce sa obsahom kanabidiolu v CBD oleji (Kitamura a kol., 2020); účinkami kontaminácie CBD olejov (Lachenmeier a kol., 2019); ako aj celkovým kvantitatívno-kvalitatívnym zložením CBD olejov (Liebling a kol.,

2020).

Myslíme si, že registráciou lieku s obsahom CBD, ktorý by spĺňal exaktné normy, čo sa týka kvantity a kvality, by sa výrazne pomohlo k rozšíreniu možností terapie niektorých extrapyramídových ochorení a ochorení psychiatricko-neurologickej škály. Ambulantné nasadenie CBD predstavuje bezpečnejší spôsob medikácie pacienta. Riziko predstavuje hlavne samoliečba pacienta, čo predstavuje riziko dekompenzácie, resp. vzniku pseudo-neracionálnych anomálií súvisiacich s nesprávnym užívaním doplnkov výživy. Nádejou je fakt, že na území Slovenska sa má CBD definitívne vyradiť zo zoznamu omamných a psychotropných látok, ktorý sa v čase realizácie predloženej štúdie z nevedno akých dôvodov v zozname nachádzal. V roku 2020 sa v rámci aktualizácie nemeckého liekopisu (Deutsches Arzneibuch) pridala tiež monografia pre *Cannabis extractum normatum*, ktorá by mala disponovať limitnými skúškami pre obsahové látky, ako aj pre liekopisné skúšky, ktoré majú normatívny charakter. Na základe toho dedukujeme, že v blízkom období sa otvárajú možnosti registrácie lieku s obsahom CBD aj na území Európskej únie.

ZÁVER

Cieľom predloženej štúdie bolo stanovenie kvalitatívnej a kvantitatívnej akosti troch CBD olejov od rôznych výrobcov. Z našich zistení vyplýva, že vzorky mali nejednotné zloženie a kvalitu. Stanovili sme číslo kyslosti vehikula, ktoré bolo v dvoch prípadoch liekopisne vyhovujúce, jedna vzorka nevyhovovala. Okrem kyslosti sme stanovili aj absorbanciu, ktorá bola v prípade všetkých vzoriek liekopisne vyhovujúca. Skúšku totožnosti CBD sme stanovili experimentálne pomocou TLC. Vzorka 1 obsahovala znečistenie a CBD. Vzorka 2 obsahovala okrem CBD aj THC, CBN a balasty. Vzorka 3 neobsahovala balasty, iba CBD a CBG. Kvantitu kanabinoidov vo vzorkách sme realizovali vlastnou navrhnutou metódou pomocou HPLC, ktorých výsledky sumarizujeme v tabuľke 3. Mikro-

biologické skúšky boli vo všetkých prípadoch liekopisne vyhovujúce, vzorky neobsahovali životaschopné mikroorganizmy. Na základe dosiahnutých výsledkov odporúčame venovať sa problematike aj naďalej, pretože zabezpečenie liekopisne kvalitného CBD oleja, jeho dávkovanie a správna edukácia pacienta môže byť ďalšou možnosťou terapie extrapyramídových porúch.

ZOZNAM LITERATÚRY

Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., Mastinu, A.: *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 227, 300 – 315. Doi: 10.1016/j.jep.2018.09.004.

Ciolino, L. A., Ranieri, T. L., Taylor, A. M.: Commercial *Cannabis* consumer products Part 2: HPLC-dad quantitative analysis of cannabis cannabinoids. *Forensic Science International*, 2018, 289, 438 – 447. Doi: 10.1016/j.forsciint.2018.05.033.

Citti, C., Linciano, P., Forni, F., Vandelli, M. A., Gigli, G., Laganà, A., Cannazza, G.: Analysis of impurities of cannabidiol from hemp. isolation, characterization and synthesis of cannabidibutol, the novel cannabidiol butyl analog. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2019, 175, 112 752. Doi: 10.1016/j.jpba.2019.06.049.

Devinsky, O., Patel, A. D., Cross, J. H., Villanueva, V., Wirrell, E. C., Privitera, M., Greenwood, S. M., Roberts, C., Checketts, D., Vanlandingham, K. E., Zuberi, S. M.: Effect of cannabidiol on drop seizures in the lennox–gastaut syndrome. *New England Journal of Medicine*, 2018, 378, 20, 1888 – 1897. Doi: 10.1056/nejmoa1714631.

European pharmacopoeia 10.0. Published in accordance with the Convention on the elaboration of a *European Pharmacopoeia*. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Council of Europe, 2019. <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur>

10th-edition. Accessed December 17, 2021.

Jahodář, L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny* [Pharmacobotany: seed plants]. Praha: Karolinum, 2009, s. 87.

Kitamura, M., Kiba, Y., Suzuki, R., Tomida, N., Uwaya, A., Isami, F., Deng, S.: Cannabidiol content and *in vitro* biological activities of commercial cannabidiol oils and hemp seed oils. *Medicines*, 2020, 7 (9), 57. Doi: 10.3390/medicines7090057.

Lachenmeier, D. W., Habel, S., Fischer, B., Herbi, F., Zerbe, Y., Bock, V., Rajcic de Rezende, T., Walch, S. G., Sproll, C.: Are side effects of cannabidiol (CBD) products caused by tetrahydrocannabinol (THC) contamination? *F1000Research*, 2020, 8, 1394. Doi: 10.12688/f1000research.19931.2.

Levinsohn, E. A., Hill, K. P.: Clinical uses of cannabis and cannabinoids in the United States. *Journal of the Neurological Sciences*, 2020, 411, 116 717. Doi: 10.1016/j.jns.2020.116717.

Li, H., Kong, W., Chambers, Ch. R., Yu, D., Ganea, D., Tuma, R. F., Wards, S. J.: The non-psychoactive phytocannabinoid cannabidiol (CBD) attenuates pro-inflammatory mediators, T cell infiltration, and thermal sensitivity following spinal cord injury in mice. *Cellular Immunology*, 2018, 329, 1 – 9. Doi: 10.1016/j.cellimm.2018.02.016.

Liebling, J. P., Clarkson, N. J., Gibbs, B. W., Yates, A. S., O'sullivan, S. E.: An analysis of over-the-counter cannabidiol products in the United Kingdom. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2020. Doi: 10.1089/can.2019.0078.

Oladimeji, A. V., Valan, M. F.: Phytochemical profile of cannabis plant: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2020, 9 (3), 680 – 687. Doi: 10.22271/phyto.2020.v9.i3k.11350.

Pack, A., Sekar, K.: Faculty opinions recommendation of trial of cannabidiol for drug-resistant seizures in the Dravet syndrome. *Faculty Opinions – Post-Publication Peer Review of the Biomedical Literature*, 2019. Doi: 10.3410/f.727642604.793556783.

Peres, F. F., Lima, A. C., Hallak, J. E. C., Crippa, J. A., Silva, R. H., Abílio, V. C.: Cannabidiol

as a promising strategy to treat and prevent movement disorders? *Frontiers in pharmacology*, 2018, 9, 482. Doi: 10.3389/fphar.2018.00482

Richardson, S. P., Wegele, A. R., Skipper, B., Deligtisch, A., Jinnah, H. A.: Dystonia treatment: patterns of medication used in an international cohort. *Neurology*, 2017, 88 (6), 543 – 550. Doi: 10.1212/WNL.0000000000003596.

The German Pharmacopœia: Cannabis extract, standardized (Cannabis extractum normatum). Charleston, SC: BiblioLife, 2020. <https://www.gmp-compliance.org/gmp-news/german-pharmacopoeia-draft-monograph-for-cannabis-extracts>. Accessed December 17, 2021.

Varadkar, S.: Cannabidiol for drop seizures in Lennox-Gastaut syndrome. *The Lancet*, 2018, 391 (10 125), 1006 – 1007. Doi: 10.1016/S0140-6736(18)30135-1.

Wilson-Morkeh, H., Al-Abdulla, A., Sien, L., Mohamed, H., Youngstein, T.: Important drug interactions exist between cannabidiol oil and commonly prescribed drugs in rheumatology practice. *Rheumatology*, 2019, 59 (1p), 249 – 251. Doi: 10.1093/rheumatology/kez304.

POKYNY PRE AUTOROV

ZAMERANIE ČASOPISU

Folia Pharmaceutica Cassoviensia je vedecký časopis založený v roku 2019 a vydávaný Univerzitou veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, SR. Časopis je vydávaný štvrťročne a uverejňuje pôvodné štúdie prinášajúce najnovšie poznatky z farmaceutickej a biomedicínskej oblasti, prehľadové články a kazuistiky z lekárenskej a z klinickej praxe. Okrem toho sa v časopise publikujú aj krátke oznámenia zamerané na rýchle uverejnenie poznatkov o aktuálnych vedeckých problémoch a objavoch vo farmácii a medicíne. Časopis neuverejňuje správy o vedeckých podujatiach a redakciou nevyžiadané recenzie.

Autori sú zodpovední za originalitu zaslaných príspevkov, správnosť ich obsahu a za to, že predkladaná práca alebo jej časti neboli publikované alebo zaslané na publikovanie inde.

Autori zasielajú príspevky elektronicky vo formáte textového procesora MS Word alebo vo formáte RTF. O zaradení príspevkov do časopisu rozhoduje redakčná rada na základe posudkov aspoň dvoch anonymných recenzentov. Príspevky schválené na publikovanie sa zasielajú autorovi spolu s recenznými posudkami na prípadné doplnenie alebo prepracovanie. Autor vráti redakcii upravený rukopis a pripojí písomné stanovisko k návrhom a pripomienkam recenzentov. Rozhodnutie redakčnej rady o prijatí alebo zamietnutí príspevku je konečné.

Za uverejnenie článku v časopise sa nevyžadujú žiadne poplatky.

VŠEOBECNÉ ZÁSADY

Príspevky sa uverejňujú v slovenskom, českom alebo anglickom jazyku. Ak je príspevok písaný v inom ako anglickom jazyku, vyžaduje sa názov práce, abstrakt a kľúčové slová v angličtine.

Kompletný text rukopisu vrátane fotografií, obrázkov, tabuliek a grafov sa zasiela v elektronickej forme na nasledovnú adresu: **folia.pharma@uvlf.sk** alebo **zuzana.holeckova@uvlf.sk**. Ak rukopis nesplňa 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), adrenalin/liekopis (nie epinefrín/INN), hydroxykarbamin (nie hydroxyurea), kromoglykán (nie chromoglykán), cholestyramín (nie colestyramín, kolestyramín), lítium (lithium), manitol (nie mannitol).

Latinské termíny sa píše kurzívou.

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

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

Fotografie, obrázky, grafy. Aby sa vyhlo

prípadným nepresnostiam či chybám, odporúčame zaslať fotografie, obrázky a grafy zvlášť v osobitnej prílohe (aj v prípade, že ich už autori majú v texte) a uviesť zdrojový program, v ktorom boli vypracované (napr. tabuľka – MS Word, graf – MS Excel). V texte sa uvádza odkaz na príslušnú fotografiu, obrázok a graf, napr. (viď obr. 1). Odkaz sa uvedie aj vtedy, keď autor zašle fotografie, obrázky a grafy iba v prílohe, aby bolo jasne označené miesto, kde sa má príslušná fotografia, obrázok alebo graf v texte nachádzať. Fotografie majú mať minimálne rozlíšenie na úrovni 300 dpi a musia byť jasné a ostré. Vzhľadom na technické komplikácie, ku ktorým môže dôjsť pri konvertovaní farebných obrázkov pre potreby 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 šípku alebo iným symbolom, ktorý je vysvetlený v legende.

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

Tabuľky je kvôli prípadným technickým komplikáciám potrebné vyhotoviť v programe MS Word (nesmú byť do textu vložené ako obrázky).

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 vyvedené závery. Zdôrazňuje nové a dôležité aspekty štúdie a pozorovaní.

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

ÚVOD

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

MATERIÁL A METÓDY

Prezentuje sa podrobný popis a charakteristika objektov pozorovania/experimentov, vrátane kontrol. Identifikujú sa použité metódy, prístroje (meno a adresa výrobcu v zátvorke) a postupy s dostatočnými podrobnosťami na to, aby ich bolo možné reprodukovat'. 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.

Používané 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.

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

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

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

Online časopis:

Simon, J. A., Hudes, E. S.: Relationship of

ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA* 1999, 281, 2289 – 2293. <http://url>. Accessed July 11, 2009.

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.

PREHLADOVÉ ČLÁNKY

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

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

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

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

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

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

ZÁVER – Zodpovedanie otázok pre výskum, položených v úvode.

ZOZNAM LITERATÚRY – Potvrďuje práce iných vedcov – 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 kazuistik je nasledovná:

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

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

ÚVOD – vysvetľuje dôvody, pre ktoré bol daný prípad opísaný

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

DISKUSIA – zdôrazňujú sa zaujímavé aspekty prípadu

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

ZOZNAM LITERATÚRY

RECENZIA

Publikujú sa aj kritické rozborové odborného diela (napr. knihy, články), 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