

FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis

UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609

ISSN 2729-790X



4
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 štvrťročne s príspevkami v slovenskom, českom alebo anglickom jazyku s abstraktom v angličtine.

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

Šéfredaktorka/Editor-in-Chief:

Výkonná redaktorka/Deputy/Managing Editor:

Redakčná rada/Editorial Board:

Jana Mojžišová

Zita Faixová

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

Vydavateľ/Publisher:

© Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2019

Adresa redakcie/Editor Address:

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

Technická redaktorka/Technical Editor:

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

Grafická úprava/graphic design:

Báštiová, I.

ISSN: 2585-9609

EVČ: EV 5741/18

IČO: 00 397 474

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

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

VYDÁVA
UNIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE V KOŠICIACH
SLOVAKIA



FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA
IV., 4, 2022

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

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, IV., 4, 2022

O B S A H

Hruškovcová, Jana; Bhide, Mangesh; Kulkarni, Amod:	
NANOPARTICLES CROSSING THE BLOOD BRAIN BARRIER (REVIEW ARTICLE)	5
Rozman Antoliová, Natália; Gažová, Andrea; Kyselovič, Ján; Petrovič, Vladimír:	
ST. JOHN'S WORT MEDICINAL PRODUCTS IN SLOVAKIA –	
EFFICACY OF ORAL FORMULATION OF SJW PRODUCTS	23
Komanová, Zuzana; Sučík, Monika; Valenčáková, Alexandra:	
MOŽNOSTI TERAPIE PRI NÁDOROVOM OCHORENÍ HLAVY A KRKU	
POSSIBILITIES OF THERAPY OF HEAD AND NECK TUMOR DISEASES	32
Jurčacková, Zuzana; Hrčková, Gabriela:	
PRÍRODNÉ LÁTKY AKO MODULÁTORY TRANSKRIPČNÉHO FAKTORA NF-κB	
NATURAL PRODUCTS AS MODULATORS OF THE TRANSCRIPTION FACTOR NF-κB	47
Reňáková, Ivana; Falis, Marcel	
STANOVENIE TOXICITY ANTIDEPRESÍV	
DETERMINATION OF TOXICITY OF ANTIDEPRESSANTS	62
Gernátová, Nora; Piešová, Elena; Dudášová, Irena:	
NEALKOHOLOVÁ STEATOHEPATITÍDA A JEJ FARMAKOTERAPIA	
PHARMACOTHERAPY FOR NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS	72
Mojžišová, Gabriela:	
RESVERATROL A JEHO PROTINÁDOROVÉ ÚČINKY	
ANTI-TUMOR EFFECTS OF RESVERATROL	84
Ciglanová Denisa; Jurčacková, Zuzana; Mudroňová, Dagmar; Dvorožňáková, Emília; Hrčková, Gabriela:	
ÚČINOK DIALYZOVATEĽNÉHO LEUKOCYTÁRNEHO EXTRAKTU NA IMUNITNÉ BUNKY	
KRVI A RAST CÝST U MYŠÍ S INFEKCIOU <i>ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS</i>	
PO PERORÁLNOU, SUBKUTÁNNOU A INTRAPERITONEÁLNU PODANÍ	
DIFFERENTIAL ACTIVITY OF HUMAN LEUKOCYTE EXTRACT ON BLOOD IMMUNE	
CELLS AND CYST GROWTH IN MICE WITH <i>ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS</i>	
INFECTION AFTER ORAL, SUBCUTANEOUS AND INTRAPERITONEAL ROUTES	
OF ADMINISTRATION	98
Bačkorová, Miriam; Lukáčová, Katarína:	
HODNOTENIE BIOLOGICKEJ AKTIVITY PLODOV <i>ROSA CANINA</i> L.	
EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF <i>ROSA CANINA</i> L. FRUITS	110
Hudák, Alexander; Šuleková, Monika; Váhovská, Lucia:	
OPTIMALIZÁCIA PODMIENOK STANOVENIA 5-FLUÓRURACILU METÓDOU UHPLC	
OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR THE UHPLC DETERMINATION	
OF 5-FLUOROURACIL	118
Pokyny pre autorov	125



NANOPARTICLES CROSSING THE BLOOD BRAIN BARRIER (REVIEW ARTICLE)

Hruškovcová, Jana¹; Bhide, Mangesh^{1,2}; Kulkarni, Amod^{1,2}

¹Laboratory of Biomedical Microbiology and Immunology

University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice

²Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava
The Slovak republic

amod.kulkarni@uvlf.com

ABSTRACT

The presence of blood-brain barrier (BBB) restricts the passage of therapeutic substances into the brain parenchyma limiting the therapy for neurological disorders such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease or cancer and neuro-infections. In recent decades, nanotechnological research has focused on the development of nano-sized particles (100 nm) that could cross the BBB and effectively distribute therapeutic substances to the brain. This review discusses three types of nanoparticles: organic, inorganic, and hybrid nanomaterials that can cross the BBB and deliver therapeutic substances into the brain to treat neurological diseases.

Key words: blood-brain barrier; central nervous system; nanoparticle

INTRODUCTION

The central nervous system (CNS) is protected by the blood-brain barrier (BBB), a specialized structure maintaining homeostasis of the CNS microenvironment crucial for its neuronal activity and functions (Profaci et al., 2020). The BBB complex is composed of brain microvascular endothelial cells (BMEC), with junctional complexes such as adherent junctions (AJ) and highly specialized tight junctions (TJ). These specialized junctions are characterized by the absence of fenestrae and a reduced level of endocytosis, which provides BBB unique barrier properties. Other components of the BBB complex are pericytes, astrocytes and the basement membrane, which have a supporting function. Aside from CNS protection, the BBB acts as a physical, metabolic, and transport barrier, regulating the passage of ions, small molecules, and macromolecules from blood to brain tissue (Pandit et al., 2020). As a result, the BBB creates a significant barrier to drug distribution in the brain and limits non-invasive therapeutic options for a variety

of neurological diseases and disorders (Micheli et al., 2012; Hersh et al., 2016).

Nanoparticles have been developed as a promising tool for drug distribution into the CNS since the 1980s, as they provide a non-invasive method of overcoming BBB (Tiwari and Amiji, 2006). Nanoparticles are colloidal nanocarriers of different shapes used as vehicles for the transfer of therapeutic substances to the target tissues. The size of nanoparticles ranges from 1 to 100 nm in diameter at least in one dimension, while nanoparticles used in medicine must be smaller than 200 nm due to the size of body microcapillaries (Chamundeeswari et al., 2019). The main advantage of these nanoparticles is their multifunctionality namely, their ability to reach and facilitate the passage of drugs that are unable to cross in to the CNS. The multifunctionality of nanoparticles characterized by their physicochemical and biomimetic (mimicking physiological structures and processes in the body) properties has encouraged to utilize them as drug delivery vehicles (Masserini, 2013). Moreover, the surface of nanoparticles has been decorated with ligands of essential nutrients like glucose, amino acids, and nucleosides to elivate their BBB crossing by specific transporters and receptor-mediated or adsorptive-mediated transcytosis (De Rosa et al., 2012; Sharma et al., 2019). Other features of nanoparticles are: a) high chemical and biological stability; b) ability to prevent enzymatic degradation of loaded drugs; c) possibility to conjugate hydrophobic or hydrophilic drugs and ligands for tissue specific delivery (Tiwari and Amiji, 2006; Petkar et al., 2011); d) improvement of the therapeutic effects of the drug; b) reduction of side effects; c) increased permeability and circulation time (Burduşel et al., 2022). Last but not least, nanoparticles should be non-toxic to cells, biocompatible and biodegradable, non-flammable and non-immunogenic (Petkar et al., 2011).

Nanoparticles are widely used in clinical practice, not only as carriers of therapeutic substances, like targeted cancer therapy, but also as a tool for diagnostics, biomarker detection and imaging methods (Chamundeeswari et al., 2019). For clinical purposes, it

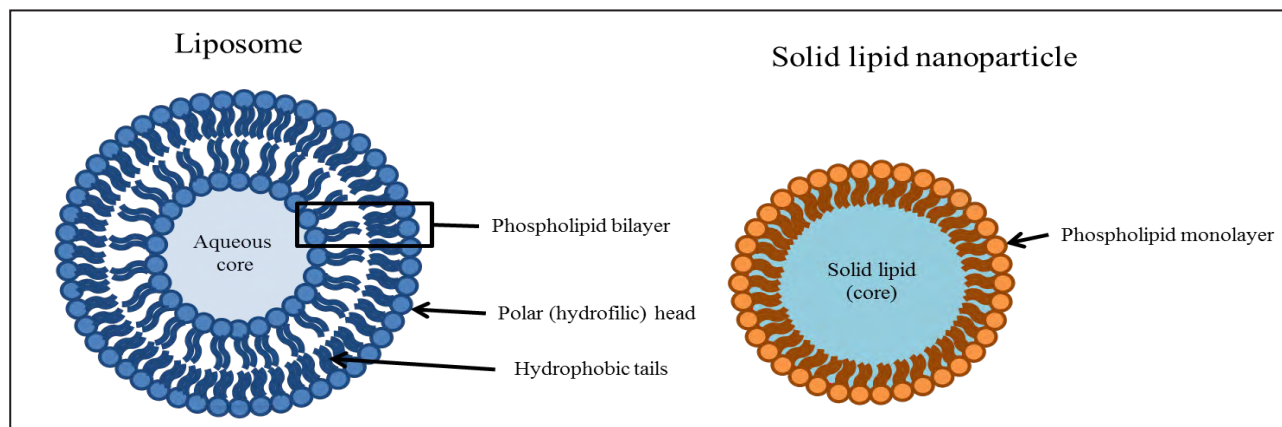
is essential to design nanoparticles to evade the non-specific interaction between surface of nanoparticles and blood proteins. The main limiting factor for the use of nanoparticle is their rapid removal from the blood circulation by the reticuloendothelial system (RES). The rate of removal depends on the surface properties of the nanoparticles and their size. Plasma proteins (opsonins, albumin, and immunoglobulins) can bind to the surface of hydrophobic colloidal particles resulting in opsonization of nanoparticles and their removal through RES in the spleen and liver. To avoid the RES mediated removal, nanoparticles are developed to possess a neutral surface charge or hydrophilic surfactants by coating polyethylene glycol on their surface (Peyrard-Janvid et al., 2014). Alternatively, the size of the nanoparticles can be fixed up to 80 nm. Nanoparticles with these properties are able to avoid the RES, circulate in the blood for a long time and successfully target or pass through the BBB to the brain (Blasi et al., 2007; Provenzale and Silva, 2009; Masserini, 2013).

This review discusses the various nanoparticles that have been used as effective drug delivery systems into the brain parenchyma via the BBB. We also discuss the properties and application possibilities of the most common organic and inorganic nanoparticles, as well as differences in drug structure and loading. Finally, we assess the challenges associated with the successful implementation of nanotechnological systems in clinical practice.

Nanoparticles used in medicine

Several classes of nanoparticles have been developed as therapeutic and diagnostic agents for cancer, diabetes, asthma, allergy, pain, infections, and a variety of other ailments since the late 1980s (Tiwari and Amiji, 2006). Nanoparticles can provide convenient and more effective ways of administration, reduced side effects, extend the effective time of the drug and thereby reduce healthcare costs. They enable not only the targeted delivery of drugs to tissues but also the controlled release of their cargo. On a molecular scale, nanoparticles enable the identification of ab-

Fig. 1: Lipid-based nanoparticles



Source: modified from Masserini, 2013

normalities, virus fragments and markers of diseases, such as precancerous cells, that have been difficult to detect. Last but not least, nanoparticles carrying contrast agents improve the specificity and sensitivity of imaging techniques such as magnetic resonance. Many companies are developing drugs based on nanoparticles, which makes nanomedicine more commercially available (Zhang et al., 2008).

1. Organic nanoparticles

Organic nanoparticles are carbon-based carriers entrapped or attached with the drug in their matrix. Due to their excellent biocompatibility, improved drug loading capacity, superior permeability, retention effect and low toxicity, organic nanoparticles were the molecules of choice to modify and target specific tissues and load multiple drugs. Typical examples of organic nanoparticles are – lipid nanoparticles, polymeric nanoparticles, micelles and dendrimers (López-Dávila et al., 2012).

1.1. Lipid nanoparticles

Lipid nanoparticles are created on the concept of biological membranes, which guarantees their biocompatibility. The similarity with cell membrane facilitates the lipid nanoparticles to pass through the BBB, and thus the loaded drugs. Two of the most im-

portant lipid-based nanoparticles include liposomes and solid lipid nanoparticles, composed of phospholipids, phosphatidylcholine or cholesterol. Liposomes and solid lipid nanoparticles (see Fig. 1) have slightly different structures, but both are stable *in vivo* and are used for drug distribution, most commonly in inhalation therapy (Chenthamara et al., 2019).

Liposomes

Liposomes (20 nm – 100 µm) were discovered in 1960s by A. D. Bangham and represent the first generation of nanoparticles determined for drug delivery. In composition, liposomes mimic the plasma membranes of cells. They are self-assembled vesicles consisting of phospholipid molecules with a polar head and two hydrophobic tails (amphiphilic phospholipids) forming a bilayer around the aqueous core. Their similarities to cell membrane facilitate the crossing of BBB (Tiwari and Amiji, 2006; Chenthamara et al., 2019; Nakhaei et al., 2021). Liposomes consist of sphingomyelin, phosphatidylcholine and glycerophospholipids. Addition of cholesterol increases the stability of liposomes *in vivo* and reduces the permeability of their bilayer. These biocompatible and non-toxic nanocarriers are used to transport amphoteric, hydrophobic and hydrophilic drugs into target tissue and protect the loaded drugs from host

enzymes. Furthermore, liposome surface properties have been modified to prolong their circulation time, avoid opsonization and enzymatic degradation (Tiwari and Amiji, 2006; De Rosa et al., 2012; López-Dávila et al., 2012; Masserini, 2013; Hersh et al., 2016; Nakhaei et al., 2021).

Liposomes are synthesized by several techniques such as dehydration, rehydration, reverse phase evaporation, sonication or extrusion which are determined on the basis of required particle size, the number of lamellae, and drug-loading. For instance, drugs can be loaded in liposome by active or passive methods. The active loading, known as the remote loading method, involves loading of drugs into liposomes using differences in electric potentials through the liposomal membrane or pH gradient. Thus, the active loading method is far more effective and reduces the leakage of loaded drug during its storage. In the passive loading method, drugs are mixed with lipids and subsequently a liposome is formed. In both active and passive method the hydrophilic drugs are loaded directly into the aqueous core, while hydrophobic drugs are loaded between individual lamellae (Nakhaei et al., 2021).

Based on their structure, liposomes are classified as: a) small unilamellar vesicles (SUV) consisting of single bilayer and a size of 20 – 100 nm; b) large unilamellar vesicles (LUV) also possessing single bilayer with a size exceeding 100 nm; c) reverse phase evaporation vesicles (REV) with size of 0,5 μm are single or oligolamellar vesicles; d) oligolamellar vesicles (OLV) are made of several bilayers (up to 10) and their size varies between 0,1 – 1 μm ; and e) large multilamellar vesicles (MLV) made of multiple concentric bilayers with a size ranging from 2 – 10 μm (Pidgeon et al., 1987; Tiwari and Amiji, 2006; Samad et al., 2007; Masserini, 2013; Nakhaei et al., 2021). Liposomes are further classified based on surface charge, as follows: a) negative liposomes composed of acid phospholipids; b) neutral liposomes composed of nonionic phospholipids; and c) positive liposomes composed of alkaline phospholipids (Xin et al., 2018).

Positive liposomes are used as gene delivery system for transfection (Xin et al., 2018). There are several liposomal products approved by U. S. Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA), e. g. Doxil[®]/Caelyx[®] (PEG-modified liposome consists of soya phosphatidylcholine and cholesterol, loaded with doxorubicin hydrochloride) for breast cancer treatment (Abraham et al., 2005); DepoCyt[®] (consisting of triglycerides, phospholipids and cholesterol, loaded with cytarabine) for treatment of lymphomatous meningitis or Marqibo[®] (consisting of distearoylphosphatidylcholine and cholesterol, loaded with vincristine sulphate) for treatment of leukemia (Liu et al., 2022).

Furthermore, liposomes could cross the BBB via passive diffusion, adsorptive-mediated transcytosis and receptor-mediated transcytosis, and are used for distribution of therapeutic agents for treatment of glioma as DOX (composed of cholesterol, hydrogenated soy phosphatidylcholine and 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, loaded with anthracycline antibiotic (Tiwari and Amiji, 2006; Olusanya et al., 2018; Karim et al., 2016); cerebral ischemia as FK506-liposome (composed of dipalmitoylphosphatidylcholine, cholesterol, and distearoylphosphatidylethanolamine-PEG2000, loaded with neuroprotective agent FK506) (Tiwari and Amiji, 2006; Fukuta et al., 2015); and the delivery of opioids or baclofen to the CNS for treatment of chronic pain or spasticity, respectively (Tiwari and Amiji, 2006; Hersh et al., 2016).

Solid lipid nanoparticles

Solid lipid nanoparticles (SLN) (40 nm – 200 nm) are stable lipid particles with a solid hydrophobic core in which the lipophilic or hydrophobic therapeutic agents are dissolved or dispersed. The core is covered by a monolayer of phospholipids surrounded by water or aqueous surfactant solution. SLN consist of biocompatible and biodegradable solid lipids like triglycerides, fatty acids or waxes, with similar properties as low melting point and rigidity at body temperature. The SLN are stabilized by emulsifiers

like polysorbates, bile salts, tween 80 or lecithin. The amount of emulsifier depends on the method of administration (Tiwari and Amiji, 2006; Kaur et al., 2008; De Rosa et al., 2012; Masserini, 2013; Edis et al., 2021).

SLN are prepared by various methods like spray drying and evaporation, but the most common method is hot or cold high-pressure homogenization. For the hot homogenization method, lipids and drugs are mixed while heating the mix above the melting temperature of the lipid. Subsequent homogenization is performed by homogenizer or ultrasonic probe under high pressure. The resulting SLN are up to 40 nm in size. On the other hand, cold method of homogenization involves melting of lipids and drugs with immediate cooling on dry ice and subsequent milling. Thereafter, the particles are homogenized under high pressure and the size of resulting SLN of 50 – 100 nm. The cold method of homogenization is especially employed to incorporate thermosensitive therapeutic agents (Parhi and Suresh, 2010; Mehnert & Mäder, 2012; Naseri et al., 2015; Satapathy et al., 2021).

When compared to liposomes, dendrimers and inorganic nanoparticles, SLN have better biocompatibility, stability of loaded drugs, excellent cellular absorption, improved bioavailability and minimal toxicity of loaded drugs. SLN have a higher drug binding efficiency and are able to ensure controlled drug release over several days to few weeks (Kaur et al., 2008; Edis et al., 2021).

The composition of SLN has been regulated by altering their surface properties to increase drug delivery into the brain and limit their eviction by RES (Blasi et al., 2007; Kaur et al., 2008; Edis et al., 2021). The SLN could cross the BBB passively by diffusion, via the paracellular route or transcytosis (Kadari et al., 2018; Satapathy et al., 2021).

SLN is a potentially advantageous drug delivery system for targeting drugs to the CNS. For example, SLN created from stearic acid and loaded with nicotinamide was tested to improve cognition impairment caused by Alzheimer's disease in animal model (Vakilinezhad et al., 2018); SLN created from stearic

triglyceride loaded with bromocriptine was used in study of Parkinson's disease (Esposito et al., 2008) and SLN composed of stearic acid, lecithin and taurocholate, loaded with curcumin was tested to alleviate the symptoms of Huntington's disease in animal models (Sandhir et al., 2014).

1.2. Polymer-based nanoparticles

Nanoparticles based on polymers are often used in biomedicine due to their versatility, adjustable size and shape, the possibility of attaching various molecules (drugs, genes, DNA, dyes) and ability to surface functionalization with various ligands for targeting specific tissues. Moreover, they have the ability to react to physical (magnetic field, ultrasound) and biological (pH, enzymes) factors (Tapeinos et al., 2017).

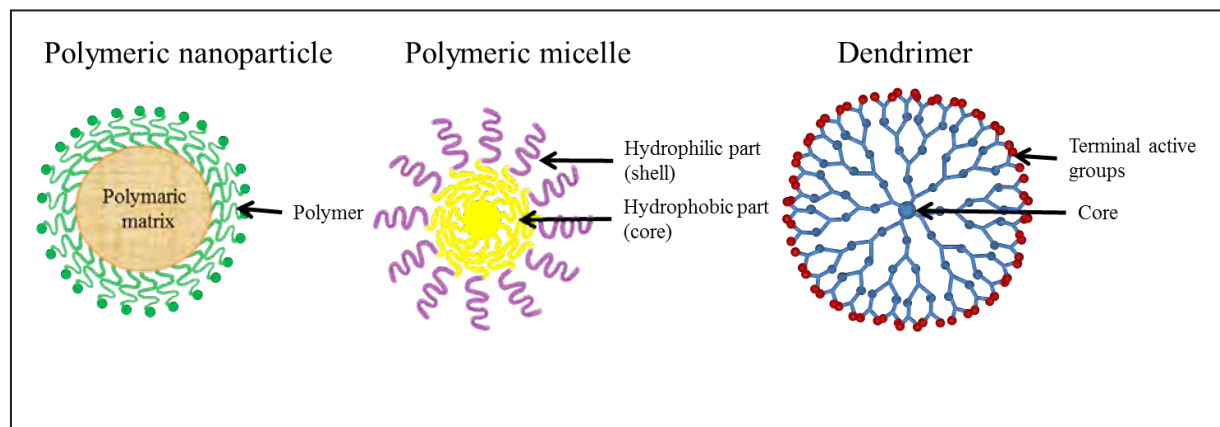
The surface of polymeric nanoparticles can be modified by various functional groups, like transferrin receptor ligand to enhance crossing of BBB. There is also the possibility of tailoring the physicochemical properties of nanopolymers, including surface charge, size and shape, to increase their passage through BBB (Hersh et al., 2016).

Polymeric nanoparticles are able to cross BBB by transcytosis or cell-based mechanism (Masserini, 2013; Caraway et al., 2022); thus polymeric nanoparticles, polymeric micelles and dendrimers (see Fig. 2) are most often used for brain cancer research like Gliadel®, the polymeric nanoparticle for treatment of brain tumors (Panigrahi et al., 2011); or polylactico-glycolic acid-based polymeric nanoparticle loaded with camptothecin for treatment of intracranial tumor model (Panigrahi et al., 2011; Patel et al., 2012).

Polymeric nanoparticles

Polymeric nanoparticles are solid colloidal (1 – 1000 nm) polymeric nanoparticles (copolymers, polysaccharides). They consist of a polymeric matrix in the core in which a therapeutic agent that can be trapped, dissolved, encapsulated or absorbed therein (Tiwari and Amiji, 2006; De Rosa et al., 2012). Nanomaterials for these nanocarriers are synthesized using organic chemistry. The most commonly used synthet-

Fig. 2: Polymeric-based nanoparticles



Source: modified from Masserini, 2013

ic polymers for the preparation of these nanocarriers are polyalkylcyanoacrylate, polymethylmethacrylate, acrylic copolymers, poly-D, L-lactide-co-glycolide, and polylactide. Natural polymers such as chitosan, albumin and heparin can also be used (Choonara et al., 2011; De Rosa et al., 2012; Edis et al., 2021).

The synthesis of polymer nanoparticles depends on the type of loaded drug and the method of administration. The two most common methods are polymer dispersion and monomer polymerization. The most often used technique is to dissolve polymers in organic solvents to obtain monomers. Organic solvents represent a toxic risk, so all residues must be removed. Subsequently, a controlled polymerization of the monomers takes place, and the resulting nanoparticles acquire suitable colloidal properties (Zielińska et al., 2020).

Polymeric nanoparticles have a low density and therefore are able to coat various types of therapeutic agents, proteins, nucleic acids and contrast agents, making them suitable candidates for therapeutic drug delivery vehicles (Tiwari and Amiji, 2006). Their physicochemical properties, size, shape and surface charge can be adjusted to facilitate the penetration of therapeutic agents into the brain, or to protect the therapeutic agent from degradation and prolong the release of the therapeutic agent (Hersh et al., 2016; Chamundeeswari et al., 2019).

Polymeric nanoparticles are designed to be biodegradable and for controlled drug release. In order to improve pharmacokinetics and biological distribution, the surface of polymeric nanoparticles is covered with hydrophilic surfactants (Tween 80) or colloidal particles (Tiwari and Amiji, 2006). Studies of polylactic-co-glycolic acid (PLGA) loaded with doxorubicin for chemotherapy of glioblastoma (Sadat Tabatabaei Mirakabad et al., 2014; Maksimenko et al., 2019); polyanhydride Gliadel (Panigrahi et al., 2011) and chitosan (Mohammed et al., 2017) nanoparticles used in brain cancer research were published.

Polymeric micelles

Micelles consist of amphiphilic molecules forming monolayers and bilayers. Their vesicular structure offer special protection of loaded drugs against degradation and a wide range of possibilities for targeted functionalisation/combined therapy (López-Dávila et al., 2012). Polymeric micelles are composed of amphiphilic copolymers forming spherical structures with a hydrophilic shell and a hydrophobic core in external solvent (Chamundeeswari et al., 2019). Inverse micelles can be prepared by using an amphiphilic or detergent molecule in a non-polar solvent. The size and shape of micelles are determined by pH and temperature of the external solvent (Chamundeeswari

et al., 2019; Nakhaei et al., 2021).

Micelles can be prepared by direct dissolution technique or dialysis. The direct dissolution technique consists of dissolving the drug and the amphiphilic copolymer in water at increasing temperature. In the dialysis method, the drug, polymer and organic solvent are placed in a dialysis bag. Next, the dialysis bag is placed in water to remove the organic solvent (Yadav et al., 2019).

Stability of micelles can be improved by cross-linking between the shell or core chains. Other adjustable properties of polymer micelles are their response to external stimuli, such as pH, light, temperature, ultrasound and thereby to control the release of loaded drugs (Masserini, 2013).

One of the most widely used polymers is a Pluronic-type block copolymer based on ethylene oxide and propylene oxide, which has a demonstrable analgesic effect on the CNS (Blasi et al., 2007; Masserini, 2013). Micelles conjugated with ligands that target the BBB, such as iRGD conjugated micelle for glioma treatment (Lu et al., 2020); or micelles functionalized with rabies virus glycoprotein peptid loaded with doxorubicin (Xu et al., 2021) are used in brain cancer research.

Dendrimers

Dendrimers are three-dimensional tree-like structures formed by the ramification of subunits (terminal active groups) around a core initiator (López-Dávila et al., 2012; Chamundeeswari et al., 2019). The core of dendrimer is connected to at least two identical chemical structures and polymer units of other molecules are attached. Polymer units have at least one branching connection. Chain repetition and branching result in a series of radially concentric layers (Masserini, 2013). This arrangement results in a tightly packed structure at the periphery and loosely packed structure at the core, leaving gaps that play a key role in the dendrimer's ability to bind drugs (Dhanikula et al., 2009).

Wide spread choice of dendrimers for biomedical application are the polyamidoamine (PAMAM) den-

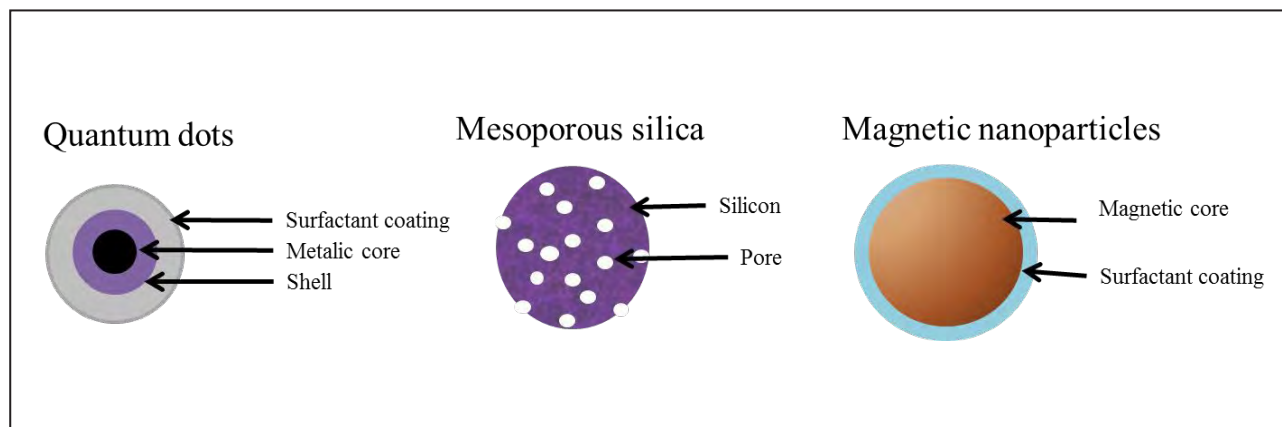
drimers. The PAMAM dendrimers are made of an inner diamine (ethylenediamine) core and peripheral branches formed by the tertiary amine. Initially the PAMAM dendrimers were synthesised by Michael addition of amine bearing core (such as ammonia) with methyl acrylate to generate ester-terminated dendrimers (referred as half generation of dendrimer). Subsequently, their amidation was performed by ethylenediamine to yield amine-terminated PAMAM dendrimers (Albertazzi et al., 2013; Edis et al., 2021).

Synthesis of PAMAM dendrimers is carried out either by divergent, convergent or by a combination of both methods. During the divergent method, dendrimers grow from the core to the periphery and in the convergent method; dendrimers grow from the periphery and spread inside until they form a core. Combination of both mentioned methods is performed by reaction of two monomers prepared by convergent and divergent methods to form a trimer (Yadav et al., 2019).

The drugs can be trapped in the nuclear cavities of a dendrimer through hydrophobic, hydrogen or chemical bonds. Alternatively, the drug can also be covalently attached to the terminal active groups (Chamundeeswari et al., 2019). The biggest advantages of using dendrimers are their structure, multivalence, easy surface functionalization and solubility in water. They further increase the solubility of the drug, prolong the circulation half-life and control the release of the drug (Yadav et al., 2019). Nevertheless, dendrimers can exhibit cytotoxic and hemolytic effects; they could be non-degradable in a physiological environment, which can cause their accumulation in tissues with serious side effects. This can be prevented by PEGylation or acetylation of the their surface (Chentharama et al., 2019).

Dendrimers are suitable as carriers for drug delivery into brain parenchyma (Dwivedi et al., 2016). PAMAM dendrimers are most often used due to their non-toxicity, flexibility, easy modifications of its surface and, thanks to its structure, they have an extremely high surface-to-volume ratio (Albertazzi et al., 2013; Bae et al., 2021; Caraway et al., 2022). For

Fig. 3: Inorganic nanoparticles



Source: modified from Din et al., 2017

example, PAMAM dendrimer loaded with carbamazepine showed promising results for the treatment of neurodegenerative diseases associated with protein aggregations such as Alzheimer's disease, Huntington's disease and Parkinson's disease (Igartúa et al., 2018); PEGylated PAMAM loaded with doxorubicin shows increased delivery of payload into brain tumor (He et al., 2011); and PAMAM dendrimer conjugated with N-acetyl-L-cysteine (antioxidant and antiinflammatory agent) showed improved survival and motor function of rabbits suffering from cerebral palsy (Zhang et al., 2020).

2. Inorganic nanoparticles

An inorganic core and an organic shell make up inorganic nanoparticles. The inorganic core is made up of metal or oxide-based biocompatible nanomaterials, while the shell is made of carbon and protects the core from unwanted biological, physical, or chemical interactions. Shell, on the other hand, acts as a substrate for biomacromolecular conjugation (Burduşel et al., 2022). In comparison to organic nanoparticles, inorganic nanoparticles have unique physical and chemical properties such as stability, the ability to easily modify the surface, extended lifetime, reduced toxicity, a good ability to bind the drug, and the ability to

control its release (Burduşel et al., 2022). Quantum dots, metallic nanoparticles, and oxide nanoparticles (see Fig. 3) are examples of inorganic nanoparticles (Burduşel et al., 2022).

2.1. Quantum dots

Semiconductor nanocrystals or Quantum dots (2 – 10 nm) consist of a core and a shell with appropriate surfactant coating, prepared by high-temperature strategy (Chenthamara et al., 2019; Edis et al., 2021). The core contains metal complexes, such as noble metals, semiconductors, and magnetic transition metals. Based on the metals used in the cores, Quantum dots are divided into groups: a) group contains atoms in III – V element groups in periodic table as indium arsenate, indium phosphate (InP), gallium arsenate (GaAs) and metalloid cores from gallium nitride (GaN); b) group contains atoms in II – IV element groups like cadmium-selenium (CdSe), zinc sulfide (ZnS), zinc-selenium (ZnSe) and cadmium-tellurium (CdTe) (Chamundeeswari et al., 2019; Edis et al., 2021). Their properties include good water solubility, chemical and optical properties, and surface modifications can improve biocompatibility. The optical properties of Quantum dots are determined by their size and shape: particles 2 – 3 nm in size emit green

and blue light, while larger particles (5 – 6 nm in size) emit red and orange light (Chamundeeswari et al., 2019; Chenthamara et al., 2019).

Cadmium-based semiconductors have excellent optical properties. However, because these metals can have toxic effects on the human body, they must be protected by a zinc (ZnS) shell. Other non-toxic components with similar optical properties are also being investigated (Chamundeeswari et al., 2019; Edis et al., 2021).

Quantum dots have been used in fluorescent probes, photosensitizers, and radiosensitizers. They are resistant to pH changes, chemical degradation, and have high thermal stability. Because of their small size, Quantum dots can easily pass-through cell membranes, have a high specific surface area, and can absorb high-energy photons such as gamma radiation. Drugs, however, must be conjugated on their solid core (Edis et al., 2021).

Several studies are investigating Quantum dots as a potential drug carrier. For example, graphene Quantum dots demonstrated inhibition of amyloid aggregation in the brain parenchyma, which accompanies Alzheimer's disease (Liu et al., 2015); or prevent accumulation of α -synuclein accompanying Parkinson's disease (Kim et al., 2018) *in vitro*. CdTe Quantum dots conjugated with transferrin receptor ligand were used in an *in vitro* study of HIV-associated encephalopathy (G. Xu et al., 2013) or in glioma theranostics (Cabral Filho et al., 2016). CdSe/ZnS Quantum dots are commonly used in medical research (Michalet et al., 2005).

2.2. Metallic nanoparticles

These nanoparticles contain noble metals (gold, silver) or copper and possess a solid and dense structure with 10 – 100 nm in size. Metallic nanoparticles, as well as other inorganic nanoparticles, are not able to cover drug inside, therefore the therapeutic substances must be conjugated on the surface (Hersh et al., 2016; Burduşel et al., 2022; Chandrakala et al., 2022).

Due to their small size, metal nanoparticles can

cross the BBB through passive diffusion, transcytosis and transsynaptic transport (Yang et al., 2010).

Gold nanoparticles

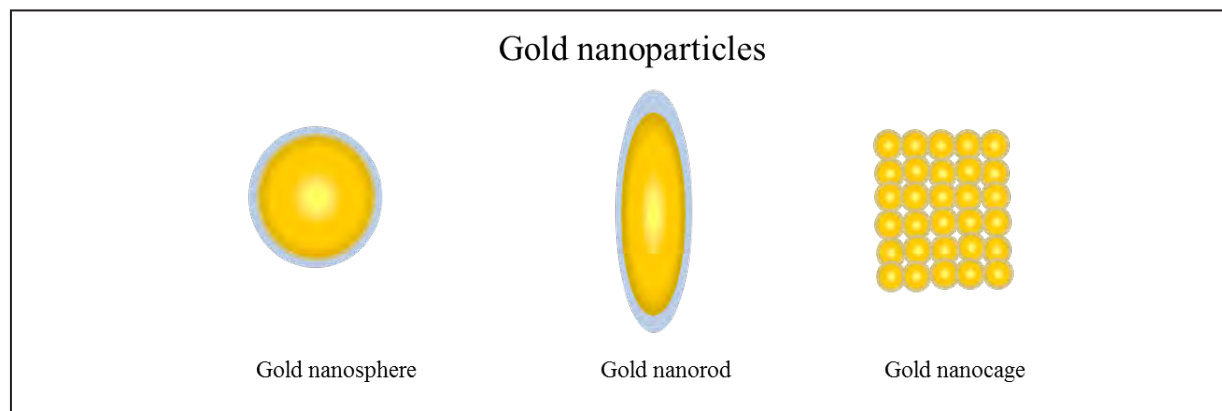
The unique properties of gold make these particles one of the most promising nanomaterials for biomedical use (Li et al., 2019). Gold nanoparticles are inert and biocompatible structures with high electrical conductivity and optical properties. They serve as carriers of therapeutic molecules, for medical imaging, diagnostics and also for photothermal and radiation therapy. Thanks to their surface properties they are capable of conjugation with drugs, dyes and biomolecules (Yeh et al., 2012; Burduşel et al., 2022). Based on shape, gold nanoparticles are divided into: a) nanospheres; b) nanorods; and c) nanocages (see Fig. 4) (Li et al., 2019).

Spherical gold nanoparticles are generated by reducing hydrogen tetrachloroauric acid (HAuCl₄) with citrate in boiling water, wherein the citrate acting as a reduction and stabilizing agent. Nanospheres are simple to make, have a uniform size, are biocompatible, have low toxicity, can easily penetrate tissues, and their surfaces are very easy to modify (Yeh et al., 2012; Li et al., 2019).

Gold nanorods are distinguished from nanospheres by their elongated shape and are produced using the seed-mediated colloidal growth method. Growth (secondary nucleation) occurs when pre-prepared nanosphere gold particles (seeds) are mixed with a surfactant medium. The particle size is controlled by the addition of reducing agents such as hydroxylamine and sodium citrate (Li et al., 2019).

Gold cages are concave nanoparticles with a porous structure. Small molecules can be encapsulated inside and other molecules can enter through the pores on the surface. The drug is located in the core and the pores are covered with a material with a phase change. Plasmon resonance causes melting of the phase and the drug is released. In addition, functional groups on the surface can target specific tissue, like transferrin receptor ligand or angiopep-2 for targeting BBB. The preparation is carried out by the method called "etch-

Fig. 4: Types of gold nanoparticles



Source: modified from Li et al., 2019

ing the template". However, this method is difficult, because there is a risk of collapsing of gold shell (Li et al., 2019). The therapeutic agent can be attached to the gold nanoparticle by covalent or non-covalent conjugation (Yeh et al., 2012). Gold nanoparticles have found application in many biomedical fields, e. g. nanogold conjugated with epidermal growth factor is used in the therapy of brain tumors (Cheng et al., 2011; Meyers et al., 2015) and gold nanoparticles functionalized by angiopo-2 and conjugated with doxorubicin were used in glioma study (Ruan et al., 2015).

Silver nanoparticles

Silver nanoparticles are among the most commonly used metal nanoparticles in biomedical applications due to their catalytic effect, chemical stability, universal biological activity, electrical conductivity, antibacterial, and optical properties. The antimicrobial and antiseptic properties of silver are caused by its ability to adhere to bacterial cell walls and cause oxidative stress, which leads to the damage of bacterial membranes and bacterial death (Burduşel et al., 2022).

The preparation of silver nanoparticles is performed by reduction of gallic acid by citrate anion in water (Kumar et al., 2018). Silver nanoparticles as well as other metal nanoparticles can be easily modi-

fied to target drugs and drugs must be conjugated to the nanoparticle surface. Silver nanoparticles show anti-cancer activity and enhance chemotherapeutic effects (Burduşel et al., 2022). However, they are not suitable for brain targeting because of neuronal death (F. Xu et al., 2013). On the other hand, studies were conducted where silver nanoparticles conjugated with H_2S showed lower toxicity and at the same time reduced brain inflammation (Gonzalez-Carter et al., 2017).

Copper nanoparticles

The essential element copper participates in the regulation of cellular processes, which support the physiological activity of bones, blood vessels and nerves, participates in wound healing and immune function so they can be used in bone healing therapy (Burduşel et al., 2022).

Copper nanoparticles, on the other hand, are not suitable as drug carriers into brain tissue, because while in small concentrations, they increase BMEC proliferation, at higher concentrations they are cytotoxic to BMEC and cause lesions in the brain tissue (Trickler et al., 2012; Zhang et al., 2012).

2.3. Mesoporous silica

Silicon occurs naturally in the body and its role is to regulate the development of connective tissues

and the skeleton (Burduşel et al., 2022). Mesoporous silica form honeycomb structure with the possibility of binding several hydrophobic and/or hydrophilic drugs (Chamundeeswari et al., 2019). Silicon nanoparticles consist of silicon oxide (SiO_2) and are prepared by the sol-gel method. Silicon alkoxide is hydrolyzed and condensed by acid and base catalysis. Surfactant molecules serve as a template around which polycondensation occurs and the formation of a network of precursors is created in a colloidal solution (sol). This solution depends on the speed of polycondensation reactions and forms a gel. In diluted conditions, monodispersed silicate nanoparticles are formed (Ghaferi et al., 2021).

Properties predetermining mesoporous silica nanoparticles for use in nanomedicine include: a) ability to transport and effective drug targeting; b) adjustable pore size and structure; c) internal biocompatibility and surface functionalization; d) the pore characteristics can be used on the one hand when loading these nanoparticles with drugs, dyes and biomolecules, on the other hand when releasing the cargo into tissues. The opening of the pores depends on the local micro-environment of the tissue, e. g. enzymes expressed by the tumor, or the external environment that prevents premature and nonspecific release of cargo, e. g. ultrasound or light (Burduşel et al., 2022).

Silica-based nanomaterials are used in biomolecule delivery systems, e. g. mesoporous particles MCM-41 modified by photosensitive ligand of cinnamic acid derivative and the pores containing Naproxen sodium salt shows controlled release of Naproxen after exposure to UV light (Almáši et al., 2021); calcium-doped mesoporous silica nanoparticles functionalized by polysorbate-80 were used to deliver rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease *in vitro* (Fateh Bashar zad et al., 2022); or nanoparticles with iron core and mesoporous silica shell functionalized by fibronectin ligand to target glioma cells and loaded with DOX show effective delivery of anticancer drug into brain (Turan et al., 2019).

2.4. Iron oxide nanoparticles and magnetic nanoparticles

Iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles (1 – 100 nm) represent biomedically versatile tool especially due to their magnetic, semiconducting, chemical, biocompatible and bioactive properties. In addition, the surface can be modified by conjugation with therapeutic substances and biomolecules. The magnetic properties can be used in the targeted delivery of these conjugated substances and their localization can be enhanced using external magnetic field (Sandhiya et al., 2009; Popescu et al., 2020; Burduşel et al., 2022).

Based on magnetic characteristics, this nanoparticles can be classified as: a) paramagnetic (in the absence of an external magnetic field, they form weak magnetic moments); b) diamagnetic (without the presence of an external magnetic field they do not exhibit any magnetic moments); c) ferromagnetic (they remain magnetized even in the absence of an external magnetic field); d) and super-paramagnetic (acts as a paramagnet in the presence of an external field) (Edis et al., 2021).

On the other hand, when an alternating magnetic field is applied, the orientation of unpaired electrons in the shell of iron nanoparticles changes, resulting in the release of energy in the form of heat, which does not harm healthy cells but does harm to cancer cells. This property is used locally in research into cancer therapy with magnetic hyperthermia (van Landeghem et al., 2009; Maier-Hauff et al., 2011; Gavilán et al., 2021). It has been shown that using magnetic nanoparticles with iron oxide and the subsequent addition of an external magnetic field, these nanoparticles can transcellularly cross the BBB in the mouse brain (Hersh et al., 2016); and can be used for imaging (MRI) of brain tumors (Mahmoudi and Hadjipapayis, 2014).

Other oxide-based nanoparticles

Nanoparticles of zinc oxide (O'Connor et al., 2020); titanium oxide (Cheng et al., 2021); cerium oxide (Wei et al., 2021) and magnesium oxide (Yin et al., 2020) were tested due to their antibiofilm, anti-

microbial activity and the presence of minerals that, after dissolution, are incorporated into biological processes, supporting bone mineralization and bone tissue regeneration (Burduşel et al., 2022).

3. Hybrid nanoparticles

Hybrid nanoparticles combine two or more organic and inorganic nanoparticles. On the basis of connected nanoparticles, they are classified as: organic-inorganic; inorganic-inorganic; organic-organic and multicomponent nanoparticles (Chamundeeswari et al., 2019). These hybrids combine the dual nature of nanoparticles and multiply their effects, and provide better stability. The goal of hybrid nanoparticles is to increase the biological activity and availability of the drug with negligible side effects. This requires consideration of the desired site of action, type of physiological barriers, conjugated drug, solubility and stability of nanoparticles (Chamundeeswari et al., 2019). Since hybrid particles combine the advantages of using several nanoparticles, they are the subject of intensive research in the field of targeted therapy of neurological disorders, e. g. PLGA-cholesterol nanoparticles for treatment of Huntington's disease (Belletti et al., 2018); Lecithin/chitosan nanoparticles to protect astrocytes during Krabbe's disease (associated with extensive demyelination, neuroinflammation and death) (Clementino et al., 2021); and cRGD-directed nanogold/PEG-poly(ϵ -caprolactone) hybrid nanoparticles for targeted glioblastoma in mouse (Zhong et al., 2014).

CONCLUSION

The development of targeted and specific CNS therapies that do not harm surrounding healthy tissue or disrupt the BBB holds great promise for nanomedicine. The most significant advantages of nanoparticles are modulated cargo release, good bioavailability, the ability to protect chemically labile molecules, low excipient costs, good drug incorporation, and a wide range of application possibilities. Their main disadvantage is their low filling capacity, drug excre-

tion during storage, relatively high water content, and gelatinization tendency.

Various formulations of nanocarrier-drug systems have been synthesized, modified, and characterized in recent years, yielding promising results, particularly in the targeted delivery of drugs to the brain and other difficult-to-reach tissues with minimal damage to healthy cells. However, in order to successfully incorporate nanosystems into clinical practice, a number of challenges must be overcome. One of the most serious issues is the toxicity of some nanocarriers (particularly Quantum dots, dendrimers, or several metal nanoparticles), so more research is needed to reduce toxicity and study materials without toxic effects. It is also critical that the excipients used to make the nanoparticles are safe for humans to consume. Because the properties of nanoparticle-drug systems can change depending on formulation and drug conjugation, there is a need for research into the long-term effects of nanoparticles on the organism. Finally, it is clear that the continuous discovery of new non-toxic materials is required. This discovery should be accompanied by studies that can demonstrate important aspects of nanocarriers such as non-toxicity, biodistribution, particularly in the CNS, clearance, and so on.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the financial support of projects: VEGA 1/0105/19, VEGA 2/0128/21, APVV-18-0259, Euronomed 2021-105 (ERA-NET H2020) and DSV-ITMS2014, project code NFP313010V455.

REFERENCES

- Abraham, S. A., Waterhouse, D. N., Mayer, L. D., Cullis, P. R., Madden, T. D., Bally, M. B.: The liposomal formulation of doxorubicin. *Methods in Enzymology*, 2005, 391, 71 – 97. Doi: 10.1016/S0076-6879(05)91004-5.
- Albertazzi, L., Gherardini, L., Brondi, M., Sulis Sato, S., Bifone, A., Pizzorusso, T., Ratto, G.

- M., Bardi, G.: *In vivo* distribution and toxicity of PAMAM dendrimers in the central nervous system depend on their surface chemistry. *Molecular pharmacology*, 2013, 10 (1), 249 – 260. Doi: 10.1021/mp300391v.
- Almáši, M., Matiašová, A. A., Šuleková, M., Beňová, E., Ševc, J., Váhovská, L., Lisnichuk, M., Girman, V., Zelenáková, A., Hudák, A., Zelenák, V.: *In vivo* study of light-driven naproxen release from gated mesoporous silica drug delivery system. *Scientific Reports*, 2021, 11 (1), 20 191. Doi: 10.1038/s41598-021-99678-y.
- Bae, Y., Lee, J., Kho, C., Choi, J. S., Han, J.: Apoptin gene delivery by a PAMAM dendrimer modified with a nuclear localization signal peptide as a gene carrier for brain cancer therapy. *Kjpp.*, 2021, 25 (5), 467 – 478. Doi: 10.4196/kjpp.2021.25.5.467.
- Belletti, D., Grabrucker, A. M., Pederzoli, F., Menrath, I., Vandelli, M. A., Tosi, G., Duskey, T. J., Fornì, F., Ruozi, B.: Hybrid nanoparticles as a new technological approach to enhance the delivery of cholesterol into the brain. *Int. J. Pharm.*, 2018, 543 (1–2), 300–310. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.03.061.
- Blasi, P., Giovagnoli, S., Schoubben, A., Ricci, M., Rossi, C.: Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2007, 59 (6), 454 – 477. Doi: 10.1016/j.addr.2007.04.011.
- Burduşel, A. C., Gherasim, O., Andronescu, E., Grumezescu, A. M., Ficai, A.: Inorganic nanoparticles in bone healing applications. *Pharmaceutics*, 2022, 14 (4). Doi: 10.3390/pharmaceutics14040770.
- Cabral Filho, P. E., Cardoso, A. L. C., Pereira, M. I. A., Ramos, A. P. M., Hallwass, F., Castro, M. M. C. A., Geraldes, C. F. G. C., Santos, B. S., Pedroso de Lima, M. C., Pereira, G. A. L., Fontes, A.: CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 2016, 1860 (1, Part A), 28 – 35. Doi: 10.1016/j.bba-gen.2015.09.021.
- Caraway, C. A., Gaitsch, H., Wicks, E. E., Kalluri, A., Kunadi, N., Tyler, B. M.: Polymeric nanoparticles in brain cancer therapy: A review of current approaches. *Polymers (Basel)*, 2022, 14 (14). Doi: 10.3390/polym14142963.
- Chamundeeswari, M., Jeslin, J., Verma, M. L.: Nanocarriers for drug delivery applications. *Environmental Chemistry Letters*, 2019, 17 (2), 849 – 865. Doi: 10.1007/s10311-018-00841-1.
- Chandrakala, V., Aruna, V., Angajala, G.: Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems. *Emergent Materials*, 2022. Doi: 10.1007/s42247-021-00335-x.
- Cheng, W., Xu, X., Lang, Y., Cheng, Z., Rizwan, M., Tang, X., Xie, L., Liu, Y., Xu, H., Liu, Y.: Anatase and rutile TiO₂ nanoparticles lead effective bone damage in young rat model via the IGF-1 signaling pathway. *Int. J. Nanomedicine*, 2021, 16, 7233 – 7247. Doi: 10.2147/ijn.S333632.
- Cheng, Y., Meyers, J. D., Agnes, R. S., Doane, T. L., Kenney, M. E., Broome, A. M., Burda, C., Basilion, J. P.: Addressing brain tumors with targeted gold nanoparticles: a new gold standard for hydrophobic drug delivery? *Small*, 2011, 7 (16), 2301 – 2306. Doi: 10.1002/sml.201100628.
- Chenthamara, D., Subramaniam, S., Ramakrishnan, S. G., Krishnaswamy, S., Essa, M. M., Lin, F.-H., Qoronfleh, M. W.: Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomaterials Research*, 2019, 23 (1), 20. Doi: 10.1186/s40824-019-0166-x.
- Choonara, Y. E., Pillay, V., Ndesendo, V. M., du Toit, L. C., Kumar, P., Khan, R. A., Murphy, C. S., Jarvis, D. L.: Polymeric emulsion and crosslink-mediated synthesis of super-stable nanoparticles as sustained-release anti-tuberculosis drug carriers. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 87 (2), 243 – 254. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.05.025.
- Clementino, A., Velasco-Estevez, M., Buttin, F., Sonvico, F., Dev, K. K.: Hybrid nanoparticles as a novel tool for regulating psychosine-induced neuroinflammation and demyelination *in vitro* and *ex vivo*. *Neurotherapeutics*, 2021, 18 (4), 2608 – 2622. Doi: 10.1007/s13311-021-01109-3.

- De Rosa, G., Salzano, G., Caraglia, M., Abbruzzese, A.: Nanotechnologies: a strategy to overcome blood-brain barrier. *Curr. Drug. Metab.*, 2012, 13 (1), 61 – 69. Doi: 10.2174/138920012798356943.
- Dhanikula, R. S., Hammady, T., Hildgen, P.: On the mechanism and dynamics of uptake and permeation of polyether-copolyester dendrimers across an *in vitro* blood-brain barrier model. *J. Pharm. Sci.*, 2009, 98 (10), 3748 – 3760. Doi: 10.1002/jps.21669.
- Din, F. U., Aman, W., Ullah, I., Qureshi, O. S., Mustapha, O., Shafique, S., Zeb, A.: Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *Int. J. Nanomedicine*, 2017, 12, 7291 – 7309. Doi: 10.2147/ijn.S146315.
- Dwivedi, N., Shah, J., Mishra, V., Mohd Amin, M. C., Iyer, A. K., Tekade, R. K., Kesharwani, P.: Dendrimer-mediated approaches for the treatment of brain tumor. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2016, 27 (7), 557 – 580. Doi: 10.1080/09205063.2015.1133155.
- Edis, Z., Wang, J., Waqas, M. K., Ijaz, M., Ijaz, M.: Nanocarriers-mediated drug delivery systems for anticancer agents: An overview and perspectives. *Int. J. Nanomedicine*, 2021, 16, 1313 – 1330. Doi: 10.2147/ijn.S289443.
- Esposito, E., Fantin, M., Marti, M., Drechsler, M., Paccamiccio, L., Mariani, P., Sivieri, E., Lain, F., Menegatti, E., Morari, M., Cortesi, R.: Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bromocriptine. *Pharm. Res.*, 2008, 25 (7), 1521 – 1530. Doi: 10.1007/s11095-007-9514-y.
- Fateh Bashar zad, S., Hamidi, M., Maleki, A., Karami, Z., Mohamadpour, H., Reza Saghatchi Zanjani, M.: Polysorbate-coated mesoporous silica nanoparticles as an efficient carrier for improved rivastigmine brain delivery. *Brain Research*, 2022, 1781, 147 786. Doi: 10.1016/j.brainres.2022.147786.
- Fukuta, T., Ishii, T., Asai, T., Sato, A., Kikuchi, T., Shimizu, K., Minamino, T., Oku, N.: Treatment of stroke with liposomal neuroprotective agents under cerebral ischemia conditions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, 97 (Pt. A), 1 – 7. Doi: 10.1016/j.ejpb.2015.09.020.
- Gavilán, H., Avugadda, S. K., Fernández-Cabada, T., Soni, N., Cassani, M., Mai, B. T., Chantrell, R. W., Pellegrino, T.: Magnetic nanoparticles and clusters for magnetic hyperthermia: optimizing their heat performance and developing combinatorial therapies to tackle cancer. *Chemical Society reviews*, 2021, 50 (20), 11614 – 11667.
- Ghaferi, M., Koochi Moftakhari Esfahani, M., Raza, A., Al Harthi, S., Ebrahimi Shahmabadi, H., Alavi, S. E.: Mesoporous silica nanoparticles: synthesis methods and their therapeutic use – recent advances. *J. Drug Target.*, 2021, 29 (2), 131 – 154. Doi: 10.1080/1061186x.2020.1812614.
- Gonzalez-Carter, D. A., Leo, B. F., Ruenrangsak, P., Chen, S., Goode, A. E., Theodorou, I. G., Chung, K. F., Carzaniga, R., Shaffer, M. S. P., Dexter, D. T., Ryan, M. P., Porter, A. E.: Silver nanoparticles reduce brain inflammation and related neurotoxicity through induction of H₂S-synthesizing enzymes. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1), 42 871. Doi: 10.1038/srep42871.
- He, H., Li, Y., Jia, X. R., Du, J., Ying, X., Lu, W. L., Lou, J. N., Wei, Y.: PEGylated Poly(amidoamine) dendrimer-based dual-targeting carrier for treating brain tumors. *Biomaterials*, 2011, 32 (2), 478 – 487. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.002.
- Hersh, D. S., Wadajkar, A. S., Roberts, N., Perez, J. G., Connolly, N. P., Frenkel, V., Winkles, J. A., Woodworth, G. F., Kim, A. J. (2016): Evolving drug delivery strategies to overcome the blood brain barrier. *Curr. Pharm. Des.*, 2016, 22 (9), 1177 – 1193. Doi: 10.2174/1381612822666151221150733.
- Igartúa, D. E., Martinez, C. S., Temprana, C. E., Alonso, S. d. V., Prieto, M. J.: PAMAM dendrimers as a carbamazepine delivery system for neurodegenerative diseases: A biophysical and nanotoxicological characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 544 (1), 191 – 202. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.04.032.
- Kadari, A., Pooja, D., Gora, R. H., Gudem, S., Kolapalli, V. R. M., Kulhari, H., Sistla, R.: Design of multifunctional peptide collaborated and docetaxel loaded lipid nanoparticles for antiglioma therapy.

- Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2018, 132, 168 – 179. Doi: 10.1016/j.ejpb.2018.09.012.
- Karim, R., Palazzo, C., Evrard, B., Piel, G.: Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: Current state-of-the-art. *Journal of Controlled Release*, 2016, 227, 23 – 37. Doi: 10.1016/j.jconrel.2016.02.026.
- Kaur, I. P., Bhandari, R., Bhandari, S., Kakkar, V.: Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. *J. Control. Release*, 2008, 127 (2), 97 – 109. Doi: 10.1016/j.jconrel.2007.12.018.
- Kim, D., Yoo, J. M., Hwang, H., Lee, J., Lee, S. H., Yun, S. P., Park, M. J., Lee, M., Choi, S., Kwon, S. H., Lee, S., Kwon, S.-H., Kim, S., Park, Y. J., Kinoshita, M., Lee, Y.-H., Shin, S., Paik, S. R., Lee, S. J., Lee, S., Hong, B. H., Ko, H. S.: Graphene quantum dots prevent α -synucleinopathy in Parkinson's disease. *Nature Nanotechnology*, 2018, 13 (9), 812 – 818. Doi: 10.1038/s41565-018-0179-y.
- Kumar, K. H., Venkatesh, N., Bhowmik, H., Kuila, A.: Metallic nanoparticle: A review. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 2018, 4, 3765 – 3775. Doi: 10.26717/BJSTR.2018.04.00.
- Li, W., Cao, Z., Liu, R., Liu, L., Li, H., Li, X., Chen, Y., Lu, C., Liu, Y.: AuNPs as an important inorganic nanoparticle applied in drug carrier systems. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2019, 47 (1), 4222 – 4233. Doi: 10.1080/21691401.2019.1687501.
- Liu, P., Chen, G., Zhang, J.: A review of liposomes as a drug delivery system: Current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives. *Molecules*, 2022, 27 (4). Doi: 10.3390/molecules27041372.
- Liu, Y., Xu, L.-P., Dai, W., Dong, H., Wen, Y., Zhang, X.: Graphene quantum dots for the inhibition of β amyloid aggregation [10.1039/C5NR06282A]. *Nanoscale*, 2015, 7 (45), 19 060 – 19 065. Doi: 10.1039/C5NR06282A.
- López-Dávila, V., Seifalian, A. M., Loizidou, M.: Organic nanocarriers for cancer drug delivery. *Current Opinion in Pharmacology*, 2012, 12 (4), 414 – 419. Doi: 10.1016/j.coph.2012.02.011.
- Lu, L., Zhao, X., Fu, T., Li, K., He, Y., Luo, Z., Dai, L., Zeng, R., Cai, K.: An iRGD-conjugated prodrug micelle with blood-brain-barrier penetrability for anti-glioma therapy. *Biomaterials*, 2020, 230, 119 666. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119666.
- Mahmoudi, K., Hadjipanayis, C. G.: The application of magnetic nanoparticles for the treatment of brain tumors. *Front. Chem.*, 2014, 2, 109. Doi: 10.3389/fchem.2014.00109.
- Maier-Hauff, K., Ulrich, F., Nestler, D., Niehoff, H., Wust, P., Thiesen, B., Orawa, H., Budach, V., Jordan, A.: Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.*, 2011, 103 (2), 317 – 324. Doi: 10.1007/s11060-010-0389-0.
- Maksimenko, O., Malinovskaya, J., Shipulo, E., Osipova, N., Razzhivina, V., Arantseva, D., Yarovaya, O., Mostovaya, U., Khalansky, A., Fedoseeva, V., Alekseeva, A., Vanchugova, L., Gorshkova, M., Kovalenko, E., Balabanyan, V., Melnikov, P., Baklaushev, V., Chekhonin, V., Kreuter, J., Gelperina, S.: Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. *Int. J. Pharm.*, 2019, 572, 118 733. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118733.
- Masserini, M.: Nanoparticles for brain drug delivery. *ISRN Biochem.*, 2013, 238 428. Doi: 10.1155/2013/238428.
- Mehnert, W., Mäder, K.: Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64, 83 – 101. Doi: 10.1016/j.addr.2012.09.021.
- Meyers, J. D., Cheng, Y., Broome, A. M., Agnes, R. S., Schluchter, M. D., Margevicius, S., Wang, X., Kenney, M. E., Burda, C., Basilion, J. P.: Peptide-targeted gold nanoparticles for photodynamic therapy of brain cancer. *Part Part Syst. Charact.*, 2015, 32 (4), 448 – 457. Doi: 10.1002/ppsc.201400119.
- Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J. J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S. S., Weiss, S.: Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Sci-*

ence, 2005, 307 (5709), 538 – 544. Doi: 10.1126/science.1104274.

Micheli, M. R., Bova, R., Magini, A., Polidoro, M., Emiliani, C.: Lipid-based nanocarriers for CNS-targeted drug delivery. *Recent Pat. CNS Drug Discov.*, 2012, 7 (1), 71 – 86. Doi: 10.2174/157488912798842241.

Mohammed, M. A., Syeda, J. T. M., Wasan, K. M., Wasan, E. K.: An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics*, 2017, 9 (4). Doi: 10.3390/pharmaceutics9040053.

Nakhaei, P., Margiana, R., Bokov, D. O., Abdelbasset, W. K., Jadidi Kouhbanani, M. A., Varma, R. S., Marofi, F., Jarahian, M., Beheshtkhoo, N.: Liposomes: structure, biomedical applications, and stability parameters with emphasis on cholesterol. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2021, 9, 705 886. Doi: 10.3389/fbioe.2021.705886.

Naseri, N., Valizadeh, H., Zakeri-Milani, P.: Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. *Adv. Pharm. Bull.*, 2015, 5 (3), 305 – 313. Doi: 10.1517/apb.2015.043.

O'Connor, J. P., Kanjilal, D., Teitelbaum, M., Lin, S. S., Cottrell, J. A.: Zinc as a therapeutic agent in bone regeneration. *Materials (Basel)*, 2020, 13 (10). Doi: 10.3390/ma13102211.

Olusanya, T. O. B., Haj Ahmad, R. R., Ibegbu, D. M., Smith, J. R., Elkordy, A. A.: Liposomal drug delivery systems and anticancer drugs. *Molecules*, 2018, 23 (4). Doi: 10.3390/molecules23040907.

Pandit, R., Chen, L., Götz, J.: The blood-brain barrier: Physiology and strategies for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2020, 165 – 166, 1 – 14. Doi: 10.1016/j.addr.2019.11.009.

Panigrahi, M., Das, P. K., Parikh, P. M.: Brain tumor and Gliadel wafer treatment. *Indian J. Cancer.*, 2011, 48 (1), 11 – 17. Doi: 10.4103/0019-509x.76623.

Parhi, R., Suresh, P.: Production of solid lipid nanoparticles-drug loading and release mechanism. *J. Chem. Pharm. Res.*, 2010, 2 (1), 211 – 227.

Patel, T., Zhou, J., Piepmeier, J. M., Saltzman, W. M.: Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, 64 (7), 701 – 705. Doi: 10.1016/j.addr.2011.12.006.

Petkar, K. C., Chavhan, S. S., Agatonovik-Kustrin, S., Sawant, K. K.: Nanostructured materials in drug and gene delivery: a review of the state of the art. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 2011, 28 (2), 101 – 164. Doi: 10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v28.i2.10.

Peyrard-Janvid, M., Leslie, E. J., Kousa, Y. A., Smith, T. L., Dunnwald, M., Magnusson, M., Lentz, B. A., Unneberg, P., Fransson, I., Koillinen, H. K., Rautio, J., Pegelow, M., Karsten, A., Basel-Vanagaite, L., Gordon, W., Andersen, B., Svensson, T., Murray, J. C., Cornell, R. A., Kere, J., Schutte, B. C.: Dominant mutations in GRHL3 cause Van der Woude Syndrome and disrupt oral periderm development. *Am. J. Hum. Genet.*, 2014, 94 (1), 23 – 32. Doi: 10.1016/j.ajhg.2013.11.009.

Pidgeon, C., McNeely, S., Schmidt, T., Johnson, J. E.: Multilayered vesicles prepared by reverse-phase evaporation: liposome structure and optimum solute entrapment. *Biochemistry*, 1987, 26 (1), 17 – 29. Doi: 10.1021/bi00375a004.

Popescu, R. C., Straticiuc, M., Mustăciosu, C., Temelie, M., Trușcă, R., Vasile, B., Boldeiu, A., Mirea, D., Andrei, R. F., Cenușă, C., Mogoantă, L., Mogoșanu, G. D., Andronescu, E., Radu, M., Veldwijk, M. R., Savu, D. I.: Enhanced internalization of nanoparticles following ionizing radiation leads to mitotic catastrophe in MG-63 human osteosarcoma cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21 (19). Doi: 10.3390/ijms21197220.

Profaci, C. P., Munji, R. N., Pulido, R. S., Daneman, R.: The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *Journal of Experimental Medicine*, 2020, 217 (4), e2019006210.1084/jem.20190062.

Provenzale, J. M., Silva, G. A.: Uses of nanoparticles for central nervous system imaging and therapy. *American Journal of Neuroradiology*, 2009,

30 (7), 1293 – 1301. Doi: 10.3174/ajnr.A1590.

Ruan, S., Yuan, M., Zhang, L., Hu, G., Chen, J., Cun, X., Zhang, Q., Yang, Y., He, Q., Gao, H.: Tumor microenvironment sensitive doxorubicin delivery and release to glioma using angiopep-2 decorated gold nanoparticles. *Biomaterials*, 2015, 37, 425 – 435. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.007.

Sadat Tabatabaei Mirakabad, F., Nejati-Koshki, K., Akbarzadeh, A., Yamchi, M. R., Milani, M., Zarghami, N., Zeighamian, V., Rahimzadeh, A., Alimohammadi, S., Hanifepour, Y., Joo, S. W.: PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014, 15 (2), 517 – 535. Doi: 10.7314/apjcp.2014.15.2.517.

Samad, A., Sultana, Y., Aqil, M.: Liposomal drug delivery systems: an update review. *Current Drug Delivery*, 2007, 4 (4), 297 – 305. Doi: 10.2174/156720107782151269.

Sandhir, R., Yadav, A., Mehrotra, A., Sunkaria, A., Singh, A., Sharma, S.: Curcumin nanoparticles attenuate neurochemical and neurobehavioral deficits in experimental model of Huntington's disease. *Neuromolecular Med.*, 2014, 16 (1), 106 – 118. Doi: 10.1007/s12017-013-8261-y.

Sandhiya, S., Dkhar, S. A., Surendiran, A.: Emerging trends of nanomedicine--an overview. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2009, 23 (3), 263 – 269. Doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00692.x.

Satapathy, M. K., Yen, T. L., Jan, J. S., Tang, R. D., Wang, J. Y., Taliyan, R., Yang, C. H.: Solid lipid nanoparticles (SLNs): An advanced drug delivery system targeting brain through BBB. *Pharmaceutics*, 2021, 13 (8). Doi: 10.3390/pharmaceutics13081183.

Sharma, G., Sharma, A. R., Lee, S.-S., Bhat-tacharya, M., Nam, J.-S., Chakraborty, C. Advances in nanocarriers enabled brain targeted drug delivery across blood brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 559, 360 – 372. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.056.

Tapeinos, C., Battaglini, M., Ciofani, G.: Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. *J. Control. Release*, 2017, 264, 306 – 332.

Doi: 10.1016/j.jconrel.2017.08.033.

Tiwari, S. B., Amiji, M. M.: A review of nanocarrier-based CNS delivery systems. *Current Drug Delivery*, 2006, 3 (2), 219 – 232. Doi: 10.2174/156720106776359230.

Trickler, W. J., Lantz, S. M., Schrand, A. M., Robinson, B. L., Newport, G. D., Schlager, J. J., Paule, M. G., Slikker, W., Biris, A. S., Hussain, S. M., Ali, S. F.: Effects of copper nanoparticles on rat cerebral microvessel endothelial cells. *Nanomedicine (Lond.)*, 2012, 7 (6), 835 – 846. Doi: 10.2217/nnm.11.154.

Turan, O., Bielecki, P., Perera, V., Lorkowski, M., Covarrubias, G., Tong, K., Yun, A., Rahmy, A., Ouyang, T., Raghunathan, S., Gopalakrishnan, R., Griswold, M. A., Ghaghada, K. B., Peiris, P. M., Karathanasis, E.: Delivery of drugs into brain tumors using multicomponent silica nanoparticles. *Nanoscale*, 2019, 11 (24), 11 910 – 11 921. Doi: 10.1039/c9nr02876e.

Vakilinezhad, M. A., Amini, A., Akbari Javar, H., Baha'addini Beigi Zarandi, B. F., Montaseri, H., Dinarvand, R.: Nicotinamide loaded functionalized solid lipid nanoparticles improves cognition in Alzheimer's disease animal model by reducing Tau hyperphosphorylation. *Daru*, 2018, 26 (2), 165 – 177. Doi: 10.1007/s40199-018-0221-5.

van Landeghem, F. K., Maier-Hauff, K., Jordan, A., Hoffmann, K. T., Gneveckow, U., Scholz, R., Thiesen, B., Brück, W., von Deimling, A.: Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 2009, 30 (1), 52 – 57. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.044.

Wei, F., Neal, C. J., Sakthivel, T. S., Kean, T., Seal, S., Coathup, M. J.: Multi-functional cerium oxide nanoparticles regulate inflammation and enhance osteogenesis. *Materials Science and Engineering: C*, 2021, 124, 112 041. Doi: 10.1016/j.msec.2021.112041.

Xin, H., Jiang, Y., Lv, W., Xu, J.: Chapter 9 – Liposome-Based Drug Delivery for Brain Tumor Theranostics. In P. Kesharwani, U. Gupta (Eds.). *Na-*

nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Brain Tumors. Academic Press, 2018, 245 – 266. Doi: 10.1016/B978-0-12-812218-1.00009-9.

Xu, F., Pieltz, C., Farkas, S., Qazzaz, M., Syed, N. I.: Silver nanoparticles (AgNPs) cause degeneration of cytoskeleton and disrupt synaptic machinery of cultured cortical neurons. *Molecular Brain*, 2013, 6 (1), 29. Doi: 10.1186/1756-6606-6-29.

Xu, G., Mahajan, S., Roy, I., Yong, K.-T.: Theranostic quantum dots for crossing blood-brain barrier *in vitro* and providing therapy of HIV-associated encephalopathy [Review]. *Frontiers in Pharmacology*, 2013, 4. Doi: 10.3389/fphar.2013.00140.

Xu, J., Yang, X., Ji, J., Gao, Y., Qiu, N., Xi, Y., Liu, A., Zhai, G.: RVG-functionalized reduction sensitive micelles for the effective accumulation of doxorubicin in brain. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, 19 (1), 251. Doi: 10.1186/s12951-021-00997-z.

Yadav, H. K. S., Almokdad, A. A., Shaluf, S. I. M., Debe, M. S.: Chapter 17 – Polymer-Based Nanomaterials for Drug-Delivery Carriers. In S. S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R. K. Mishra, S. Thomas (Eds.). *Nanocarriers for Drug Delivery*. Elsevier, 2019. 531 – 556. Doi: 10.1016/B978-0-12-814033-8.00017-5.

Yang, Z., Liu, Z. W., Allaker, R. P., Reip, P., Oxford, J., Ahmad, Z., Ren, G.: A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. *J. R. Soc. Interface*, 2010, 7 (Suppl. 4), S411 – S422. Doi: 10.1098/rsif.2010.0158.focus.

Yeh, Y. C., Creran, B., Rotello, V. M.: Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, 2012, 4 (6), 1871 – 1880. Doi: 10.1039/c1nr11188d.

Yin, Y., Huang, Q., Yang, M., Xiao, J., Wu, H., Liu, Y., Li, Q., Huang, W., Lei, G., Zhou, K.: MgO Nanoparticles protect against titanium particle-induced osteolysis in a mouse model because of their positive immunomodulatory effect. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2020, 6 (5), 3005 – 3014. Doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b01852.

Zhang, L., Bai, R., Liu, Y., Meng, L., Li, B., Wang, L., Xu, L., Le Guyader, L., Chen, C.: The dose-dependent toxicological effects and potential perturbation on the neurotransmitter secretion in brain following intranasal instillation of copper nanoparticles. *Nanotoxicology*, 2012, 6 (5), 562 – 575. Doi: 10.3109/17435390.2011.590906.

Zhang, L., Gu, F. X., Chan, J. M., Wang, A. Z., Langer, R. S., Farokhzad, O. C.: Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2008, 83 (5), 761 – 769. Doi: 10.1038/sj.clpt.6100400.

Zhang, Z., Lin, Y.-A., Kim, S.-Y., Su, L., Liu, J., Kannan, R. M., Kannan, S.: Systemic dendrimer-drug nanomedicines for long-term treatment of mild-moderate cerebral palsy in a rabbit model. *Journal of Neuroinflammation*, 2020, 17 (1), 319. Doi: 10.1186/s12974-020-01984-1.

Zhong, Y., Wang, C., Cheng, R., Cheng, L., Meng, F., Liu, Z., Zhong, Z.: cRGD-directed, NIR-responsive and robust AuNR/PEG-PCL hybrid nanoparticles for targeted chemotherapy of glioblastoma *in vivo*. *J. Control. Release*, 2014, 195, 63 – 71. Doi: 10.1016/j.jconrel.2014.07.054.

Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., Souto, E. B.: Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*, 2020, 25 (16). Doi: 10.3390/molecules25163731.



ST. JOHN'S WORT MEDICINAL PRODUCTS IN SLOVAKIA – EFFICACY OF ORAL FORMULATION OF SJW PRODUCTS

Rozman Antoliová, Natália¹; Gažová, Andrea²; Kyselovič, Ján³; Petrovič, Vladimír⁴

¹Department of Pharmacology and Toxicology

University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice

²Faculty of Medicine, Comenius University Bratislava

Institute of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Špitálska 24, 813 72 Bratislava

³Faculty of Medicine, Comenius University Bratislava

⁵th Department of Internal Medicine, Špitálska 24, 813 72 Bratislava

⁴Department of Pharmacology and Toxicology

University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice

The Slovak republic

natalia.antolikova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Hypericum perforatum (St. John's wort, SJW, *Hypericaceae*) is one of the most prominent and best investigated medicinal plants during the last two decades, the focus of interest clearly being on its potential as phyto antidepressant. Nowadays, SJW is an established medicine for mild to moderate depression, registered in many European countries, and considered to have fewer side effects compared to traditional antidepressants. Long-term use of a commercial antidepressant often demonstrates efficacy, but side effects cause that 10 – 20 % of patients withdraw from treatment. Consequently, there is a need for new actives with better safety profiles, such as hypericum extract. The inhibition of MAOs (monoamine oxidases) may be a potential mechanism responsible for the

antidepressant action of St. John's wort. Some *in vitro* studies have shown that Hypericum extract and, specifically, hyperforin are inhibitors of synaptic reuptake of numerous neurotransmitters (serotonin, noradrenaline, dopamine). Additionally, within this study, we analysed the effects of *H. perforatum* through a complete list of pharmacies in the Slovak republic. We focused on the composition and amount of individual substances in SJW medicinal products. From our findings it follows that the vast majority of SJW products fail to adequately address clinically relevant safety issues on their labelling caused by the incorrect dosing or low content of the desired substance in the preparation.

Key words: antidepressant activity; *H. perforatum*; plant extracts

INTRODUCTION

St. John's wort (SJW), known botanically as *Hypericum perforatum* (a member of the *Hypericaceae* family), is a sprawling, leafy herb that grows in open, disturbed areas throughout much of the world's temperate regions (Henderson et al., 2002; Klemow et al., 2011). It is used in traditional or folk medicine for treating a diverse range of disorders that includes bacterial and viral infections, respiratory impairment, skin wound, peptic ulcers, and inflammation (Nicolussi et al., 2020). This species is also used as a herbal remedy to treat a variety of internal and external problems. Nowadays, research suggests the effectiveness of this herb in treating other ailments including cancer, inflammation-related disorders, bacterial and viral diseases, and as an antioxidant and neuroprotective agent (Klemow et al., 2011). However, the most common reason for using *Hypericum perforatum* is to alter mood to relieve the symptoms associated with depressive episodes or major depression respectively (Nicolussi et al., 2020). SJW is believed to exert its antidepressant action by inhibiting the uptake of serotonin, noradrenaline and dopamine. Extract of SJW has been shown to have a potent affinity for the adenosine, serotonin (5HT₁, 2A), benzodiazepine and γ -aminobutyric acid (GABA) receptors and to weakly inhibit monoamine oxidase. It has also been postulated that SJW's antidepressant activity may be a result of its effect on interleukin-6 (Henderson et al., 2002; Fisher et al., 2021).

The herb contains the following flavonoids: mainly hyperoside, rutoside, quercetin, isoquercetin; naphthodianthrones; hypericin and derivatives – pseudo-hypericin, protohypericin and isohypericin that are considered to be hypericin precursors; biflavonoids: amentoflavone and biapigenine; fluoroglucinol derivatives – hyperforin and adhyperforin; caffeic and chlorogenic acid; catechine tanning agents; xantons, as well as essential oil containing monoterpenes, aliphatic hydrocarbons and aldehydes and sesquiterpenes (Anyzewska et al., 2010).

Clinical application of SJW

The aqueous extracts rich in hydrophilic agents (flavonoid glycosides, tanning agents and phenol acids) have astringent and relaxation properties, and are used in contractions of the bile ducts, gastrointestinal mucous membrane inflammation and as an agent stimulating the production of digestive fluids. The extracts produced from the herbal drug by a suitable procedure using ethanol/methanol (50 – 80 % v/v) containing mainly hypericin, hyperforin, xantons, flavonoids and procyanamides have effects on the central nervous system and are used to treat mild depression-like mood disorders (Anyzewska et al., 2010). SJW preparations and their effects were similar to synthetic antidepressants. *H. perforatum* and its active constituents may exert antidepressant effects comparable to those of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors, with a better tolerability profile. However, it should be noted that the side effects of *H. perforatum* were observed in mostly short-term trials and long-term users should be advised of the potential risks. And *H. perforatum* has been shown to be a cost-effective alternative to generic antidepressants (Zirak et al., 2019; Nicolussi et al., 2020). The results of the latest studies indicate that the antidepressive effects of hyperforin are more powerful than the ones of hypericin, as it is a more potent inhibitor of the uptake of serotonin, noradrenaline, dopamine, GABA and L-glutamate (Anyzewska et al., 2010). However, the amount of hypericin varies widely in different parts of the plant, under different growth conditions, and at different times of the year (Henderson et al., 2002).

Adverse effect and pharmacokinetic drug interaction with SJW

Undesirable effects that were most commonly reported were gastrointestinal irritations, allergic reactions, fatigue and restlessness (Nicolussi et al., 2020). Side effects of SJW become particularly apparent in combination with cyclosporine, tacrolimus, amprenavir, indinavir, and other protease inhibitors, irinotecan and warfarin (Habs et al., 2018). Most of

Tab. 1: Possible interactions of SJW and other drugs

Drug Pharmacokinetic interactions	Result of action
Warfarin	Induction of CYP2C9
Cyklosporin	Induction of CYP3A4 the transport P-glycoprotein
Oral contraceptives	Induction of CYP1A2 and CYP3A4
Theophylline	Induction of CYP1A2
Digoxin	Induction of transport P-glycoprotein
HIV (protease inhibitors, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors)	Induction of CYP3A4
Anticonvulsants (carbamazepine, phenobarbitone, phenytoin)	Induction of CYP3A4
Drug Pharmacodynamic interactions	Result of action
SSRI	Potentialiation of serotonin concentrations
Triptans	Potentialiation of serotonin concentrations

CYP2C9, CYP3A4, CYP1A2 – enzymes cytochrome P450; SSRI – selective serotonin reuptake inhibitors

Source: Henderson et al., 2002

these interactions are consistent with the induction of cytochrome P450 3A4 enzyme, including enhanced expression and drug efflux activity of P-glycoprotein (Clauson et al., 2008).

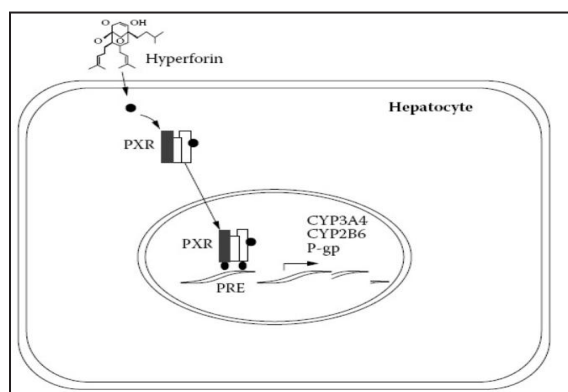
The most common effects are gastrointestinal symptoms, allergic reactions, dizziness or confusion, tiredness or sedation and dry mouth. The majority of these reactions were generally considered to be mild, moderate or transient. Events also involved reactions of the skin exposed to light (hypericin and related naphthodianthrone cause phototoxicity due to UV light sensitivity, which has been showed in *in vitro* and *in vivo* experiments and in humans) that was followed by increased bleeding time with coumarin-type oral anticoagulants, bleeding with oral contraceptives, therefore, women taking the pill are advised to use additional contraceptive measures, and it is reportedly responsible for decreased plasma levels of digoxin (see Tab. 1). In the absence of sufficient data, use in patients under 18 years, during pregnancy

and lactation is not recommended (Henderson et al., 2002; Clauson et al., 2008; Habs et al., 2018; Nicolussi et al., 2020).

The hyperforin is mainly responsible for pharmacokinetic interactions with other drug substances, which are metabolized by certain CYP450 isoenzymes and transported by P-gp (Nicolussi et al., 2020). Hyperforin enters the cell and binds to the human pregnane X receptor (PXR) in the cytoplasm. The complex enters the nucleus, binding with the pregnane response element (PRE). This complex (PXR/PRE) induces the downstream gene targets CYP3A4, CYP2B6, and MDR1, producing the enzymes cytochrome P450 (CYP) 3A4, CYP2B6, and P-gp, (see Fig. 1) (Klemow et al., 2011).

The induction of CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 and P-gp is directly correlated with the content of hyperforin in the herbal preparation. However, at daily dosages of maximum 1 mg hyperforin, no clinically relevant pharmacokinetic interactions are to be expected.

Fig. 1: Reaction between hyperforin and PXR receptor



PXR – human pregnane X receptor in the cytoplasm; PRE – pregnane response element; CYP3A4, CYP2B6 – enzymes cytochrome P450; P-gp – P-glycoprotein

Source: Klemow et al., 2011

ted (Nicolussi et al., 2020). Therapy with SJW should be administered as a monotherapy and their products are not sufficiently investigated to be recommended for combination therapy with psychotropic drugs or medications for other indications (Habs et al., 2018).

Different geographical distinction

SJW is considered a medicinal product in Europe and China but a finished dietary supplement product in the United States (U. S.) (see Tab. 2) (Habs et al., 2018). In particular, Europe and the Mediterranean basin represent a hot spot of diversity for *Hypericum species* (Tocci et al., 2018).

The EU legal definition differentiates between herbal medicinal products, herbal substances and herbal preparations. Herbal substances are whole, fragmented or cut plants, plant parts, algae, fungi, lichen in an unprocessed, usually dried form, but sometimes fresh. Herbal products are obtained by extracting, distilling, fractionating, purifying, concentrating or fermenting of herbal substances. Consequently, herbal medicinal products contain as active ingredients one or more herbal substances or one or more herbal preparations or herbal substances in combination with

one or more herbal preparation (Directive_2001/83/EC, 2001). St. John's wort is not currently regulated by the U. S. Food and Drug Administration, and there is no current standard in place about the contents and potency of the medication (Habs et al., 2018).

Older results – nowadays studies – situation in Slovakia

The older studies showed that tablets and capsules containing a standardized ethanolic extract of SJW wort at the amount ranging from 60 mg to 425 mg of extract are usually used to treat the episodes of mild depressive disorders. According to manufacturers, these products provide the daily dose ranging from 0.3 mg to 3.0 mg of total hypericins expressed as hypericin (Anyzewska et al., 2010). The German Commission E and European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) monographs recommend 900 mg of standardized extract per day (Klemow et al., 2011). Nowadays, by Nicolussi et al. (2020), hyperforin is the major active principle of SJW leading to antidepressant effect. When the recommended daily dose of SJW 900 mg (3×300 mg) is taken, this amount of the extract is equivalent to a daily dose of approximately 40 mg of hyperforin. Hyperforin, hypericin, and flavonoids have been demonstrated to be present in very different concentrations in various commercial products. The length of treatment of controlled clinical trials ranges between 4 to 12 weeks (Habs et al., 2018). Commercial preparations differ significantly in their content of hyperforin, hypericin, and flavonoids. Importantly, the induction of CYP3A4 in intestinal cells correlates with the content of hyperforin (Nicolussi et al., 2020). We focused on the composition and amount of individual substances in SJW medicinal products.

MATERIALS AND METHODS

An exhaustive search was conducted of the primary literature using secondary databases including EMA (HMPC), SUKL (State Institute for Drug Control), SCP (Summary of Product Characteristic), ADC

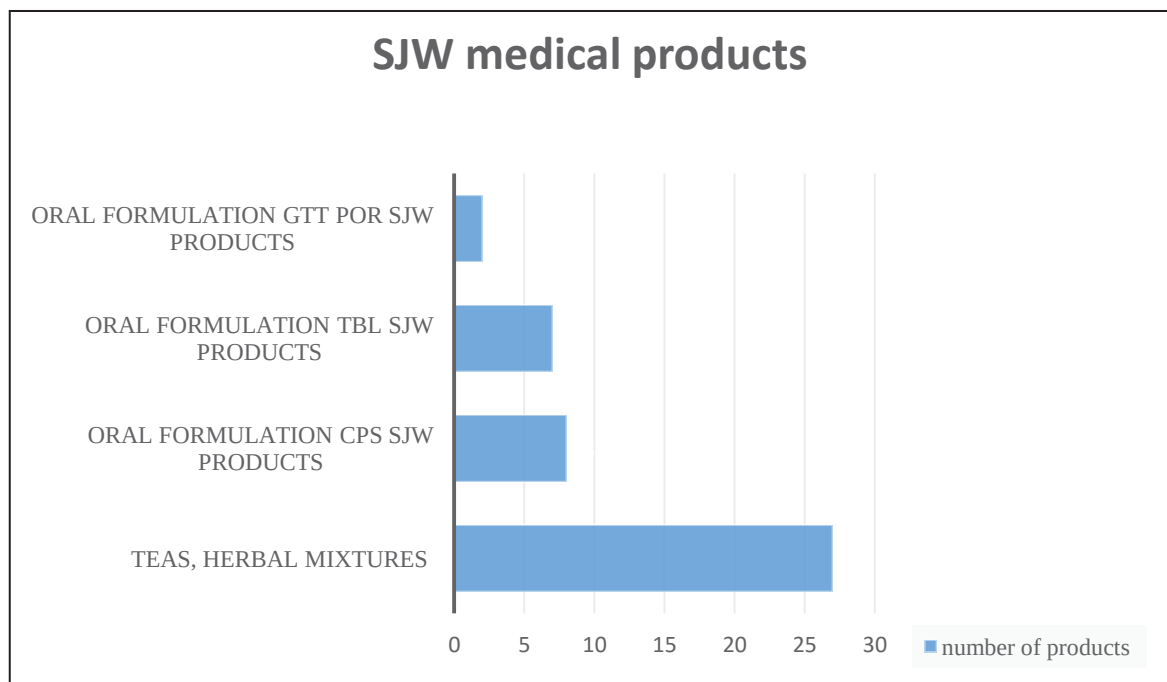
Tab. 2: Definition between dietary supplement and herbal medicinal product

It could be intended to supplement the diet and will contain, for instance, a vitamin, a mineral, a herb, a botanical or an amino acid – a dietary supplement might also be intended to supplement the diet by increasing the total daily intake of a concentrate, a metabolite, a constituent, an extract or a combination of these ingredients.	WHO (2019) Dietary supplement
It defines in part as products taken by mouth that contain a dietary ingredient – dietary ingredients include vitamins, minerals, amino acids, and herbs or botanicals, as well as other substances that can be used to supplement the diet (the FDA suggests to consult a health care professional before using any dietary supplement) – many supplements contain ingredients that have strong biological effects, and such products may not be safe in all people (appropriate labelling and warning is necessary) – supplements can be harmful when using improperly – warnings and precautions are providing the consumer with the information, that when using these products with prescribed medicines could lead to harmful, even life-threatening, results.	FDA (2015) Dietary supplement
It defines as any medicinal product, exclusively containing as active substances one or more herbal substances or one or more herbal preparations, or one or more such herbal substances in combination with one or more such herbal preparations.	EMA/HMPC (2018) Herbal medicinal product

WHO – World Health Organization; FDA – U. S. Food and Drug Administration; EMA – European Medicines Agency; HMPC – Committee on Herbal Medicinal Products

Source: Klemow et al., 2011; Habs et al., 2018; Nicolussi et al., 2020

Graph 1: Availability of SJW products in Slovakia



Tab. 3: Commercial oral formulation tablets (TBL) and capsules (CPS) of SJW medicinal products

Manufacturer	Oral formulations	<i>H. perforatum</i> in 1 tbl/cps	Constituents
Virde Slovakia, s. r. o (SVK) Virde, spol. s. r. o (CZE)	CPS	50 mg	<i>Hypericum perforatum</i> , L-tryptofan, <i>Valeriana officinalis</i> , Magesium
Augeri, s. r. o	CPS	20 mg***	<i>Hypericum perforatum</i> , L-tyrosine, 5-hydroxytryptophan, <i>Valeriana officinalis</i> , Vitamin B6, B12, Magnesium, Zinc, <i>Melissa officinalis</i>
Advance nutraceutics, s. r. o (CZE)	CPS	300 mg (equivalent to 300 mg of dried plant) (hypericin 0.3%)	<i>Hypericum perforatum</i> , L-tryptofan, L-phenylalanin, Niacin, Vitamins B5, B6
Woykoff, a. s. (CZE)	TBL	300 mg (equivalent to 300 mg of dried plant) (hypericin 2 %) (hyperfotin 3 %)	<i>Hypericum perforatum</i> , L-tryptofan, Vitamin B6
Simply You Slovakia s. r. o. (SVK)	CPS	20 mg	<i>Hypericum perforatum</i> , L-tryptofan, <i>Valeriana officinalis</i> , Vitamin B6, Magnesium, <i>Melissa officinalis</i> , <i>Crocus sativus</i>
Pharco, s. r. o. (SVK)	CPS	233 mg (hypericin 0.7 mg) (hyperforin $\geq$ 4.9 mg)	<i>Hypericum perforatum</i> , L-tryptofan, L-tyrosine, L-phenylalanine, Niacin, Vitamin B6, Magnesium
Green-Swan Pharmaceuticals SR, s. r. o. (SVK)	TBL	10 mg* (equivalent to 150 mg of dried plant)	<i>Hypericum perforatum</i> , <i>Valeriana officinalis</i> , Vitamin B6, Magnesium
	TBL	10 mg* (equivalent to 150 mg of dried plant)	<i>Hypericum perforatum</i> , <i>Cimicifuga racemosa</i> , Vitamin D3, Calcium
Liftec CZ, spol. s. r. o. (CZE)	TBL	43 mg	<i>Hypericum perforatum</i>
Active life Inv., s. r. o. (SVK)	CPS	10 mg*	<i>Hypericum perforatum</i> , <i>Passiflora incarnata</i> , <i>Melissa officinalis</i> , <i>Valeriana officinalis</i> , <i>Humulus lupulus</i>

*** SJW extract 10 : 1 (20 mg) corresponds to 200 mg of dried butterbur; *SJW extract 15 : 1 (10 mg) corresponds to 150 mg of dried butterbur; * SJW extract 10 : 1 (10 mg)

(Database of Pharmaceutical Preparations). SJW products were identified and then compiled into Table 3. Field headings of the spreadsheet included: manufacturer, formulations, dosage, constituents.

RESULTS

A significant percentage of the population uses herbal products for preventive and therapeutic purposes. We recorded a real increase in the distribution

Tab. 4: Commercial local application of SJW medicinal product

Schwabe Austria	UNG (unguentum)	0.09 g/50 g	<i>Arnica montana</i> , <i>Calendula officinalis</i> , <i>Hamamelis virginiana</i> , <i>Echinacea angustifolia</i> , <i>Echinacea purpurea</i> , <i>Chamomilla recutita</i> , <i>Bellis perennis</i> , <i>Symphytum officinale</i> , <i>Hypericum perforatum</i> , <i>Achillea millefolium</i> , <i>Aconitum napellus</i> , <i>Atropa belladonna</i> , <i>Mercurius solubilis Hahnemanni</i> , <i>Hepar sulfuris</i>
--------------------	--------------------	-------------	--

Tab. 5: Commercial SJW product, oral formulation drops (GTT POR)

Bios-Medica, s. r. o. (SVK)	GTT POR	15 ml/100 ml	<i>Hypericum perforatum</i> , <i>Avena sativa</i> , <i>Cola vera</i> , <i>Eleutherococcus senticosus</i> , <i>Hyssopus officinalis</i> , <i>Melissa officinalis</i> , <i>Panax ginseng</i> , <i>Rhodiola rosea</i> , <i>Rosa californica</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Mentha piperita</i> , <i>Ocimum basilicum</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Gentiana amarella</i> , <i>Castanea sativa</i> , <i>Sinapsis arvensis</i>
--------------------------------	---------	--------------	---

and sales of preparations containing *H. perforatum* from the statistics. We summarized the types of products containing this medicinal herb from the survey that we conducted in the period from July to December 2019 (see Graph 1). They were teas, oral formulations – cps (capsules), tbl (tablets) and gtt (drops) of the SJW preparation.

Homeopathic preparations of SJW were excluded. Tea preparations (27 products) of SJW we also excluded. Subsequently, we began to focus on phyto-preparations containing *H. perforatum* only in oral form, including tablets and capsules (see Tab. 3). Products without containing a dosage were also excluded.

Table 4 contains only one preparation containing *H. perforatum*, which is applied in our country in the form of an ointment. It is a combined preparation with other plants.

Table 5 contains a SJW preparation which is applied orally, more specifically in the form of drops. It is also a combined preparation with other plants.

DISCUSSION

A growing percentage of the population use herbal medical products for preventive and therapeutic uses. One of them is also hypericum extract containing numerous pharmacologically active ingredients, including naphthodianthrone hypericin and pseudohypericin, a broad range of flavonoids, phloroglucinols (hyperforin) and adhyperforin. The extract as a whole has to be considered as the active substance since several groups of active compounds contribute to its antidepressant and other effects. Hypericum extract documented a moderate clinical effect but better tolerability than conventional drugs (Di Pierro et al., 2018). As a monotherapy, SJW has an encouraging safety profile. However, relevant and, in some case, life-threatening interactions have been reported, particularly with drugs which are substrates of cytochrome P450 and P-glycoprotein (Borrrelli and Izzo, 2009). Moreover, on the basis of this fact, nowadays manufacturers continue to describe SJW extract as 0.3 % hypericin without standardizing the presence of other active fractions (Di Pierro et al., 2018). In

Slovakia, the majority of the above mentioned oral formulation herbal medicinal products contained maximum 150 to 300 mg of *Hypericum perforatum* in one cps or tbl. The content of *Hypericum perforatum* varies greatly, probably due to the different composition of other components in the product. Preparations can help the proper functioning of the psyche, to the proper functioning of the nervous system, to reduce exhaustion and fatigue and facilitate relaxation. But the reference value of intake in 1 capsule or tablet is not usually determined.

However, the individual preparations unanimously state restrictions with regard to use in children, pregnant and breastfeeding women. They state a dosage of 1 cps/tbl per day, with a smaller content even twice a day. However, according to recent studies, a dosage of 3 x 300 mg and thus 900 mg of standardized extract per day has been recommended to achieve the desired results.

Not all preparations also reported the content of active substances of hepericin and hyperforin from the total content of *Hypericum perforatum*. However, from the available data, we see that mainly the daily doses of hyperforin exceed the limit of 1 mg, which according to the above mentioned study is considered safe and thus without clinically significant interactions. Because, as far as we know today, SJW represents the herbal product most involved in herb-drug interactions. Pharmacokinetic interactions arise when SJW is combined with drugs which are CYP and P-glycoprotein substrates. And pharmacodynamic interactions also occur when SJW is combined with drugs which enhance 5-HT signalling in the brain (Borrelli and Izzo, 2009). Although we initially excluded homeopathic preparations from our study, at least we must mention the only SJW (distributor is Schwabe Austria) preparation in Slovakia, which can be obtained with a prescription on our market. It is a Sol inj formulation. The preparation is included in the homeopathic area containing *Hypericum perforatum* 0.66 mg in 1 ampoule of solution (2.2 ml with the total amount of 2.2 g) indicated for stimulation of the body's own healing mechanisms in various injuries

(sports, accident) such as bumps, sprains, fractures of bones, blood bruises, hemorrhages into the joints, concussions etc., postoperative and post-traumatic edema and swelling of the soft tissues, inflammatory and inflammatory-related degenerative processes of all organs and tissues, especially the supporting and locomotor system (tendovaginitis, styloitis, epicondillitis, bursitis, peri arthritis humeroscapularis, osteoarthritis of the lumbar, knee and small joints), gingivitis, purulence of dental cams, periodontitis. It has the same application limitations as oral preparations.

CONCLUSION

Our findings showed that the vast majority of SJW products fail to adequately address clinically relevant safety issues on their labelling. The reason may be the incorrect dosing or low content of the desired substance in the preparation. A small number of products do provide an acceptable amount of information on drug-herb interactions.

REFERENCES

- Anyzewska, M., Kowalczyk, A., Lozak, A., Jablczyńska, R., Fijałek, Z.: Determination of total hypericins in St. John's wort and herbal medicinal products. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 2010, 67 (6), 587 – 593.
- Borrelli, F., Izzo, A. A.: Herb-drug interactions with St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): an update on clinical observations. *The AAPS Journal*, 2009, 11 (4), 710.
- Clauson, K. A., Santamarina, M. L., Rutledge, J. C.: Clinically relevant safety issues associated with St. John's wort product labels. *BCM Complementary Medicine and Therapies*, 2008, 8, 42.
- Di Pierro, F., Risso, P., Settembre, R.: Role in depression of a multi-fractionated versus a conventional *Hypericum perforatum* extract. *Panminerva Medica*, 2018, 60 (4), 156 – 160.

Fisher, K. A., Patel, P., Abualula, S., Livasky Conception: St. John's Wort-induced supraventricular tachycardia. *Cureus*, 2021, 13 (4) e14356.

Habs, M., Binder, K., Krauss, S., Müller, K., Ernst, B., Valentini, L., Koller, M.: A balanced risk-benefit analysis to determine human risks associated with pyrrolizidine alkaloids (PA) – the case of herbal medicinal products containing St. John's wort extracts (SJW). *Nutrients*, 2018, 10, 804.

Henderson, L., Yue, Q. Y., Bergguist, C., Gerden, B., Arlett, P.: St. John's wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes. *BJCP*, 2002, 54 (4), 349 – 356.

Klemow, K. M., Bartlow, A., Crawford, J., et al.: Chapter 11 – Medical attributes of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). In *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. Florida: CRC Press/Taylor & Francis, 2011.

Nicolussi, S., Drewe, J., Butterweck, V., Meyer Zu Schwabedissen, H. E.: Clinical relevance

of St. John's wort drug interactions revisited. *BJP*, 2020, 177 (6), 1212 – 1226.

Tocci, N., Perenzoni, D., Iamónico, D., Fava, F., Weil, T., Mattivi, F.: Extracts from *Hypericum hircinum* subsp. *majus* exert antifungal activity against a panel of sensitive and drug-resistant clinical strains. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9, 382.

Zirak, N., Shafiee, M., Soltani, G., Mirzaei, M., Sahebkar, A.: *Hypericum perforatum* in the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders: Current evidence and potential mechanisms of action. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234 (6), 8496 – 8508.



MOŽNOSTI TERAPIE PRI NÁDOROVOM OCHORENÍ HLAVY A KRKU POSSIBILITIES OF THERAPY OF HEAD AND NECK TUMOR DISEASES

Komanová, Zuzana; Sučík, Monika; Valenčáková, Alexandra

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

alexandra.valencakova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Skvamocelulárny karcinóm zodpovedá za väčšinu nádorových ochorení hlavy a krku, ktorý vzniká zo skvamóznej výstelky vlhkých slizničných povrchov hlavy a krku, hltana, hrtana a paranazálnych dutín. Cieľom tejto štúdie je zhrnúť v súčasnosti dostupné poznatky o základných špecifikách nádorov hlavy a krku a popísať možnosti ich liečby. Táto štúdia opisuje štyri kazuistiky, pri ktorých boli použité rôzne postupy liečenia. Stanovenie správnej liečby závisí na jednej strane od zdravotného stavu pacienta, no taktiež od veľkosti, typu a lokalizácie nádoru. Liečba prináša so sebou aj množstvo nepríjemných nežiaducich účinkov, ktoré závisia od jej typu. Pacienti liečení rádioterapiou často trpia bolestivou mukozitídou, ktorá je spojená so sťaženým prijímaním potravy,

čo môžeme vidieť u všetkých pacientov v našich kazuistikách. V prvej a druhej kazuistike bola s rádioterapiou spojená aj nepríjemná dermatitída, ktorá mohla byť zosilnená cetuximabom. V tretej a štvrtej kazuistike bola použitá kombinovaná liečba rádioterapie spolu s chemoterapiou. Nežiaducimi účinkami pri liečbe cytostatikami býva nauzea a vomitus, ako to bolo aj u našich pacientov. Na základe opisu týchto kazuistík sme chceli poukázať na to, že zvolenie správnej liečby pri nádoroch hlavy a krku závisí od viacerých faktorov a nie je to vždy jednoznačné a ľahké. V priebehu liečby sa môže terapia meniť podľa toho, ako na ňu pacient reaguje.

Kľúčové slová: cetuximab; cisplatina; chemoterapia; karcinóm; rádioterapia

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma accounts for the majority of head and neck cancers, arising from the squamous lining of the moist mucosal surfaces of the head and neck, pharynx, larynx, and paranasal sinuses. This study aims to summarise the currently available knowledge about the essential specificities of head and neck tumours and to describe their treatment possibilities. This study describes four case studies in which different treatment procedures were used. Determining the correct treatment depends on the patient's state of health and the tumour's size, type and location. The therapy also brings several unpleasant side effects that depend on its type. Patients treated with radiotherapy often suffer from painful mucositis, which is associated with difficulty taking food, which we can see in all patients in our case reports. In the first and second cases, unpleasant dermatitis was also associated with radiotherapy, which could have been intensified by cetuximab. In the third and fourth cases, a combined treatment of radiotherapy together with chemotherapy was used. Undesirable effects during therapy with cytostatics are nausea and vomitus, as was the case in our patients. Based on the description of these cases, we wanted to point out that choosing the proper treatment for head and neck tumours depends on several factors and is not always straightforward. During treatment, the therapy can be changed according to how the patient responds to it.

Key words: carcinoma; cetuximab; cisplatin; chemotherapy; radiotherapy

ÚVOD

Karcinómy hlavy a krku predstavujú 5 % všetkých nádorových ochorení. V roku 2018 predstavovali približne 887 649 nových prípadov a 453 307 úmrtí s nádorovým ochorením na celom svete (Bray a kol.,

2018). Nádory hlavy a krku predstavujú široký pojem, ktorý zahŕňa epitelové malignity vznikajúce z paranasálnych dutín, nosovej dutiny, ústnej dutiny, hltana, hrtana a slinných žliaz. Takmer všetky tieto malignity sú skvamocelulárne karcinómy hlavy a krku, pre ktoré sú najvýznamnejšími rizikovými faktormi konzumácia tabaku a alkoholu (Kawashita a kol., 2020). Tabakový dym obsahuje viac ako 40 karcinogénnych látok z tabaku ako aj z cigaretového papiera (Klener, 2002). Za vysoko karcinogénne sa považuje fajčenie marihuany pre vysoký obsah dechtových látok. Podľa American Cancer Society je 85 – 90 % nádorov hlavy a krku spôsobených tabakovými produktmi. Zistilo sa, že globálne sú dôležité aj ďalšie rizikové faktory nezávislé od tabaku, alkoholu a HPV. Epidemiologické údaje identifikovali chronickú konzumáciu alkoholu ako významný rizikový faktor karcinómov horného zažívacieho traktu, vrátane karcinómu orofaryngu a hrtana. Hoci presné mechanizmy, ktorými chronické požívanie alkoholu stimuluje karcinogézu nie sú známe, experimentálne štúdie na zvieratách podporujú koncepciu, že etanol nie je karcinogén, ale za určitých experimentálnych podmienok je kokarcinogénom alebo promótorom nádorov. Metabolizmus etanolu vedie k tvorbe acetaldehydu a voľných 14 radikálov. Nahromadili sa dôkazy, že acetaldehyd je prevažne zodpovedný za karcinogézu spojenú s alkoholom. Predovšetkým je nebezpečná kombinácia chronického abúzu alkoholu spolu s fajčením cigariet. Kombinácia týchto dvoch prostriedkov zvyšuje riziko karcinómu až 100-krát viac ako u osôb, ktoré iba fajčia alebo pijú alkohol (Poschl, 2004). Za ko-faktor karcinogény sa považujú taktiež vírusy, predovšetkým ide o HSV-1 (herpes simplex vírus), HPV typ 16,18 (ľudský papillomavírus) pri karcinóme orofaryngu a EBV vírus (vírus Epsteina-Barrovej) u nasofaryngeálneho karcinómu (Hashim a kol., 2008). Nekvalitná strava môže byť taktiež príčinou rozvoja nádorov hlavy a krku. Konzumácia červeného mäsa a vyprážaných potravín zvyšuje riziko karcinómu horných dýchacích ciest a hltana. Najviac karcinogénnych zlúčenín vzniká práve pri procese smaženia a grilovania. Dedičné nádorové ochorenia predstavi-

jú 1 – 5 % všetkých zhubných nádorov. Sú za nich zodpovedné hlavne mutácie v supresorových génoch. Existujú vo forme autozomálne dominantných, autozomálne recesívnych a dedične konštitucionálnych chromozomálnych anomálií (Klener, 2002). Žuvanie betelových orechov zvyšuje riziko orálnej/orofaryngeálnej HNSCC 2 až 15-násobne (Guha a kol., 2007). Zanedbávanie starostlivosti o ústnu dutinu, vrátane nedostatočného používania zubnej kefky a nedostatočného používania ústnej vody súvisia s 2-násobne zvýšeným rizikom HNSCC (Guha a kol., 2014; Mazul a kol., 2017). Pacienti s chronickou infekciou hepatitídou C alebo chronickou infekciou HIV a súvisiacou imunodeficienciou majú zvýšené riziko vzniku HNSCC a môžu mať horšie výsledky súvisiace s rakovinou (D'Souza a kol., 2014; Mahale a kol., 2016; Economides a kol., 2018). Iní pacienti s potlačenou imunitou, najmä pacienti s transplantovanými solídnymi orgánmi, majú až 3-krát vyšší výskyt HNSCC (Liu a kol., 2014; Rabinovics a kol., 2014). Napokon, rôzne genetické polymorfizmy prispievajú k vnímavosti na tento druh nádorov a pravdepodobne interagujú s inými rizikovými faktormi (Vigneswaran a kol., 2014; Vukovic a kol., 2018).

Nádory ústnej dutiny sú celosvetovo jednou z najčastejších malignít. Štandardom starostlivosti je primárna chirurgická resekcia s alebo bez pooperačnej adjuvantnej terapie. Zlepšenie chirurgických techník v kombinácii s rutinným používaním pooperačného ožarovania alebo chemoradiačnej terapie viedlo k zlepšeniu prežívania. Úspešná liečba je založená na multidisciplinárnych liečebných stratégiách s cieľom maximalizovať onkologickú kontrolu a minimalizovať vplyv terapie na formu a funkciu.

Medzi nádory hlavy a krku zaradíme nádory nosovej dutiny, prínosových dutín, ústnej dutiny, nazofaryngu, orofaryngu, hypofaryngu, štruktúry laryngu a krku. Hoci nádory vychádzajú najmä zo slizničných povrchov, postihujú tiež kožu, mäkké tkanivá, svaly, kosti tváre a krku, ako aj veľké a malé slinné žľazy. Často býva v rôznych stupňoch postihnutá reč, prehĺtanie a dýchanie, čo sú mimoriadne dôležité funkcie pre kvalitu života a prežitia (Adam a kol., 2004). Ná-

dory hlavy a krku zvyčajne začínajú v dlaždicových bunkách, ktoré lemujú slizničné povrchy, napríklad vo vnútri úst, hrdle a hlasovej schránke. Tieto nádory sa označujú ako skvamocelulárne karcinómy hlavy a krku (HNSCC) (Longo, 2020). Skvamocelulárne karcinómy (SCC) vznikajú zo skvamóznej výstelky vlhkých slizničných povrchov hlavy a krku, hltana, hrtana a paranazálnych dutín. Pochádzajú tiež z povrchu kože, pričom najväčší podiel kožného SCC vzniká hlavne na hlave a krku vystavených slnku (Gurudutt a Genden, 2011). Nádory hlavy a krku môžu začať aj v slinných žľazách, prínosových dutinách alebo svaloch či nervoch v hlave a krku, no tieto typy nádorov sú oveľa menej časté (Longo, 2020).

Závažnosť ochorenia je určená podľa lokalizácie, miestneho rozsahu, stupňa postihnutia regionálnych uzlín, podľa stupňa diferenciácie nádoru a taktiež závisí aj na celkovom stave pacienta a prítomnosti metastáz. Nádory hlavy a krku patria medzi časté malignity s nie príliš dobrou prognózou (Novotný, 2005).

Príznaky môžu zahŕňať hrčku na krku alebo bolesť v ústach, či hrdle, ktorá môže byť bolestivá, pričom bolesť neustupuje. Pacient môže mať problémy s prehĺtaním, môže sa zmeniť hlas alebo nastať chrapot hlasu. Biela alebo červená škvrna na d'asnách, jazyku alebo sliznici úst, nezvyčajné krvácanie alebo bolesť v ústach, opuch čeľuste. TNM (tumor, nodus, metastáza) klasifikácia je publikovaná európskou organizáciou UICC (Union for International Cancer Control). TNM systém anatomického rozsahu hodnotí 3 zložky: T: rozsah primárneho nádoru N: neprítomnosť alebo prítomnosť a rozsah metastáz v regionálnych lymfatických uzlinách M: neprítomnosť alebo prítomnosť vzdialených metastáz. Pre každú lokalizáciu existujú dve klasifikácie. Prvá je klinická klasifikácia označovaná ako TNM alebo cTNM, ktorá je dôležitá pre výber a hodnotenie liečby. Nálezy sú získané na podklade klinického vyšetrenia, zobrazovacích vyšetřovacích metódach, endoskopie, biopsie a iných potrebných vyšetřeniach. Druhá klasifikácia je patologická, označovaná ako pTNM a je založená na nálezoch získaných pred liečbou, doplnených ale-

bo zmenených ďalšími nálezmi, ktoré boli získané pri chirurgickom výkone (Krška a kol., 2014).

Diagnóza nádorov ústnej dutiny závisí od získania vzorky tkaniva z lézie, biopsie. V ideálnom prípade by biopsiu mal vykonať orálny a maxilofaciálny chirurg, keďže ošetrojúci chirurg má možnosť absolvovať kompletne vyšetrenie hlavy a krku vrátane presných meraní, palpácie hrúbky lézie a klinického vyšetrenia krčných uzlín. Vo vybraných situáciách má dokonca možnosť získať určité zobrazenie pred deformáciou lézie prostredníctvom zmien po biopsii. To platí najmä pre skoré nádory ústnej dutiny, kde môže byť ťažké určiť hĺbku lézie na postbiopsickom zobrazení v dôsledku edému tkaniva.

Výber správnej liečby je závislý na lokalizácii nádoru, jeho veľkosti a tiež celkovom stave pacienta. V niektorých prípadoch sa kombinuje viac liečebných metód ako napríklad chirurgická liečba, chemoterapia, rádioterapia, prípadne biologická liečba (Dobrovič a kol., 2017). Rádioterapia spolu s chemoterapiou majú významnú úlohu v liečbe nádorov hlavy a krku. Primárna chemoterapia umožňuje zachovanie funkcie orgánu a je liečbou voľby pre nádory vznikajúce v orofaryngu, nazofaryngu, hypofaryngu a hrtane (Lefebvre, 2006; Kazi a kol., 2008). Pri nádoroch ústnej dutiny sa najlepšie dosahujú výsledky pomocou chirurgických techník spolu s adjuvantnou alebo pooperačnou rádioterapiou (Scully a kol., 2009). Rádioterapia patrí medzi základné metódy liečby zhubných nádorov. Používa sa na liečbu pokročilého ochorenia ako doplnok k chirurgickému zákroku alebo súbežne s chemoterapiou. Využíva letálny účinok ionizujúceho žiarenia na nádorové bunky, ktoré nemajú takú schopnosť regenerácie enzymatickým systémom ako bunky zdravých tkanív. Táto nižšia schopnosť regenerácie sa využíva pri frakciovej rádioterapii, kde sa celková dávka žiarenia aplikuje v nízkych denných dávkach po dobu 6 – 7 týždňov v prípade kuratívnej rádioterapie (Novotný a kol., 2017). Pri liečbe ožarovaním v oblasti hlavy a krku sa štandardne používajú techniky ako trojrozmerná konformná rádioterapia (3D-CRT), rádioterapia riadená obrazom (IGRT) a rádioterapia s modulovanou intenzitou (IMRT) (Her-

mans a kol., 2012). IMRT sa používa kvôli vyššej účinnosti pri predchádzaní vedľajším účinkom v porovnaní s trojrozmernou konformnou rádioterapiou. IMRT má tú výhodu, že umožňuje presnejšie dodanie dávky do miesta nádoru, pričom súčasne znižuje vystavenie normálnych tkanív žiareniu. Akútne nežiaduce účinky spojené s rádioterapiou nastupujú už v priebehu ožarovania a trvajú približne 3 mesiace od skončenia liečby. Intenzita reakcie úzko súvisí s počtom frakcií a trvaním liečby. Medzi najčastejšie nežiaduce účinky patrí orálna mukozitída, xerostómia a strata chuti. Radiáciou indukovaná orálna mukozitída je značne nepríjemná a je výraznejšia u pacientov podstupujúcich chemorádioterapiu. V extrémnych prípadoch sa môžu objaviť lézie charakterizované veľkými a bolestivými vredmi, ktoré majú významný vplyv na kvalitu života pacienta a môžu značne obmedzovať činnosti ako je jedenie, rozprávanie alebo prehĺtanie slín (Watters a kol., 2011).

Chirurgická liečba pri nádoroch hlavy a krku je využívaná u 2/3 pacientov. Cieľom je odstránenie primárneho novotvaru a spádových lymfatických uzlín. Radikálnym odstránením ložiska sa značne znásobuje percento možnosti vyliečenia, avšak musí byť odstránené celé, spoločne s dostatočne veľkým okrajovým lemom zdravého tkaniva (Dobrovič a kol., 2017). Ak sú u pacienta preukázané regionálne metastázy, alebo sa objaví predpoklad výskytu subklinických metastáz súčasne s primárnym nádorom, odstraňuje sa spádová lymfatická oblasť. Rozoznávame kuratívnu a paliatívnu chirurgickú liečbu (Becker, 2005). Chirurgická resekcia je preferovaná pri nádoroch ústnej dutiny v spojení s elektívnou krčnou disekciou, po ktorej nasleduje adjuvantná rádioterapia alebo chemorádioterapia (v závislosti od posúdenia vysokorizikových znakov).

Chemoterapia sa u nádorov hlavy a krku využíva pri dvoch indikáciách. Prvá je samostatná paliatívna liečba a druhá je liečba lokálne pokročilých nádorov v kombinácii s rádioterapiou. Princípom chemoterapie je podávanie liekov, ktoré sú produktami chemickej syntézy alebo deriváty látok získaných z rastlín alebo plesní. Pri nádoroch hlavy a krku využívame

cisplatinu, karboplatinu, taxány – paklitaxel, docetaxel, 5-fluorouracil a metotrexát. Používame ich samostatne alebo v kombinácii. Pri nádoroch hlavy a krku sa chemoterapia využíva iba okrajovo. Veľkým problémom je vysoká toxicita a preto býva prítomnosť iných ochorení ako je vysoký vek, podvýživa alebo porucha srdca častou prekážkou pre podanie cytostatík. Pred zahájením chemoterapie musí byť preto zhodnotený celkový stav pacienta, rozsah a lokalizácia nádoru, predchádzajúca liečba a možná toxicita. Cytostatická liečba sa môže aplikovať vo viacerých spôsoboch podania. Najmenej zaťažujúce a neinvazívne je perorálne podanie. Ďalším spôsobom je podanie cytostatika intravenózne za pomoci infúzie alebo injekcie. V ojedinelých prípadoch je možná aj intraarteriálna alebo intrakavitálna aplikácia. Konkomitantná chemorádioterapia je kombinácia jednotlivých spôsobov liečby nádorových ochorení. Spojenie cytostatík spolu s rádioterapiou sa považuje za účinnú liečbu aj napriek niektorým negatívam (Šlampa a Petera, 2007). Konkomitantná chemorádioterapia bola pôvodne vyvinutá ako štandardný postup pre lokálne pokročilé inoperabilné nádory a dnes sa stáva veľmi účinnou alternatívou chirurgickej liečby. Pri aplikácii chemorádioterapie dochádza medzi žiarením a cytostatikom k interakciám, ktoré zvyšujú ich účinok na nádorové tkanivo. Na druhej strane môže viesť k väčšiemu poškodeniu zdravých tkanív v porovnaní s aplikovaním len jedného terapeutického postupu. U lokálne pokročilých nádorov hlavy a krku je konkomitantná chemorádioterapia efektívnejšia ako samostatná aplikácia jednotlivých metód. Pri kombinovanej liečbe sa spolu s ožarovaním najčastejšie používa cisplatina samostatne, alebo v kombinácii s 5-fluorouracilom. Podobný efekt vykazuje aj jeho analóg karboplatina (Šlampa a Smílek, 2016). U lokálne pokročilých nádorov hlavy a krku pred chirurgickou liečbou sa aplikuje indukčná chemoterapia. Aby sa dosiahol očakávaný efekt, spravidla sa aplikujú 3 – 4 cykly chemoterapie. Výhodou indukčnej chemoterapie je zmenšenie rozsahu primárneho nádoru, prípadná eradikácia mikroskopicky vzdialených metastáz. Pri liečbe nádorov hlavy a krku nie je indikácia in-

dukčnej chemoterapie jednoznačná. Môže sa použiť pri rozsiahlych nádoroch hypofaryngu, orofaryngu a laryngu s bilaterálnymi uzlinami. Najčastejšie je podávaná cisplatina alebo taxány (Pointreau a kol., 2009; Cohen a kol., 2014; Šlampa a Smílek, 2016). Paliatívna chemoterapia sa používa pri pacientoch s lokálnou recidívou, pri progresívnych ochoreniach a pri pacientoch s metastázovými postihnutiami, pri ktorých nie je možná chirurgická liečba alebo rádioterapia. Pri nádoroch hlavy a krku je prínos paliatívnej chemoterapie minimálny. Výnimku tvoria nediferencované karcinómy, prevažne nádory nazofaryngu (Adam a kol., 2003; Adam a kol. 2004). Paliatívna liečba je indikovaná s cieľom spomaliť nádorový proces a zmenšiť symptómy, ktoré nádor spôsobuje. Štandardným režimom cytostatickej liečby bolo podávanie metotrexátu v týždňovom intervale, avšak neskôr boli publikované výsledky štúdie, ktoré preukázali vyššiu efektivitu kombinácie cisplatiny a 5-fluorouracilu. Taktiež vyššiu účinnosť zaznamenali pri podaní chemoterapie spolu s cetuximabom (Vermorken a kol., 2007). Nežiaduce účinky chemoterapeutických látok vznikajú z dôvodu rýchlo sa deliacich buniek organizmu, ktoré sú napádané spoločne s patologickými bunkami. Chemoterapia sa podáva v cykloch, ktoré majú priaznivý efekt na regeneráciu organizmu a ústup nežiaducich účinkov. Prejav negatívneho účinku tiež závisia od druhu cytostatika a jeho dávky. Cytostatiká napádajú aj zdravé bunky, a to bunky produkujúce krv, vláskové bunky a bunky slizníc v oblasti úst, hrdla a v tráviacom trakte. Medzi krátkodobé účinky patrí vypadávanie vlasov, anémia, nevoľnosť, vracanie, hnačka a infekcie v ústach. Týmto nežiaducim účinkom sa dá predchádzať alebo zmierniť ich príznaky.

Metotrexát pôsobí ako antifolátový antimetabolit. Je absorbovaný do bunky nosičmi nazývanými ľudský redukovaný folátový nosič a tvorí metotrexát-polyglutamát. Metotrexát aj metotrexát-polyglutamát inhibujú enzým dihydrofolátreduktázu, ktorá katalyzuje premenu dihydrofolátu na tetrahydrofolát, čo je aktívna forma kyseliny listovej. Tetrahydrofolát je nevyhnutný pre syntézu nukleotidov DNA aj RNA.

Metotrexát-polyglutamát ďalej inhibuje dihydrofolát-reduktázu a tymidylát-syntázu, čím inhibuje syntézu DNA. Tento mechanizmus sa využíva pri liečbe nádorov pre svoj cytotoxický účinok (Singh a kol., 2019). Najčastejšími nežiaducimi účinkami sú gastrointestinálne prejavy ako nevoľnosť, vracanie, vredy na slizniciach, strata chuti do jedla. Tieto sú zaznamenané u väčšiny pacientov a sú ľahko zvládnuteľné (Chande a kol., 2014). Hlavným nežiaducim účinkom metotrexátu je hepatotoxicita. Tieto vedľajšie účinky sú podobné nedostatku folátu a možno im predísť doplnením metotrexátu o kyselinu listovú (Bannwarth a kol., 1994).

Cisplatina pôsobí prostredníctvom cytotoxicity nešpecifickej pre bunkový cyklus, ktorá sa dosahuje kovalentnou väzbou platiny na purínové bázy guanín a adenín. Táto kovalentná väzba vedie k vnútrovláknovým a medzivláknovým krížovým väzbám, ktoré spôsobujú následné zlomy vlákna. Zatiaľ čo sú v hre mechanizmy opravy DNA, bunky často podliehajú apoptickej alebo neapoptickej bunkovej smrti v dôsledku poškodenej zvyškovej DNA, RNA a proteínov (Casini a kol., 2018). Chemoterapia cisplatinou je obzvlášť účinná pri zacielení na rýchlo sa deliace bunky, čo je významné pri rýchlo rastúcich malígnych nádoroch (Aggarwal a kol., 1993). Medzi nežiaduce účinky, ktoré sa môžu vyvinúť, najčastejšie patria gastrointestinálne symptómy. Viac ako 90 % pacientov pociťuje nevoľnosť a vracanie; proti týmto symptómom sa podávajú antiemetiká. V menšom počte prípadov sa vyskytujú celkové symptómy ako horúčka, hyposténia, zmenený cyklus spánok-bdenie, myelosupresia a zmeny v pečeni, koži a dýchanom aparáte. Medzi negatívne vedľajšie účinky s viac alebo menej závažným postihnutím tkanív patrí neurotoxicita, nefrotoxicita a ototoxicita (Astolfi a kol., 2013).

5-Fluorouracil (5-FU) vstupuje do buniek a premieňa sa na fluorodeoxyuridínmonofosfát (FdUMP). FdUMP tvorí komplexy s enzýmom tymidylátsyntázou (TS), čím inhibuje produkciu zlúčeniny deoxytymidínmonofosfátu (dTMP). dTMP je nevyhnutný pre replikáciu a opravu DNA a vyčerpanie tejto zlúčeniny

vedie k nerovnováhe intracelulárnych nukleotidov, čo vedie k dvojvláknovému zlomu v DNA enzýmoch endonukleázy (Zhang a kol., 2008). Nežiaduce účinky: 5-FU má pri systémovom použití veľa nežiaducich účinkov. Najčastejším nežiaducim účinkom hláseným u pacientov, ktorí dostávali systémovú liečbu 5-FU, bola hnačka. Medzi ďalšie časté nežiaduce účinky patrí vracanie, nevoľnosť a dehydratácia. Ďalšie vedľajšie účinky, ktoré si vyžadujú sledovanie u pacientov, ktorí dostávajú systémovú chemoterapiu 5-FU, zahŕňajú neutropéniu, pyrexiiu, pľúcnu embóliu, trombocytopéniu a leukopéniu.

Biologická alebo cielečná liečba je terapia látkami cielenými proti štruktúram pre nádorové tkanivo. Používa sa ako doplnok k málo špecifickej chemoterapii na liečbu recidivujúcich a metastatických nádorov (Klener, 2014). Princípom biologickej liečby je blokáda prenosu informácií. Začína naviazaním ligandu na extracelulárnu časť receptora a dochádza k vytvoreniu signálu, ktorý sa prenáša do intracelulárnej časti receptora. Dochádza k aktivácii tyrozínkinázy a spustí sa kaskáda prenosu informácií, ktorá vedie k bunkovej proliferácii, angiogenéze, diferenciácii, apoptóze, chemorezistencii a metastázovaniu. Najvýznamnejšou monoklonálnou protilátkou liečby nádoru hlavy a krku je cetuximab. Zvyšuje protinádorový účinok súčasne podávaných cytostatík a žiarenia (Fusek, 2010). Spinocelulárne karcinómy hlavy a krku potrebujú pre svoj rast epidermálny rastový faktor (EGF) a sú charakteristické vysokou expresiou jeho receptora (EGFR). Cetuximab špecificky blokuje EGFR a bráni tak nádorovej proliferácii (Šlampa a Smílek, 2016).

Cetuximab je monoklonálna protilátka, ktorá sa špecificky viaže na EGFR na normálnych aj nádorových bunkách, aby kompetitívne inhibovala väzbu epidermálneho rastového faktora (EGF) a iných ligandov, ktoré sú produkované normálnymi a nádorovými tkanivovými epiteliálnymi bunkami (Snyder a kol., 2005). Po naviazaní na doménu III EGFR (čo je väzbové miesto pre jeho ligandy rastového faktora) cetuximab zabraňuje receptoru prijať rozšírenú konformáciu, čím inhibuje aktiváciu EGFR, ako aj fos-

foryláciu a aktiváciu kináz spojených s receptorom. Inhibícia signálnej dráhy EGFR v konečnom dôsledku vedie k inhibícii progresie bunkového cyklu, dráh prežitia buniek a motility, ako aj invázii nádorových buniek. Cetuximab tiež indukuje apoptózu buniek a znižuje produkciu matricovej metaloproteinázy a vasculárneho endotelového rastového faktora (VEGF). *In vitro* sa ukázalo, že cetuximab inhibuje nádorovú angiogenézu. Väzba cetuximabu na EGFR tiež vedie k internalizácii komplexu protilátka-receptor, čo vedie k celkovej regulácii expresie EGFR. K-Ras je malý G-proteín od EGFR, ktorý hrá dôležitú úlohu pri podpore signálnej kaskády EGFR: v niektorých malígnych bunkách môže K-Ras získať aktivačné mutácie v exóne 2, a tak byť nepretržite aktívny bez ohľadu na reguláciu EGFR. Keďže mutantné proteíny môžu izolovať dráhu od účinku EGFR, mutácie K-Ras môžu spôsobiť, že inhibítory EGFR, ako je cetuximab, nebudú účinné pri uplatňovaní protinádorových účinkov. Použitie cetuximabu pri nádoroch dvojakého typu K-Ras s expresiou EGFR je teda obmedzené (Vincenzi a kol., 2010). Počas liečby monoklonálnymi protilátkami sa môžu vyskytnúť infúzne reakcie, ktoré sú charakterizované rýchlym nástupom anafylaktickej reakcie (obštrukcia dýchacích ciest, žihľavka, hypotenzia a/alebo zástava srdca) a vyžadujú okamžité prerušenie infúzie cetuximabu. Ďalším, relatívne častým nežiaducim účinkom je hypomagnézia. Pretože sa sérový horčík často nemeria, tento vedľajší účinok môže byť často vynechaný a prejaví sa až potom, čo sa stane závažným. Klinické prejavy hypomagnézie sa môžu vyskytnúť postupne alebo náhle a zahŕňajú srdcové arytmie, záchvaty a iné abnormality elektrolytov, napr. hypokaliémiu (Gurdal a kol., 2019).

MATERIÁL A METÓDY

V tejto štúdii sme sa venovali možnostiam terapie pri nádorovom ochorení hlavy a krku. MUDr. Vladimír Malec, PhD., ktorý je špecialista v odbore klinická onkológia, nám poskytol depersonalizované výpisy zo zdravotnej dokumentácie pacientov. Na ich

podklade sme spracovali 4 kazuistiky. V kazuistikách sme sa zamerali na terapiu pacientov s nádorovým ochorením v oblasti hltana a na základe odbornej literatúry sme vyhodnocovali výsledky týchto pacientov. Pomocou odbornej literatúry v databázach PubMed, Solen, ScienceDirect a Scopus sme vyhodnocovali výsledky terapie pacientov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kazuistika 1: Pacientka s karcinómom pravej tonzily liečená radiačnou terapiou spolu s cetuximabom

Pacient: 60-ročná žena

Osobná anamnéza: učiteľka na základnej škole, nefajčí, alkohol pije príležitostne. Žiadne významné ochorenie v minulosti nemala.

Rodinná anamnéza: matka mala rakovinu pažeráka, otec rakovinu pečene

Subjektívne ťažkosti: zdurenie na pravej strane krku pretrvávajúce asi dva mesiace

Vyšetrenia:

- histológia: histologické vyšetrenie potvrdilo v pravej tonzile diferencovaný skvamocelulárny karcinóm s pozitívnymi resekčnými okrajmi. Ďalej histológia preukázala metastázu v jednej z dvoch extirpovaných lymfatických uzlín.
- Klinické vyšetrenie: v oblasti pravej podnebnéj mandle bola zistená povrchová infiltrácia, ktorá siaha aj na mäkké podnebie a predný podnebný oblúk.
- RTG hrudníka: negatívne
- USG pečene: negatívne
- Pred rádioterapiou bola vykonaná perakútna endoskopická gastrostómia

Diagnóza: karcinóm pravej tonzily T3 N2a M0

Liečba:

- Rádioterapia: 54 Gy pre oblasť subklinického postihnutia a 70 Gy pre primárny nádor a postihnuté lymfatické oblasti v 35 frakciách počas 7 týždňov

- Biologická liečba: cetuximab, v úvodnej dávke 400 mg/m² a následne 250 mg/m² počas 7 týždňov

Epikríza: pacientka prijatá na ORL kvôli zdureniu na pravej strane krku. Histologické vyšetrenie ukázalo v pravej tonzile diferencovaný skvamocelulárny karcinóm s resekčnými okrajmi, a taktiež metastázu lymfatických uzlín. Na základe všetkých vyšetrení bol pacientke diagnostikovaný karcinóm orofaryngu T3 N2a M0. Ordinovaná bola liečba rádioterapiou spolu s cetuximabom, ktorú pacientka absolvovala ambulantne.

Záver: pacientke bol diagnostikovaný karcinóm orofaryngu liečený konformnou rádioterapiou spolu s konkomitantnou biologickou liečbou cetuximabom počas siedmich týždňov. V priebehu liečby sa u nej objavilo niekoľko vedľajších účinkov ako mukozitída v oblasti orofaryngu, mierne nevoľnosti s úbytkom hmotnosti 6 kg, dysfágia tuhej potravy a erytémová dermatitída na tvári a krku. Po ukončení liečby boli vykonané kontrolné vyšetrenia, kde bol lokálny nález orofaryngu negatívny a lymfadenopatia vymizla. Gastrostomický katéter bol odstránený 4 mesiace po ukončení liečby. U pacientky sa vyskytli poradiačné komplikácie, ako znížený objem slín a zhoršené hltanie. 3 roky po liečbe karcinómu orofaryngu bol nález v oblasti hlavy a krku negatívny bez iných neskorých následkov liečby.

Diskusia: pacientkou z kazuistiky 1 bola 60-ročná pani, ktorá pre zdurenie v pravej časti krku navštívila špecialistu otorinolaryngológa. Po všetkých vyšetreniach jej bola stanovená diagnóza karcinóm orofaryngu podľa TNM klasifikácie ako T3 N2a M0. T3 znamená, že nádor je väčší ako 4 cm, N2a znamená, že unilaterálna metastáza v jednej lymfatickej uzline má veľkosť od 3 do 6 cm a M0 znamená, že sa u pacientky nenachádzajú vzdialené metastázy. Počas 7 týždňov bola liečená rádioterapiou spolu s cetuximabom v úvodnej dávke 400 mg/m² a následne 250 mg/m². Cetuximab je monoklonálna protilátka inhibujúca receptor pre epidermálny rastový faktor, ktorý zvyšuje cytotoxické účinky žiarenia pri skvamocelulárnom karcinóme. Metaanalýza potvrdila, že cetuximab plus

rádioterapia je lepšia ako samotná rádioterapia v predĺžení trvania kontroly lokoregionálneho ochorenia a prežitia pri pokročilom karcinóme hlavy a krku (Herve a kol., 2017). Trojrozmerná konformná rádioterapia sa vykonala s cieľom prispôbiť tvar ožarovaného objemu nepravidelnému tvaru nádorového ložiska. Táto technika umožňuje ožiarit cieľový objem s menším zaťažením okolitých zdravých tkanív (Šlamp a kol., 2007). Pred podaním rádioterapie bola vykonaná perakútna endoskopická gastrostómia (PEG), ktorej cieľom bolo zabezpečiť dostatočnú výživu aj pri vzniku radiačnej mukozitídy. Tá sa nakoniec objavila ako akútna odpoveď na liečbu, ktorá postihuje väčšinu pacientov s rádioterapiou. Dokonca cielená terapia cetuximabom zosilňuje mukozitídu a môže spôsobiť dermatitídu. S primárnou mukozitídou je spojená aj bolesť, čo viedlo k strate hmotnosti a použitia gastrostomickej trubice (Herve a kol., 2017).

Kazuistika 2: Pacient s karcinómom hypofaryngu liečený radiačnou terapiou spolu s cetuximabom

Pacient: 58-ročný muž

Osobná anamnéza: fajčiar, fajčí 10 cigariet za deň, alkohol pije každý deň jeden pohár vína. Liečený na arteriálnu hypertenziu, hyperlipoproteinémiu, pečeňovú steatózu a chronickú pankreatitídu.

Rodinná anamnéza: nevýznamná

Subjektívne ťažkosti: pocit cudzieho telesa v krku a škrabanie v hrdle

Vyšetrenia:

- histológia: menej diferencovaný skvamocelulárny rohový karcinóm
- Ultrasonografia: rozsiahla infiltrácia na krku 4 cm paramediálne
- CT: pod čeľustnou slinnou žľazou patologická infiltrácia s neostrým ohraničením
- USG pečene: steatóza pečene, chronická pankreatitída
- RTG hrudníka: negatívne
- Klinické vyšetrenie: v ľavej časti hypofaryngu bola zistená rozsiahla nádorová infiltrácia

Diagnóza: karcinóm hypofaryngu T3 N2b M0

Liečba:

- IMRT rádioterapia s konkomitantnou biologickou liečbou cetuximabom
- Rádioterapia: 66 Gy pre oblasť tumoru hypofaryngu a postihnutých uzlín vľavo
- Biologická liečba: cetuximab v 1 nasycovacej dávke 600 mg/m² a následne spolu s rádioterapiou 400 mg/m²

Epikríza: pacient prijatý na ORL kvôli pocitu cudzieho telesa v krku a škrabaním v hrdle. Histologické vyšetrenie preukázalo diferencovaný skvamocelulárny rohovujúci karcinóm. Na základe všetkých vyšetrení bol pacientovi diagnostikovaný karcinóm hypofaryngu T3 N2b M0. Ordinovaná bola liečba kombinovanou rádioterapiou spolu s cetuximabom, ktorú pacient absolvoval hospitalizovaný na onkologickom oddelení v Roosveltovej nemocnici v Banskej Bystrici.

Záver: pacientovi bol diagnostikovaný karcinóm hypofaryngu liečený kombinovanou IMRT rádioterapiou spolu s biologickou liečbou cetuximabom. Prvé 3 týždne reagoval na liečbu bez problémov, potom sa rozvinuli závažné komplikácie. Rádioterapia musela byť prerušená z dôvodu rozvoja ťažkej kožnej a slizničnej toxicity a infekčných komplikácií. Rozsiahla dermatitída krku bola liečená antibiotikom cefalexín a pacient trpel tiež bolestivou mukozitídou, ktorá bola liečená opiátmi. Po doliečení pokračoval v rádioterapii, ale už bez cetuximabu. Bol pozorovaný úbytok na váhe 10 kg, preto mu bola podaná čiastočná parenterálna výživa. Pri prepustení pacienta bola koža krku zahojená, sliznice v ústnej dutine bez patologických povlakov a pacient toleroval kašovitú stravu. Pri kontrole po 2 mesiacoch bolo prevedené vyšetrenie PET/CT s negatívnym nálezom. Tiež bolo vykonané RTG pľúc s negatívnym výsledkom. Z poradiačných komplikácií sa vyskytol znížený objem slín a boli mu odporúčané umelé sliny. Posledná kontrola bola po 5 rokoch s negatívnym výsledkom.

Diskusia: pacientom z kazuistiky 2 bol 58-ročný muž, ktorý pre pocit cudzieho telesa v krku a škrabaní navštívil otorinolaryngológa. Absolvoval CT, USG vyšetrenie a bola mu odobratá vzorka na histológiu. Na základe týchto vyšetrení mu bola stanovená diagnóza

karcinóm hypofaryngu, podľa TNM klasifikácie ako T3 N2b M0. T3 znamená, že nádor je väčší ako 4 cm, N2b znamená, že unilaterálne metastázy sa nachádzajú vo viacerých lymfatických uzlinách, pričom žiadna nie je väčšia ako 6 cm a M0 znamená, že sa u pacienta nenachádzajú vzdialené metastázy. Z anamnézy možno vidieť viacero rizikových faktorov, ktoré môžu spôsobiť nádor v oblasti hlavy a krku. Fajčenie a pitie alkoholu patrí medzi najrizikovejšie faktory pre vznik karcinómu (Klener, 2002). Chirurgická liečba v tomto prípade nebola možná, keďže nádor má viac ako 4 cm. V týchto prípadoch sa rozhoduje medzi rádioterapiou, chemoterapiou a biologickou terapiou. Vzhľadom k pridruženým chorobám pacienta sa predpokladalo, že rádioterapia s cetuximabom bude tá správna voľba. Prvé tri týždne bol liečený radiačnou terapiou spolu s cetuximabom, ktorá musela byť prerušená kvôli ťažkým nežiaducim účinkom. IMRT sa stala bežnou technikou pre pacientov s karcinómom hlavy a krku vďaka svojej schopnosti selektívne zacieliť primárne miesto a rizikové oblasti lymfatických uzlín, znížením dávky do zdravých susedných tkanív, čím sa zlepši pokrytie cieľového objemu s lokoregionálnou kontrolou. Často sa používa na oblasť hypofaryngu, pričom sa vyhýba dôležitým štruktúram ako je mozog, zrak a príušná slinná žľaza (Kwong a kol., 2004). V metaanalýze Lambercht a kol. (2013) bolo hlásené významne menej xerostómie súvisiacej s IMRT v porovnaní s 3D CRT po 6 mesiacoch liečby. Okrem toho Rathod a kol. (2013) zistili, že výrazne nižšiu suchosť v ústach, otváranie úst, lep-kavé sliny, prehĺtanie majú pacienti práve pri IMRT. Rozsiahla dermatitída a mukozitída bola výsledkom nežiaducich účinkov rádioterapie a cetuximabu ako bolo potvrdené v metaanalýze (Herve a kol., 2017). Z tohto dôvodu musela byť liečba prerušená, pacient sa preliečil betalaktámovým antibiotikom cefalexín, ktorý je účinný pri infekciách kože a mäkkých tkanív. S bolestivou mukozitídou bolo pravdepodobne spojené aj problémové prijímanie potravy, pacient schudol 10 kg, a preto mu bola podaná čiastočná parenterálna výživa. Po ukončení liečby mu bolo vykonané ešte kontrolné vyšetrenie PET/CT s negatívnym výsled-

kom a po 5 rokoch bol pacient bez známk recidívy.

Kazuistika 3: Pacient s karcinómom jazyka liečený chirurgickou liečbou doplnenou radiačnou liečbou a cisplatinou

Pacient: 53-ročný muž

Osobná anamnéza: fajčiar, fajčí 8 cigariet za deň, alkohol pije každý deň, dva poháre piva

Rodinná anamnéza: onkologicky nevýznamná

Subjektívne ťažkosti: pocit cudzieho telesa v krku, zdurené mandle

Výšetrenia:

- histológia: rohovatejúci epidermoidný karcinóm koreňa jazyka, vľavo infiltrujúci v rozsahu 30 mm a zasahujúci do spodiny a jedného laterálneho okraja nádoru
- CT: v zadnej tretine jazyka vľavo na hrane tumorózna infiltrácia do 2 cm
- RTG hrudníka: negatívne

Diagnóza: karcinóm jazyka T2 N0 M0

Liečba:

- resekcia tumoru jazyka
- adjuvantná rádioterapia

Epikríza: pacient prijatý na ORL kvôli pocitu cudzieho telesa v krku a zdureným mandliam. Histologické vyšetrenie preukázalo rohovujúci epidermoidný karcinóm koreňa jazyka. Ďalšie vyšetrenia objavili na hrtane tumoróznu infiltráciu do 2 cm. V tomto prípade bol diagnostikovaný karcinóm jazyka T2 N0 M0. Vykonaná bola resekcia jazyka a po štyroch týždňoch nasledovala adjuvantná rádioterapia IMRT žiarením s 35 ožiarmi, prvé dva týždne prebiehala spolu s chemoterapiou cisplatinou.

Záver: pacientovi bol diagnostikovaný karcinóm jazyka a bola vykonaná resekcia jazyka, po štyroch týždňoch nasledovala adjuvantná rádioterapia žiarením IMRT a chemoterapia cisplatinou. Dva mesiace po liečbe bolo vykonané PET/CT, kde bol stav po resekcii jazyka bez znakov lokálnej recidívy, bez vzdialenej diseminácie. Vyšetrenie ústnej dutiny ukázalo, že sliznica je pokojná, jazyk menej pohyblivý, po resekcii zjazvený. Pacient sa cítil dobre, môže jesť všetko okrem štiplavého a tiež udáva sucho v ústach. Bolo

mu odporúčané zvlhčenie umelými slinami a návšteva klinického logopéda, kvôli problémom s rečou. Kontrola na ORL každý rok, po piatich rokoch negatívny výsledok a ukončenie liečby.

Diskusia: pacientom z kazuistiky 3 bol 53-ročný muž, ktorý navštívil otorinolaryngológa z dôvodu pocitu cudzieho telesa v krku a zdurených mandlí. Na CT vyšetrení bola viditeľná tumorózna infiltrácia v zadnej tretine jazyka. Histologické vyšetrenie potvrdilo epidermoidný karcinóm koreňa jazyka, podľa TNM klasifikovaný wako T2 N0 M0. T2 znamená, že nádor má rozmer od 2 do 4 cm, N0 a M0 znamenajú, že regionálne miestne aj vzdialené uzliny sú bez metastáz. Pri včasných nádoroch jazyka ako v tomto prípade sa zvykne používať ako najvhodnejšia metóda chirurgická liečba. Avšak, pri tomto pacientovi bola okrem tumoru jazyka zistená aj tumorózna infiltrácia, preto bola zvolená kombinácia chirurgického odstránenia tumoru s následnou adjuvantnou rádioterapiou a chemoterapiou po štyroch týždňoch. Pooperačné ožarovanie zlepšuje výsledok skvamocelulárneho karcinómu vznikajúceho v hlave a krku. Jednou stratégiou na zlepšenie výsledku je zosilnenie účinkov pooperačnej rádioterapie používaním súbežnej chemoterapie po kompletnej resekcii. Nerandomizovaná štúdia naznačila, že tento prístup môže znížiť riziko lokálnej a regionálnej recidívy u vysokorizikových pacientov (Cooper a kol., 2012). Pri pooperačnej adjuvantnej konkomitantnej chemoterapii s rádioterapiou býva častá toxicita, čo sa prejavuje mukozitídou (Bernier a kol., 2006). Rovnako to bolo aj u tohto pacienta. Štúdia tiež preukázala, že konkomitantná chemoterapia a rádioterapia je efektívnejšia ako rádioterapia samotná, čo sa týka lokálnej kontroly a prežívania nezávisle od frakčionálneho režimu rádioterapie (Budach, 2007). Rozsah resekcie a aj sprievodné komplikácie onkologickej liečby majú za následok vznik deficitu na úrovni reči a prehĺtania. Tie môžu negatívne ovplyvňovať kvalitu života pacienta. Pacient podstúpil rehabilitácie i klinického logopéda, ktorí zohrávajú dôležitú úlohu pri poruchách s rečou po resekcii jazyka. Pacient rehabilitácie úspešne zvládol a po piatich rokoch nepreukazuje známky recidívy.

Kazuistika 4: Pacient so zhubným nádorom podnebného oblúka liečený radikálnou rádioterapiou spolu s konkomitantnou chemoterapiou cisplatinou a 5-fluorouracilom

Pacient: 52-ročný muž

Osobná anamnéza: fajčí asi 5 cigariet denne, alkohol konzumuje pravidelne

Rodinná anamnéza: otec zomrel na karcinóm pažeráka

Subjektívne ťažkosti: bolesti v krku. Pacient má pocit, akoby mal v krku žmolky, vykašľava hlien. Ťažšie sa mu dýcha nosom, zvykne byť unavený.

Vyšetrenia:

- histológia: stredne diferencovaný nerohovateľný epidermoidný karcinóm v excízii z kraniálnej časti *arcus palatoglossus*
- USG: zväčšené lymfatické a submandibulárne uzliny na krku pred kývačom
- CT krku: negatívne
- CT hrudníka: negatívne

Diagnóza: karcinóm orofaryngu – podnebného oblúka T2 N2 M0

Liečba:

- konkomitantne rádioterapia a cisplatina + 5-fluorouracil
- radikálna rádioterapia konformnou technikou

Epikríza: pacient prijatý na ORL kvôli bolestiam v krku, má pocit, akoby mal v krku žmolky a vykašľava hlien. Histologické vyšetrenie potvrdilo nerohovateľný epidermoidný karcinóm predného podnebného oblúka. Na základe vyšetrení bola stanovená diagnóza karcinóm podnebného oblúka s rozsahom T2 N2 M0. Liečený bol v úvodnej dávke konkomitantnou rádioterapiou s cisplatinou a 5-fluorouracilom a ďalej nasledovala radikálna rádioterapia.

Záver: pacientovi bol diagnostikovaný karcinóm podnebného oblúka. V úvode liečby bola zahájená terapia konkomitantnou rádioterapiou s cisplatinou a 5-fluorouracilom. Pacient túto liečbu zvládol dobre bez nevoľností, cítil sa unavený a mal suché sliznice. Ďalej nasledovala radikálna rádioterapia konformnou technikou v CTD 70 Gy. Z vedľajších účinkov sa u neho vyskytli výrazné hlien, ktoré ho budili v noci.

Ťažko sa mu dýchalo nosom, výrazne sa mu znížil príjem jedla, čo malo za následok úbytok váhy o 8 kg. Bol mu odporúčaný sprej do nosa vincentka, ktorý zvlhčuje a čistí nosovú sliznicu. Na líci sa mu objavila aftózna eflorescencia a oblasť mäkkého podnebia orofaryngu bola opuchnutá. Na tieto problémy bolo predpísané antibiotikum ciprofloxacín a antitymotikum flukonazol. Po dvoch týždňoch bolo preukázané zlepšenie a tiež dokázal lepšie jesť. Po troch cykloch radikálnej rádioterapie na lokoregionálnu oblasť v CTD 70 Gy s úvodom konkomitantnej chemorádioterapie bola liečba ukončená. Pri kontrole po štyroch týždňoch sa pacientovi zlepšilo prehĺtanie. Počas piatich rokov chodil pravidelne na kontroly s negatívnymi výsledkami.

Diskusia: pacient z kazuistiky 4 je 52-ročný muž, ktorý bol prijatý na ORL kvôli bolestiam v krku, má pocit, akoby mal v krku žmolky, vykašľava hlien, ťažšie sa mu dýcha a zvykne byť unavený. Všetky tieto príznaky sú typické pre karcinóm v oblasti ústnej dutiny. Z anamnézy sme zistili, že za vznik karcinómu v oblasti ústnej dutiny môžu mať vplyv rizikové faktory, a to výskyt karcinómu v rodine, fajčenie a konzumovanie alkoholu. Z vyšetrení sa zistila diagnóza karcinóm podnebného oblúka podľa TNM klasifikácie ako T2 N2 M0. Z toho vyplýva, že nádor je väčší ako 2 cm, ale menší ako 4 cm. Nerastie do blízkych tkanív (T2). Nerozšíril sa do blízkych lymfatických uzlín (N0) ani do vzdialených miest (M0). Pri tomto type nádoru, kde veľkosť nie je príliš veľká, je možnosť chirurgickej alebo kombinovanej liečby. V tomto prípade bola v úvode liečby zahájená terapia konkomitantnou rádioterapiou s cisplatinou a 5-fluorouracilom, ktorú pacient zvládol bez závažných nežiaducich účinkov. Cítil sa unavený, čo je pri liečbe bežné. Liečba konformnou rádioterapiou je súčasťou štandardných odporúčaní pre plánovanie radikálnej rádioterapie pre karcinómy hlavy a krku. V priebehu liečby sa u neho vyskytlo ďalších niekoľko nepríjemných nežiaducich účinkov, ktoré museli byť liečené farmakologickou liečbou. Boli mu nasadené antibiotiká s účinnou látkou ciprofloxacín a antitymotiká s účinnou látkou flukonazol. Po liečbe sa mu zmiernil

opuch, aftózna eflorescencia a dokázal lepšie konzumovať potravu, čo môžeme považovať za úspešnú liečbu. Aj napriek viacerým nepríjemným nežiaducim účinkom liečbu dokončil a recidíva nenastala ani 5 rokov od ukončenia liečby.

ZÁVER

Z výsledkov vyplýva, že neexistuje jeden optimálny spôsob liečby zhubných nádorov hlavy a krku. S dobrou prognózou sa ukazujú niektoré nechirurgické liečebné metódy pozostávajúce z kombinácie rádio-terapie, chemoterapie a biologickej liečby. V predkladannej práci sú opísané 4 kazuistiky karcinómu hltana, lokalizovaného na inom mieste a s inou terapiou liečby. Výber liečby pre pacienta závisel od viacerých faktorov, ako je zdravotný stav pacienta, veľkosť nádoru, typ nádoru a lokalizácia.

ZOZNAM LITERATÚRY

Adam, Z., Vorlíček, J.: Koptíková, J.: *Obecná onkologie a podpůrná léčba* [General Oncology and Supportive Care]. Praha: Grada, 2003. 25 – 27.

Adam, Z.: *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob* [Diagnostic and Treatment Procedures for Malignant Diseases]. 2.vyd. Praha: Grada, 2004. 696 s.

Aggarwal, S. K. A.: Histochemical approach to the mechanism of action of cisplatin and its analogues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1993, 7, 1053 – 1073.

Astolfi, L., Ghiselli, S., Guaran, V., Chicca, M., Simoni, E., Olivetto, E., Lelli, G., Martini, A.: Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation. *Oncology Reports*, 2013, 4, 1285 – 1292.

Bannwarth, B., Labat, L., Moride, Y., Schaeffer, T.: Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Drugs*, 1994, 47 (1), 25 – 50.

Becker, H. D.: *Chirurgická onkologie* [Surgical Oncology]. Praha: Grada, 2005. s. 904.

Budach, W.: Chemo-radiation for locally advanced pharyngo-laryngeal cancer. *Radiother. Oncol.*, 2007, 1, 8.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A.: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68 (6), 394 – 424.

Bernier, J., Vermorken, J. B., Koch, W. M.: Adjuvant therapy in patients with resected poor-risk head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2006, 24 (17), 2629 – 2635.

Casini, A., Wai-Yin Sun, R., Ott, I.: Medicinal chemistry of gold anticancer metallodrugs. *Metal-Drugs*, 2018, 12, 199 – 218.

Chande, N., Wang, Y., MacDonald, J. K., McDonald, J. W.: Methotrexate for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2014, 1, 8.

Cohen, E., Karrison, T. G., Kocherginsky, M., Mueller, J., Egan, R., Huang, C. H., Brockstein, B. E., Agulnik, M. B., Mittal, B. B., Yunus, F., Samant, S., Racz, L. E., Mehra, R., Kumar, P., Ondrey, F., Marchand, P., Braegs, B., Seiwert, T. Y., Villafior, V. M., Haraf, D. J., Vokes, E. E.: Phase III randomized trial of induction chemotherapy in patients with N2 or N3 locally advanced head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2014, 25, 2735 – 2743.

Cooper, J. S., Zhang, Q., Pajak, T. F., Forastiere, A. A., Jacobs, J., Saxman, S. B., Kish, J. A., Kim, H. E., Cmelak, A. J., Rotman, M., Lustig, R., Ensley, J. F., Thorstad, W., Schultz, C. J., Yom, S. S., Ang, K. K.: Long-term follow-up of the RTOG 9501/Intergroup Phase III Trial: Postoperative concurrent radiation therapy and chemotherapy in high-risk squamous cell carcinoma of the head and neck. *International Journal of Radiation Oncology*, 2012, 84 (5), 1198 – 1205.

Dobrovič, Š., Sičák, M.: Neskorá alebo nesprávna diagnostika a liečba nádorov hlavy a krku – kazuistiky [The late or incorrect diagnostic treatment of head and neck cancer – cases]. *Bratislava: Onko-*

lógia, 2017, 4, 258 – 261.

D'souza, G., Carey, T. E., William, W. N. Jr., Nguyen, M. L., Ko, E. C., Riddell, J. 4th, Pai, S. I., Gupta, V., Walline, H. M., Lee, J. J., Wolf, G. T., Shin, D. M., Grandis, J. R., Ferris, R. L.: Epidemiology of head and neck squamous cell cancer among HIV-infected patients. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2014, 65 (5), 603 – 610.

Economides, M. P., Amit, M., Mahale, P. S., Hosry, J. J., Jiang, Y., Bharadwaj, U., Sturgis, E. M., Torres, H. A.: Impact of chronic hepatitis C virus infection on the survival of patients with oropharyngeal cancer. *Cancer*, 2018, 124 (5), 960 – 965.

Fusek, M., Vitek, L., Blahoš, J., Hajdúch, M., Ruml, T.: *Biologická léčiva: teoretické základy a klinická praxe* [Biological Drugs: Theoretical Basics and Clinical Practice]. Praha: Grada, 2012. s. 11.

Guha, N., Warnakulasuriya, S., Vlaanderen, J., Straif, K.: Betel quid chewing and the risk of oral and oropharyngeal cancers: A meta-analysis with implications for cancer control. *International Journal of Cancer*, 2014, 135 (6), 1433 – 1443.

Guha, N., Boffetta, P., Wünsch, F. V., Eluf, N. J., Shangina, O., Zaridze, D., Curado, M. P., Koifman, S., Matos, E., Menezes, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Fernandez, L., Mates, D., Daudt, A. W., Lisowska, J., Dikshit, R., Brennan, P.: Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: Results of two multicentric case-control studies. *American Journal of Epidemiology*, 2007, 10, 1159 – 1173.

Gurdal, H., Tuglu, M. M., Bostanabad, S. Y., Dalkiliç, B.: Partial agonistic effect of cetuximab on epidermal growth factor receptor and Src kinase activation in triple-negative breast cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, 2019, 54 (4), 1345 – 1356.

Gurudutt, V., Genden, E.: Cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Skin Cancer*, 2011, 1, 1 – 10.

Herve, Y., Epstein, J. B., Bensadoun, R. J., Saunders, D. P., Lalla, R. V., Migliorati, C. A., Heaivilin, N., Zumsteg, Z. S.: Common oral compli-

cations of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. *Cancer Medicine*, 2017, 6 (12), 2918 – 2931.

Hashim, D., Genden, E., Posner, M., Hashibe, M., Boffetta, P.: Head and neck cancer prevention: from primary prevention to impact of clinicians on reducing burden. *Annals of Oncology*, 2019, 30 (5), 744 – 756.

Hermans, R., Reiser, M. F.: *Head and neck cancer imaging*. 2nd edn. Berlin: Springer, 2012. 2 – 9.

Kazi, R., Venkitaraman, R., Johnson, C., Prasad, V., Clarke, P., Rhys-Evans, P., Nutting, C. M., Harrington, K. J.: Electrolaryngographic comparison of voice outcomes in patients with advanced laryngopharyngeal cancer treated by chemoradiotherapy or total laryngectomy. *International Journal of Radiation Oncology*, 2008, 70 (2), 344 – 352.

Kawashita, Y., Soutome, S., Umeda, M., Saito, T.: Oral management strategies for radiotherapy of head and neck cancer. *Japanese Dental Science Review*, 2020, 56 (1), 62 – 67.

Klener, P.: *Klinická onkologie* [Clinical Oncology]. 1. vyd. Praha: Galén, 2002. s. 686.

Klener, P.: *Principy systémové protinádorové léčby* [Principles of Systemic Antitumour Treatment]. Praha: Grada, 2013. 552 s.

Krška, Z., Hoskovec, D., Petruželka, L.: *Chirurgická onkologie* [Surgical Oncology]. Praha: Grada, 2014. 904 s.

Kwong, D. L., Pow, E. H., Sham, J. S., McMillan, A. S., Leung, L. H., Leung, W. K., Chua, D. T., Cheng, A. C., Wu, P. M., Au, G. K.: Intensity-modulated radiotherapy for early-stage nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*, 2004, 7, 1584 – 1593.

Lambrecht, M., Nevens, D., Nuyts, S.: Intensity-modulated radiotherapy vs. parotid-sparing 3D conformal radiotherapy. *Strahlentherapie und Onkologie*, 2013, 189 (3), 223 – 229.

Lefebvre, J. L.: Laryngeal preservation in head and neck cancer: a multidisciplinary approach.

The Lancet Oncology, 2006, 7 (9), 747 – 755.

Liu, Q., Yan, L., Xu, C., Gu, A., Zhao, P., Jiang, Z. Y.: Increased incidence of head and neck cancer in liver transplant recipients: a meta-analysis. *BMC Cancer*, 2014, 1, 12 – 14.

Longo, D.: Head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, 2020, 1, 60 – 72.

Mahale, P., Sturgis, E. M., Tweardy, D. J., Ariza-Heredia, E. J., Torres, H. A.: Association between hepatitis C virus and head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 2016, 108 (8), 108.

Mazul, A. L., Taylor, J. M., Divaris, K., Weisler, M. C., Brennan, P., Anantharaman, D., Abedi-Ardekani, B., Olshan, A. F., Zevallos, J. P.: Oral health and human papillomavirus – associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, 2017, 123 (1), 71 – 80.

Novotný, J., Vítek, P., Petruželka, L.: *Klinická a radiační onkologie pro praxi* [Clinical and Radiation oncology for Practice]. Praha: Triton, 2005, 21, 314.

Novotný, J.: *Perspektivy protinádorové léčby* [Perspectives of Antitumour Treatment]. <http://www.lpr.cz/index.php/onkologie>. [cit. 2017-6-21].

Pointreau, Y., Garaud, P., Chapet, S., Sire, C., Tuchais, C., Tortochaux, J., Faivre, S., Guerif, S., Alfonsi, M., Calais, G.: Randomized trial of induction chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil with or without docetaxel for larynx preservation. *Journal of the National Cancer Institute*, 2009, 101 (7), 498 – 506.

Poschl, G.: Alcohol and cancer. *Alcohol and Alcoholism*, 2004, 39 (3), 155 – 165.

Rabinovics, N., Mizrahi, A., Hadar, T., Ad-El, D., Feinmesser, R., Guttman, D., Shpitzer, T., Bachar, G.: Cancer of the head and neck region in solid organ transplant recipients. *Head & Neck*, 2014, 36 (2), 181 – 186.

Rathod, S., Gupta, T., Ghosh-Laskar, S., Murthy, V., Budrukhar, A., Agarwal, J.: Quality-of-life (QOL) outcomes in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) treated with in-

tensity-modulated radiation therapy (IMRT) compared to three-dimensional conformal radiotherapy (3D-CRT): Evidence from a prospective randomized study. *Oral Oncology*, 2013, 49 (6), 634 – 642.

Scully, C., Bagan, J. V.: Recent advances in oral oncology 2008; squamous cell carcinoma imaging, treatment, prognostication and treatment outcomes. *Oral Oncology*, 2009, 45 (6), 25 – 30.

Singh, R. K., van Haandel, L., Kiptoo, P., Becker, M. L., Siahaan, T. J., Funk, R. S.: Methotrexate disposition, anti-folate activity and efficacy in the collagen-induced arthritis mouse model. *European Journal of Pharmacology*, 2019, 1, 264 – 274.

Snyder, L. C., Astsaturov, I., Weiner, L. M.: Overview of monoclonal antibodies and small molecules targeting the epidermal growth factor receptor pathway in colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer*, 2005, 5 (Suppl. 2), S71 – 80.

Šlampa, P., Petera, J.: *Radiační onkologie* [Radiation Oncology]. Praha: Galén, 2007. 772 s.

Šlampa, P., Smilek, P.: *Nádory hlavy a krku: přehled diagnostiky a léčby maligních nádorů horních dýchacích a polykacích cest, hrtanu, slinných žláz a kůže* [Head and Neck Tumours: Overview of Diagnosis and Treatment of Malignant Tumours of Upper Respiratory tract, Pharynx, Larynx, Salivary Glands and Skin]. Praha: Mladá fronta, 2016. 261 s.

Vermorken, J. B., Remenar, E., van Herpen, C., Gorlia, T., Mesia, R., Degardin, M., Stewart, J. S., Jelic, S., Betka, J., Preiss, J. H., van den Weyngaert, D., Awada, A., Cupissol, D., Kienzer, H. R., Rey, A., Desautois, I., Bernier, J., Lefebvre, J. L., EORTC 24971/TAX 323 Study Group.: Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, 2007, 17, 1695 – 1704.

Vigneswaran, N., Williams, M. D.: Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 2014, 26 (2), 123 – 141.

Vincenzi, B., Zoccoli, A., Pantano, F., Venditti, O., Galluzzo, S.: Cetuximab: from bench to bedside. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2010, 10 (1),

80 – 95.

Vukovic, V., Stojanovic, J., Vecchioni, A., Pastorino, R., Boccia, S.: Systematic review and meta-analysis of SNPs from GenomeWide Association Studies of Head and Neck Cancer. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery*, 2018, 159 (4), 615 – 624.

Watters, A. L., Epstein, J. B., Agulnik, M.: Oral complications of targeted cancer therapies: A narrative literature review. *Oral Oncology*, 2011, 47 (6), 441 – 448.

Zhang, N., Yin, Y., Xu, S. J., Chen, W. S.: 5fFluorouracil: Mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules*, 2008, 13 (8), 1551 – 1569.



PRÍRODNÉ LÁTKY AKO MODULÁTORY TRANSKRIPČNÉHO FAKTORA NF- κ B

NATURAL PRODUCTS AS MODULATORS OF THE TRANSCRIPTION FACTOR NF- κ B

Jurčacková, Zuzana^{1, 2}; Hrčková, Gabriela¹

¹ Parazitologický ústav, Slovenská Akadémia Vied, Hlinkova 3, 04001 Košice

² Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

jurcackova@saske.sk

ABSTRAKT

Jadrový faktor kappa B (NF- κ B) je transkripčný faktor, ktorý indukuje expresiu rôznych pro-zápalových génov. NF- κ B má významnú úlohu aj pri regulácii aktivácie a diferenciácie vrodenných imunitných buniek a zápalových T lymfocytov. V dôsledku toho deregulovaná aktivácia NF- κ B prispieva k vzniku patogénnych procesov rôznych zápalových ochorení. Tento transkripčný faktor sa preto stal hlavným cieľom pri vývoji nových liekov a skúmané boli aj viaceré skupiny prírodných zlúčenín z hľadiska ich potenciálnych inhibičných účinkov na NF- κ B. Cieľom tohto prehľadového článku je popísať dve cesty aktivácie transkripčného faktora NF- κ B a poskytnúť prehľad o prírodných látkach rastlinného pôvodu, najmä izoprenoidoch a fenolických látkach, ktoré

sú v súčasnosti uvádzané ako najúčinnšie inhibítory dráhy NF- κ B.

Kľúčové slová: fenolické látky; izoprenoidy; jadrový faktor kappa B

ABSTRACT

Nuclear factor kappa B (NF- κ B) is a transcription factor that induces the expression of various pro-inflammatory genes. NF- κ B has a significant role in the regulation of activation and differentiation of innate immune cells and inflammatory T lymphocytes. Consequently, deregulated activation of NF- κ B contributes to the pathogenesis of various inflammatory diseases. Therefore, this transcription factor has become the main target in the development of new drugs, and several groups

of natural compounds have been investigated in terms of their potential inhibitory effects on NF- κ B. The aim of this review article is to describe two pathways of activation of the transcription factor NF- κ B and to provide an overview of natural substances of plant origin, especially isoprenoids and phenolics, which are currently reported as the most effective inhibitors of the NF- κ B pathway.

Key words: isoprenoids; nuclear factor kappa B; phenolics

ÚVOD

Jadrový faktor kappa B (NF- κ B) zohráva dôležitú úlohu v systémoch vrodenej a získanej imunitnej odpovede a jeho činnosť je spájaná s viacerými druhmi ochorenia, od tých menej závažných až po nádorové ochorenia. Tento transkripčný faktor je zapojený aj do viacerých mechanizmov proliferácie a apoptózy. Navyše je schopný aktivovať prozápalové gény a spúšťať kaskády zápalových reakcií v organizme. NF- κ B je jedným z hlavných indukovateľných transkripčných faktorov u cicavcov a dôležitú úlohu zohráva aj pri expresii cytokínov, chemokínov a adhézných molekúl. Medzi ďalšie mediátory zápalu, ktoré sú pod vplyvom jadrového transkripčného faktora kappa B patrí aj indukovateľná syntáza oxidu dusnatého (iNOS), s ňou spojená produkcia oxidu dusnatého a prostaglandín syntázy, najmä cyklooxygenázy 2 (COX-2) (D'Acquisto a kol., 1997). Prostaglandíny sú tiež schopné inhibovať aktivitu jadrového faktora, navyše cyklopentenón prostaglandín môže priamo blokovať aktivitu inhibítorov NF- κ B kinázy (IkB) (Rossi a kol., 2000).

Napriek tomu, že dráha NF- κ B je pomerne dobre preskúmaná, poskytuje mnohé výzvy pre ďalší výskum nielen z hľadiska molekulárnej biológie, ale aj z pohľadu perspektívneho využitia prírodných látok pri vývoji liečiv. Liečba zápalových stavov prírodnými látkami rastlinného pôvodu je známa už oddávna, napriek tomu v súčasnosti neustále narastá počet nových prírodných látok s potenciálnym využitím vo

farmaceutickom priemysle. Navyše, prírodné látky sa ukázali ako silný modulátor aktivity transkripčného faktora NF- κ B. Dosiaľ sú najlepšie preštudované dve skupiny potenciálnych cieľových sekvencií, ktorých modulácia významne ovplyvní celú kaskádu jadrového faktora. Prvou skupinou sú inhibítory NF- κ B (IkB) a druhú skupinu tvorí kinázový komplex IkB (IKK). Prírodné látky tiež ovplyvňujú export komplexu NF- κ B-IkB z jadra, ako aj presun neaktívneho komplexu do jadra prostredníctvom jadrového exportného signálu, ktorý obsahuje inhibičný proteín IkB α . Väčšina prírodných látok však pôsobí širokospektrálne, a preto sú potrebné ďalšie štúdie na objasnenie presných účinkov látok, ako aj cieľových sekvencií v kaskáde NF- κ B.

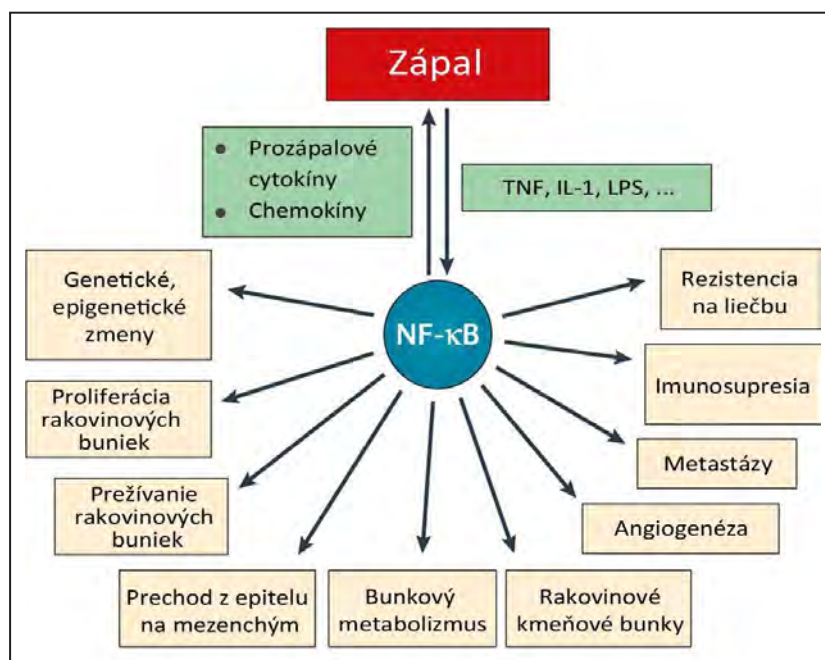
Vysvetlenie a pochopenie účinkov produktov naturálneho pôvodu na molekulárnej úrovni je dôležité a významne tak prispieva k tvorbe a vývoju nových liečiv, ktoré môžu byť použité pri terapii širokej škály ochorení a zápalových procesov.

Transkripčný faktor NF- κ B

Transkripčný faktor NF- κ B bol prvý krát objavený Davidom Baltimorem v roku 1986 (Sen a Baltimore, 1986). Ovplyvňuje transkripciu génu kódujúceho ľahký reťazec κ imunoglobulínov, odkiaľ pochádza aj jeho názov. NF- κ B bol spočiatku identifikovaný ako proteín, ktorý je potrebný pre expresiu génov špecifických pre B bunky, neskôr sa podarilo dokázať, že je exprimovaný vo väčšine buniek (Zhang a Gosh, 2001). NF- κ B sa viaže na dekamerickú sekvenciu -5' GGG ACT TTC C 3' v intrónovom zosilňovači kappa ľahkého imunoglobulínového reťazca zrelých B buniek a plazmatických buniek, ale nie je schopný naviazať sa na rovnakú sekvenciu nezrelých pre-B buniek (Sen a Baltimore, 1986). Väzbová aktivita transkripčného faktora NF- κ B je indukovaná nielen vnútrobunkovými, ale aj mimobunkovými signálmi a väzbové miesto pre NF- κ B sa nachádza v promótorových oblastiach a zosilňovačoch viacerých inducibilných génov.

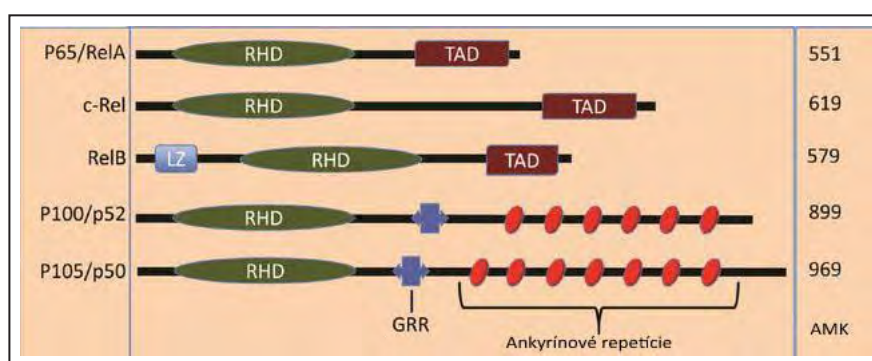
Transkripčný faktor NF- κ B sa zúčastňuje celej škály bunkových procesov, ktoré predstavujú odpoveď

Obr. 1: Úloha NF-κB v imunitnom systéme



Zdroj: upravené podľa Taniguchi a Karin, 2018

Obr. 2: Schematické znázornenie členov rodiny NF-κB



RHD – Rel homologná doména, TAD – transaktivačná doména, LZ – leucínový zips, GRR – oblasti bohaté na glycín, AMK – aminokyseliny

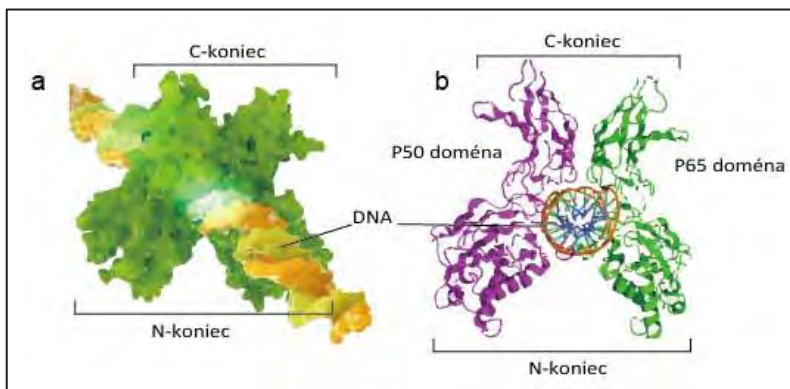
Zdroj: upravené podľa Tilstra a kol., 2011

na rôzne formy stresových podnetov v podobe prítomnosti voľných radikálov, ultrafialového žiarenia, ale aj prítomnosti bakteriálnych alebo vírusových antigénov, či cytokínov (Baeuerle, 1991). NF-κB sa vo významnej miere podieľa na zápalovej a imunitnej odpovedi organizmu, diferenciácii a raste buniek, apoptóze a na transkripcii z vírusových promótorov (Jimi a Gosh, 2005). Nádorové ochorenia, zápal, au-

toimunitné ochorenia, septický šok a vírusové infekcie vedú k deregulácii tohto transkripčného faktora (Yamanoto a Gaynor, 2001) (vid' obr. 1).

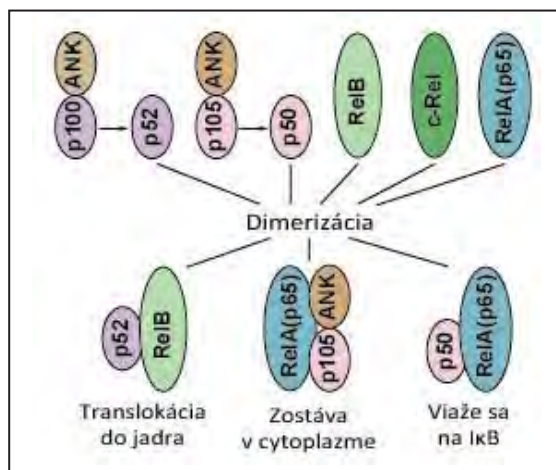
Členovia rodiny NF-κB sa rozdeľujú do dvoch skupín – NF-κB proteíny a Rel proteíny (vid' obr. 2). Do skupiny Rel patria c-Rel, RelB, RelA (p65) a vírusový onkoproteín v-Rel. Členovia skupiny NF-κB sú NF-κB1 (p50 a jeho prekursor p105) a NF-κB2 (p52

Obr. 3: Väzba dimérneho proteínu NF- κ B s reťazcom DNA



Zdroj: upravené podľa <https://www.creative-diagnostics.com/The-NF-κB-Signaling-Pathway.htm>

Obr. 4: Vznik homodimérnych a heterodimérnych komplexov NF- κ B/Rel



droj: upravené podľa <https://www.creative-diagnostics.com/The-NF-κB-Signaling-Pathway.htm>

a jeho prekursor p100). Tieto proteíny sú až do skrátenia proteolýzou v neaktívnej forme. Proteíny c-Rel, RelB, RelA a rovnako aj ich vírusový homológ v-Rel, obsahujú minimálne jednu transaktivačnú doménu v C-terminálnej oblasti a sú priamo syntetizované ako aktívne transkripčné proteíny. Podjednotky p50 a p52 skupiny NF- κ B sú najskôr vytvárané ako dlhšie prekurzory s veľkosťou 105 kDa a 100 kDa, z toho dôvodu musia byť proteolyticky štiepené (Karin a Ben-Neriah, 2000). Prekurzorové proteíny podjednotky p50 – p105 sú skracované konštitutívne, naopak, pre-

kurzor p100 podjednotky p52 je skracovaný v závislosti od signálnych dráh (Beinke a Ley, 2004).

Proteíny sa spájajú do homodimérov alebo heterodimérov a vytvárajú transkripčné regulačné komplexy, ktorých transkripčná aktivita je charakterizovaná zložením dimérov a rovnako závisí aj od lokalizácie v bunke, či asociácii s inhibítorovými proteínmi skupiny I κ B kináz (Hayden a Gosh, 2004). Charakteristickým znakom jednotlivých podjednotiek NF- κ B je vysoko konzervovaná N-terminálna doména, ktorú tvorí približne 300 aminokyselín. Označuje sa

ako Rel homológna doména (RHD). Táto oblasť je zodpovedná za väzbu na molekulu DNA (viď obr. 3), dimerizáciu, interakciu s proteínom I κ B inhibujúcim NF- κ B, ako aj za lokalizáciu transkripčného faktora v jadre. Aktívny NF- κ B musí obsahovať aspoň jeden proteín s transaktivačnou doménou, ktorá je nevyhnutná pre aktiváciu génovej expresie.

Najčastejšie sa vyskytujúcou formou transkripčného faktora NF- κ B v bunkách je heterodimér p50/p52. Nie je však jediný. Aj ostatné podjednotky sa môžu spájať do heterodimérov alebo homodimérov a vytvárať tak aktívne transkripčné regulátory. Jedinou výnimkou, ktorá sa nemôže spájať a vytvárať homodiméry, sú proteíny RelB. Zloženie podjednotiek sa líši v závislosti od typu bunky, doby pôsobenia stimulu a vlastností podnetu, ktorý indukuje ich spájanie. Práve z toho dôvodu je možné vytvárať veľký počet kombinácií homodimérnych a heterodimérnych faktorov NF- κ B/Rel (viď obr. 4). Jednotlivé proteíny NF- κ B/Rel majú navyše odlišné biologické funkcie, presne fyziologické funkcie jednotlivých proteínov dosiaľ neboli exaktne popísané. Príkladom sú homodiméry z podjednotiek p50 a p52, ktorým chýba transaktivačná doména. Tieto podjednotky súperia o miesta κ B s ďalšími komplexami NF- κ B a preto pôsobia na expresiu génov skôr inhibične (May a Gosh, 1997). Ďalším príkladom je strata podjednotky p65, ktorá spôsobí letalitu embrya v dôsledku degenerácie pečene, zatiaľ čo strata ktorejkoľvek inej podjednotky vyústí k imunitnej deficiencii, nie však k poškodeniu plodu a vývojovým poruchám. Transkripčná aktivita NF- κ B je regulovaná na viacerých úrovniach, najmä cez I κ B proteíny a cez rôzne kombinácie NF- κ B podjednotiek. Najsilnejšie je inhibovaný komplex p50/p65, a to prostredníctvom inhibičného proteínu rodiny I κ B-I κ B α , menej inhibované sú komplexy p50/RelB a p50/c-Rel. I κ B β má rovnakú inhibičnú aktivitu pre všetky komplexy (Baeuerle a Baltimore, 1988).

NF- κ B je považovaný aj za hlavného sprostredkovateľa imunitnej odpovede. Pre správnu funkciu NF- κ B je nevyhnutná presná regulácia odpovedí na odlišné podnety. Väzba ligandu na rôzne druhy recep-

torov, akými sú IL-1R (z angl. interleukin 1 receptor), TNFR (z angl. tumor necrosis factor receptor), TLR (z angl. Toll-like receptors), TCR (z angl. T cell receptors), BCR (z angl. B-cell receptors), BAFF-R (z angl. B-cell activating factor receptor) a LT β R (z angl. lymphotoxin b receptor) spúšťa reguláciu expresie cytokínov, chemokínov, rastových faktorov, povrchových adhezívnych molekúl, imunoreceptorov, niektorých ďalších transkripčných faktorov, ale aj regulátorov apoptózy a efektorových enzýmov (Bonizzi a Karin, 2004). NF- κ B ovplyvňuje aj vývin tkanív a orgánov v priebehu embryogenézy a vplýva aj na fyziológiu tkanív v dospelosti. Navyše je hlavným regulátorom odpovedí na stres a je schopný blokovat' apoptózu v niektorých bunkových typoch.

Aktivácia NF- κ B

Na aktivácii NF- κ B sa podieľa mnoho rôznych látok a molekúl. Najdôležitejšími regulátormi sú inhibítory NF- κ B (I κ B) a kinázový komplex I κ B (IKK). Proteíny NF- κ B sa v nestimulovaných bunkách nachádzajú v cytoplazme v neaktívnej forme, kde asociujú s inhibičnými proteínmi rodiny I κ B (najmä I κ B α , I κ B β a NEMO/I κ B γ (z angl. NF- κ B essential modulator) prostredníctvom 5 – 7 ankyrínových repetitívnych domén (30 – 33 aminokyselín), ktoré sú súčasne jedným z charakteristických znakov proteínov I κ B rodiny. Do tejto rodiny patrí aj Bcl-3 (z angl. B-cell lymphoma 3-encoded protein), I κ B ϵ a prekurzory p100 a p105 (Abraham, 2000). Proteín Bcl-3 špecificky interaguje s homodimérmi p50, prípadne p52 a s heterodimérmi p50/p52 a následne spúšťa expresiu génov κ B, a to aj napriek tomu, že patrí do rodiny inhibičných proteínov. Prekurzor p100, ktorý sa nachádza v komplexe s RelB, potláča transkripčnú aktivitu RelB prostredníctvom svojej C-terminálnej oblasti. Proteolýza p100 a následné uvoľnenie diméru p52/RelB je spúšťané najmenej tromi členmi rodiny TNF, a to CD40, LT β R a BAFF-R (Yamamoto a Gaynor, 2004).

Lokalizácia diméru v bunke je ovplyvnená väzbou NF- κ B a I κ B, v dôsledku prekrytia jadrového lokalizačného signálu NF- κ B, ktorý sa nachádza v C-termi-

nálnej oblasti Rel homológnej domény NF- κ B proteínov. Súčasne prebieha export komplexu NF- κ B-I κ B z jadra. Proteíny I κ B β a I κ B ϵ sú naviazané na diméry NF- κ B a nachádzajú sa striedavo medzi cytoplazmou a jadrom (Lee a Hannink, 2002). Inhibičný proteín I κ B β navyše dokáže prekryť oba jadrové lokalizačné signály a z toho dôvodu udržiava NF- κ B diméry trvalo v cytoplazme (Tam a Sen, 2001).

Gény kódujúce podjednotky RelB a c-Rel, ako aj vysoko konzervované prekursorové proteíny NF- κ B1 (p50) a NF- κ B2 (p52) obsahujú vo svojich promótorových oblastiach elementy κ B, ktoré sú indukovateľné NF- κ B. Z toho dôvodu sa zloženie komplexov NF- κ B, a tým aj indukcia a expresia mnohých génov môže meniť. Komplexy obsahujúce prekursorový proteín p50 alebo p52 sa môžu čiastočne nahrádzať. Podobne je to aj v prípade p50 a kompenzácie nedostatku RelB, c-Rel a p65 (Nakamura a kol., 2013).

Klasická dráha aktivácie NF- κ B

Klasická dráha, nazývaná aj klasická cesta aktivácie NF- κ B je dosiaľ najlepšie preštudovanou dráhou aktivácie tohto transkripčného faktora. Zahŕňa fosforyláciu I κ B, čím umožní translokáciu dimérov NF- κ B do jadra, následne ich väzbu na promótorov cieľových génov a spúšťa ich transkripciu (Rothwarf a Karim, 1999). Fosforylácia I κ B prebieha pomocou kinázového komplexu IKK, ktorý je zložený z katalytických podjednotiek IKK α a IKK β a regulačného proteínu NEMO (Karim, 1999). Aktiváciu môže spúšťať viacero stimulátorov vrátane patogénov, stresových signálov a prozápalových cytokínov – TNF a IL-1 (Kelliher a kol., 1998). IL-1 a TNF predstavujú základné prozápalové cytokíny, ktoré sú pri poranení alebo infekcii tkaniva okamžite uvoľňované. Stimuly aktivácie NF- κ B sú rozpoznávané najmä transmembránovými Toll-like receptormi (TLR), ktoré majú dôležitú úlohu vo vrodenej imunitnej odpovedi. TLR rozoznávajú mikrobiálne molekulárne vzorce, preto sú aj súčasťou skupiny receptorov rozoznávajúcich molekulárne vzory (PRR, z angl. pattern recognition receptors) odkiaľ pochádza ich názov (Akira a kol., 2006). Vyskytujú sa v bunkách imunitného systé-

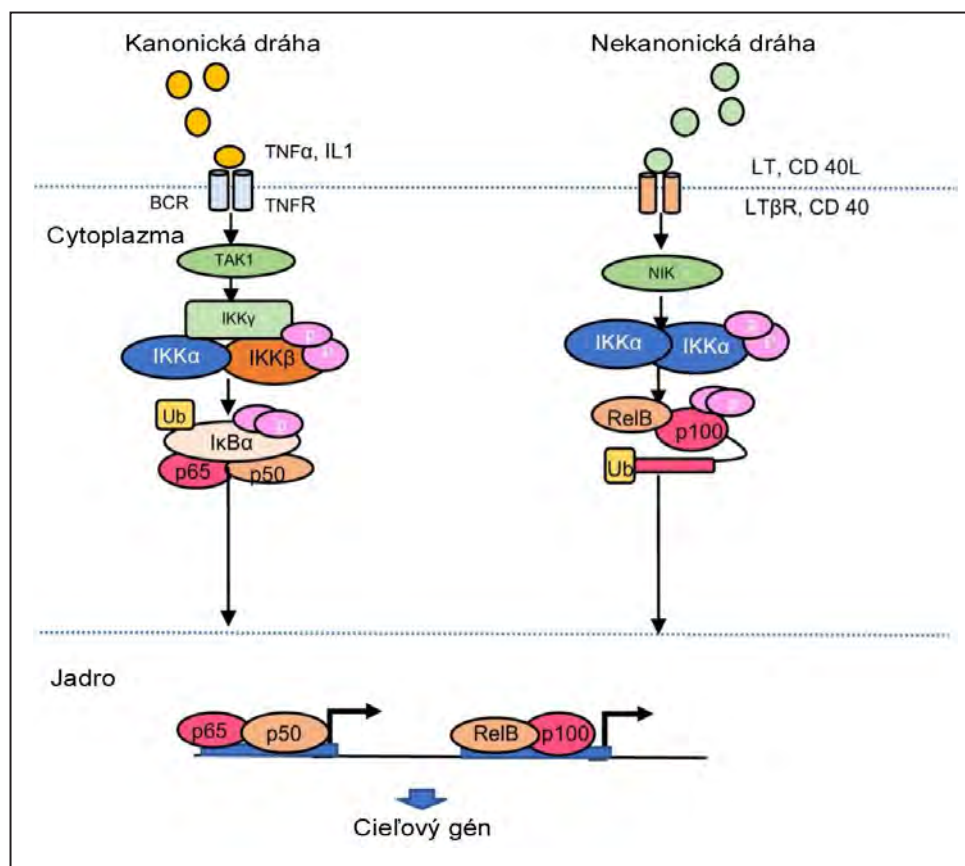
mu, ako sú makrofágy, dendritové bunky, neutrofil, mastocyty a B-lymfocyty, ale aj vo fibroblastoch a bunkách epitelu. V prípade rozpoznania patogénu sú schopné aktivovať imunitný systém prostredníctvom produkcie prozápalových cytokínov, interferónov alebo antimikrobiálnych peptidov (Abbas a kol., 2010). Napriek tomu, že tieto receptory predstavujú štrukturálne odlišné typy, využívajú podobné signálne transdukčné mechanizmy, ktoré zahŕňajú aktiváciu IKK a NF- κ B (Ghosh a Karin, 2002). NF- κ B môže byť tiež stimulovaný aktiváciou T-bunkového receptora. Všetky tieto stimuly vedú ku kaskáde reakcií, ktoré následne spúšťajú aktiváciu kinázového IKK komplexu. Aktivovaný IKK komplex je schopný fosforylovať dva seríny v I κ B a spúšťať ubikvitináciu. Takto označený inhibítor je odstránený v 26S proteazóme a uvoľnené diméry NF- κ B sú translokované do jadra. Väzba NF- κ B na molekulu DNA však nestačí na aktiváciu cieľového proteínu, preto sú potrebné ďalšie transkripčné koaktivátory (Sheppard a kol., 1999).

Aktivácia NF- κ B sa spája najmä so zvýšenou aktiváciou transkripčných génov kódujúcich chemokíny (napr. IL-8, eotaxín, MCP-1, MIP-1, RANTES), cytokíny (napr. TNF, IL-1), adhezívne molekuly (napr. ELAM, ICAM-1, VCAM-1), mediátory zápalu (napr. COX-2) a inhibítory apoptózy. Všetky tieto molekuly predstavujú významné zložky nešpecifickej imunitnej odpovede v boji proti invadujúcim mikroorganizmom. Zabezpečujú tiež presun fagocytujúcich a zápalových buniek do tkanív tam, kde sa nachádza patogén. Aktivované fagocytujúce bunky pohltia, usmrčia a rozložia baktérie a po translokácii do sekundárnych lymfoidných orgánov prezentujú baktériové antigény T-lymfocytom, čím začnú procesy špecifickej imunitnej odpovede. NF- κ B okrem transkripcie imunoglobulínových génov zabezpečuje aj transkripciu génov pre IL-2, IL-18, IFN γ , CD80 a CD86 a ďalších, ktoré sa podieľajú na aktivácii T-lymfocytov (Buc, 2012).

Alternatívna dráha aktivácie NF- κ B

Alternatívna dráha aktivácie NF- κ B je dosiaľ preštudovaná v menšej miere ako klasická. Charakteris-

Obr. 5: Klasická a alternatívna dráha aktivácie NF- κ B



Zdroj: upravené podľa Khongthong a kol., 2019

tickým znakom tejto dráhy je, že nezahŕňa fosforyláciu a ubikvitináciu I κ B, a to z dôvodu aktivátorov NF- κ B, ako napr. CD40, CD30, CD27, RANK (z angl. receptor activator of NF- κ B), B-bunky aktivujúci faktor TNF rodiny, LMP-1 Epstein-Barrovej vírus (z angl. latent membrane protein-1) a lymfotoxín- β receptory, ktoré spúšťajú výhradne alternatívnu dráhu aktivácie. Táto dráha začína aktiváciou NIK (z angl. NF- κ B-inducing kinase), ktorá je závislá len na homodiméri IKK α IKK komplexu a aktivovaný je výhradne p52/RelB dimérom (Bonizzi a Karin, 2004). IKK α fosforyluje podjednotku p100 na C-terminálnom konci a takto zabezpečí ubikvitináciu a následné proteolytické štiepenie v proteazóme 26S na podjednotku p52 odstránením ankyrínových re-

petícií (Quing a kol., 2005). Ankyrínové repetície na C-terminálnom konci zabezpečujú lokalizáciu p100 v cytoplazme a súčasne bránia premiestneniu do jadra. Z toho dôvodu je skrátená podjednotka p52 už ako dimér s RelB translokovaná do jadra. Dimér p52/RelB, ako aj samotná alternatívna dráha aktivácie sa uplatňujú predovšetkým pri expresii génov, ktoré sa podieľajú na vývoji a udržiavaní štruktúry a funkcie sekundárnych lymfoidných orgánov (Dejardin a kol., 2002) (viď obr. 5).

Inhibícia NF- κ B prírodnými látkami rastlinného pôvodu

Vplyv látok pochádzajúcich z prírodných zdrojov na transkripčný faktor NF- κ B bol prvý krát popísaný

Tab. 1: Prehľad vybraných prírodných látok rastlinného pôvodu inibujúcich NF-κB

	Látka	Producent	Účinok/Mechanizmus
IZOPRENOIDY	andalusol	<i>Siderites foetens</i>	protizápalový/redukcia NO cez inhibíciu iNOS
	kaurénové diterpenoidy (najmä: kamebanín, kamebacel A, kamebakaurín a excisanín A)	<i>Isodon japonicus</i>	protizápalový/zníženie aktivity IKK, inhibícia produkcie NO, inhibícia aktivácie NF-κB
	hypoestoxid	<i>Hypoestes rosea</i>	protizápalový/zníženie aktivity IKK, inhibícia produkcie NO, inhibícia aktivácie NF-κB, inhibícia produkcie prozápalových cytokínov (IL-1b, TNF-α, IL-6)
	seskviterpénové laktóny (najmä partenolid)	<i>Tanacetum parthenium</i>	protinádorové, zníženie rezistencie na chemoterapeutiká/inhibícia produkcie NO závislej od iNOS
	triterpénové saponíny (avicíny)	<i>Acacia victoriae</i>	protinádorové/indukcia apoptózy, zníženie proliferácie nádorových buniek
	triterpenoidy (pristimerín)	<i>Celastrus</i> spp.	cytotoxické, protinádorové/zníženie indukcie iNOS, potláča aktiváciu NF-κB
	kardenolidy (oleandrín)	<i>Nerium oleander</i>	protizápalové, protinádorové/inhibícia dráhy NF-κB
FENOLICKÉ LÁTKY	deriváty teaflavínu, epigalokatechín-3-galát	<i>Thea sinensis</i>	inhibícia aktivácie NF-κB, zníženie produkcie NO cez inhibíciu iNOS
	wogonín, baikalín, baikaleín	<i>Scutellaria baicalensis</i>	zníženie produkcie NO, regulácia expresie iNOS, COX-2
	hypericín	<i>Hypericum perforatum</i>	protizápalové/inhibícia aktivácie NF-κB
	kurkumín	<i>Curcuma longa</i>	protinádorové, protiapoptické/inhibícia iNOS, inhibícia NF-κB
	sylibarínové flavonolignany	<i>Silybum marianum</i>	cytoprotektívne, protizápalové, protinádorové, chemoprotektívne/inhibícia aktivácie NF-κB, inhibícia produkcie IL-1, regulácia expresie COX-2

NO – oxid dusnatý, iNOS – indukovateľná syntáza oxidu dusnatého, IKK – kinázový komplex IκB, NF-κB – jadrový faktor kappa B, IL-1 – interleukín 1, IL-6 – interleukín 6, TNF-α – tumor nekrotizujúci faktor alfa

v roku 1994 (Kopp a Chosh), kedy bol identifikovaný salicylát sodný a jeho polysyntetický derivát aspirín. Tento objav sa stal základom pre ďalší výskum prírodných látok, najmä extraktov izolovaných z liečivých rastlín, ktoré mali inhibičnú aktivitu na NF-κB (viď tab. 1). Tieto štúdie však vyžadujú celý rad kontrolných experimentov s použitím rôznych stimulátov na aktiváciu kaskády signálnych dráh, testovanie zápalových procesov v organizme, využitie rôznych typov buniek, ako aj testy špecificity zamerané na jednotlivých členov kaskády NF-κB, vrátane sledo-

vania degradácie IκB, komplexu IKK, translokácie NF-κB do jadra a väzby NF-κB na molekulu DNA, ktoré sú kľúčovými krokmi kaskády.

Izoprenoidy

Klasické farmakologické štúdie naznačujú, že niektoré druhy extraktov z rastlín *Sideritis* sp. (*Lamiaceae*) majú protizápalovú aktivitu a viedli k identifikácii andalusolu, diterpenoidu izolovaného zo *Siderites foetens* Clemen. s významnými protizápalovými účinkami (Navarro a kol., 1997). Testami na

bunkovej línii makrofágov J774 sa neskôr podarilo dokázať, že táto zlúčenina nemá žiadne toxické účinky a redukuje syntézu oxidu dusnatého (NO) prostredníctvom inhibície iNOS (z angl. inducible nitric oxide synthase) génu, ktorý je pod kontrolou NF- κ B. Inhibičný účinok andalusolu na NF- κ B bol zaznamenaný od koncentrácie 50 μ M prostredníctvom testu EMSA (z angl. electrophoretic mobility shift assay) (de las Heras a kol., 1999) a výraznejší účinok bol dosiahnutý v prípade, ak boli bunky stimulované lipopolysacharidom (LPS) po dobu 1 hod. Podobné inhibičné vlastnosti na NF- κ B boli dosiahnuté aj v prípade kaurénov, ďalších členov rodiny diterpenoidov pri testoch na rovnakej bunkovej línii J774 (Castrillo a kol., 2001). Kaurénové diterpenoidy pôsobia prostredníctvom znižovania aktivity IKK, konkrétne IKK β , kedy bola pri koncentrácii 25 μ M danej látky dosiahnutá 70 – 80 % inhibícia. V prípade alternatívnej dráhy aktivácie NF- κ B sa zistilo, že kaurény pôsobia ako NIK inhibítory a interferujú fosforyláciu IKK.

Neskôr boli ako inhibítory NF- κ B identifikované aj ďalšie látky štruktúrne príbuzné diterpenoidom, patriace do rodiny kaurénových diterpenoidov (kamebanín, kamebacetal A, kamebakaurin, excisanín A a hypoestoxid) izolovaných z rastliny *Isodon japonicus* (Lamiaceae), a to už pri koncentráciách 13,3 μ M. Zistilo sa, že tieto látky inhibujú produkciu NO a aktiváciu NF- κ B v bunkách stimulovaných LPS. Produkcia NO bola výrazne potlačená už pri nízkych IC₅₀ hodnotách (z angl. 50 % inhibitory concentration) (0,06 μ M; 0,58 μ M; 0,15 μ M a 0,35 μ M). Najvyššia inhibičná aktivita bola pozorovaná v prípade excisanínu, ktorý znížil rast buniek o < 50 %, a tým aj produkciu NO. Hypoestoxid izolovaný z rastliny *Hypoestes rosea* (Acanthaceae) s výraznými protizápalovými účinkami špecificky inhibuje aktivitu IKK komplexu (Ojo-Amaize a kol., 2001). Navyše, v bunkovej línii ľudských nádorových epitelových buniek HeLa stimulovaných TNF- α , hypoestoxid vykazoval významnú inhibičnú aktivitu na NF- κ B pri koncentráciách 50 – 100 μ M, pričom IC₅₀ hodnota dosiahla 11 μ M. Tieto koncentrácie účinnej látky však neboli dostatočné na

inaktiváciu niektorých iných transkripčných faktorov, ako AP-1 (z angl. activator protein 1) a SP-1 (z angl. specificity protein 1) (Black a kol., 2001). Hypoestoxid inhiboval aj produkciu prozápalových cytokínov (IL-1b, TNF- α , IL-6) pri koncentrácii 10 μ M v mononukleárných bunkách periférnej krvi stimulovaných LPS. Potlačená bola aj produkcia NO v ľudských artikulárnych chondrocytoch stimulovaných interleukínmi IL-1b a IL-17 pri koncentráciách 5, 10 a 50 μ M.

Ďalšou skupinou prírodných látok s inhibičnými účinkami na NF- κ B sú seskviterpénové laktóny. Inhibičné vlastnosti týchto látok však nezávisia len od použitej koncentrácie danej látky, ale vychádzajú najmä zo štruktúry molekúl. Inhibičný účinok je vyšší v prípade, ak danú látku tvoria laktónové kruhy obsahujúce konjugované exometylénové skupiny (α -metylény- γ -laktón) a nenasýtené konjugované esterové skupiny (Rüngeler a kol., 1999). Prítomnosť týchto skupín v seskviterpénových laktónoch výrazne zosilnila inhibíciu produkcie NO závislej na iNOS (Han a kol., 2001). Príkladom takejto látky je partenolid izolovaný z rastliny *Tanacetum parthenium* (Asteraceae), ktorý potláčal aktivitu NF- κ B v HeLa bunkách, a to už od koncentrácie 5 až 10 μ M. Partenolid zabránil degradácii inhibičných proteínov I κ B α , I κ B β tak, že ovplyvnil aktivitu IKK komplexu prostredníctvom modifikácie cysteínu 179 (Kwok a kol., 2001). Navyše bolo dokázané, že partenolid významne znižuje chemorezistenciu buniek karcinómu prsníka po podaní paklitaxelu. V nádorových bunkách prsníka, ktoré aktivujú antiapoptické gény dochádza k nadmernej expresii NF- κ B, a z toho dôvodu je inhibícia dôležitá najmä pre zvyšovanie citlivosti na chemoterapeutiká (Patel a kol., 2000).

Významné účinky preukázali aj dichlórmetánové extrakty izolované zo stromu *Acacia victoriae* patriace do skupiny triterpénových saponínov, nazývaných avicíny. Zložka extraktov označených FO35, ako aj avicín D a G sa ukázali ako selektívne indukujúce apoptózu a znižujúce proliferáciu nádorových Jurkat T buniek a buniek rakoviny prsníka (Mujoo a kol., 2001). Avicín G navyše inhibuje aktiváciu NF- κ B v Jurkat T bunkách indukovaných pomocou TNF- α

až o 90 % do 4 hodín po podaní 1 μM (2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Haridas a kol., 2001). Avicín G tiež špecificky potláča translokáciu NF- κ B (podjednotka p65) do jadra, a tým aj väzbu tohto transkripčného faktora na molekulu DNA. Aktivita avicínu G bola dokázaná aj pri inhibícii indukcie iNOS a COX-2 v LPS aktivovaných RAW264.7 makrofágoch. Avicíny majú potenciál pri použití v terapii nádorových ochorení z dôvodu účinnej indukcie cielenej apoptózy v malígnych bunkách (Croce, 2001).

Potenciálny inhibítor NF- κ B v makrofágoch je aj triterpenoid, pristimerín (Drich a kol., 1997). Táto látka účinne potlačila indukciu iNOS, a to už pri IC_{50} hodnotách 0,2 – 0,3 μM v LPS stimulovaných RAW264.7 makrofágoch a pri koncentrácii 0,5 μM pristimerín potláčal aj aktiváciu NF- κ B. Pri použití dvakrát až trikrát vyšších koncentrácií (1 μM) pristimerínu bol zaznamenaný 37 % cytotoxický účinok pri hodnotení MTT testom a 20 % pri použití sulforodamínu B. Vysoká miera cytotoxicity bola potvrdená aj pri hodnotení účinkov na V-70, KB a P388 bunkových líniiach, a to už pri koncentráciách IC_{50} 0,25; 0,5 a 0,1 μM (Ankli a kol., 2000). Syntetický pripravený triterpenoid vykazoval inhibičné vlastnosti na aktiváciu iNOS, COX-2 a NF- κ B (Suh a kol., 1998; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26683203/>).

Významným inhibítorom NF- κ B je kardenolid, glykozid oleandrín izolovaný z *Nerium oleander* (Apocynaceae). Vysoká miera inhibície aktivácie NF- κ B v bunkovej línii U937 bola zaznamenaná pri koncentrácii 1,7 μM (90 %) a podobné výsledky boli dosiahnuté aj pri testovaní na rôznych ľudských bunkových líniiach (HeLa, CaOV3 a Jurkat), ako aj myšiacích L-929 fibroblastoch. Väčšina prírodných látok potláčajúcich aktivitu NF- κ B pôsobí aj na transkripčný faktor AP-1, čo bolo potvrdené aj v prípade testovania účinkov oleandrínu na bunkách U937 stimulovaných LPS, PMA a TNF- α . Výsledky poukazujú na nešpecifický inhibičný účinok na kaskádu NF- κ B a naznačujú, že oleandrín môže pôsobiť aj ako inhibítor kináz (Manna a kol., 2000).

Fenolické látky

Fenolické látky zahŕňajú širokú škálu zlúčenín s protizápalovým účinkom sprostredkovaným inhibíciou NF- κ B alebo iNOS v rôznych typoch buniek (Surh a kol., 2001). Navyše, fenolické látky majú aj významné antioxidantné vlastnosti, a preto sú viaceré zlúčeniny definované ako nešpecifické inhibítory NF- κ B. Príkladom je kvercetín a resveratrol, ktoré pôsobia prostredníctvom primárnej redukcie reaktívnych foriem kyslíka (Manna a kol., 2000a). Niektoré fenolické látky môžu tento transkripčný faktor nielen inhibovať, ale aj aktivovať.

Polyfenolické látky, deriváty teaflavínu a epigalokatechín-3-galát (EGCG) izolované z čajovníka *Thea sinensis* (Theaceae) významne potláčali aktiváciu NF- κ B v RAW 267.4 bunkách stimulovaných LPS pri koncentrácii 30 μM (Pan a kol., 2000b); v dôsledku čoho bola zaznamenaná aj znížená produkcia NO a iNOS proteínu. Ako inhibítor expresie IKK α v RAW246.7 bunkách bol potvrdený aj derivát teaflavínu – teaflavín-3,3'-digalát pri rovnakej koncentrácii 30 μM . EGCG potláčal aktiváciu NF- κ B aj v zdravých ľudských epidermálnych keratinocytoch (80 μM) a v ľudských epidermálnych bunkách karcinómu A431 (20 μM) (Ahmad a kol., 2000).

Čínska bylina *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) obsahuje množstvo látok štruktúrne podobných fenolom, ktoré inhibujú produkciu NO a aktiváciu NF- κ B. Príkladom je wogonín, metylový flavón, ale aj baikalín a baikaleín, ktoré značne redukujú produkciu NO v makrofágoch RAW264.7 stimulovaných LPS už pri nízkych IC_{50} hodnotách (9,5; 15 a 19 μM) (Chen a kol., 2001). Zistilo sa, že táto inhibícia bola sprostredkovaná reguláciou expresie iNOS génu a rovnako aj COX-2. Podobný účinok týchto látok bol pozorovaný aj na stimulované C6 gliové bunky potkana (Kim a kol., 2001).

Niektoré prírodné látky môžu vykazovať aj značný toxický účinok na bunky organizmu. Antrachinón emodín mal podobné inhibičné vlastnosti ako predchádzajúce fenolické látky, avšak pri podaní vyššej dávky – 74 μM vykazoval až 30 % cytotoxicitu.

Silným inhibítorom NF- κ B, ktorý je indukovaný

TNF- α v rôznych typoch buniek, vrátane U-937 bunkovej línie, Jurkat, HeLa a H4 je resveratrol (Manna a kol., 2000). Široké spektrum buniek, na ktoré môže resveratrol vplývať naznačuje, že táto látka má značne nešpecifické účinky. Zistilo sa, že resveratrol má supresívny účinok aj na transkripčný faktor Ap-1 aktivovaný TNF- α , ako aj na c-Jun kinázy a MAPK (z angl. mitogen activated protein kinase) kinázovú dráhu v U-937 bunkách. Špecifické cieľové miesta tejto látky boli nájdené len v kaskáde indukovanej TNF- α , ktorá zabezpečuje presun podjednotky p-65 NF- κ B do jadra a je nezávislá od fosforylácie, prípadne degradácie I κ B a väzby NF- κ B na molekulu DNA.

Medicínsky významná bylina *Hypericum perforatum* (Hypericaceae) je používaná už celé storočia pri liečbe miernych depresívnych porúch. Jednou z hlavných účinných látok tejto rastliny je hypericín, ktorý pôsobí ako silný neantioxidačný inhibítor NF- κ B. Zistilo sa, že hypericín potláča aktivitu NF- κ B v HeLa (1,98 μ M) a TC-10 (3,96 μ M) bunkách po stimulácii TNF- α , zároveň však indukcia NF- κ B v HeLa bunkách nebola ovplyvnená, čo preukázalo, že hypericín nevychytáva voľné radikály. Hypericín tiež účinkuje aj na kinázovú dráhu transkripčného faktora, najmä na proteínkinázu C, ktorá sa podieľa na indukcii NF- κ B (Lallena a kol., 1999). Táto látka bola aktívna aj pri potlačení expresie IL-6 indukovaného TNF- α , čím bolo dokázané, že hypericín je schopný zabrániť indukovanej expresii zápalových génov, ktoré sú cieľovými sekvenciami pre transkripčný faktor NF- κ B.

Kurkumín izolovaný z rastliny *Curcuma longa* (Zingiberaceae) je študovaný najmä z dôvodu jeho protinádorových účinkov. Významné účinky boli pozorované aj pri inhibícii iNOS na modeli myšacích buniek *ex vivo* a na myšacích makrofágoch RAW364.7 prostredníctvom supresie NF- κ B. Pri oboch štúdiách stačilo 10 μ M tejto účinnej látky na inhibíciu iNOS v stimulovaných bunkách. Navyše, kurkumín v bunkách pôsobil aj na IKK komplex, kedy došlo k pozastaveniu jeho fosforylácie. Kurkumín potlačil aj aktiváciu NF- κ B a AP-1 po stimulácii IL-1 a TNF- α v bunkách kostnej drene (Xu et al., 1998). Nešpecifický inhibičný účinok kurkumínu na transkripčný

faktor NF- κ B bol pozorovaný na bunkách stimulovaných H₂O₂. Aktivita týchto buniek tiež preukázala, že kurkumín je v porovnaní s hypericínom schopný vychytávať voľné radikály. Navyše kurkumín môže pôsobiť proapopticky v bunkách rakoviny prostaty, a to prostredníctvom aktivácie NF- κ B a inhibície TNF- α (Mukhopadhyay a kol., 2001).

Významnými fenolickými látkami sú aj sylimarínové flavonolignanov. Oxidačnou reakciou flavonoidov (taxifolín) a fenyylpropanoidov (koniferil alkohol) vzniká sylimarínový komplex, extrakt zo semien *Sylibum marianum* (Asteraceae), ktorý obsahuje 70 – 80 % flavonolignanov. K najlepšie preštudovaným látkam patrí silybín (silibinin), izosilibinín, silydianín a silychristín. Novšie identifikované deriváty silymarínu ako dehydrosilybín, silandrín, silymonín, silyhermín majú silnejšiu antioxidačnú a cytoprotektívnu aktivitu (Borecký a kol., 2010). Na základe výsledkov experimentálnych štúdií boli popísané ich antioxidačné, protizápalové, imunomodulačné a antifibrotické vlastnosti, ako aj ich komplexné metabolické účinky a protinádorové vlastnosti (Ulbricht a Wendy, 2010). Silymarín blokuje aktiváciu NF- κ B prostredníctvom inhibície degradácie I κ B, čím následne zabráni presunu NF- κ B do jadra, a tým aj génovej expresii pri odpovedi na zápalové reakcie (Lin a Karin, 2007). Kang a kol. (2004) zistili, že silymarín (6,25; 12,5; 25; 50 ng.ml⁻¹) potlačil produkciu IL-1 indukovanú LPS (200 ng.ml⁻¹), produkciu prostaglandínu E a expresiu COX-2 v peritoneálnych makrofágoch myši prostredníctvom inhibície transkripčného faktora NF- κ B. Silymarín blokuje aj aktiváciu NF- κ B indukovanú forbolesterom, LPS, kyselinou okadaovou a ceramidom. Tieto účinky sú špecifické, a preto nebol potvrdený žiadny vplyv na iné transkripčné faktory, ako napr. AP-1. Wang a kol. (2002) sledovali neuroprotektívny účinok silymarínu proti neurotoxícite na mezencefalických kultúrach neurónov indukovaných LPS. Zápalové reakcie v centrálnom nervovom systéme prispievajú k neurodegeneratívnym chorobám, ako Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a skleróza multiplex. Vo svojej štúdii zistili, že silymarín inhibuje tvorbu mediátorov zápalu, ako

je TNF- α a NO, a tým znižuje poškodenie dopami-nergnych neurónov stimulovaných LPS. Navyše silymarín znížil aj produkciu iNOS, tvorbu superoxidu a negatívne ovplyvnil aktiváciu NF- κ B, čo naznačuje, že inhibičné účinky tejto prírodnej látky na aktiváciu mikroglií môžu byť sprostredkované potlačením aktivácie NF- κ B dráh (Wang a kol., 2002). Niekoľko ďalších štúdií ďalej ukázalo, že silymarín inhibuje dráhu ERK-1/2 (z angl. extracellular signal-regulated kinase 1/2), ktorá je súčasťou indukcie transkripcie iNOS sprostredkovanej NF- κ B. Silymarín inhibuje NF- κ B, a tým aj zápalové procesy a oxidačný stres (Kim a kol., 2015).

Protinádorové a chemoprotektívne účinky silymarínu a silibínu boli potvrdené na viacerých typoch nádorov v *in vitro* aj *in vivo* podmienkach. Tieto štúdie naznačujú, že silymarín potláča aktiváciu NF- κ B indukovanú TNF- α v časovo a koncentračne závislých dávkach prostredníctvom fosforylácie a degradácie I κ B. Súčasne blokuje translokáciu podjednotky p65 do jadra bez vplyvu na schopnosť väzby na molekulu DNA. Silymarín je aj významným inhibítorom expresie TNF- α v rôznych typoch buniek a tkanív (He a kol., 2004). Silymarín tiež inhibuje expresiu TNF- α indukovanú LPS alebo mykotoxínmi, čo naznačuje jeho hepatoprotektívne účinky (He a kol., 1996).

Hepatoprotektívne účinky silymarínu boli študované pri chronických ochoreniach pečene, akým je chronická hepatitída C a zápal pečene. Poškodenie je spôsobené najmä bunkami imunitného systému a produkciou zápalových cytokínov a chemokínov, ktoré sú indukované transkripčným faktorom NF- κ B. Na modeli hepatitídy C v konkanavalínom A stimulovaných T bunkách myši bolo dokázané, že liečba silymarínom (25 mg.kg⁻¹) významne potlačila hladiny intrahepatálnych mRNA pre IL-2, IL-4, IFN- γ (z angl. interferon gamma), TNF- α a sekréciu rovnakých cytokínov v slezine. Rovnako došlo k zvýšeniu intrahepatálnej hladiny IL-10 v splenocytoch a k indukcii apoptózy hepatocytov (Schumann a kol., 2003).

ZÁVER

Transkripčný faktor NF- κ B je dobre preštudovaný proteín zodpovedný za reguláciu komplexných javov s kľúčovou úlohou pri kontrole bunkovej signalizácie za určitých fyziologických a patologických podmienok. Navyše, NF- κ B riadi expresiu génov kódujúcich prozápalové cytokíny, ako IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , chemokíny najmä IL-8, MIP-1, RANTES, ale aj adhezívne molekuly (napr. ELAM, ICAM-1, VCAM-1), mediátory zápalu (napr. COX-2), rastové faktory a imunitné receptory, z ktorých všetky majú významnú úlohu pri kontrole väčšiny zápalových procesov. NF- κ B preto predstavuje významný terapeutický cieľ z hľadiska použitia liekov zameraných na liečbu mnohých zápalových ochorení, vrátane artritídy, astmy a autoimunitných ochorení, ktoré v súčasnosti patria k najčastejšie sa vyskytujúcim ochoreniam.

V posledných desaťročiach sa pozornosť zameriava najmä na identifikáciu zlúčenín, ktoré selektívne ovplyvňujú práve dráhu NF- κ B. Výsledky štúdií dokázali inhibičné účinky na tento transkripčný faktor u viacerých prírodných zlúčenín, najmä izoprenoidov a fenolických látok. Avšak farmakologické účinky potenciálnych prírodných látok je potrebné ďalej podrobne preštudovať, a to najmä z dôvodu pozorovaného širokospektrálneho pôsobenia extraktov. Dôležité sú aj následné *in vivo* štúdie, ktoré potvrdia zistené farmakologické vlastnosti skúmaných látok. Osobitnú výzvu predstavuje aj charakterizácia prírodných produktov, ktorá musí poskytnúť presné údaje o čistote zlúčenín získaných prostredníctvom vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie, nukleárnej magnetickej rezonancie a hmotnostnej spektrometrie.

POĎAKOVANIE

Štúdia bola realizovaná ako súčasť grantovej úlohy APVV-17-0410 riešenej na Parazitologickom ústave SAV, v. v. i. v Košiciach.

ZOZNAM LITERATÚRY

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S.: *Cellular and Molecular Immunology*. [s. l.]. Elsevier, 2010. 54 – 55.
- Abraham, E.: NF-kappa B activation. *Crit. Care Med.*, 2004, 28 (4 Suppl.), N100 – 100.
- Ahmad, N., Gupta, S., Mukhtar, H.: Green tea polyphenol pigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kB in cancer cells versus normal cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, 376, 338 – 346.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O.: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, 124, 783 – 801.
- Ankli, A., Heilmann, J., Heinrich, M., Sticher, O.: Cytotoxic cardenolides and antibacterial terpenoids from *Crossopetalum gaumeri*. *Phytochemistry*, 2000, 54, 531 – 537.
- Baeuerle, P. A.: The inducible transcription activator NF-KB: regulation by distinct protein subunits. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1991, 1072, 63 – 80.
- Baeuerle, P. A., Baltimore, D.: I Kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*, 1988, 242 (4878), 540 – 546.
- Beinke, S., Ley, S. C.: Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem. J.*, 2004, 382, 39 – 409.
- Black, A. R., Black, J. D., Azizkhan-Clieord, J.: Sp1 and Kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J. Cell Physiol.*, 2001, 188, 140 – 160.
- Bonizzi, G., Karin, M.: The two NF-kB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.*, 2004, 25, 280 – 288.
- Borecký, P., Bielík, J., Mrázová, L.: Postavenie silymarínu v súčasných liečebných stratégiách z klinického a farmakoekonomického pohľadu [The place of silymarin in current treatment strategies from a clinical and pharmacoeconomic point of view]. *Farmakoekonomika a lieková politika*, 2010, 6 (3), 1 – 12.
- Buc, M.: *Základná a klinická imunológia* [Basic and Clinical Immunology]. Bratislava: Veda, 2012. 104 s.
- Castrillo, A., De Las Heras, B., Hortelano, S., Rodríguez, B., Villars, A., Bosca, L.: Inhibition of the nuclear factor kB (NF-kB) pathway by tetracyclic kaurene diterpenoids in macrophages. Specific effects on Nf-Kb-inducing kinase activity and in the coordinate activation of Erk and p38 MAPK. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 15 854 – 15 860.
- Croce, C. M.: How can we prevent cancer? *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, USA 98, 10 986 – 10 988.
- D'Acquisto, F., Iuvone, T., Rombolà, L., Sautebin, L., Di Rosa, M., Carnuccio, R.: Involvement of NF-kB in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. *FEBS Lett.*, 1997, 418, 175 – 178.
- Dejardin, E., Droin, N. M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z. W., Karin, M., Ware, C. F., Green, D. R.: The lymphotoxin-β receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kB pathways. *Immunity*, 2002, 17, 525 – 535.
- Ghosh, S., Karin, M.: Missing pieces in the NF-kB puzzle. *Cell*, 2002, 109, S81 – S96.
- Haridas, V., Arntzen, C. J., Gutterman, J. U.: Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Aca-cia victoriae* (Bentham), inhibit activation of nuclear factor-kB by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001, 98, 11 557 – 11 562.
- Hayden, M. S., Ghosh, S.: Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.*, 2004, 18 (18), 2195 – 2224.
- He, Q., Kim, J., Sharma, R. P.: Silymarin protects against liver damage in BALB/c mice exposed to fumonisin B1 despite increasing accumulation of free sphingoid bases, *Toxicol. Sci.*, 2004, 80 (2), 335 – 342.
- Jimi, E., Ghosh, S.: Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone. *Immunol. Rev.*, 2005, 208, 80 – 87.
- Kang, J. S., Jeon, Y. J., Park, S. K., Yang, K. H., Kim, H. M.: Protection against lipopolysac-

charide-induced sepsis and inhibition of interleukin-1 β and prostaglandin E₂ synthesis by silymarin. *Biochem. Pharmacol.*, 2004, 67 (1), 175 – 181.

Karin, M. The beginning of the end: I κ B kinase (IKK) and NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 27 339 – 27 342.

Karin, M., Ben-Neriah, Y.: Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000, 18, 621 – 63.

Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B. Z., Leder, P.: The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF- κ B signal. *Immunity*, 1998, 8, 297 – 303.

Khongthong, P., Roseweir, A. K., Edwards, J.: The NF- κ B pathway and endocrine therapy resistance in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer.*, 2019, 26 (6), R369 – R380.

Kim, E. J., Lee, M. Y., Jeon, Y. J.: Silymarin inhibits morphological changes in LPS stimulated macrophages by blocking NF- κ B pathway. *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, 2015, 19 (3), 211 – 218.

Kim, H., Kim, Y. S., Kim, S. Y., Suk, K.: The plant flavonoid wogonin suppresses death of activated C6 rat glial cells by inhibiting nitric oxide production. *Neurosci. Lett.*, 2001, 309, 67 – 71.

Kopp, E., Ghosh, S.: Inhibition of NF- κ B by sodium-salicylate and aspirin. *Science*, 1994, 265, 956 – 959.

Kwok, B. H. B., Koh, B., Ndubuisi, M. I., Elofsson, M., Crews, C. M.: The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits I κ B kinase. *Chem. Biol.*, 2001, 8, 759 – 766.

Lallena, M.-J., Diaz-Meco, M. T., Bren, G., Payá, C. V., Moscat, J.: Activation of I κ B kinase by protein kinase C isoforms. *Mol. Cell Biol.*, 1999, 19, 2180 – 2188.

Lee, S. H., Hannink, M.: Characterization of the nuclear import and export functions of I κ B- ϵ . *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 22.

Lin, W. W., Karin, M. A.: Cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.*, 2007, 117 (5), 1175 – 1183.

Manna, S. K., Mukhopadhyay, A., Aggarwal, B. B.: Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J. Immunol.*, 2000, 164, 6509 – 6519.

May, M. J., Ghosh, S.: Rel/NF- κ B and I κ B proteins: an overview. *Semin. Cancer Biol.*, 1997, 8, 63 – 73.

Mujoo, K., Haridas, V., Hoffmann, J. J., Wächter, G. A., Hutter, L. K., Lu, Y., Blake, M. E., Jayatilake, G. S., Bailey, D., Mills, G. B., Gutterman, J. U.: Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth.) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis. *Cancer Res.*, 2001, 61, 5486 – 5490.

Mukhopadhyay, A., Bueso-Ramos, C., Chatterjee, D., Pantazis, P., Aggarwal, B. B.: Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene*, 2001, 20, 7597 – 7609.

Nakamura, H., Aoki, K., Masuda, W., Alles, N., Nagano, K., Fukushima, H., Osawa, K., Yasuda, H., Nakamura, I., Mikuni-Takagaki, Y., Ohya, K., Maki, K., Jimi, E.: Disruption of NF- κ B1 prevents bone loss caused by mechanical unloading. *J. Bone Miner. Res.*, 2013, 28 (6), 1457 – 1467.

Navarro, A., De Las Heras, B., Villar, A. M.: Andalusol, a diterpenoid with anti-inflammatory activity from *Siderites foetens* Clemen. *Z. Naturforsch. Sect. C. J. Biosci.*, 1997, 52, 844 – 849.

Ojo-Amaize, E. A., Kapahi, P., Kakkanaiyah, V. N., Takahashi, T., Shalom-Barak, T., Cottam, H. B., Adesomoju, A. A., Nchekwube, E. J., Oyemade, O. A., Karin, M., Okogun, J. I.: Hypoestoxide, a novel anti-inflammatory natural diterpene, inhibits the activity of I κ B kinase. *Cell Immunol.*, 2001, 209, 149 – 157.

Patel, N. M., Nozaki, S., Shortle, N. H., Bhat-Nakshatri, P., Newton, T. R., Rice, S., Gelfanov, V., Boswell, S. H., Goulet, R. J., Sledge, G. W., Nakshatri, H.: Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF- κ B is enhanced by I κ B α superrepressor and parthenolide. *Oncogene*, 2000,

19, 4159 – 4169.

Qing, G., Qu, Z., Xiao, G.: Regulation of NF- κ B2 p100 processing by its cis-acting domain. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 18 – 27.

Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., Santoro, M. G.: Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of the I κ B kinase. *Nature*, 2000, 403, 103 – 108.

Rothwarf, D. M., Karin, M.: The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci. STKE*, 1999 (5), RE1.

Rüngeler, P., Castro, V., Mora, G., Gören, N., Vichnewski, W., Pahl, H. L., Merfort, I., Schmidt, T. J.: Inhibition of transcription factor NF-kB by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. *Bioorg. Med. Chem.*, 1999, 7, 2343 – 2352.

Sen, R., Baltimore, D.: Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 1986, 46, 705 – 716.

Sheppard, K. A., Rose, D. W., Haque, Z. K., Kurokawa, R., Mcinerney, E., Westin, S., Thanos, D., Rosenfeld, M. G., Glass, C. K., Collins, T.: Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple co-activators. *Mol. Cell Biol.*, 1999, 19, 6367 – 6378.

Schumann, J., Prockl, J., Kierner, A. K., Vollmar, A. M., Bang, R., Tiegs, G.: Silibinin protects mice from T cell-dependent liver injury. *J. Hepatol.*, 2003, 39 (3), 333 – 340.

Suh, N., Honda, T., Finlay, H. J., Barchowsky, A., Williams, C., Benoit, N. E., Xie, Q.-W., Nathan, C., Gribble, G. W., Sporn, M. B.: Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res.*, 1998, 58, 717 – 723.

Sun, Z., Andersson, R.: NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock*, 2002, 18 (2), 99 – 106.

Surh, Y.-J., Chun, K.-S., Cha, H.-H., Han, S. S., Keum, Y.-S., Park, K.-K., Lee, S. S.: Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: downregulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat Res.*, 2001, 480 – 481, 243 – 268.

Tam, W. F., Sen, R.: I κ B family members function by different mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 7701 – 7704.

Tilstra, J. S., Clauson, C. L., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D.: NF- κ B in aging and disease. *Aging Dis.*, 2011, 2 (6), 449 – 65.

Taniguchi, K., Karin, M.: NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat. Rev. Immunol.*, 2018, 18, 309–324. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.142>. Accessed June 22, 2022.

Ulbricht, C. E., Wendy, C.: Phytochemicals in the oncology setting. *Curr. Treat. Options Oncol.*, 2010, 11 (3 – 4), 95 – 106.

Wang, M. J., Lin, W. W., Chen, H. L., Chang, Y. H., Ou, H. C., Kuo, J. S., Hong, J.-S., Jeng, K.-Ch. G.: Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *Eur. J. Neurosci.*, 2002, 16 (11), 2103 – 2112.

Xu, Y. X., Pindolia, K. R., Janakiraman, N., Chapman, R. A., Gautam, S. C.: Curcumin inhibits IL-1 α and TNF α induction of AP-1 and NF- κ B DNA-binding activity in bone marrow stromal cells. *Hematopathol. Mol. Hematol.*, 1998, 11, 49 – 62.

Yamamoto, Y., Gaynor, R. B.: Therapeutic potential of inhibition of the NF kappa B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.*, 2001, 107, 135 –142.

Yamamoto, Y., Gaynor, R. B.: IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem. Sci.*, 2004, 29, 72 – 79.

Zhang, G., Ghosh, S.: Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J. Clin. Invest.*, 2001, 107, 13 – 19.



STANOVENIE TOXICITY ANTIDEPRESÍV

DETERMINATION OF TOXICITY OF ANTIDEPRESSANTS

Reňaková, Ivana; Falis, Marcel

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

marcel.falis@uvlf.sk

ABSTRAKT

Antidepresíva patria medzi liečivá pôsobiace na centrálny nervový systém. Požívajú sa na liečbu depresie, ale aj iných psychických porúch, ako je napríklad panická porucha, porucha pozornosti, obsedantno-kompulzívna porucha a rôzne ďalšie poruchy. Podľa rôznych mechanizmov účinku sa rozdeľujú do viacerých skupín, my sme sa konkrétne zamerali na tricyklické antidepresíva, kam patria liečivá imipramín, klomipramín, amitriptylín a nortriptylín. Cieľom štúdie bolo stanoviť letálne koncentrácie LC_{50} u vybraných druhov liečiv pomocou alternatívneho biotestu II. generácie, ktorý trval 10 dní. Ako modelový organizmus sme použili druh *Artemia franciscana*. Artémie sme vystavili účinkom liečiv. V pravidelných 24-hodinových intervaloch sme zaznamenávali ich úhyn. LC_{50} sme získali pomocou dvojďávkovej interpoláčnej metódy podľa Rotha a pomocou programu ToxRat. Hodnota LC_{50} imipramínu po 24 hodi-

nách bola 3,561 mg.l⁻¹ (spodná hodnota intervalu spoľahlivosti pre LC_{50} bola 3,51 mg.l⁻¹ a horná hodnota intervalu spoľahlivosti pre LC_{50} bola 3,61 mg.l⁻¹). Pri zvyšných liečivách sme nemohli určiť presné hodnoty LC_{50} , nakoľko hodnoty LC_{50} boli vyššie ako nami testované najvyššie koncentrácie. Letálna koncentrácia klomipramínu bola $LC_{50} > 0,01$ mg.l⁻¹, amitriptylínu $LC_{50} > 0,1$ mg.l⁻¹ a nortriptylínu $LC_{50} > 1$ mg.l⁻¹.

Kľúčové slová: amitriptylín; *Artemia franciscana*; imipramín; klomipramín; LC_{50} ; nortriptylín

ABSTRACT

The antidepressants belong to the group of drugs acting on central nervous system. They are used to treat depression but also other mental disorders such as panic disorder, attention deficit disorder, obsessive-compulsive disorder and various other disorders. According to different mechanisms of

action, they are divided into several groups; we specifically focused on tricyclic antidepressants, which included the drugs imipramine, clomipramine, amitriptyline and nortriptyline. The aim of our study was to determine the lethal concentrations LC_{50} in selected types of drugs using an alternative bioassay II. generation, which lasted for 10 days. We used the *Artemia franciscana* species as a model organism. We exposed artemia to the effects of drugs. We recorded their deaths at regular 24-hour intervals. LC_{50} was obtained using the two-dose interpolation method according to Roth and using the ToxRat program. The LC_{50} of imipramine after 24 hours was 3.561 mg.l⁻¹ (the lower confidence interval for LC_{50} was 3.51 mg.l⁻¹ and upper confidence interval for LC_{50} was 3.61 mg.l⁻¹). For the remaining drugs, we could not determine the exact LC_{50} values, because the LC_{50} values were higher than the highest concentrations we tested. Clomipramine had the $LC_{50} > 0.01$ mg.l⁻¹, amitriptyline had the $LC_{50} > 0.1$ mg.l⁻¹, and nortriptyline had the $LC_{50} > 1$ mg.l⁻¹.

Key words: amitriptyline; *Artemia franciscana*; imipramine; clomipramine; LC_{50} ; nortriptyline

ÚVOD

Povrchové vody sú znečisťované rezíduami farmaceutických látok (Minguez a kol., 2014). Rastúcu celosvetovú kontamináciu týmito drogami možno sledovať prostredníctvom ich zvyšujúcej sa prítomnosti v kolobe vody v mestách. Ich výskyt bol zistený aj v mimomestských vodách, ako sú rieky a oceány. Niektoré endemické vodné živočíchy ako sú určité ryby a mäkkýše majú vo svojich tkanivách bioakumulované rôzne antidepresíva (Castillo-Zacarías a kol., 2021). Antidepresíva predstavujú dôležitú skupinu liekov spojených s liečením klinickej depresie a iných duševných porúch u ľudí. Sú klasifikované na základe spôsobu, akým interferujú so serotonínovým a noradrenalinovým neurotransmitterom. Sú definované dve základné triedy: selektívne inhibítory

Tab. 1: Zloženie morskej vody

Látka	Hmotnosť (g.l ⁻¹)
NaCl	23,900
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10,830
CaCl ₂ · 6H ₂ O	2,250
KCl	0,680
Na ₂ SO ₄ · 10 H ₂ O	9,060
NaHCO ₃	0,200
SrCl ₂ · 6H ₂ O	0,040
KBr	0,099
H ₃ BO ₃	0,027

spätného vychytávania serotonínu (SSRI) a inhibítory spätného vychytávania serotonínu a noradrenalínu (SNRI). Väčšina štúdií o ekotoxikologických účinkoch antidepresív je zameraná na SSRI a len málo z nich skúmalo vodnú toxicitu iných antidepresív. Okrem toho nie je dostatočne objasnený spôsob ich pôsobenia na necieľové vodné organizmy (Minguez a kol., 2014). Cieľom tejto štúdie bolo bližšie objasniť toxicitu tricyklických antidepresív a stanoviť ich letálne koncentrácie.

MATERIÁL A METÓDY

Toxicitu antidepresív sme skúmali pomocou alternatívneho biotestu II. generácie a následne sme zistili hodnoty ich letálnych koncentrácií. Hodnoty letálnych koncentrácií sme stanovili pomocou dvoj-
dávkovej interpolačnej metódy podľa Rotha (Roth a kol., 1962) a pomocou programu ToxRat (ToxRat Professional Version 3.3.0). Ako modelový organizmus sme použili druh *Artemia franciscana*, žiabronôžky z čeľade Artemiidae. Tie sme vystavili účinkom liečiv s rôznou koncentráciou a ich úhyn sme zaznamenávali v pravidelných časových intervaloch do tabuliek, následne sme zostrojili grafy a štatisticky vyhodnotili naše výsledky.

Príprava morskej vody a liahnutie

Artemia franciscana je druh, ktorý sa vyskytuje výlučne v slaných vodách a na jej prežitie je dôležitá

Tab. 2: Koncentrácie roztokov imipramínu

Označenie Petriho misky	Koncentrácia [mg.l ⁻¹]
I1	5
I2	2,5
I3	1,25
I4	0,625
I5	0,3125

Tab. 3: Koncentrácie roztokov klomipramínu

Označenie Petriho misky	Koncentrácia [mg.l ⁻¹]
O1	0,01
O2	0,005
O3	0,0025
O4	0,00125
O5	0,000625

Tab. 4: Koncentrácie roztokov amitriptylínu

Označenie Petriho misky	Koncentrácia [mg.l ⁻¹]
A1	0,1
A2	0,05
A3	0,025
A4	0,0125
A5	0,00625

Tab. 5: Koncentrácie roztokov nortriptylínu

Označenie Petriho misky	Koncentrácia [mg.l ⁻¹]
N1	1
N2	0,5
N3	0,25
N4	0,125
N5	0,0625

Tab. 6: Hodnoty k_n Deanovho-Dixonovho testu

A	2	3	4	5	6	7
k	0,886	0,591	0,486	0,430	0,395	0,370

Tab. 7: Signifikantné rozdiely preukázateľnosti

50 jedincov v skupine	
Skupina s minimálnym efektom (%)	Skupina s maximálnym efektom (%)
0	12
4	16
10	26
20	38
30	50
40	60
50	70
60	80
70	88
80	94
90	–

Tab. 8: Letalita imipramínu

IMIPRAMÍN		ČAS (hod)							
		24	48	72	96	120	144	168	192
5 mg.l ⁻¹	x	98*	98*	98*	98*	100*	100*	100*	100*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	4,3	4,3	4,3	4,3	0	0	0	0
2,5 mg.l ⁻¹	x	0	0	60*	84*	96*	100*	100*	100*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	30,1	17,2	4,3	0	0	0
1,25 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	22*	36*	62*	90*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	8,6	12,9	8,6	12,9
0,625 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	14	18	34*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	4,3	8,6	8,6
0,3125 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	0	10	12
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	0	0	4,3
K	x	2	2	2	2	4	8	12	14
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	8,6	4,3	4,3

K – kontrolná skupina n – počet replikátov
x – letalita (%) s – smerodajná odchýlka

morská voda. Tá sa používa aj na liahnutie a jej zloženie je zobrazené v tabuľke 1 (Sklenář a kol., 2006).

Jednotlivé suroviny sme navážili a doplnili destilovanou vodou do výsledného objemu 1000 ml. Takto pripravená morská voda mala hodnotu pH 8,35. Použili sme vákuovo balené cysty „MAXIMA brine shrimp eggs” (Sanders, Utah, USA). Ich liahnivosť je dosiahnutá za 18 hodín pri teplote 27 – 30 °C, slanosti 1,2 – 3 ‰ a pri pH 7,5 – 8,5. My sme pracovali pri teplote 25 °C, čím sme predĺžili liahnutie na 24 hodín. Cysty sme nasypali do sklenenej nádoby, doplnili morskou vodou a sklenenú nádobu sme uložili do vodného kúpeľa. Pre dokonalú 100 % liahnivosť je dôležitý neustály pohyb vajíčok a dostatok kyslíka. To sme docielili pomocou vibračného membránového kompresoru. Takto pripravené cysty sme nechali liahnúť 24 hodín (Sklenář a kol., 2006).

Priebeh testu

Petriho misky sme dôkladne umyli s gázou v destilovanej vode, aby sa zabránilo rôznym nečistotám, nechali sme ich vysušiť a všetky misky sme označili, aby nedošlo k ich zámene. Ako prvé sme si pripravili roztoky s koncentraciami testovaných látok. Naše liečivá museli byť dobre rozpustné vo vode. Pripravili sme roztoky imipramínu, klomipramínu, amitriptylínu a nortriptylínu v rôznych koncentráciách. Tieto roztoky sme pripravili dvojkovým riedením, ktoré je uvedené v tabuľke 2. Predĺženie životnosti artémií sme dosiahli dodaním energie z potravy. Každý roztok obsahoval okrem liečiva a morskej vody aj glukózu. Ich koncentrácie a označenia sú znázornené v tabuľkách 2 – 5. Kontrolná vzorka obsahovala len morskú vodu a glukózu bez liečiva (Dvořák a kol., 2009).

Tab. 9: Letalita klomipramínu

KLOMIPRAMÍN		ČAS (hod)							
		24	48	72	96	120	144	168	192
0,01 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	2	4	14	18
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	4,3	4,3	8,6	4,3
0,005 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	2	4	10	16
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	4,3	4,3	0	4,3
0,0025 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	2	4	10
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	4,3	4,3	8,6
0,00125 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	0	6	8
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	0	4,3	4,3
0,000625 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	0	8	10
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	0	4,3	0
K	x	2	2	2	2	4	8	12	14
	n	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	8,6	4,3	4,3

K – kontrolná skupina n – počet replikátov
x – letalita (%) s – smerodajná odchýlka

Do Petriho misiek sme napipetovali 10 ml pripraveného roztoku a pomocou pipety sme pridali 10 nauplií. Pre každú koncentráciu sme použili 5 misiek, dokopy 50 kusov nauplií. Petriho misky sme prikryli viečkom a uložili ich do termostatu, ktorého teplota bola nastavená na 20 °C. Ich úhyn sme zaznamenávali do tabuliek v časových intervaloch 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 a 240 hodín. Je potrebné počítať aj s tým, že výnimočne sa mohol objaviť úhyn v kontrolných skupinách aj po 24 alebo 48 hodinách, ktorý môžeme vysvetliť traumatizáciou pri odchyte a prenášaní nauplií pipetou. Za uhynuté nauplie sme považovali tie, ktoré nevykazovali pohyb žiadnej časti tela po dobu 15 sekúnd ani po opakovanom krúživom pohybe Petriho misky. Odčítanie sme uskutočňovali pomocou lupy a mikroskopu.

Štatistické metódy

V každej skupine sa nachádzalo 5 jedincov, ktorí boli rozdelení do 5 samostatných misiek, pričom každá miska obsahovala 10 jedincov. Počet misiek v rámci jednej použitej koncentrácie je v tabuľkách označený symbolom **n**. Aby sa zabránilo výskytu hrubých chýb, použili sme Deanov-Dixonov test pri pravdepodobnosti $\alpha = 0,05$. Ako stredná hodnota úhynu v jednotlivých koncentráciách bol vypočítaný aritmetický priemer z 5 testovaných skupín. Ako miera variácie bola stanovená smerodajná odchýlka jedného merania podľa vzorca $s = R \cdot k_n$ pre rozsah súboru menší ako 8, kde **R** je variačné rozpätie ($R = x_{\max} - x_{\min}$) a **k_n** je koeficient, ktorého číselná hodnota je uvedená v tabuľke 6 (Dvořák a Šucman, 2006).

Z vypočítaných hodnôt sme následne pripravili tabuľky a trojrozmerné grafy, ktoré znázorňujú

Tab. 10: Letalita amitriptylínu

AMITRIPTYLÍN		ČAS (hod)								
		24	48	72	96	120	144	168	192	216
0,01 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	4	24*	24	42*	56*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	4,3	25,8	25,8	30,1	30,1
0,05 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	4	6	8	12	20
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	4,3	8,6	8,6	12,9	8,6
0,025 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	6	10	14	18	28
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	4,3	8,6	8,6	8,6	8,6
0,0125 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	4	12	18	24
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	4,3	4,3	8,6	8,6
0,00625 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	0	4	6	14
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	0	4,3	4,3	4,3
K	x	0	0	0	0	4	8	10	14	14
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	4,3	4,3	8,6	4,3	4,3

K – kontrolná skupina n – počet replikátov
 x – letalita (%) s – smerodajná odchýlka

závislosť letality *Artemia franciscana* na koncentrácií látky v roztoku a na čase. Vypočítané hodnoty sme porovnali s hodnotami v tabuľke 7, v ktorej sú signifikantné rozdiely preukázateľnosti. Hodnoty, ktoré predstavujú štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými koncentraciami a druhmi toxických látok sú vo výsledných tabuľkách označené * (Wayland a Hayes, 1991).

VÝSLEDKY

Výsledky štúdie sú zobrazené v tabuľkách 8 – 11 a grafoch 1 – 4. Pri imipramíne a klomipramíne sme do tabuliek neuviedli hodnoty letality po 216 hodinách, pretože v kontrolnej vzorke došlo k úhynu väčšiemu ako 20 % a test by tak nespĺňal kritérium validácie testu. Podobne aj pri amitriptylíne a nortripty-

líne sme neuviedli hodnoty letality po 240 hodinách, pretože v kontrolnej vzorke došlo k úhynu väčšiemu ako 20 % a test by tak nespĺňal kritérium validácie testu (Dvořák a kol., 2005).

LC₅₀ získané dvojdávkovou interpolačnou metódou

Výsledné hodnoty LC₅₀ sme získali dvojdávkovou interpolačnou metódou pomocou počítačového programu. Použili sme hodnoty letality v rozmedzí 20 – 50 % a 50 – 80 %. Okrem hodnôt LC₅₀ program stanovil aj rozmedzie intervalov spoľahlivosti. Pre porovnanie výsledkov sme použili aj program ToxRat. Pri klomipramíne, amitriptylíne a nortriptylíne sme nedosiahli úhyn väčší ako 50 %, preto sme nemohli použiť dvojdávkovú interpolačnú metódu a ani program ToxRat hodnoty LC₅₀ nevyhodnotil. Výsledky

Tab. 11: Letalita nortriptylínu

NORTRIPTYLÍN		ČAS (hod)								
		24	48	72	96	120	144	168	192	216
1 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	6	8	20*	28*	34*	42*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	8,6	8,6	0	12,9	12,9	8,6
0,5 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	4	4	12	18	32*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	4,3	4,3	8,6	12,9	4,3
0,25 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	0	14	18	26
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	0	4,3	8,6	8,6
0,125 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	6	10	16	24
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	4,3	0	4,3	4,3
0,0625 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	0	2	4	22
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	0	4,3	4,3	4,3
K	x	0	0	0	0	4	8	10	14	14
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	4,3	4,3	8,6	4,3	4,3

K – kontrolná skupina n – počet replikátov
x – letalita (%) s – smerodajná odchýlka

Tab. 12: Výsledky imipramínu vyhodnotené dvojďávkovou interpolačnou metódou

Čas (hod)	Nižšia koncentrácia (mg.l ⁻¹)	Vyššia koncentrácia (mg.l ⁻¹)	LC ₅₀ (mg.l ⁻¹)	Interval spoľahlivosti (mg.l ⁻¹)
24	2,5	5	3,561	(3,51 – 3,61)
48	2,5	5	3,561	(3,51 – 3,61)
72	1,25	2,5	2,227	(1,946 – 2,548)
96	1,25	2,5	1,888	(1,793 – 1,988)
120	1,25	2,5	1,624	(1,512 – 1,745)
144	1,25	2,5	1,454	(1,295 – 1,633)
168	0,625	1,25	1,034	(0,876 – 1,221)
192	0,625	1,25	0,76	(0,673 – 0,861)
216	0,625	1,25	0,657	(0,555 – 0,779)
240	0,325	0,625	0,478	(0,416 – 0,549)

Tab. 13: Výsledky imipramínu vyhodnotené programom ToxRat

Čas (hod)	*LC ₁₀ (mg.l ⁻¹)	**LC ₂₀ (mg.l ⁻¹)	LC ₅₀ (mg.l ⁻¹)
24	3,617	3,775	4,096
48	3,617	3,775	4,096
72	1,639	1,868	2,401
96	1,470	1,654	2,072
120	1,090	1,229	1,546
144	0,678	0,829	1,218
168	0,419	0,549	0,921
192	0,340	0,431	0,677
216	0,296	0,367	0,554

*LC₁₀ letálna koncentrácia pre 10 % testovaných zvierat

**LC₂₀ letálna koncentrácia pre 20 % testovaných zvierat

hodnôt LC₅₀ získané dvojdávkovou interpolačnou metódou sú znázornené v tabuľke 12.

LC₅₀ získané programom ToxRat

Výsledné hodnoty LC₅₀ získané programom ToxRat sú znázornené v tabuľke 13.

Pri klomipramíne, amitriptylíne a nortriptylíne sme neurčili presné hodnoty LC₅₀, pretože hodnoty LC₅₀ boli vyššie ako nami testované najvyššie koncentrácie. U klomipramínu je hodnota LC₅₀ > 0,01 mg.l⁻¹, u amitriptylínu je hodnota LC₅₀ > 0,1 mg.l⁻¹ a u nortriptylínu je hodnota LC₅₀ > 1 mg.l⁻¹. Vyššie koncentrácie liečiv sme nemohli použiť z dôvodu limitnej rozpustnosti.

DISKUSIA

Keďže antidepresíva patria celosvetovo k najčastejšie predpisovaným liekom, je potrebné sledovať ako ovplyvňujú naše prostredie, nakoľko väčšina z nich alebo ich metabolitov sa dostáva do životného prostredia rôznymi cestami, najčastejšie však stolicou a močom. Tieto liečivá nevplývajú len na životné prostredie, ale aj na drobné mikroorganizmy. Pomocou

alternatívneho biotestu II. generácie sme testovali 4 liečivá zo skupiny antidepresív ich vplyv na drobné organizmy, sledovali sme úhyn nauplií a stanovili sme letálne koncentrácie daných liečiv.

Pri imipramíne sa podľa EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines) hodnota LC₅₀ udáva vyššia ako 1 mg.l⁻¹ po 96 hodinách u rýb. V našom prípade, kde sme ako modelový organizmus použili druh *Artemia franciscana*, bola hodnota LC₅₀ po 96 hodinách 1,888 mg.l⁻¹ (spodná hodnota intervalu spoľahlivosti pre LC₅₀ bola 1,793 mg.l⁻¹ a horná hodnota intervalu spoľahlivosti pre LC₅₀ bola 1,988 mg.l⁻¹), čo sa približuje k doterajším zisteným štúdiám (EDQM, Imipramine). Podľa Caymanskej chemickej spoločnosti sa v karte bezpečnostných údajov imipramínu udáva hodnota LD₅₀ 305 mg.kg⁻¹, pri klomipramíne je letálna dávka 915 mg.kg⁻¹, pri amitriptylíne 240 mg.kg⁻¹ a pri nortriptylíne 405 mg.kg⁻¹ (Safety Data Sheet, 2021). Všetky liečivá boli testované na myšiach. Z doterajších štúdií vyplýva, že amitriptylín je najviac toxický. V porovnaní s našou štúdiou sa výsledky približujú, v našom prípade sa ako najtoxickjší prejavil amitriptylín spolu s klomipramínom.

ZÁVER

Antidepresíva sa dostávajú do životného prostredia v dôsledku viacerých antropogénnych aktivít. Preto je dôležité venovať veľkú pozornosť oblastiam s rastúcou populáciou a nedostatočnými systémami čistenia odpadových vôd, nakoľko dochádza k bioakumulácii antidepresív ako aj ich metabolitov v rôznych organizmoch, hlavne v rybách, vodných rastlinách, mäkčákoch, slimákoch.

Cieľom štúdie bolo stanovenie hodnôt LC_{50} u vybraných druhov antidepresív za použitia alternatívneho biotestu II. generácie na modelovom organizme *Artemia franciscana*. Výsledné hodnoty LC_{50} sme získali pomocou dvojdávkovej interpolačnej metódy podľa Rotha a pomocou programu ToxRat. Pri liečivách sme použili rôzne koncentrácie, preto je ťažké určiť, ktoré liečivo bolo najtoxickéjšie. Hodnoty LC_{50} sme získali len pri imipramíne, pri ostatných liečivách boli hodnoty LC_{50} vyššie ako nami testované najvyššie koncentrácie. Vyššie koncentrácie sme pri liečivách nepoužili, pretože vyššie koncentrácie by boli za hranicou rozpustnosti. Zistili sme, že aj tieto liečivá majú vplyv na úhyn drobných organizmov. Z našich liečiv sa ako najviac toxický javil amitriptylín spolu s klomipramínom. Avšak koncentrácie, ktoré sme použili v našej štúdii nepredstavujú nijaké špecifické riziko pre životné prostredie. Koncentrácia tricyklických antidepresív v povrchových vodách je značne nízka, nachádzajú sa len v stopových množstvách.

ZOZNAM LITERATÚRY

Castillo-Zacarias, C., Barocio, M. E., Hidalgo-Vázquez, E., Sosa-Hernández, J. E., Parra-Arroyo, L., López-Pacheco, I. Y., Barceló, D., Iqbal, H. N. M., Parra-Saldívar, R.: Antidepressant drugs as emerging contaminants: Occurrence in urban and non-urban waters and analytical methods for their detection. *Science of the Total Environment*, 2021, 757, 1 – 11.

Dvořák, P., Šucman, E., Beňová, K.: The development of a ten-day biotest using *Artemia salina* nauplii. *Biologia*, 2005, 60 (5), 593 – 597.

Dvořák, P., Šucman, E.: *Návody ke cvičením z biofyziky se základy statistiky* [Instructions for Exercises in Biophysics with the Basics of Statistics]. 2. vyd. Brno: Ediční středisko VFU, 1996. 13 – 44.

Dvořák, P., Žďarský, M., Beňová, K.: Possibilities of alternative generation II biotests at *Artemia*. *Interdisciplinary Toxicology*, 2009, 2 (2), 45 – 47.

European Directorate for the quality of the Medicines. *Imipramine*. Strasbourg – France: EDQM, Council of Europe, 31. 05. 2017. 5 p. https://sds.edqm.eu/pdf/SDS/EDQM_201600475_1.0_SDS_SK.pdf?ref=1619856368 Accessed September 26, 2022.

Minguez, L., Farcy, E., Ballandonne, C., Lepailleur, A., Serpentine, A., Lebel, J.-M., Bureau, R., Halm-Lemeille, M.-P.: Acute toxicity of 8 antidepressants: What are their modes of action? *Chemosphere*, 2014, 108, 314 – 319.

Ratte, H. T., Ratte, M., Daniels, B.: *About us. ToxRat*. <https://www.toxrat.com/about-us_en.html>. [cit. 2022-3-10].

Roth, Z., Josífk, M., Malý, V., Trčka, V.: *Statistické metody v experimentální medicíně* [Statistical Methods in Experimental Medicine]. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1962, 592 s.

Safety Data Sheet. Amitriptyline. Michigan, USA: Cayman Chemical Company, 13. 07. 2021. 10 p. < <https://www.caymanchem.com/msdss/15881m.pdf>>. Accessed October 12, 2021.

Safety Data Sheet. Clomipramine. Michigan, USA: Cayman Chemical Company, 13. 09. 2021. 8 p. < <https://www.caymanchem.com/msdss/15884m.pdf>>. Accessed October 12, 2021.

Safety Data Sheet. Imipramine. Michigan, USA: Cayman Chemical Company, 13. 07. 2021. 8 p. < <https://www.caymanchem.com/msdss/15890m.pdf>>. Accessed October 12, 2021.

Safety Data Sheet. Nortriptyline. Michigan, USA: Cayman Chemical Company, 03. 03. 2021. 10

p. < <https://www.caymanchem.com/msdss/15884m.pdf>>. Accessed October 12, 2021.

Sklenář, Z., Dvořák, P., Beňová, K.: Možnosti využití biotestu s *artemia salina* při studování toxikologických účinků inhibitorů cyklin-dependentních kináz [Possible use of *artemia salina* biotest for study of toxicologic effects of inhibitors]. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2006, 20, 62 – 65.

Wayland Hayes, J.: *Hayes' handbook of pesticide toxicology*. London: Academic press, Elsevier, 1991.1186 p.



NEALKOHOLOVÁ STEATOHEPATITÍDA A JEJ FARMAKOTERAPIA PHARMACOTHERAPY FOR NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

Gernátová, Nora¹; Piešová, Elena²; Dudášová, Irena³

¹Lekáreň Na korze, Ružová 27, 083 01 Sabinov

²Katedra biológie a fyziológie

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

³Interná a všeobecná ambulancia, Námestie sv. Martina 9, 082 71 Lipany

Slovenská republika

elena.piesova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Nealkoholová steatohepatitída (NASH) je považovaná za progresívnu formu nealkoholovej tukovej choroby pečene (NAFLD), ktorá môže progredovať do vývoja cirhózy pečene a vzniku hepatocelulárneho karcinómu pečene. Najčastejšou príčinou NAFLD/NASH je metabolický syndróm. Cieľom štúdie bolo v súbore 15 pacientov rôzneho veku a pohlavia (9 mužov a 6 žien) s diagnostikovanou NASH zistiť prítomnosť obezity na základe stanovenia indexu telesnej hmotnosti (BMI) a merania obvodu pásu, sledovať zmeny laboratórnych vyšetrení sérových hepatálnych enzýmov (alanínaminotransferáza – ALT, aspartátaminotransferáza – AST) a lipidového profilu (triacylglyceroly – TAG, lipoproteíny s nízkou hustotou prenášajúce cholesterol – LDL-C) pred a po 6 mesiacov trvajúcej terapii a analyzovať indikovanú farmakotera-

piu. Výsledky štúdie potvrdili, že nadváhou trpelo 40 % pacientov a obezitou 1. stupňa trpelo 33,3 % pacientov. Abdominálna obezita sa zistila u 53,3 % a abdominálna nadváha u 20 % pacientov. Pred liečbou malo 86,7 % pacientov zvýšenú aktivitu ALT v sére, po liečbe klesli hodnoty u všetkých, pričom 1 pacient mal referenčnú hodnotu ALT. Koncentrácie AST boli zvýšené oproti referenčnej hodnote u 80 % pacientov, po liečbe klesli hodnoty u všetkých, referenčnú hodnotu dosiahlo 33,3 % pacientov. Koncentrácie triacylglycerolov a LDL-C boli zvýšené u 5 pacientov, po liečbe dosiahli koncentrácie u všetkých referenčné hodnoty. Pri liečbe u 8 pacientov (53,3 %) bol najčastejšie indikovaný atorvastatín v rôznych denných dávkach. Monoterapia (ezetimib, fenofibrát, silymarín) bola aplikovaná u 13 pacientov (86,6 %). Najefektívnejšia terapia bola pri použití ezetimibu (1 x 10 mg) a atorvastatínu (1 x 20 mg).

Kľúčové slová: atorvastatín; hepatálne testy; LDL-C; steatohepatitída; terapia; triacylglycerol

ABSTRACT

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is considered a progressive form of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), which can progress to the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma of the liver. The most common cause of NAFLD/NASH is metabolic syndrome. The aim of the study was to determine the presence of obesity in a group of 15 patients of different ages and sexes (9 men and 6 women) diagnosed with NASH based on the determination of body mass index (BMI) and waist circumference measurements, to monitor changes in laboratory examinations of serum hepatic enzymes (alanine aminotransferase – ALT, aspartate aminotransferase – AST) and lipid profile (triacylglycerols – TAG, low density lipoproteins transport cholesterol – LDL-C) before and after 6 months of therapy and to analyze indicated pharmacotherapy. The results of the study confirmed that 40 % of patients suffered from overweight and 33.3 % of patients suffered from obesity of the 1st degree. Abdominal obesity was found in 53.3 % and abdominal overweight in 20 % of patients. Before the treatment, 86.7 % of patients had elevated serum ALT activity, after the treatment the values decreased in all, while one patient had a reference ALT value. AST concentrations were increased compared to the reference value in 80 % of patients, after the treatment the values decreased in all, the reference value was reached in 33.3 % of patients. The concentrations of triglycerides and LDL-C were increased in 5 patients, after the treatment the concentrations reached the reference values in all. In the treatment of 8 patients (53.3 %), atorvastatin in various daily doses was most often indicated. Monotherapy (ezetimibe, fenofibrate, silymarin) was applied in 13 patients (86.6 %). The most effective therapy was when using ezetimibe (1 x 10 mg) and

atorvastatin (1 x 20 mg).

Key words: atorvastatin; LDL-C; liver tests; steatohepatitis; therapy; triacylglycerol

ÚVOD

Nealkoholová steatohepatitída (NASH), anglicky non-alcoholic steatohepatitis, je považovaná za progresívnu formu nealkoholovej tukovej choroby pečene (NAFLD), anglicky nonalcoholic fatty liver disease, ktorá môže progredovať do vývoja cirhózy pečene a vzniku hepatocelulárneho karcinómu pečene. Podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb (MKCH10) (ICD – 10 Version: 2016) patria NASH a NAFLD k diagnóze Choroby pečene K70-K77. Choroba NAFLD/NASH je považovaná za orgánovú, resp. pečennú manifestáciu metabolického syndrómu s prejavmi obezity, inzulínovej rezistencie (IR), hypertenzie a dyslipidémie. Na základe populačných štúdií sa predpokladá, že NAFLD je prítomná u 16 – 23 % populácie (Bellentani a kol., 2000) a samotný NASH u 1 – 2 % populácie (Ground, 1982). Výskyt NASH stúpa priamoúmerne s narastajúcim počtom obéznych pacientov a s počtom pacientov, ktorí trpia ochoreniami, ktoré klinicky k obezite vedú. Vzhľadom na narastajúcu incidenciu a závažnosť je NASH zaradovaná medzi priority v starostlivosti o pacienta (Holomáň a kol., 2016).

V patogenéze NAFLD/NASH zohrávajú významnú úlohu niektoré rizikové faktory spájajúce sa s metabolickým syndrómom. Obezita je považovaná za významný rizikový faktor v rozvoji ochorenia. Rozhodujúce je množstvo prítomného viscerálneho tuku, ktorý je možné posúdiť zmeraním obvodu pásu. Voľné mastné kyseliny (VMK) sa rýchlejšie mobilizujú z viscerálnych (centrálnych) ako subkutánnych (periférnych) zásob. V procese esterifikácie tvoria VMK triacylglyceroly (TAG), pričom tvorba TAG sa v dôsledku IR zvyšuje. Aktivita lipoproteínovej lipázy je u diabetikov znížená, čo má za následok hromadenie lipoproteínov s veľmi nízkou hustotou (VLDL), chylomikrónov a TAG v plazme. Výskyt NASH je

u chorých s NAFLD zistený u 10 – 40 %. Ešte vyšší je výskyt u obeznych pacientov (55 – 74 %) a u diabetikov 2. typu (21 – 78 %) (Chalasani a kol., 2015). V súčasnosti sa venuje zvýšená pozornosť aj ďalším faktorom, ktoré vedú k vzniku a rozvoju oxidačného stresu s rozvojom lipoperoxidácie, úlohe endotoxínov a cytokínmi sprostredkovanej zápalovej odpovede, ktoré sa môžu podieľať na vzniku NASH (Farrell a Larter, 2006).

Farmakoterapia NASH je zameraná na ovplyvnenie zápalových zmien poškodzujúcich hepatocyty a na zabránenie vzniku fibrózy pečene. Cieľom farmakoterapie je zlepšenie laboratórneho nálezu (zníženie aktivity aminotransferáz), zlepšenie inzulínovej senzitivity s úpravou narušeného tukového a glycidového metabolizmu a priame ovplyvnenie metabolizmu hepatocytov (Fejfar a kol., 2016).

Cieľom našej štúdie bolo zistiť výskyt obezity u skupiny pacientov s diagnostikovanou NASH stanovením indexu telesnej hmotnosti (BMI) a meraním obvodu pása, interpretovať laboratórne výsledky vybraných hepatálnych enzýmov (alanínaminotransferáza – ALT, aspartátaminotransferáza – AST) a lipidového profilu (triacylglyceroly – TAG, lipoproteíny s nízkou hustotou prenášajúce cholesterol – LDL-C) vzhľadom na referenčné hodnoty pred a po 6-mesačnej terapii a analyzovať preskripciu liečiv na základe analýzy preskripčných záznamov.

MATERIÁL A METÓDY

Charakteristika súboru pacientov

Analyzovaný súbor pozostával z 15 pacientov, a to z 9 mužov (60 %) a 6 žien (40 %). Ich vek sa pohyboval od 33 do 67 rokov, pričom priemerný vek všetkých pacientov bol 51,7 roka. Priemerný vek žien bol 51,5 roka a mužov 52,3 roka.

Získanie laboratórnych výsledkov

V spolupráci s interným a všeobecným lekárom sme získali výsledky laboratórnych vyšetrení pre realizáciu retrospektívnej analýzy. Všetky laboratórne analýzy boli uskutočnené na prislúchajúcich praco-

viskách laboratórnej diagnostiky. Analýza výsledkov sa týkala obdobia od júla do decembra 2019, t. j. 6 mesiacov. Informácie o zdravotnom stave a laboratórnych vyšetreniach pacientov so steatózou a steatohepatítidou sme získali z ich chorobopisov. Následne sme spracovali potrebné údaje, ako je vek a pohlavie pacientov, stanovená diagnóza, laboratórne výsledky hepatálnych enzýmov ALT a AST, hladiny TAG a lipoproteínových častíc bohatých na cholesterol (LDL-C) a naordinovanú farmakologickú terapiu.

Všetky zistené údaje boli spracované v súlade so zákonom o ochrane osobných údajov. Pohlavie a vek pacientov sme určili na základe rodného čísla.

Laboratórne výsledky pred a po 6-mesačnej liečbe sme spracovali do tabuliek pomocou programu Microsoft Excel.

Prítomnosť obezity

Ia) Stanovenie BMI

Vo všeobecnosti sa obezita považuje za najrizikovejší faktor, ktorého dôsledkom môže vzniknúť steatóza a následne steatohepatitída. Medzi najčastejšie používané kritérium pre hodnotenie obezity patrí stanovenie BMI.

Stupeň obezity sme zistili na základe BMI. BMI sme vypočítali podľa vzorca:

$$BMI = \frac{\text{hmotnosť (kg)}}{\text{výška}^2 (m^2)}$$

Ib) Meranie a hodnotenie obvodu pása

V našej štúdii sme obvod pása u pacientov merali horizontálne, presnejšie v strednej vzdialenosti medzi *crista iliaca* a dolným okrajom rebra. Pacienti počas merania stáli, s chodidlami od seba vo vzdialenosti cca 13 cm s rovnomerne rozloženou váhou na oboch nohách.

Štatistická analýza

Pri štatistickej analýze výsledkov štúdie bola okrem metódy deskriptívnej štatistiky použitá neparametrická testovacia metóda (Wilcoxonov párový test). Výpočty boli realizované pomocou programu Wilco-

xon Signed-Rank Test Calculator a podľa Gravettera a Wallnaua (2013), pričom hodnota T_+ znamená súčet kladných poradí a T_- súčet záporných poradí.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Marchesini a kol. (2016) vo svojej štúdii uviedli, že 56 – 79 % pacientov s nadváhou ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$) trpí NAFLD a u tretiny je diagnostikovaný metabolický syndróm.

Z výsledkov našej štúdie vyplýva, že 40 % pacientov nášho súboru trpelo nadváhou ($BMI 25 - 29,9 \text{ kg/m}^2$) a 33,3 % pacientov trpelo obezitou 1. stupňa ($BMI 30 - 34,9 \text{ kg/m}^2$). Steatóza býva diagnostikovaná aj u jednotlivcov označených ako „neobézni“, ktorí majú hodnoty BMI v norme (BMI do $24,9 \text{ kg/m}^2$). U týchto sa vyskytuje centrálna obezita (Farrell a Larter, 2006) alebo niektorý ďalší z rizikových faktorov metabolického syndrómu (Marchesini a kol., 2016). V našom prípade sa tento stav vyskytoval u štyroch pacientov (26,6 %), u troch mužov a jednej ženy.

Dâmaso a kol. (2008) uvádzajú, že veľmi dôležitú úlohu pri vzniku NASH zohráva podiel viscerálneho (vnútrobrušného) tuku, ktorý sa určuje meraním obvodu pásu.

Fraenkel a Lazúrová (2006) sledovali vzťah medzi BMI a obvodom pásu u pacientov so steatózou a steatohepatítidou. Vo svojej práci uviedli, že obvod pásu patrí k rozhodujúcim antropometrickým parametrom vedúcim k vzniku NAFLD a NASH, pretože meranie obvodu pásu signalizuje informáciu o množstve prítomného tuku, ktorý obaľuje vnútorné orgány, a to predovšetkým pečeň.

Pri vyhodnotení údajov získaných pri meraní obvodu pásu sme vychádzali zo štúdie Koninga a kol. (2007) a Paveleková a Peterková (2008), kedy u mužov v prípade, ak obvod pásu je väčší ako 94 cm, hrozí zvýšené riziko ukladania viscerálneho tuku (abdominálna nadváha) a ak je obvod väčší ako 102 cm, pacienti majú vysoké riziko ukladania viscerálneho tuku (abdominálna obezita). Za zvýšené riziko ukladania viscerálneho tuku (abdominálna nadváha) u žien je považovaný obvod pásu väčší ako 80 cm

a vysoké riziko ukladania tuku (abdominálna obezita) pri obvode pásu väčšom ako 88 cm.

V našom súbore pacientov mali dvaja muži (22,2 %) obvod pásu väčší ako 94 cm a u jednej ženy (16,7 %) bol obvod pásu väčší ako 80 centimetrov, a preto na základe týchto výsledkov môžeme skonštatovať, že celkovo trom pacientom (20 %) hrozilo zvýšené riziko ukladania viscerálneho tuku, teda abdominálna nadváha. Abdominálna obezita sa vyskytovala u štyroch mužoch (44,4 %); ktorí mali obvod pásu nad 102 centimetrov a u štyroch žien (66,6 %), ktoré mali obvod pásu nad 88 centimetrov. Na základe nameraných hodnôt obvodu pásu sme dospeli k záveru, že 53,3 % pacientov nášho súboru trpí abdominálnou obezitou, pacienti majú vysoké riziko zvýšeného ukladania viscerálneho tuku a riziko zvýšenej úmrtnosti.

Aminotrasferázy (ALT, AST) sú pečeňové enzýmy, ktorých hodnoty sa používajú pri biochemických vyšetreniach pri podozrení na ochorenie pečene. Medzi hlavné kritériá na stanovenie diagnózy NASH patria zvýšené sérové aktivity pečeňových enzýmov ALT a AST. Viacerí autori však uvádzajú, že u časti pacientov s NASH je zisťovaná normálna hladina aminotransferáz (Mofrad a kol., 2003; Amarapurkar a Patel, 2004).

Pred 6-mesačnou liečbou bola hodnota ALT zvýšená u 13 pacientov (86,66 %); a to u 7 mužov (77,78 %) (viď tab. 1) a u 6 žien (100 %) (viď tab. 2). Laboratórne hodnoty pacientov sme porovnávali s referenčnou hodnotou pre ALT, ktorá sa pohybuje v rozmedzí $0,20 - 0,80 \text{ } \mu\text{kat.l}^{-1}$ u mužov a $0,20 - 0,60 \text{ } \mu\text{kat.l}^{-1}$ u žien. Po polročnej terapii boli sérové aktivity ALT u všetkých mužov a žien znížené oproti hodnotám pred terapiou. Referenčnú hodnotu pre ALT u mužov spĺňali 3 muži, avšak ani jedna žena. Na hladine významnosti $p < 0,01$ bol u mužov preukázaný štatisticky významný rozdiel v aktivitách ALT pred a po aplikácii terapie, u žien bol výsledok signifikantný pri hladine významnosti $p < 0,05$. Sérové aktivity AST pred terapiou boli zvýšené oproti referenčnej hodnote ($0,17 - 0,85 \text{ } \mu\text{kat.l}^{-1}$ u 8 mužov (88,88 %) a u 4 žien (66,66 %) (viď tab. 3). Po 6-mesačnej liečbe boli znížené sérové aktivity AST u všetkých mužov a u

Tab. 1: Sérová aktivita ALT ($\mu\text{kat.l}^{-1}$) u mužov pred a po liečbe

Číslo pacienta	Pred liečbou	Po liečbe	Rozdiel	Poradie absolútnych hodnôt rozdielov
1	0,79	0,77	0,02	1
2	5,52	2,72	2,80	8
3	2,20	1,02	1,18	7
4	0,60	0,60	0	
5	1,40	1,00	0,40	6
6	1,10	0,86	0,24	4
7	1,02	0,82	0,20	3
8	1,34	1,03	0,31	5
9	0,97	0,79	0,18	2
Súčet				36

$T_+ = 36$, $T_- = 0$; kritická hodnota T pri $n = 8$ ($p < 0,01$) je 0,3; výsledok je signifikantný pri $p < 0,01$

Tab. 2: Sérová aktivita ALT ($\mu\text{kat.l}^{-1}$) u žien pred a po liečbe

Číslo pacienta	Pred liečbou	Po liečbe	Rozdiel	Poradie absolútnych hodnôt rozdielov
10	0,71	0,68	0,03	1
11	1,23	1,03	0,20	4
12	0,89	0,77	0,12	2
13	1,03	0,85	0,18	3
14	1,20	0,90	0,30	6
15	1,06	0,82	0,24	5
Súčet				21

$T_+ = 21$, $T_- = 0$; kritická hodnota T pri $n = 6$ ($p < 0,05$) je 0,6; výsledok je signifikantný pri $p < 0,05$

všetkých žien. Referenčnú hodnotu pre AST u mužov spĺňalo 5 mužov (55,55 %) a 4 ženy (66,66 %). Na hladine významnosti $p < 0,01$ bol v súbore pacientov preukázaný štatisticky významný rozdiel v aktivitách AST pri porovnaní hladín pred a po aplikácii terapie.

Amarapurkar a kol. (2006) na základe výsledkov svojej štúdie referovali o tom, že vysoké hodnoty transamináz nie sú špecifické a nemusia znamenať progresiu NASH. Chen a kol. (2006) uvádzajú, že u niektorých pacientov s NASH sú zisťované nor-

málne hodnoty aminotransferáz a naopak u niektorých pacientov s vysokými hodnotami pečeňových enzýmov nemusí byť diagnostikovaná steatohepatitída, preto je pri diagnostikovaní NASH nevyhnutná biopsia pečene (Amarapurkar a kol. 2006). Adams a kol. (2005) zistili, že hladiny pečeňových enzýmov u pacientov s NAFLD kolíšu a normálne hodnoty aminotransferáz sa vyskytujú až u 78 % pacientov s týmto ochorením. Keď sú sérové hodnoty aminotransferáz zvýšené, zvýšenie je mierne a často obme-

Tab. 3: Sérová aktivita AST ($\mu\text{kat.l}^{-1}$) u pacientov pred a po liečbe

Číslo pacienta	Pred liečbou	Po liečbe	Rozdiel	Poradie absolútnych hodnôt rozdielov
1	1,20	0,80	0,40	12,5
2	1,62	0,99	0,63	15
3	1,40	0,86	0,54	14
4	0,71	0,70	0,01	1
5	0,88	0,82	0,06	3
6	1,16	0,89	0,27	10
7	1,18	0,84	0,34	11
8	1,03	0,80	0,23	9
9	1,40	1,00	0,40	12,5
10	0,80	0,78	0,02	3
11	1,10	0,90	0,20	7,5
12	0,86	0,83	0,03	5
13	0,79	0,77	0,02	3
14	1,01	0,85	0,16	6
15	1,20	1,00	0,20	7,5
Súčet				120

$T_+ = 120$, $T_- = 0$; kritická hodnota T pri $n = 15$ ($p < 0,01$) je 15; výsledok je signifikantný pri $p < 0,01$

dzené na jednu, resp. obidve aminotrasferázy (ALT, AST). Uslusoy a kol. (2009) uskutočnili štúdiu, ktorej sa zúčastnilo 34 pacientov, z toho 12 mužov a 22 žien. 25 pacientov malo zvýšené hodnoty aminotransferáz. U 9 pacientov boli zistené normálne hodnoty ALT a AST. U 16 pacientov z 25-tich bola diagnostikovaná NASH a u zvyšných 9 bola zistená jednoduchá steatóza. U 9 pacientov s fyziologickou hladinou ALT sa neskôr potvrdila po histopatologickom vyšetrení u 7 z nich prítomnosť NASH a u 2 jednoduchá steatóza. V závere štúdie autori uviedli, že poškodenie pečene zistené pri histopatologickom vyšetrení bolo závažnejšie u pacientov s NASH, u ktorých boli vysoké hladiny enzýmov, v porovnaní s pacientmi, u ktorých boli hladiny enzýmov v norme, avšak rozdiely neboli štatisticky významné.

Takmer 70 % pacientov s NAFLD trpí dyslipidémiou charakterizovanou zvýšenou koncentráciou

TAG v sére, zvýšením hladiny LDL-C a nízkymi hodnotami HDL cholesterolu (Speliotes a kol., 2010).

TAG reprezentujú hlavnú formu intrahepatálnych lipidov akumulovaných pri NAFLD. Zvýšený príjem TAG jedlom a transport mastných kyselín (MK) uvoľnených z inzulín rezistentného tukového tkaniva a tiež intenzívna *de novo* lipogenéza v pečeni sú významné cesty vedúce k intrahepatálnej akumulácii TAG (Wasilevska, Lebensztejn, 2021). K vývoju NAFLD a progresii ochorenia prispieva zvýšená hladina cholesterolu v bunkách. Absorpcia cholesterolu je sprostredkovaná špecifickým transportným proteínom Niemann Pick C1-like 1, ktorý je bohato produkovaný kefkovitým lemom membrány enterocytov v tenkom čreve (Luo, Yang, Song, 2020). Cholesterol je esterifikovaný acetyl-CoA cholesterol acyltransferázou 2 (ACAT-2) a inkorporovaný spolu s TAG

Tab. 4: Koncentrácia TAG (mmol.l⁻¹) u pacientov pred a po liečbe

Číslo pacienta	Pred liečbou	Po liečbe	Rozdiel	Poradie absolútnych hodnôt rozdielov
1	1,02	0,99	0,03	3,5
2	1,31	1,01	0,30	14
3	1,91	1,65	0,26	11
4	1,89	1,69	0,20	10
5	1,80	1,53	0,27	12
6	1,41	1,38	0,03	3,5
7	1,23	1,10	0,13	8
8	1,11	1,00	0,11	7
9	0,86	0,79	0,07	5
10	1,01	0,99	0,02	2
11	0,70	0,69	0,01	1
12	1,11	1,11	0	
13	1,81	1,67	0,14	9
14	1,99	1,70	0,29	13
15	1,23	1,15	0,08	6
Súčet				105

$T_+ = 105$, $T_- = 0$; kritická hodnota T pri $n = 14$ ($p < 0,01$) je 12; výsledok je signifikantný pri $p < 0,01$

a apolipoproteínom B-48 do chylomikrónov. TAG sú hydrolyzované lipoproteínovou lipázou a chylomikróny sú transformované do chylomikrónových remnantov obsahujúcich hlavne cholesterol, ktoré sú následne vychytávané pečeňou (Wang, 2007).

Intracelulárna akumulácia lipidov pri NAFLD rezultuje z nerovnováhy medzi absorpciou mastných kyselín, syntézou a oxidáciou lipidov a exportom TAG prostredníctvom lipoproteínov s veľmi nízkou denzitou (VLDL). VLDL, ktoré sú syntetizované v hepatocytoch, sú vylučované do cirkulácie, kde sa pôsobením lipoproteínovej lipázy cez medziprodukt lipoproteíny intermediárnej denzity (IDL) premieňajú na lipoproteíny s nízkou hustotou bohaté na cholesterol (LDL-C). Úlohou LDL je zabezpečiť transport cholesterolu z hepatocytov k periférnym bunkám. Pokiaľ bunky tkanív nemajú dostatok receptorov LDL, hromadia sa tieto LDL častice v krvnej plazme, t. j. stúpa hladina LDL-cholesterolu.

V štúdií sme sledovali zmeny výsledkov laboratorneho vyšetrenia lipidového metabolizmu u pacientov, a to hladiny TAG a LDL-C pred a po liečbe. Zistili sme, že pred liečbou u 3 mužov (33,33 %) a u 2 žien (33,33 %) boli koncentrácie TAG a LDL-C vyššie ako je referenčná hodnota pre TAG (0,45 – 1,7 mmol.l⁻¹) a pre LDL-C (1,2 – 3,0 mmol.l⁻¹). Po 6-mesačnej liečbe sme na základe výsledkov koncentrácií TAG zistili, že u všetkých pacientov sa koncentrácie TAG a LDL-C znížili a ani u jedného neboli hodnoty vyššie ako je stanovená referenčná hodnota pre TAG a LDL-C. Zníženie TAG a LDL-C bolo signifikantné pri hladine významnosti $p < 0,01$ (viď tab. 4 a 5).

Farmakoterapia NAFLD/NASH

Choroba NAFLD/NASH je veľmi často diagnostikovaná u asymptomatických jedincov po detekcii zvýšených hodnôt aminotransferáz počas rutinného skríningového vyšetrenia (Matteoni a kol., 1999; Far-

Tab. 5: Koncentrácia LDL-C (mmol.l⁻¹) u pacientov pred a po liečbe

Číslo pacienta	Pred liečbou	Po liečbe	Rozdiel	Poradie absolútnych hodnôt rozdielov	Poradie rozdielov s vyznačeným smerom
1	2,45	2,31	0,14	10	10
2	2,03	1,99	0,04	6	6
3	3,48	2,97	0,51	14	14
4	3,11	2,75	0,36	11	11
5	3,17	2,67	0,50	13	13
6	2,72	2,64	0,08	8	8
7	1,87	1,86	0,01	3	3
8	1,45	1,45	0		
9	1,39	1,40	- 0,01	3	- 3
10	1,79	1,78	- 0,01	3	- 3
11	1,49	1,48	0,01	3	3
12	2,08	2,09	- 0,01	3	- 3
13	3,21	2,80	0,41	12	12
14	3,01	2,88	0,13	9	9
15	2,22	2,17	0,05	7	7
Súčet				96	9

T₊ = 96, T₋ = 9; kritická hodnota T pri n = 14 (p < 0,01) je 12; výsledok je signifikantný pri p < 0,01

rell a Larter, 2006).

Liečba je empirická a zameriava sa na liečbu prítomného metabolického syndrómu. Spočíva v terapii prítomných rizikových faktorov, t. j. diabetu, dyslipidémie a obezity (Brúha a kol., 2007). Základom terapie je redukcia váhy, zvýšenie fyzickej aktivity, zmena stravovacích návykov a dôsledná terapia dyslipidémie. Na farmakologické ovplyvnenie metabolizmu cholesterolu a tukov a na úpravu hladín lipoproteínov v krvnej plazme sa používajú liečivá s rôznym mechanizmom účinku (viď tab. 6). K najpoužívanejšej skupine liečiv patria statíny. Mechanizmus ich účinku spočíva v inhibícii enzýmu 3-hydroxy-3-metyl glutaryl CoA reduktázy (HMG-CoA reduktáza), čo vedie následne k znižovaniu intracelulárnej syntézy cholesterolu. Statíny sú považované za efektívne a bezpečné látky, pri aplikácii ktorých môže ďalej dôjsť k zníženiu zápalovej aktivity, k zníženiu koncentrácie TAG a miernemu zvýšeniu koncentrácie HDL-C. Podľa

výsledkov klinických štúdií a praxe statíny dokážu znížiť hladinu LDL-C o 38 – 40 %, pričom hypolipidemický účinok varíruje podľa účinnosti konkrétneho statínu (Laššánová, Tisoňová, Kriška, 2005). V našej štúdii pri užívaní statínov pacientmi klesla hladina LDL-C v krvnej plazme od 4,3 % do 12,8 % a koncentrácia TAG od 1 % do 14,6 % (viď tab. 7). Spôľahlivým typom hypolipidemika sú fibráty. Fungujú ako agonisti peroxizóm proliferátor-aktivaného receptora α (PPAR- α), ktorý patrí do rodiny nukleárných receptorov. Ich stimuláciou sa zvyšuje aktivita lipoproteínovej lipázy, zvyšuje sa oxidatívna degradácia MK, čo spôsobuje zníženie tvorby LDL častíc bohatých na TAG. V našej štúdii pacient 6 užíval počas liečby fenofibrát v dávke 1 x 200 mg. Po liečbe boli uňho hodnoty TAG a LDL-C znížené o 2,1 %, resp. o 2,9 %. Ezetimib je selektívny inhibítor črevnej absorpcie cholesterolu, ktorý blokuje v duodene Nieman-Pickov proteín. Ezetimib je indikovaný

Tab. 6: Liečivá používané pri 6-mesačnej terapii NASH

Číslo pacienta	Počet a % pacientov	Liečivo	Dávka (mg)	Poznámka
1, 2, 5, 7, 8, 15	6 (39,9)	Atorvastatín	1 x 20	10
14	1 (6,7)	Atorvastatín	1 x 10	Hymekronón 3 x 400 mg
4	1 (6,7)	Atorvastatín Vitamín E	1 x 20 1 x 400	
10, 12	2 (13,4)	Simvastatín	1 x 20	
13	1 (6,7)	Simvastatín Ezetimib	1 x 40 1 x 10	
3	1 (6,7)	Ezetimib	1 x 10	
6	1 (6,7)	Fenofibrát	1 x 200	
9, 11	2 (13,4)	Silymarín	3 x 150	

Tab. 7: Pokles a nárast priemerných hodnôt sledovaných parametrov v závislosti od indikovanej terapie

Terapia	Pokles ALT (%)	Pokles AST (%)	Pokles TAG (%)	Pokles LDL-C (%)	Návrat LDL-C (%)
Atorvastatín 1 x 20 mg	37,2	24,4	12,5	5,3	0
Atorvastatín 1 x 10 mg	25,0	15,8	14,6	4,3	0
Atorvastatín 1 x 20 mg Vitamín E 1 x 100 mg	0	1,4	10,6	11,5	0
Simvastatín 1 x 20 mg	8,7	2,4	1,0	0	0,3
Simvastatín 1 x 40 mg Ezetimib 1 x 10 mg	17,5	2,5	7,7	12,8	0
Ezetimib 1 x 10 mg	53,6	38,6	11,5	14,7	0
Fenofibrát 1 x 200 mg	21,8	23,3	2,1	2,9	0
Silymarín 3 x 150 mg	17,3	24,0	5,1	0	0

ako prídavná liečba k terapii statínmi, ktoré redukujú syntézu cholesterolu v pečeni. Dvomi odlišnými mechanizmami ezetimib a statín zabezpečujú komplementárnu redukciu cholesterolu. Ezetimib je možné indikovať aj v monoterapii k diéte znižujúcej lipidy u pacientov, ktorí netolerujú liečbu statínmi (Oleárová a kol., 2015). V našej štúdii pacient 13 užíval kombináciu liečiv simvastatín (1 x 40 mg) a ezetimib (1 x 10 mg). Táto indikovaná terapia viedla k zníženiu sledovaných laboratórnych parametrov. V štúdii Sanyala a kol. (2010) bol u pacientov s NASH bez *diabetes mellitus* dokumentovaný pozitívny účinok dlhodobého užívania vitamínu E (800 IU/deň), ktorý spočíval v antioxidačnom účinku vitamínu E, v zabránení poškodenia mitochondrií, v ovplyvnení apoptózy a zápalovej odpovede a v znížení aktivity aminotransferáz (Gitto a kol., 2015). Holomán a kol. (2016) v štúdii uvádzajú, že denná dávka 800 mg vitamínu E mala pozitívny efekt na steatózu pečene v 36 % prípadov pacientov s NASH. Silymarín je tradičné hepatikum, pri ktorom viaceré štúdie potvrdili priaznivý hepatoprotektívny efekt a koreláciu medzi výškou dávky a účinkom liečiva (Saller a kol., 2008). Za racionálnu dávku sa považuje dávka od 420 – 600 mg/deň. V našej štúdii bol silymarín indikovaný 2 pacientom v dávke 3 x 130 mg so zlepšenými laboratórnymi výsledkami po liečbe. Avšak niektorí autori sa domnievajú, že pre rutinné využitie cytoprotektívnych a antioxidačných látok nie je dostatok dôkazov (Zima, 2008).

Pacientka 14, ktorá trpela tráviacimi ťažkosťami po prekonaní akútneho zápalu pečene a cholecystitídy, mala naordinovanú doplnkovú liečbu hymekromónom, ktorý užívala 3 x 400 mg denne. Po 6-mesačnej terapii výsledky potvrdili, že táto doplnková farmakoterapia mala pozitívny vplyv na regeneráciu poškodených hepatocytov.

ZÁVER

NAFLD a NASH sú v súčasnosti považované za najrozšírenejšie ochorenia pečene nielen v západných štátoch, ale nárast tohto ochorenia môžeme sledovať

aj na Slovensku. Steatóza vedie k zvýšenej morbidite a mortalite najmä v podskupine obéznych ľudí, diabetických pacientov a u pacientov so steatohepatitídou. V štúdii sme sa zaoberali analýzou klinických údajov u 15 pacientov, ktorí boli liečení na NAFLD a NASH. Na základe meraní BMI a obvodu pásu sme potvrdili prítomnosť obezity a nadmerného množstva viscerálneho tuku u týchto pacientov. Zistili sme, že nadváhou (BMI 25 – 29,9) trpelo 40 % pacientov (2 muži a 4 ženy), obezitou 1. stupňa (BMI 30 – 34,9) trpelo 33,33 % (4 muži a 1 žena). Na základe merania obvodu pásu sme zistili, že abdominálnou nadváhou trpelo 22 % (2 muži) a abdominálnou obezitou 44,4 % (4 muži) mužov, u žien abdominálnou nadváhou trpelo 16,7 % (1 žena) a abdominálnou obezitou 66,6 % (4 ženy). Na základe sérových aktivít aminotransferáz (ALT, AST) a lipidového profilu (TAG, LDL-C) pred liečbou sme zistili, že zvýšené hodnoty ALT boli zistené u 86,66 % pacientov (7 mužov a 6 žien) a zvýšené hodnoty AST boli diagnostikované u 8 mužov (88,88 %) a 4 žien (66,66 %). Po 6-mesačnej liečbe boli hodnoty ALT a AST u všetkých pacientov znížené oproti hodnotám pred terapiou. Zvýšené koncentrácie TAG a LDL-C pred liečbou boli preukázané u 3 mužov (33,33 %) a 2 žien (33,33 %). Po 6-mesačnej liečbe hodnoty TAG a LDL-C neboli vyššie ako je stanovená referenčná hodnota pre TAG a LDL-C. U 7 pacientov bol indikovaný atorvastatín v monoterapii a u jedného pacienta v kombinácii s vitamínom E. Simvastatín užívali dvaja pacienti a simvastatín v kombinácii s ezetimibom jeden pacient. Liečba s použitím jedného liečiva bola indikovaná pri ezetimibe, fenofibráte a silymaríne. Pokles laboratórnych hodnôt bol diagnostikovaný pri všetkých indikovaných liečivách a ich kombináciách. Najefektívnejšia bola terapia ezetimibom (1 x 10 mg) a atorvastatínom (1 x 20 mg).

ZOZNAM LITERAÚRY

Adams, L. A., Angulo, P., Lindor, K. D.: Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ*, 2005, 172, 899 – 905.

- Amarapurkar, D. N., Patel, N. D.: Clinical spectrum and natural history of non-alcoholic steatohepatitis with normal alanine aminotransferase values. *Trop. Gastroenterol.*, 2004, 25, 130 – 134.
- Bellentani, S., Saccoccio, G., Massutti, F., Crocè, L. S., Brandi, G., Sasso, F., Cristanini, G., Tirielli, C.: Prevalence of risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann. Intern. Med.*, 2000, 132, 112 – 117.
- Brůha, R., Dvořák, K.: Nealkoholická steatóza a steatohepatitída [Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis]. *Interní Med.*, 2007, 5, 210 – 212.
- Dâmaso, A. R., Prado, W., de Piano, L.: Relationship between nonalcoholic fatty liver disease prevalence and visceral fat in obese adolescents. *Dig. Liver Dis.*, 2008, 40 (2), 132 – 139.
- Farrell, G. C., Larter, C. Z.: Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology*, 2006, 43, S99 – S112.
- Fejfar, T., Hůlek, P., Dresslerová, I.: Terapie nealkoholové steatohepatitidy NASH [Therapy of nonalcoholic steatohepatitis (NASH)]. *Interní Med.*, 2016, 18 (5), 233 – 235.
- Fraenkel, E., Lazúrová, I.: Nealkoholová steatohepatitída a inzulinová rezistencia [Nonalcoholic steatohepatitis and insulin resistance]. *Interná med.*, 2006, 6 (11), 606 – 611.
- Ground, K. E.: Liver pathology in aircrew. *Aviat. Space Environ. Med.*, 1982, 53, 14 – 18.
- Holomáň, J., Szántová, M., Zima, M., Slobodová, L.: Manažment nealkoholovej tukovej choroby pečene [The management of non-alcoholic fatty liver disease]. *Via pract.*, 2016, 13 (5), 179 – 186.
- Gitto, S., Vitale, G., Villa, E., Andreone, P.: Treatment of nonalcoholic steatohepatitis in adults: present and future. *Gastroenterol. Res. Pract.*, 2015, 2015: 732870.
- Gravetter, F. J., Wallnau, L. B.: *Statistics for the Behavioral Sciences*. 13th edn. Wadsworth, CA: Cengage Learning, 2013, 714 – 716.
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Diehl, A. M., Brunt, E. M., Cusi, K., Charlton, M., Sanyal, A. J.: The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*, 2015, 55 (6), 2005 – 2023.
- Chen, Ch. H., Huang, M. H., Yang, Ch. Ch., Yeh, Y. H., Yueh, S. K.: Prevalence and risk factors of nonalcoholic fatty disease in an adult population of Taiwan: metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese adults. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2006, 40 (8), 745 – 752.
- Koning, L., Merchant, A., Pogue, J., Anand, S.: Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. *Eur. Heart J.*, 2007, 28, 850 – 856.
- 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.
- Luo, J., Yang, H., Song, B. L.: Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2020, 21, 225 – 245.
- Marchesini, G., Petta, S., Dalle-Grave, R.: Diet, weight loss, and liver health in nonalcoholic fatty liver disease: Pathophysiology evidence, and practice. *Hepatology*, 2016, 63, (6), 2032 – 2043.
- Matteoni, C. A., Younossi, Z. M., Gramlich, T., Boparai, N., Liu, Y. C., McCullough, A. J.: Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 1999, 116, 1413 – 1419.
- Mofrad, P., Contos, M. J., Haque, M., Sargeant, C., Fisher, R. A., Luketic, V. A., Sterling, R. K., Shiffman, M. L., Stravitz, R. T., Sanyal, A. J.: Clinical and histological spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology*, 2003, 37, 1286 – 1292.
- Oleárová, A., Jurečková, K., Lehocká, L., Masaryková, L.: Nové možnosti liečby dyslipoproteínemií. [Novel targeted therapeutics in dyslipoproteinemia]. *Prakt. lekár.*, 2015, 5 (3 – 4), 92 – 96.
- Paveleková I., Peterková, V.: Je školská

mládež na Slovensku obéžna? [Do Slovak teenagers have overweight?] In: Evžen Řehulka: *Škola a zdraví pro 21. století*. 1. vyd. Brno: PF Masarykovy univerzity, 2008, 169 – 178.

Saller, R., Brignoli, R., Melzer, J., Meier, R.: An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. *Forsch Komplementmed.*, 2008, 15 (1), 9 – 20.

Sanyal, A. J., Chalasani, N., Kowdley, K. V., McCullough, A., Diehl, A. M., Bass, N. M., Neuschwander-Tetri, B. A., Lavine, J. E., Tonascia, J., Unalp, A., Van Natta, M., Clark, J., Brunt, E. M., Kleiner, D. E., Hoofnagle, J. H., Robuck, P. R., NASH CRN: Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.*, 2010, 362, 1675 – 1685.

Speliotes, E. K., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Vasan, R. S., Meigs, J. B., Sahani, D. V., Hirschhorn, J. N., O'Donnell, Ch. J., Fox, C. S.: Fatty liver is associated with dyslipidemia and dysglycemia independent of visceral fat: the Framingham Heart Study. *Hepatology*, 2010, 51, 1979 – 1987.

Uslusoy, H., Nak, S. G., Gülten, M., Biyikli, Z.: Non-alcoholic steatohepatitis with normal aminotransferase values. *World J. Gastroenterol.*, 2009, 15 (15), 1863 – 1868.

Wang, D. Q. H.: Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu. Rev. Physiol.*, 2007, 69, 221 – 248.

Wasilewska, N., Lebensztejn, D. M.: Non-alcoholic fatty liver disease and lipotoxicity. *Clin. Exp. Hepatol.*, 2021, 7 (1), 1 – 6.

Wilcoxon Signed-Rank Test Calculator. <https://www.socscistatistics.com/tests/signedranks/default2.aspx>. Accessed July 22, 2022.

Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., Wymer, M.: Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 2016, 64, 73 – 84.

Zima, M.: Nealkoholová tuková choroba pečene [Nonalcoholic fatty liver disease]. *Via pract.*, 2008, 5 (4 – 5), 166 – 169.



RESVERATROL A JEHO PROTINÁDOROVÉ ÚČINKY

ANTI-TUMOR EFFECTS OF RESVERATROL

Mojžišová, Gabriela

Centrum klinického a predklinického výskumu MEDIPARK
Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Trieda SNP 1, 040 11 Košice
Slovenská republika

gabriela.mojzisova@upjs.sk

ABSTRAKT

Resveratrol (trans-3,4',5-trihydroxystilbén) je prírodne sa vyskytujúca polyfenolová zlúčenina s početnými biologickými účinkami. Boli preukázané jeho antioxidantné, protizápalové, kardioprotektívne, antibakteriálne alebo antifungálne účinky. V posledných rokoch resveratrol priťahoval pozornosť aj z dôvodu jeho schopnosti ovplyvňovať proces karcinogenézy inhibíciou iniciácie a progresie nádorového procesu. Tento prehľadový článok sumarizuje možné mechanizmy antiproliferatívneho, resp. protinádorového účinku resveratrolu v *in vitro* a *in vivo* podmienkach.

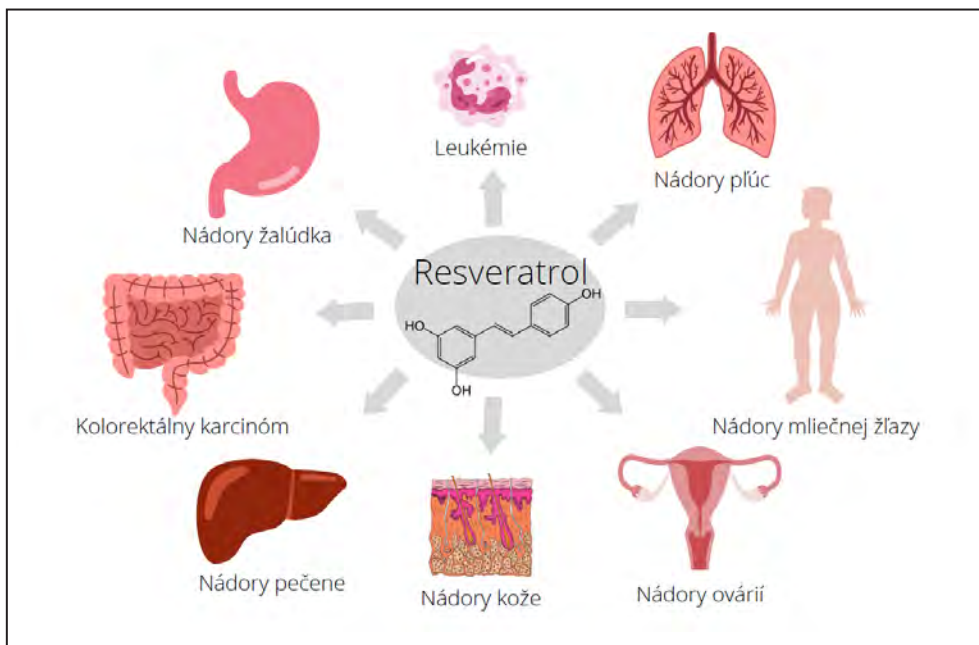
Kľúčové slová: polyfenolové zlúčeniny; protinádorové účinky; resveratrol

ABSTRACT

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) is a naturally occurring polyphenolic compound with a broad spectrum of biological activities including antioxidant, anti-inflammatory, cardioprotective, antibacterial or antifungal activity. In the last decade, resveratrol has attracted attention due to its ability to modulate process of carcinogenesis by affecting cancer initiation and progression. This review summarizes the basic mechanisms of antiproliferative as well as anticancer effects of resveratrol in both *in vitro* and *in vivo* conditions.

Key words: anti-tumor effects; polyphenolic compounds; resveratrol

Obr. 1.: Terapeutický potenciál resveratrolu pri rôznych typoch nádorov



Zdroj: obrázok bol vytvorený pre účely tejto štúdie

ÚVOD

Resveratrol (RE), bioaktívna molekula syntetizovaná niektorými rastlinami ako odpoveď na mikrobiálnu infekciu alebo UV žiarenie, pritiahla pozornosť odbornej spoločnosti po publikovanej práci autorov Renaud a de Lorgeril (1992), ktorí dali do súvislosti konzumáciu červeného vína so zníženou mortalitou na kardiovaskulárne ochorenia (známy Francúzsky paradox). Aj keď v súčasnosti je realita „Francúzskeho paradoxu“ sporná, výsledkom tohto objavu bol intenzívny výskum zameraný na zdravie prospešný účinok RE. Boli preukázané jeho početné biologické účinky, napr. antioxidačné, antimikrobiálne, kardioprotektívne a mnohé ďalšie (He a Yan, 2013; Abu-Amero a kol., 2016; Riba a kol., 2017; Banez a kol., 2020). Ďalšou oblasťou intenzívneho výskumu biologických účinkov resveratrolu je jeho potenciál ovplyvniť proces karcinogenézy na rôznych stupňoch (Jang a kol., 1997; Ko a kol., 2017). V posledných

dvoch dekádach početné experimentálne aj klinické štúdie preukázali chemopreventívny a antiproliferatívny účinok RE (Howells a kol., 2011; Szekeres a kol., 2011; Singh a kol., 2015; Akter a kol., 2021) (viď obr. 1).

In vitro účinok

Presný mechanizmus chemopreventívneho a protinádorového účinku RE v súčasnosti nie je známy, avšak na základe publikovaných štúdií je možné predpokladať jeho pleiotropný efekt.

Aberantná apoptóza je jeden z typických znakov nádorovej bunky a základom antiproliferatívneho účinku početných protinádorových látok je ich schopnosť indukovať proces apoptózy u nádorových buniek. Vnútná dráha apoptózy (tzv. mitochondriálna) je v konečnom dôsledku charakterizovaná uvoľnením proapoptických proteínov (napr. cytochróm *c*, Smac/DIABLO), čo vedie k tvorbe apoptozómu s následnou aktiváciou kaspáz, štiepením cieľových proteínov

nov a smrti bunky. Aktivácia tejto cesty apoptózy je kontrolovaná členmi rodiny Bcl-2 proteínov, ktoré môžu mať antiapoptickú (napr. Bcl-2, Bcl-XL) alebo proapoptickú funkciu (napr. Bax, Bad, Bid) (Cassier a kol., 2017). Schopnosť RE indukovať apoptózu súvisí s moduláciou funkcie Bcl-2 proteínov. U nádorovej línie mliečnej žľazy (MCF-7) RE znižoval expresiu Bcl-2 proteínu a na druhej strane zvyšoval hladiny Bax so súčasnou aktiváciou kaspázy-9 (Kim a kol., 2004). Aj neskoršie štúdie potvrdili schopnosť RE indukovať apoptózu u MCF-7. Tento účinok bol závislý na použitej dávke, pričom v nižších dávkach spôsoboval zastavenie bunkového cyklu v S fáze, so súčasnou inhibíciou cyklínu-D a cyklín dependentných kináz (CDK). Vysoké dávky RE naproti tomu viedli k zastaveniu bunkového cyklu v G1 fáze a objaveniu sa buniek v sub-G0/G1 fáze, ktorá je považovaná za marker apoptózy. Zároveň došlo u nádorových buniek k aktivácii kaspázy-9 a poklesu množstva antiapoptotického proteínu Bcl-2 (Venkatadri a kol., 2016; Ding a kol., 2020). Schopnosť RE indukovať mitochondriálnu cestu apoptózy bola preukázaná aj u ďalších nádorových línií. U bunkovej línie LNCaP (nádor prostaty), RE indukoval apoptózu intenzívnejšie ako iné polyfenolové zlúčeniny prítomné v hrozne (kys. galová, kvercetín) so súčasnou aktiváciou kaspázy kaspázy-3 a -7 (Ferruelo a kol., 2014). Proapoptický účinok spojený s aktiváciou kaspáz 7/9 a zmenami v expresii CDK2 a CDK4 ako aj cyklínu D1 bol pozorovaný aj u buniek kolorektálneho karcinómu (HCT116 a CaCo-2) inkubovaných s RE v mikromolárnych koncentráciách (Liu a kol., 2014).

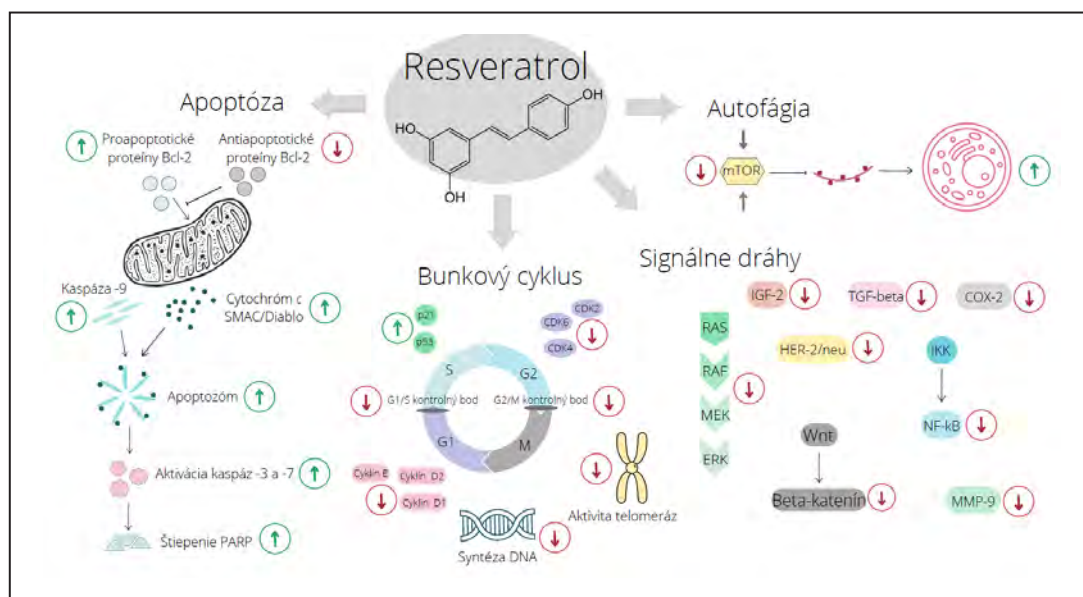
Početné štúdie dokumentovali schopnosť RE indukovať túto cestu apoptózy u ďalších nádorových bunkových línií. Resveratrol u buniek A431 (epidermoidný nádor) v závislosti na použitej dávke inhiboval cyklín dependentné kinázy (CDK2, CDK4 a CDK6), výsledkom čoho bolo zastavenie bunkového cyklu v G1 fáze s následnou indukciou apoptózy (Kim a kol., 2016). Zastavenie bunkového cyklu v S fáze dokumentovali aj Ko a kol. (2017) u leukemických buniek CEM-C7H2, ktoré neobsahujú funkčný pro-

tein p53. Zastavenie bunkového cyklu v S fáze bolo dokumentované aj ďalšími autormi, ktorí zistili tento účinok RE na rôznych nádorových bunkových líniách (Garcia a kol., 2012; Wu a kol., 2019). Tento efekt môže súvisieť so schopnosťou RE inhibovať ribonukleotidreduktázu, enzým nevyhnutný pre syntézu DNA v začiatkových štádiách S fázy bunkového cyklu. Bolo dokázané, že RE bol ako inhibítor DNA syntézy asi 25-krát účinnejší ako hydroxyurea, ktorá je používaná ako cytostatikum v klinickej praxi (Eder a kol., 2015). Podobné účinky zistili aj u buniek izolovaných z nádoru prostaty, kde RE inhiboval cyklín-D a cyklín-E ako aj expresiu cyklín dependentných kináz (CDK4 a CDK2). Zároveň bola zvýšená expresia tumor supresorového génu p53 a aktivácia kaspáz -3 a -9. Podobný účinok mal RE aj u gliómových buniek U251, kde indukoval fragmentáciu DNA spojenú s aktiváciou kaspázy-3 a rozštiepením jej substrátu – poly(ADP-ribózo)polymerázy (PARP). Ako autori tejto štúdie preukázali, zároveň došlo k zvýšenému uvoľňovaniu cytochrómu *c* z mitochondrií a tiež k zvýšenej expresii proapoptotického proteínu Bax.

Pľúcne nádory patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce nádory a preto je samozrejmé, že sa upriamila pozornosť aj na štúdium schopnosti RE ovplyvniť rast a množenie u buniek izolovaných z pľúcnych nádorov. U buniek z pľúcneho nádoru RE spôsoboval zastavenie bunkového cyklu a indukciu apoptózy. Tento účinok koreloval s indukciou kaspáz a zníženou expresiou antiapoptotického proteínu Bcl-2 (Yousef a kol., 2017; Fan a kol., 2020). RE okrem toho, že sám inhiboval rast buniek pľúcneho nádoru, výrazne potencoval aj účinok paklitaxelu, antineoplastickej látky používanej v klinickej praxi. Nádorové bunky po ovplyvnení RE reagovali na antiproliferatívny účinok paklitaxelu oveľa intenzívnejšie. Toto zistenie dáva dobrý predpoklad na štúdium možného potenciačného účinku týchto dvoch látok s možným využitím v klinickej praxi (Maloney a kol., 2020).

Na druhej strane Pozo-Guisado a kol. (2005) dokumentovali, že indukcia apoptózy nemusí byť závislá od kaspáz. U buniek MCF-7 autori zistili, že RE inhiboval expresiu Bcl-2, avšak u týchto buniek nedošlo

Obr. 2.: Potenciálne cieľové molekuly antiproliferatívneho účinku resveratrolu



Zdroj: obrázok bol vytvorený pre účely tejto publikácie

k uvoľneniu cytochrómu *c*, aktivácii kaspáz 3/8 alebo štiepeniu PARP. Zároveň však RE menil membránový mitochondriálny potenciál, indukoval produkciu voľných kyslíkových radikálov a inhiboval NF-kap-paB.

V poslednom období boli publikované vedecké práce poukazujúce na schopnosť RE modulovať aj iné formy bunkovej smrti. Autofágia je dôležitá pre udržiavanie bunkovej homeostázy, ale za určitých podmienok môže viesť k bunkovej smrti (Denton a Kumar, 2019).

Park a kol. (2016) zistili, že RE indukoval bunkovú smrť u buniek MCF-7 (mamárny karcinóm) inhibíciou mTOR signálnej dráhy, ktorá za bazálnych podmienok inhibuje autofágiu. Neskôr Luyten a kol. (2017) preukázali, že v RE indukovanej supresii nádorových buniek zohráva dôležitú úlohu aj intracelulárne kalcium a inozitol trifosfát a jeho receptory, ktoré sú kľúčové pre aktiváciu autofágie indukovanej inhibíciou mTOR. Schopnosť RE indukovať autofágiu cez inhibíciu mTOR bola dokázaná aj u buniek orálneho karcinómu rezistentných na cisplatinu (Chang a kol., 2017) alebo u buniek melanómu (Gong a Xia, 2020).

Na antiproliferatívnom účinku RE sa môžu podieľať aj iné mechanizmy. Lanzilli (2006) zistil, že RE u buniek nádoru mliečnej žľazy okrem iného znižuje aktivitu telomeráz. Teloméry sú definované zakončenia chromozómov obsahujúcich špecifické, opakujúce sa sekvencie DNA. Sú nevyhnutné pre normálnu replikáciu chromozómov, avšak ich dĺžka sa s každou replikáciou skracuje až nakoniec bunka odumiera. Telomeráza je enzým, ktorý opravuje poškodené teloméry a v súčasnosti prevláda domnienka, že nádorové bunky majú mutantnú telomerázu, ktorá je schopná zabráňovať skracovaniu telomér a nádorová bunka sa týmto stáva nesmrteľnou. Inhibícia telomeráz teda vedie k obnoveniu „smrteľnosti“ nádorovej bunky. Tieto výsledky poukazujú na možné využitie RE v chemoprevencii nádorov mliečnej žľazy alebo prostaty. Inhibícia telomerázovej aktivity ako možný mechanizmus antiproliferatívneho účinku RE bola zistená aj u melanómových buniek (Platella a kol., 2017). Na obr. 2 sú znázornené potenciálne ciele a mechanizmy antiproliferatívneho účinku resveratrolu.

In vivo experimenty

Nádory kože

Nemelanómové nádory kože (NMSC) patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce malignity, ktorých incidencia sa stále zvyšuje. Aj keď mortalita na NMSC je nízka, tieto nádory predstavujú závažný medicínsky problém, hlavne z dôvodu limitovanej terapie.

Pretože klinické a epidemiologické údaje jasne preukázali koreláciu medzi vznikom nemelanómových nádorov kože a UV žiarením, bol študovaný aj potenciálne chemopreventívny, resp. chemoterapeutický účinok RE u experimentálnych zvierat po expozícii UV žiareniu (Chen a kol., 2013).

Lokálne aplikovaný RE v dávke 25 $\mu\text{mol}/\text{myš}$ signifikantne redukoval poškodenie kože u SKH-1 bezsrstých myší krátkodobo exponovaných UVB žiarením. Signifikantne redukoval UVB-indukované zhrubnutie kože a edém, inhiboval zvýšenú aktivitu cyklooxygenázy a ornitindekarboxylázy, ktoré sú považované za markery karcinogenézy, ako aj UVB-sprostredkovanú lipidovú peroxidáciu (Afaq a kol., 2003). Neskôr títo autori študovali mechanizmus protektívneho účinku RE u týchto experimentálnych zvierat po opakovanej expozícii UVB žiarením. Zistili, že RE moduloval kľúčové regulátory bunkového cyklu vrátane potlačenia expresie jadrového antigénu ako aj cyklín-dependentných kináz (CDK-2, 4 a 6) a cyklínu D1 a D2, ktorých expresia bola signifikantne zvýšená po ožiarení UVB. Zároveň bola zvýšená expresia inhibítora cyklín-dependentných kináz (WAF1/p21) a tumor supresorového génu p53 a znížená expresia mitogénom aktivovanej proteín kinázy (MAPK) (Reagan-Shaw a kol., 2004). Ako bolo neskôr zistené, preventívny účinok RE pri UVB indukovanom poškodení kože bol rovnaký bez ohľadu na to, či RE bol aplikovaný pred alebo po expozícii myší UVB žiareniu, pričom tento účinok bol spojený s moduláciou expresie survivínu a ďalších mechanizmov zapojených do apoptózy (Aziz a kol., 2005).

Na druhej strane, vplyv RE na melanómové nádory kože nie je taký jednoznačný. Melanómy patria medzi vysokoagresívne nádory s výraznou schopnosťou

metastázovať do vzdialených orgánov. Osmond a kol. (2012) študovali efekt RE na melanómové bunky, resp. melanóm v *in vitro* a *in vivo* podmienkach. Zatiaľ čo RE signifikantne potlačil rast a proliferáciu melanómových buniek v *in vitro* podmienkach, jeho protektívny účinok u experimentálnych zvierat bol minimálny. Ako sa autori domnievajú, tento rozdiel môže byť zapríčinený nízkou biologickou dostupnosťou perorálne aplikovaného RE. Podobné výsledky boli publikované aj neskôr, keď RE neovplyvnil rast nádorov iniciovaných podkožnou aplikáciou melanómových buniek (Osmond a kol., 2013).

Rozdielne výsledky získali Wu a Cui (2017), ktorí študovali antiproliferatívny/protinádorový účinok RE v *in vitro* aj *in vivo* podmienkach. RE signifikantne potlačal rast melanómových buniek a zároveň u experimentálnych zvierat aplikácia RE viedla k výraznej redukcii veľkosti nádorov. Signifikantné potlačenie rastu nádorov u myší po subkutánnej aplikácii melanómových buniek dokumentovali aj ďalší autori. Bhattacharya a kol. (2011), podobne ako v predchádzajúcej práci, študovali schopnosť RE potlačiť rast melanómových buniek *in vitro* aj *in vivo*. Zistili, že RE okrem potlačenia rastu nádorových buniek mal výrazný účinok aj na migráciu a invazivitu melanómových buniek a zároveň preukázali schopnosť RE redukovat' rast nádorov u experimentálnych zvierat. Ako uvádzajú autori nedávno publikovanej štúdie, protektívny účinok RE v tomto modelovom usporiadaní môže súvisieť so signifikantne zvýšenou aktivitou NK buniek v nádoroch (Lee a kol., 2021).

Ako už bolo spomínané, melanómy majú výrazný potenciál metastázovať do vzdialených tkanív. Z toho dôvodu je významné zistenie, že intraperitoneálne aplikovaný RE výrazne redukoval tvorbu pľúcnych metastáz a signifikantne predlžoval prežívanie myší po inokulácii melanómových buniek (Davoodvandí a kol., 2020).

Protektívny účinok RE na vznik kožných nádorov bol preukázaný aj za iných modelových podmienok. Chemicky indukované nádory kože patria medzi časté modely používané pri štúdiu terapeutického účinku potenciálnych liečiv. Zvyčajne sa používa dvoj-

stupňový model, pri ktorom po iniciácii mutagénom 7,12-dimetylbenz[a]antracénom (DMBA) nasleduje aplikácia promótoru 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetátu (TPA) vedúca k tvorbe benígnych papilómov (Vähätupa a kol., 2019); ktoré môžu progredovať do spinocelulárneho karcinómu (Neagu a kol., 2016). Schopnosť RE inhibovať tvorbu nádorov kože bola potvrdená aj pri tomto modeli.

Hu a kol. (2016) dokumentovali protektívny účinok RE u DMBA/TPA indukovaných nádorov kože u potkanov kmeňa Wistar. Intraperitoneálna aplikácia RE v dávke 1 – 2 mg.kg⁻¹ signifikantne redukovala incidencia, multiplicitu ako aj objem a hmotnosť nádorov u experimentálnych zvierat.

Nádory gastrointestinálneho traktu

Kolorektálne nádory patria medzi nádory s najvyššou incidenciou a mortalitou v celosvetovom meradle (Sung a kol., 2021).

Účinnosť RE v *in vivo* podmienkach bola študovaná na dvoch animálnych modeloch, azoxymetánom-indukovanej karcinogenéze a u mutantných Min myši.

Tessitore a kol. (2000) študovali ochranný účinok RE pri azoxymetánom-indukovaných nádoroch gastrointestinálneho traktu. RE v dávke 200 µg/kg/deň signifikantne redukoval proliferáciu krýpt v kolóne. Po izolácii aberantných krýpt autori zistili, že protektívny účinok RE je pravdepodobne spôsobený zmenami expresie proteínov Bax a p21.

Protektívny účinok RE bol študovaný aj u kongenických myši Min s genetickou predispozíciou tvorby intestinálnych nádorov (Yu a kol., 2018). RE v pitnej vode (0,01 % koncentrácii) bol podávaný sedem týždňov od piateho dňa veku myši. Po ukončení aplikácie autori zistili, že tvorba nádorov u myši prijímajúcich RE bola redukovaná o 70 %. Genetickou analýzou bolo zistené, že RE znižoval expresiu génov priamo zapojených do progresie bunkového cyklu alebo bunkovej proliferácie (cyklíny D1 a D2, DP-1 transkripčný faktor). RE taktiež zvyšoval expresiu početných génov zapojených do modulovania funkcie imunokompetentných buniek (cytotoxické T

lymfocyty, chemotaktický faktor pre monocyty) a do inhibície procesu karcinogenézy a expanzie tumorov (proteín nádorovej susceptibility TSG101, transformujúci rastový faktor-β, desmokolín 2) (Schneider a kol., 2001).

Inhibičný účinok RE bol pozorovaný aj v experimentoch využívajúcich xenograftový model nádorov žalúdka po implantácii primárnych buniek ľudského nádoru žalúdka experimentálnym myšiam. Injekčne aplikovaný RE do blízkosti nádoru výrazne inhiboval rast nádoru v závislosti od použitej dávky. Ďalšie analýzy preukázali schopnosť RE indukovať apoptózu nádorových buniek ako aj fragmentáciu DNA, kondenzáciu chromatinu a signifikantne meniť pomer medzi proapoptickými a antiapoptickými členmi rodiny Bcl-2 proteínov (Zhou a kol., 2005).

Nádory mliečnej žľazy

Nádory mliečnej žľazy predstavujú u žien najčastejšie sa vyskytujúci typ nádorového ochorenia a celosvetovo je to piata najčastejšia príčina úmrtia na onkologické ochorenia (Sung a kol., 2021).

Karcinogénmi indukované nádory mliečnej žľazy patria medzi často používané modely. Aplikácia 7,12-dimetylbenzantracénu (DMBA) alebo N-metyl-N-nitrozourey (NMU) potkanom vedie k tvorbe estrogén-dependentných nádorov mliečnej žľazy s potenciálom metastázovať (NMU) alebo bez neho (DMBA) (Boix-Montesinos a kol., 2021). RE, považovaný za fytoestrogén, môže mať agonistické aj antagonistické účinky (Bhat a kol., 2001). To môže byť príčinou, že RE u estrogén-pozitívnych nádorov môže mať rozdielne výsledky. U početných animálnych modelov RE znižoval incidencia nádorov mliečnej žľazy. U DMBA-indukovaných nádorov mliečnej žľazy RE aplikovaný v diéte (100 µg/potkan) signifikantne predĺžil čas do objavenia sa prvých nádorov a zároveň znižoval incidencia a multiplicitu nádorov. Následné analýzy preukázali schopnosť RE potlačiť DMBA-indukovanú zvýšenú expresiu cyklooxygenázy-2 a matrixmetaloпротеinázy-9 ako aj zvýšenú aktivitu NF-κB (Banerjee a kol., 2002). Podobný účinok RE u DMBA-indukovaných nádorov u pot-

kanov dokumentovali aj Whitsett a kol. (2006). RE podávaný v diéte (1 g/kg diéty) 50 dní pred aplikáciou DMBA a následne ešte 18 týždňov po iniciácii mamárnych nádorov výrazne redukoval počet nádorov a zároveň predlžoval dobu do objavenia sa prvých nádorov. Autori predpokladajú, že preventívne podanie RE viedlo k signifikantnému zníženiu proliferácie buniek v duktálnych štruktúrach mliečnej žľazy a tým k zníženej citlivosti k účinku DMBA. Autori neskoršej štúdie sa domnievajú, že protektívny účinok RE v tomto modelovom usporiadaní môže byť spojený so signifikantnou inhibíciou 5-lipoxygenázy, potlačením lipidovej peroxidácie a zabránením poškodeniu DNA (Chatterjee a kol., 2011).

RE podávaný perorálne (10 a 100 mg.kg⁻¹) potkanom Sprague-Dawley signifikantne redukoval incidenciu, multiplicitu a dobu latencie do objavenia sa prvých nádorov mliečnej žľazy aj u NMU-indukovanej karcinogenézy, avšak iba pri vyššej použitej dávke. V dávke 10 mg.kg⁻¹ RE nemal žiadny protektívny účinok (Bhat a kol., 2001). Na druhej strane, prepupertálna aplikácia RE v dávke 10 a 100 mg.kg⁻¹ potkanom Sprague-Dawley viedla k opačným účinkom. Pri vyššej dávke RE bola zvýšená incidencia a multiplicita mamárnych nádorov v porovnaní so skupinou bez RE (Sato a kol., 2003).

Protektívny účinok RE bol dokumentovaný aj na modeli spontánnej mamárnej karcinogenézy u HER-2/neu transgénnych myší, u ktorých vznikajú nádory už v mladom veku. RE podávaný v pitnej vode (cca 4 µg/myš) 11 týždňov signifikantne predlžoval dobu latencie tvorby nádorov ako aj počet a veľkosť nádorov a zároveň znižoval počet metastáz do pľúc. Tento účinok RE bol v priamej korelácii so zníženou expresiou génu HER-2/neu a zvýšenou apoptózou v nádorových bunkách, čo, ako sa domnievajú autori, sú hlavné príčiny protektívneho účinku RE u týchto myší (Provinciali a kol., 2005).

Na druhej strane, rozdielne výsledky v účinku RE boli pozorované pri xenograftovom modeli mamárnej karcinogenézy. Intraperitoneálna aplikácia RE (25 mg.kg⁻¹) počas troch týždňov viedla k signifikantnému zmenšeniu veľkosti nádorov indukovaných apli-

káciou mamárnych nádorových buniek MB-MDA-231(ER α , ER β) atymickým myškám. Tento účinok bol sprevádzaný zníženou angiogenezou a zvýšenou apoptózou nádorových buniek (Garvin a kol., 2006). Nedávna štúdia tiež dokumentovala schopnosť RE potlačiť tvorbu pľúcnych metastáz u myší po aplikácii nádorovej bunkovej línie 4 T1 (trojito negatívny nádor mliečnej žľazy). Autori sa domnievajú, že tento účinok RE je spojený s jeho imunomodulačným účinkom (Han a kol., 2021). Opačné výsledky dokumentovali Ko a kol. (2017), ktorí zistili, že RE v nízkych dávkach stimuloval tvorbu nádorov a tvorbu metastáz u experimentálnych zvierat po aplikácii nádorových bunkových línií. Tento účinok bol spojený so signifikantným zvýšením aktivity Rac, ktorý zohráva dôležitú úlohu v procese migrácie a invazivity nádorov.

Ako už bolo spomínané, biologická dostupnosť perorálne podávaného RE je nízka. Zhao a kol. (2020) použili RE enkapsulovaný v lipozómoch za účelom zlepšenia jeho terapeutického účinku. U myší s nádormi mliečnej žľazy enkapsulovaný RE v dávke 5 mg.kg⁻¹ mal výraznejší účinok ako voľný RE v dávke 10 mg.kg⁻¹ a enkapsulovaný RE v dávke 10 mg.kg⁻¹ inhiboval rast nádorov kompletne. Okrem toho enkapsulácia RE bola spojená s výraznou redukciou nežiaducich účinkov pozorovaných u samotného RE.

Ostatné nádory

Protektívny účinok RE u experimentálnych zvierat bol potvrdený aj u početných ďalších nádorov vrátane nádorov pečene (Rajasekaran a kol., 2011; Lin a kol., 2012); pankreasu (Roy a kol., 2011); prostaty (Seeni a kol., 2008); ovárií (Lee a kol., 2009); pľúc (Malhotra a kol., 2010); ústnej dutiny (Berta a kol., 2010) alebo ezofágu (Woodall a kol., 2009).

Protinádorový účinok resveratrolu u ľudí

Početné *in vitro* a animálne štúdie dokazujúce protinádorový účinok RE akcelerovali záujem o jeho možné využitie aj v terapii nádorových ochorení u ľudí.

Levi a kol. (2005) v retrospektívnej štúdii sledovali výskyt nádorov mliečnej žľazy v závislosti od príjmu RE v období 1993 – 2003 na vzorke takmer 1000

ľudí. Zistili, že zvýšená konzumácia RE z hrozna (ale nie z vína) bola spojená so významným znížením rizika vzniku nádorov mliečnej žľazy.

V súčasnosti je v databáze <https://clinicaltrials.gov/ct2/> evidovaných 18 klinických skúšok zameraných na RE a nádorové ochorenie. Početné z nich boli zamerané na farmakokinetiku RE u ľudí, ktorá je rozdielna od farmakokinetiky u experimentálnych zvierat. Publikované výsledky dokumentujú nízku biologickú dostupnosť RE u ľudí hlavne z dôvodu extenzívneho metabolizmu. Štúdia u zdravých dobrovoľníkov dokumentovala bezpečnosť RE aj pri vysokých dávkach (5 g). Ako však autori štúdie uvádzajú, dosiahnuté plazmatické hladiny RE nemusia byť postačujúce pre systémový protinádorový účinok (Boocock a kol., 2007). Bezpečnosť vysokých dávok RE bola potvrdená aj po opakovanej aplikácii. Brown a kol. (2010) podávali RE v dávkach 0,5 – 5 g zdravým dobrovoľníkom 29 dní. Aj pri najvyššej dávke dobrovoľníci popisovali iba mierny gastrointestinálny dyskomfort. Ďalším dôležitým zistením tejto štúdie bolo, že RE významne znižoval plazmatickú hladinu IGF-1 (inzulínu podobný rastový faktor-1) a IGF-BP-3 (inzulínu podobný rastový faktor viažuci proteín-3), ktoré sa môžu podieľať na všetkých stupňoch nádorovej progresie. Cieľom ďalšej štúdie bolo stanoviť koncentrácie RE a jeho metabolitov v tkanive kolónu a rekta u pacientov s kolorektálnym karcinómom. Autori detekovali tkanivovú koncentráciu RE, ktorá bola dostatočná, aby redukovala proliferáciu nádorových buniek, ako to preukázali detekciou Ki-67, ktorý je považovaný za marker proliferácie (Patel a kol., 2010).

Je známe, že Wnt signálna dráha je, okrem iného, často aktivovaná počas nádorovej progresie (Schatoff a kol., 2017). Nguyen a kol. (2009) publikovali výsledky klinickej štúdie zameranej na vplyv RE a sušeného hroznového prášku (GP) na Wnt signálnu dráhu u pacientov s kolorektálnym karcinómom a u zdravých dobrovoľníkov. Ani RE ani GP nemali žiadny účinok na expresiu génov asociovaných s Wnt signálnou dráhou u pacientov s kolorektálnym nádorom. Na druhej strane RE a GP potlačili expresiu väčšiny gé-

nov asociovaných s uvedenou signálnou dráhou, pričom najvýraznejší účinok bol zistený u pacientov po perorálnom podaní GP v dávke 80 g/deň počas dvoch týždňov. Tento výsledok naznačuje možný potenciál RE/GP v prevencii kolorektálneho karcinómu.

Nízka biologická dostupnosť RE viedla k snahe dosiahnuť zvýšenie jeho plazmatických koncentrácií farmaceutickou úpravou RE. Howells a kol. (2011) vo svojej štúdiu použili mikronizovanú formu RE (SRT501) u pacientov s kolorektálnym karcinómom a hepatálnymi metastázami. SRT501 bol dobre tolerovaný a plazmatické hladiny RE boli viac ako trojnásobne vyššie ako boli publikované pre nemikronizovaný RE. Autori taktiež zistili zvýšenie aktívnej formy kaspázy-3 v nádorových bunkách, čo indikuje zvýšenú apoptózu indukovanú RE.

V klinických štúdiách zameraných na nádory mliečnej žľazy sa Zhu a kol. (2012) zamerali na schopnosť RE ovplyvniť hypermetyláciu promótorových génov u žien s vysokým rizikom vzniku nádorov mliečnej žľazy. Zo štyroch génov (p16, CCND2, APC, a RASSF-1A) autori detekovali pokles metylácie tumor supresorového génu RASSF-1A, ktorý bol pozitívne asociovaný so zvyšujúcou sa plazmatickou koncentráciou RE a jeho metabolitov.

U postmenopauzálnych žien redukcia SHBG (globulín viažuci pohlavné hormóny) sa dáva do súvislosti so zvýšenou adipozitou vedúcou k zvýšeným hladinám estrogénov a k zvýšeniu rizika vzniku nádorov mliečnej žľazy (Key a kol., 2002). Resveratrol u obéznych postmenopauzálnych žien v dávke 1 g/deň počas 12 týždňov zvyšoval koncentráciu SHBG a zároveň upravoval metabolizmus estrogénov, čo môže prispievať k chemopreventívnemu účinku RE.

ZÁVER

Od svojho objavenia v roku 1939 bol pleiotropný účinok RE dokumentovaný v početných štúdiách (Frémont, 2000; Tsai a kol., 2017; Wang, 2020). Z predklinických štúdií je zrejmé, že RE má výrazný potenciál nie iba v chemoprevencii, ale aj v terapii rôznych nádorov.

Na druhej strane existuje relatívne málo informácií o jeho možnom terapeutickom využití u ľudí. Základná otázka, ktorú je potrebné vyriešiť je nízka biologická dostupnosť RE po perorálnom podaní z dôvodu jeho extenzívneho metabolizmu. Z toho dôvodu by sa mal výskum zamerať na iné aplikačné cesty, ako aj na možné využitie nanotechnológií, resp. na syntézu derivátov RE s lepšími farmakokinetickými parametrami, ktoré by zvýšili jeho dostupnosť do cieľových tkanív.

Početné epidemiologické štúdie (Levi a kol., 2005; Sohrab a kol., 2013; Rabassa a kol., 2015) dokumentovali vzťah medzi konzumáciou potravín obsahujúcich RE a zdravotným stavom u ľudí. Otvorenou otázkou však ostáva, do akej miery je za tento účinok zodpovedný samotný RE a v akej miere sa na ňom podieľajú aj ďalšie zložky konzumovanej potravy. Ako ukazuje aj štúdia Nguyena a kol. (2009), celé extrakty rastlinného pôvodu môžu mať signifikantnejší účinok ako samotná izolovaná látka, aj keď tá môže byť najúčinnnejšou zložkou v danom extrakte.

Záverom je možné povedať, že RE preukázal sľubný účinok v terapii nádorových ochorení *in vitro* a *in vivo*, avšak sú potrebné ďalšie klinické a rozsiahlejšie štúdie, aby sme dokázali jeho bezpečnosť a hlavne účinnosť pri liečbe rakoviny.

POĎAKOVANIE

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dopytovo-orientovaný výskum pre udržateľné a inovatívne potraviny, Drive4SIFood 313011V336, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-16-0176. Poďakovanie patrí aj PharmDr. Radke Michalkovej, PhD., za pomoc s grafickou úpravou práce.

ZOZNAM LITERATÚRY

Abu-Amro, K. K., Kondkar, A. A., Chalam, K. V.: Resveratrol and ophthalmic diseases. *Nutrients*,

2016, 8 (4), 200.

Afaq, F., Adhami, V. M., Ahmad, N.: Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003, 186 (1), 28 – 37.

Akter, R., Rahman, H., Kaushik, D., Mittal, V., Uivarosan, D., Nechifor, A. C., Behl, T., Karthika, C., Stoicescu, M., Munteanu, M. A., Bustea, C., Bungau, S.: Chemo-preventive action of resveratrol: Suppression of p53 – a Molecular targeting approach. *Molecules*, 2021, 26 (17), 5325.

Aziz, M. H., Reagan-Shaw, S., Wu, J., Longley, B. J., Ahmad, N.: Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease? *FASEB Journal*, 2005, 19 (9), 1193 – 1195.

Banerjee, S., Bueso-Ramos, C., Aggarwal, B. B.: Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. *Cancer Research*, 2002, 62 (17), 4945 – 4954.

Banez, M. J., Geluz, M. I., Chandra, A., Hamdan, T., Biswas, O. S., Bryan, N. S., Von Schwarz, E. R.: A systemic review on the antioxidant and anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin, and dietary nitric oxide supplementation on human cardiovascular health. *Nutrition Research*, 2020, 78, 11 – 26.

Berta, G. N., Salamone, P., Sprio, A. E., Di Scipio, F., Marinos, L. M., Sapino, S., Carlotti, M. E., Cavalli, R., Di Carlo, F.: Chemoprevention of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch by topical application of resveratrol complexed with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Oral Oncology*, 2010, 46 (1), 42 – 48.

Bhat, K. P., Lantvit, D., Christov, K., Mehta, R. G., Moon, R. C., Pezzuto, J. M.: Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer Research*, 2001, 61 (20), 7456 – 7463.

- Bhattacharya, S., Darjatmoko, S. R., Polans, A. S.: Resveratrol modulates the malignant properties of cutaneous melanoma through changes in the activation and attenuation of the antiapoptotic protooncogenic protein Akt/PKB. *Melanoma Research*, 2011, 21 (3), 180 – 187.
- Boix-Montesinos, P., Soriano-Teruel, P. M., Armiñán, A., Orzáez, M., Vicent, M. J.: The past, present, and future of breast cancer models for nanomedicine development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2021, 173, 306 – 330.
- Boocock, D. J., Faust, G. E., Patel, K. R., Schinas, A. M., Brown, V. A., Ducharme, M. P., Booth, T. D., Crowell, J. A., Perloff, M., Gescher, A. J., Steward, W. P., Brenner, D. E.: Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2007, 16 (6), 1246 – 1252.
- Brown, V. A., Patel, K. R., Viskaduraki, M., Crowell, J. A., Perloff, M., Booth, T. D., Vasilinin, G., Sen, A., Schinas, A. M., Piccirilli, G., Brown, K., Steward, W. P., Gescher, A. J., Brenner, D. E.: Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Research*, 2010, 70 (22), 9003 – 9011.
- Cassier, P. A., Castets, M., Belhabri, A., Vey, N.: Targeting apoptosis in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Cancer*, 2017, 117 (8), 1089 – 1098.
- Davoodvandi, A., Darvish, M., Borran, S., Nejati, M., Mazaheri, S., Reza Tamtaji, O., Hamblin, M. R., Masoudian, N., Mirzaei, H.: The therapeutic potential of resveratrol in a mouse model of melanoma lung metastasis. *International Immunopharmacology*, 2020, 88, 106 905.
- Denton, D., Kumar, S.: Autophagy-dependent cell death. *Cell Death & Differentiation*, 2019, 26 (4), 605 – 616.
- Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xianhui, X., Ao, H., Yu, M., Lin, J., Cui, Q.: The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21 (6), 960.
- Eder, K., Mikulski, D., Molski, M.: Quantum-chemical study on the thermodynamical aspect of competitive inhibition of ribonucleotide reductase by trans-resveratrol, trans-piceatannol and hydroxyurea. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2015, 12, 93 – 102.
- Fan, Y., Li, J., Yang, Y., Zhao, X., Liu, Y., Jiang, Y., Zhou, L., Feng, Y. L., Yu, Y. T., Cheng, Y.: Resveratrol modulates the apoptosis and autophagic death of human lung adenocarcinoma A549 cells via a p53-dependent pathway: Integrated bioinformatics analysis and experimental validation. *International Journal of Oncology*, 2020, 57 (4), 929 – 938.
- Ferruelo, A., Romero, I., Cabrera, P. M., Arance, I., Andrés, G., Angulo, J. C.: Effects of resveratrol and other wine polyphenols on the proliferation, apoptosis and androgen receptorexpression in LNCaP cells. *Actas Urológicas Españolas*, 2014, 38 (6), 397 – 404.
- Frémont, L.: Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, 2000, 66 (8), 663 – 673.
- Garcia, P., Schmiedlin-Ren, P., Mathias, J. S., Tang, H., Christman, G. M., Zimmermann E. M.: Resveratrol causes cell cycle arrest, decreased collagen synthesis, and apoptosis in rat intestinal smooth muscle cells. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2012, 302 (3), G326 – G335.
- Garvin, S., Ollinger, K., Dabrosin, C.: Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts *in vivo*. *Cancer Letters*, 2006, 231 (1), 113 – 122.
- Gong, C., Xia, H.: Resveratrol suppresses melanoma growth by promoting autophagy through inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020, 19 (3), 1878 – 1886.
- Han, X., Zhao, N., Zhu, W., Wang, J., Liu, B., Teng, Y.: Resveratrol attenuates TNBC lung metastasis by down-regulating PD-1 expression on pul-

monary T cells and converting macrophages to M1 phenotype in a murine tumor model. *Cellular Immunology*, 2021, 368, 104 423.

He, S., Yan, X.: From resveratrol to its derivatives: new sources of natural antioxidant. *Current Medicinal Chemistry*, 2013, 20 (8), 1005 – 1017.

Howells, L. M., Berry, D. P., Elliott, P. J., Jacobson, E. W., Hoffmann, E., Hegarty, B., Brown, K. Steward, W. P., Gescher, A. J.: Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases-safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 2011, 4 (9), 1419 –1425.

Hu, Y. Q., Wang, J., Wu, J. H.: Administration of resveratrol enhances cell-cycle arrest followed by apoptosis in DMBA-induced skin carcinogenesis in male Wistar rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2016, 20 (13), 2935 – 2946.

Chang, C. H., Lee, C. Y, Lu, C. C., Tsai, F. J., Hsu, Y. M., Tsao, J. W., Juan, Y. N., Chiu, H. Y., Yang, J. S., Wang, C. C.: Resveratrol-induced autophagy and apoptosis in cisplatin-resistant human oral cancer CAR cells: A key role of AMPK and Akt/mTOR signaling. *International Journal of Oncology*, 2017, 50 (3), 873 – 882.

Chatterjee, M., Das, S., Janarthan, M., Ramachandran, H. K., Chatterjee, M.: Role of 5-lipoxygenase in resveratrol mediated suppression of 7,12-dimethylbenz(α)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats. *European Journal of Pharmacology*, 2011, 668 (1 – 2), 99 – 106.

Chen, A. C., Halliday, G. M., Damian, D. L.: Non-melanoma skin cancer: carcinogenesis and chemoprevention. *Pathology*, 2013, 45 (3), 331 – 341.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., Pezzuto, J. M.: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 1997, 275 (5297), 218 – 220.

Key, T., Appleby, P., Barnes, I., Reeves, G.:

Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *Journal of the National Cancer Institute*, 2002, 94 (8), 606 – 616.

Kim, Y. A., Choi, B. T., Lee, Y. T., Park, D. I., Rhee, S. H., Park, K. Y., Choi, Y. H.: Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncology Reports*, 2004, 11 (2), 441 – 446.

Kim, C. W., Hwang, K. A, Choi, K. C.: Anti-metastatic potential of resveratrol and its metabolites by the inhibition of epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of malignant cancer cells. Review. *Phytomedicine*, 2016, 23 (14), 1787 – 1796.

Ko, J. H., Sethi, G., Um, J. Y., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Kumar, A. P., Bishayee, A., Ahn, K. S.: The role of resveratrol in cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18 (12), 2589.

Lanzilli, G., Fuggetta, M. P., Tricarico, M., Cottarelli, A., Serafino, A., Falchetti, R., Ravagnan, G., Turriziani, M., Adamo, R., Franzese, O., Bonmassar, E.: Resveratrol down-regulates the growth and telomerase activity of breast cancer cells *in vitro*. *International Journal of Oncology*, 2006, 28 (3), 641 – 648.

Lee, M. H., Choi, B. Y., Kundu, J. K., Shin, Y. K., Na, H. K., Surh, Y. J.: Resveratrol suppresses growth of human ovarian cancer cells in culture and in a murine xenograft model: eukaryotic elongation factor 1A2 as a potential target. *Cancer Research*, 2009, 69 (18), 7449 – 7458.

Lee, Y., Shin, H., Kim, J.: *In vivo* anti-cancer effects of resveratrol mediated by NK cell activation. *Journal of Innate Immunity*, 2021, 13 (2), 94 – 106.

Levi, F., Pasche, C., Lucchini, F., Ghidoni, R., Ferraroni, M., La Vecchia, C.: Resveratrol and breast cancer risk. *European Journal of Cancer Prevention*, 2005, 14 (2), 139 – 142.

Lin, H. C., Chen, Y. F., Hsu, W. H., Yang, C. W., Kao, C. H., Tsai, T. F.: Resveratrol helps recove-

ry from fatty liver and protects against hepatocellular carcinoma induced by hepatitis B virus X protein in a mouse model. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 2012, 5 (7), 952 – 962.

Liu, B., Zhou, Z., Zhou, W., Liu, J., Zhang, Q., Xia, J., Liu, J., Chen, N., Li, M., Zhu, R.: Resveratrol inhibits proliferation in human colorectal carcinoma cells by inducing G1/S-phase cell cycle arrest and apoptosis through caspase/cyclin-CDK pathways. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 10 (4), 1697 – 1702.

Luyten, T., Welkenhuyzen, K., Roest, G., Kania, E., Wang, L., Bittremieux, M., Yule, D. I., Parys, J. B., Bultynck, G.: Resveratrol-induced autophagy is dependent on IP₃Rs and on cytosolic Ca²⁺. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 2017, 1864 (6), 947 – 956.

Malhotra, A., Nair, P., Dhawan, D. K.: Modulatory effects of curcumin and resveratrol on lung carcinogenesis in mice. *Phytotherapy Research*, 2010, 24 (9), 1271 – 1277.

Maloney, S. M., Hoover, C. A., Morejon-Lasso, L. V., Prosperi, J. R.: Review, Mechanisms of taxane resistance. *Cancers*, 2020, 12 (11), 3323.

Neagu, M., Caruntu, C., Constantin, C., Boda, D., Zurac, S., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M.: Chemically induced skin carcinogenesis: Updates in experimental models (Review). *Oncology Reports*, 2016, 35 (5), 2516 – 2528.

Nguyen, A. V., Martinez, M., Stamos, M. J., Moyer, M. P., Planutis, K., Hope, Ch., Holcombe, R. F.: Results of a phase I pilot clinical trial examining the effect of plant-derived resveratrol and grape powder on Wnt pathway target gene expression in colonic mucosa and colon cancer. *Cancer Management and Research*, 2009, 1, 25 – 37.

Osmond, G. W., Augustine, C. K., Zipfel, P. A., Padussis, J., Tyler, D. S.: Enhancing melanoma treatment with resveratrol. *Journal of Surgical Research*, 2012, 172 (1), 109 – 115.

Osmond, G. W., Masko, E. M., Tyler, D. S., Freedland, S. J., Pizzo, S.: *In vitro* and *in vivo* evaluation of resveratrol and 3,5-dihydroxy-4'-acetoxy-

-trans-stilbene in the treatment of human prostate carcinoma and melanoma. *Journal of Surgical Research*, 2013, 179 (1), e141 – 148.

Park, D., Jeong, H., Lee, M. N., Koh, A., Kwon, O., Yang, Y. R., Noh, J., Suh, P. G., Park, H., Ryu, S. H.: Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. *Scientific Reports*, 2016, 6, 21 772.

Patel, K. R., Brown, V. A., Jones, D. J., Britton, R. G., Hemingway, D., Miller, A. S., West, K. P., Booth, T. D., Perloff, M., Crowell, J. A., Brenner, D. E., Steward, W. P., Gescher, A. J., Brown, K.: Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Research*, 2010, 70 (19), 7392 – 7399.

Platella, C., Guida, S., Bonmassar, L., Aquino, A., Bonmassar, E., Ravagnan, G., Montesarchio, D., Roviello, G. N., Musumeci, D., Fuggetta, M. P.: Antitumour activity of resveratrol on human melanoma cells: A possible mechanism related to its interaction with malignant cell telomerase. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, 2017, 1861 (11 Pt. A), 2843 – 2851.

Pozo-Guisado, E., Merino, J. M., Mulero-Navarro, S., Lorenzo-Benayas, M. J., Centeno, F., Alvarez-Barrientos, A., Salguero, P. M.: Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB. *International Journal of Cancer*, 2005, 115, 74 – 84.

Provinciali, M., Re, F., Donnini, A., Orlando, F., Bartozzi, B., Di Stasio, G., Smorlesi, A.: Effect of resveratrol on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *International Journal of Cancer*, 2005, 115 (1), 36 – 45.

Rabassa, M., Zamora-Ros, R., Urpi-Sarda, M., Bandinelli, S., Ferrucci, L., Andres-Lacueva, C., Cherubini, A.: Association of habitual dietary resveratrol exposure with the development of frailty in older age: the Invecchiare in Chianti study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2015, 102 (6), 1534 – 1542.

Rajasekaran, D., Elavarasan, J., Sivalingam,

- M., Ganapathy, E., Kumar, A., Kalpana, K., Sakthi-sekaran, D.: Resveratrol interferes with N-nitroso-diethylamine-induced hepatocellular carcinoma at early and advanced stages in male Wistar rats. *Molecular Medicine Reports*, 2011, 4 (6), 1211 – 1217.
- Reagan-Shaw, S., Afaq, F., Aziz, M. H., Ahmad, N.: Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1 hairless mouse skin. *Oncogene*, 2004, 23 (30), 5151 – 5160.
- Renaud, S., de Lorgeril, M.: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart-disease. *Lancet*, 1992, 339, 1523 – 1526.
- Riba, A., Deres, L., Sumegi, B., Toth, K., Szabados, E., Halmosi, R.: Cardioprotective effect of resveratrol in a postinfarction heart failure model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 6 819 281.
- Roy, S. K., Chen, Q., Fu, J., Shankar, S., Srivastava, R. K.: Resveratrol inhibits growth of orthotopic pancreatic tumors through activation of FOXO transcription factors. *PLoS One*, 2011, 6 (9), e25166.
- Sato, M., Pei, R. J., Yuri, T., Danbara, N., Nakane, Y., Tsubura, A.: Prepubertal resveratrol exposure accelerates N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinoma in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Letters*, 2003, 202 (2), 137 – 145.
- Seeni, A., Takahashi, S., Takeshita, K., Tang, M., Sugiura, S., Sato, S. Y., Shirai, T.: Suppression of prostate cancer growth by resveratrol in the transgenic rat for adenocarcinoma of prostate (TRAP) model. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2008, 9 (1), 7 – 14.
- Schatoff, E. M., Leach, B. I., Dow, L. E.: Wnt signaling and colorectal cancer. *Current Colorectal Cancer Reports*, 2017, 13 (2), 101 – 110.
- Schneider, Y., Duranton, B., Gossé, F., Schleiffer, R., Seiler, N., Raul, F.: Resveratrol inhibits intestinal tumorigenesis and modulates host-defense-related gene expression in an animal model of human familial adenomatous polyposis. *Nutrition and Cancer*, 2001, 39 (1), 102 – 107.
- Singh, C. K., Ndiaye, M. A., Ahmad, N.: Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. Review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1852, 1178 – 1185.
- Sohrab, G., Hosseinpour-Niazi, S., Hejazi, J., Yuzbashian, E. Mirmiran, P., Azizi, F.: Dietary polyphenols and metabolic syndrome among Iranian adults. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2013, 64 (6), 661 – 667.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F.: Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71 (3), 209 – 249.
- Szekeres, T., Philipp, S., Fritzer-Szekeres, M., Djavan, B., Jäger, W.: Chemopreventive effects of resveratrol and resveratrol derivatives. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2011, 1215, 89 – 95.
- Tessitore, L., Davit, A., Sarotto, I., Caderini, G.: SHORT COMMUNICATION: Resveratrol depresses the growth of colorectal aberrant crypt foci by affecting *bax* and p21^{CIP} expression. *Carcinogenesis*, 2000, 21 (8), 1619 – 1622.
- Tsai, H. Y., Ho, C. T., Chen, Y. K.: Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2017, 25 (1), 134 – 147.
- Vähätupa, M., Pemmari, T., Junttila, I., Pesu, M., Järvinen, T. A. H.: Chemical-induced skin carcinogenesis model using dimethylbenz[a]anthracene and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (DMBA-TPA). *Journal of Visualized Experiments*, 2019, (154).
- Venkatadri, R., Muni, T., Iyer, A. K. V., Yakisich, J. S., Azad, N.: Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol-induced breast cancer cell death. *Cell Death and Disease*, 2016, 7, e210.
- Wang, L. Y., Zhao, S., Lv, G. J., Ma, X. J., Zhang, J. B.: Mechanisms of resveratrol in the prevention and treatment of gastrointestinal cancer. *World Journal of Clinical Cases*, 2020, 8 (12), 2425

– 2437.

Whitsett, T., Carpenter, M., Lamartiniere, C. A.: Resveratrol, but not EGCG, in the diet suppresses DMBA-induced mammary cancer in rats. *Journal of Carcinogenesis*, 2006, 5, 15.

Woodall, C. E., Li, Y., Liu, Q. H., Wo, J., Martin, R. C.: Chemoprevention of metaplasia initiation and carcinogenic progression to esophageal adenocarcinoma by resveratrol supplementation. *Anticancer Drugs*, 2009, 20 (6), 437 – 443.

Wu, F., Cui, L.: Resveratrol suppresses melanoma by inhibiting NF- κ B/miR-221 and inducing TFG expression. *Archives of Dermatological Research*, 2017, 309 (10), 823 – 831.

Wu, H., Chen, L., Zhu, F., Han, X., Sun, L., Chen, K.: The cytotoxicity effect of resveratrol: Cell cycle arrest and induced apoptosis of breast cancer 4T1 cells. *Toxins (Basel)*, 2019, 11 (12), 731.

Yousef, M., Vlachogiannis, I. A., Tsiani, E.: Effects of resveratrol against lung cancer. *In Vitro and*

in Vivo studies. *Nutrients*, 2017 (11), 1231.

Yu, S., Yin, Y., Wang, Q., Wang, L.: Dual gene deficient models of Apc^{Min/+} mouse in assessing molecular mechanisms of intestinal carcinogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 600 – 609.

Zhao, Y. N., Cao, Y. N., Sun, J., Liang, Z., Wu, Q., Cui, S. H., Zhi, D. F., Guo, S. T., Zhen, Y. H., Zhang, S. B.: Anti-breast cancer activity of resveratrol encapsulated in liposomes. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8 (1), 27 – 37.

Zhou, H. B., Chen, J. J., Wang, W. X., Cai, J. T., Du, Q.: Anticancer activity of resveratrol on implanted human primary gastric carcinoma cells in nude mice. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, 11 (2), 280 – 284.

Zhu, W., Qin, W., Zhang, K., Rottinghaus, G. E., Chen, Y. C., Kliethermes B., Sauter, E. R.: Trans-resveratrol alters mammary promoter hypermethylation in women at increased risk for breast cancer. *Nutrition and Cancer*, 2012, 64 (3), 393 – 400.



**ÚČINOK DIALYZOVATEĽNÉHO LEUKOCYTÁRNEHO EXTRAKTU
NA IMUNITNÉ BUNKY KRVÍ A RAST CÝST U MYŠÍ S INFEKCIOU
ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS PO PERORÁLNOU, SUBKUTÁNNOM A
INTRAPERITONEÁLNOU PODANÍ**

**DIFFERENTIAL ACTIVITY OF HUMAN LEUKOCYTE EXTRACT ON BLOOD
IMMUNE CELLS AND CYST GROWTH IN MICE WITH *ECHINOCOCCUS
MULTILOCULARIS* INFECTION AFTER ORAL, SUBCUTANEOUS AND
INTRAPERITONEAL ROUTES OF ADMINISTRATION**

**Ciglanová Denisa^{1,2}; Jurčacková, Zuzana^{1,2}; Mudroňová, Dagmar²; Dvorožňáková,
Emília¹; Hrčková, Gabriela¹**

¹Parazitologický ústav SAV v. v. i., Hlinkova 3, 040 01 Košice

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

hrcka@saske.sk

ABSTRAKT

Alveolárna echinokokóza (AE) spôsobená larválnym štádiom *Echinococcus multilocularis* je závažné parazitárne ochorenie spojené s imunosupresiou hostiteľa. Sledovali sa účinky humánneho neimúnneho dialyzovateľného leukocytárneho extraktu (DLE) na imunitné bunky v krvi, hmotnosť pečeni a parazitických cýst u myši kmeňa Balb/c po perorálnom (PO), subkutánnom (SC) a intraperitoneálnom podaní (IP). Významné zníženie hmotností cýst a pečeni bolo zaznamenané po PO podaní a mierne zníženie bolo zistené po SC a IP podaní. Perorálna aplikácia DLE viedla k nárastu podielu lymfoidnej populácie, čias-

točne redukovala infekciou vyvolaný pokles populácie B220+ B lymfocytov, pričom jednotlivé cesty aplikácie neovplyvnili zastúpenie CD3+ T lymfocytov. Zastúpenie CD3+CD4+ pomocných T lymfocytov bolo mierne zvýšené a CD3+CD8+ cytotoxických T lymfocytov bolo naopak významne znížené po všetkých spôsoboch aplikácie DLE v porovnaní s infikovanou skupinou. DLE terapia spôsobila pokles CD11b+ myeloidnej populácie buniek v krvi, v rámci ktorej PO aplikácia vyvolala nárast zrelých CD11b+MHCII^{high} monocytov a CD11b-SiglecF+ eozinofilov, pričom početnosť CD11b+SiglecF+ eozinofilov vzrástla po SC a IP podaní. Naša štúdia ukázala, že PO spôsob podávania DLE bol najúčinnnejší na redukciu rastu cýst

parazita. Súčasne viedol k zmierneniu imunosupresie vyvolanej parazitom prostredníctvom stimulácie Th1 typu bunkovej imunity, zníženia Th2/Treg typu imunity a populácie supresorických CD3+CD8+Tc lymfocytov v krvi počas infekcie *E. multilocularis* u myši.

Kľúčové slová: cesty podania; DLE; *Echinococcus multilocularis*; leukocyty; myši

ABSTRACT

Alveolar echinococcosis (AE) caused by the metacestode stage of *Echinococcus multilocularis* is serious parasitic disease associated with the host's immunosuppression. The effects of human non-immune dialyzable leukocyte extract (DLE) on immune cells in blood, the livers and parasitic cysts weight in Balb/c mice after oral (PO), subcutaneous (SC) and intraperitoneal administration (IP) were investigated. The significant reduction in cysts weight was recorded after PO route, whereas moderate reduction was found after SC and IP routes. Peroral application of DLE led to an increase in the proportion of the lymphoid population, partially reduced infection elicited decrease in the population of B220+B lymphocytes, while individual routes of application did not affect the representation of CD3+ T lymphocytes. The proportions of CD3+CD4+ T helper lymphocytes slightly increased and CD3+CD8+ cytotoxic T lymphocytes were significantly reduced after all routes of DLE application compared to the infected group. Compared to infected mice DLE therapy caused a decrease in the CD11b+myeloid cell population. Per os application resulted in an increase in mature CD11b+MHCII^{high} monocytes and CD11b-SiglecF+ "eosinophils", while the proportions of CD11b+SiglecF+ eosinophils increased after SC and IP administration. Our study showed that the PO route of DLE administration was the most effective in reducing parasite cyst growth. At the same time, it led to the reduction of parasite-

induced immunosuppression through stimulation of Th1-type cellular immunity, reduction of Th2/Treg-type immunity, and the population of suppressor CD3+CD8+Tc lymphocytes in the blood during *E. multilocularis* infection in mice.

Key words: administration routes; DLE; *Echinococcus multilocularis*; mice; white blood cells

ÚVOD

Echinokokóza je takmer kozmopolitná zoonóza spôsobená dospelými alebo larválnymi štádiami pásomnic (*Cestoda*), ktoré patria do rodu *Echinococcus* (čľaďade *Taeniidae*) (Wen a kol., 2019). V Európe cirkulujú dva druhy týchto pásomnic, *Echinococcus granulosus* a *Echinococcus multilocularis*, ktorých výskyt bol potvrdený aj na Slovensku (Šnábel a kol., 2000; Antolová a kol., 2009). U ľudí spôsobuje *E. multilocularis* alveolárnu echinokokózu (AE), ktorá je charakterizovaná tvorbou mnohokomorových cýst (Vuitton, 2003; Kern, 2006). Cysty, na rozdiel od cýst *E. granulosus*, nie sú ohraničené od okolitého tkaniva, ich rast je infiltratívny a pripomína malígnu neopláziu pečene (Craig, 2003). Vznik a priebeh infekcie larvami *E. multilocularis* je vždy asymptomatický a môže trvať roky, kým sa lézie stanú zjavnými (Kern a kol., 2017). Bez liečby je AE fatálna vo viac ako 80 % prípadov (Wilson a kol., 1995). Jedinou v súčasnosti dostupnou efektívnou liečbou AE je invazívna chirurgická resekcia, úspech ktorej je obmedzený schopnosťou úplne odstrániť cystu parazita s bezpečným okrajom zdravého tkaniva 2 cm, podobne ako pri onkologickej chirurgii (He a kol., 2015; Hillenbrand a kol., 2017). Chirurgická intervencia je sprevádzaná liečbou benzimidazolmi, a to albendazolom (ABZ) a mebendazolom (MBZ) a medikamentózna terapia je jedinou liečbou, ak chirurgický zákrok nie je možný. Hoci benzimidazoly sú efektívne voči dospelým neproliferujúcim štádiám helmintov, ich aktivita voči AE a CE je hlavne parazitostatická (Schantz a kol., 1983; Vuitton a kol., 2010). Terapia alveolárnej echinokokózy môže byť komplikovaná generalizovanou

imunosupresiou spôsobenou samotným parazitom (Vuitton a kol., 2006). Imunitná odpoveď počas AE je charakterizovaná skorou Th1 odpoveďou, ktorá je postupne nahradená bunkovou a humorálnou zložkou Th2 a T regulačnej imunity, v dôsledku špecifickej imunomodulačnej aktivity parazitických antigénov (Vuitton a Gottstein, 2010; Mendes a kol., 2013; Ma a kol., 2014). V súčasnosti sa skúma niekoľko prístupov zameraných na zlepšenie výsledkov terapie, pričom jedným z nich je kombinovaná terapia, kde sa predpokladá, že imunomodulačná látka, použitá ako adjuvans, zvyšuje účinnosť liečiva prostredníctvom zoslabenia imunosupresie (Gottstein a Hemphill, 2008; Siles-Lucas a kol., 2018).

Dialyzovateľný leukocytárny extrakt (DLE), dostupný pod obchodným názvom IMMODIN, je bunkový homogenát pripravený z dezintegrovaných krvných leukocytov zdravých ľudských darcov. V našich predchádzajúcich štúdiách sme ukázali, že DLE podávaný ako adjuvans k ABZ zvýšil účinnosť lieku prostredníctvom stimulácie Th1 a zoslabenia imunitných reakcií Th2/T-reg typu u myši s modelovou infekciou *Mesocestoides vogae* (Mačák Kubašková a kol., 2018). Prípravok obsahuje biologicky aktívne látky schopné normalizovať špecifickú bunkovú imunitu príjemcu. V štúdiu Zuniga-Navarrete a kol. (2021) autori detegovali štyridsaťosem jedinečných proteínov, ktoré boli klasifikované podľa ich hlavnej funkcie do troch hlavných skupín. Najväčšiu skupinu (14 proteínov, 50 %) tvorili proteíny spojené s imunitnou odpoveďou, ktoré sa môžu priamo alebo nepriamo podieľať na regulácii imunitnej odpovede, vrátane sekrécie cytokínov, ako sú IFN- γ či TNF- α a chemokínov. Okrem toho boli identifikované aj receptory pre parazity alebo mikróby, ktoré majú schopnosť rozpoznať mikroorganizmy a iniciovať ich inhibíciu alebo elimináciu. Druhá rodina proteínov (9 proteínov; 32,1 %) sa podieľa na zápalových reakciách a oprave tkaniva, kým najmenšia skupina proteínov (5 proteínov; 17,9 %) zohráva úlohu v regulácii bunkového rastu. Vo všeobecnosti sa uvádza, že neimúnne DLE pripravené z imunitných buniek ľudí a zvierat, vrátane Immodinu, môžu zlepšiť imu-

nologické parametre počas infekcií, alergií, rakoviny ako aj imunodeficiencií (Viza a kol., 2013). Niekoľko experimentálnych štúdií s použitím DLE ukázalo, že preparát bol účinný aj pri liečbe parazitárnych infekcií, napríklad akútnej leishmaniózy (Delgado a kol., 1981) a alveolárnej echinokokózy (Dvorožňáková a kol., 2009). Sľubná antivírusová aktivita bola preukázaná proti vírusu herpes simplex-1 (HSV-1) a herpes zoster (Viza a kol., 1983). Štúdia Fernández-Ortega a kol. (2004) odhalila schopnosť DLE inhibovať replikáciu HIV *in vitro* v MT4 bunkách, znížiť sekréciu TNF- α a oddialiť progresiu infekcie HIV *in vivo* k AIDS v ranom štádiu infekcie.

Cieľom tejto štúdie bolo porovnanie účinkov neimúnneho DLE na bunkovú imunitnú odpoveď v krvi po rôznych cestách podania, ako aj na zníženie rastu cýst *E. multilocularis* u myši.

MATERIÁL A METODIKY

Experimentálny model a dizajn experimentu

Infekcia *E. multilocularis* je udržiavaná na medzihostiteľoch, pieskomiloch (*Meriones ungulatus*), v akreditovanom zverinci Parazitologického ústavu Slovenskej akadémie vied v Košiciach. Ako experimentálny model sa použili 8-týždňové samce myši kmeňa BALB/c vo veku 8 – 9 týždňov s hmotnosťou cca 20 – 23 g. Myši boli infikované intraperitoneálne protoskolexami (3000/myš) izolovanými z peritoneálnej dutiny gerbíl s 3-mesačnou infekciou. Zdravé, neinfikované myši slúžili ako kontrolná skupina (ZDR) (n = 5). V štúdiu sme použili DLE registrovaný ako imunomodulačný prípravok pod obchodným názvom IMMODIN®, ktorý bol pripravený farmaceutickou spoločnosťou SevaPharma, s. r. o. (Praha, Česká republika) v spolupráci s firmou ImunaPharm, a. s. (Šarišské Michaľany, Slovensko). Infikované myši boli rozdelené do štyroch skupín (n = 5/skupina): neliečené (INF), myši liečené DLE perorálne (PO), myši liečené DLE intraperitoneálne (IP) a skupina myši liečená DLE subkutánne (SC). Liečba sa začala po 4 týždňoch po infekcii (p. i.) a DLE sa podal v 9 dávkach, dvakrát týždenne v množstve 0,2 ml/myš.

Na ďalší deň po skončení liečby boli myši usmrtené a odoberala sa krv a cysty z peritoneálnej dutiny. Krv bola získaná z retroorbitálneho splavu myši do skúmaviek s heparínom a následne boli myši usmrtené cervikálnou dislokáciou. Po otvorení peritoneálnej dutiny sa izolovali cysty parazita, boli zvážené a vypočítala sa priemerná hmotnosť $\pm$ SD pre každú skupinu.

Celkový počet bielych krviniek

Na stanovenie počtu celkových leukocytov bol použitý detekčný Türkov roztok v riedení 1 : 10. Leukocyty boli počítané v Bürkerovej komôrke použitím svetelného mikroskopu Olympus BX51 (Japonsko). Výsledný počet v 1 ml krvi bol vypočítaný vynásobením 1 x 10.

Test fagocytárnej aktivity

In vitro fagocytárna aktivita bola stanovená komerčným kitom Phagotest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Princíp testu spočíva v tom, že sa celá krv inkubuje s opsonizovanými (komplementom a imunoglobulínmi) *E. coli*, ktoré sú značené fluoresceínom (fluoresceín izotiokyanát, FITC). Baktérie sú pohlté fagocytmi a vytvárajú zelený fluorescenčný signál. Vzorky boli analyzované metódou prietokovej cytometrie cytometrom BD FACS Canto (Becton Dickinson Biosciences, Nemecko) a údaje boli analyzované pomocou softvéru FACS Diva (Becton Dickinson Biosciences, Nemecko). Výsledky boli vyjadrené percentom fagocytujúcich buniek v celkovej skúmanej populácii a priemernou intenzitou fluorescencie (MFI).

Prietoková cytometria

Analyzovali sa podiely subpopulácií lymfocytov a myeloidných buniek, vrátane eozinofilov v periférnej krvi. Päťdesiat mikrolitrov heparinizovanej krvi sa odobralo do skúmavky s okrúhlym dnom a bolo značené monoklonálnymi protilátkami inkubáciou v tme počas 20 minút pri izbovej teplote, nasledovala fixácia krvi roztokom BD FACS (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), premytie PBS a resuspendova-

nie v 100 μ l PBS. Vzorky krvi boli najskôr značené monoklonálnymi protilátkami proti povrchovým markerom CD45.2 (PE-Cyanine7, klon 104), CD3 (FITC, klon 17A2) a CD45R-B220 (APC, klon RA3-6B2). Ďalšie vzorky boli značené protilátkami voči CD3 (PerCTeFluor710, klon C 17A2), CD4 (FITC, klon GK1.5) a CD8a (PE, klon 53 – 6.7). Myeloidné subpopulácie sa analyzovali pomocou protilátok voči CD11b (FITC, klon M1/70), MHCII (PECyanine7, klon M5/114.15.2) a CD170 Siglec F (PerCPeFluor 170, klon 1RNM44N). Na meranie a analýzy bol použitý prietokový cytometer BD FACS Canto (Becton Dickinson Biosciences, USA) a hodnotilo sa relatívne percento buniek v rámci 10000 analyzovaných buniek.

Štatistické analýzy

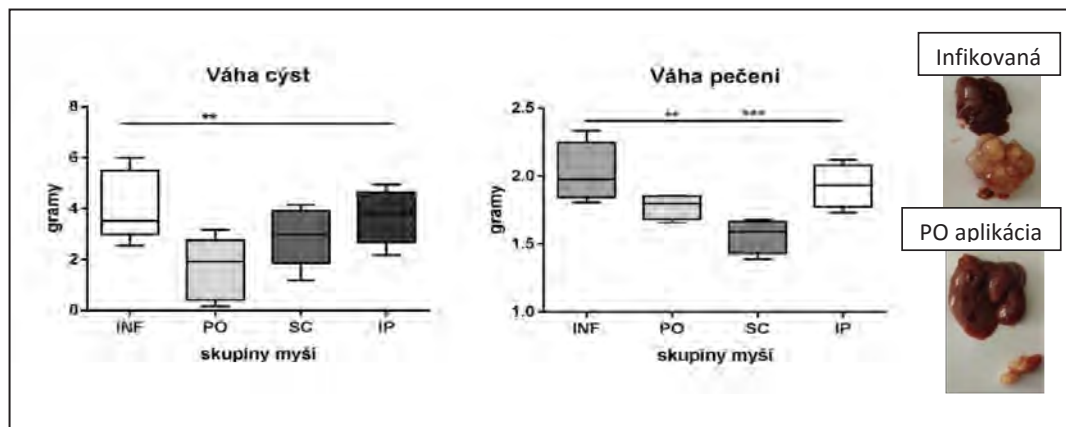
Všetky údaje boli vypočítané ako priemerná hodnota $\pm$ smerodajná odchýlka (SD). Štatistické analýzy boli vykonané pomocou jednosmerného ANOVA testu a rozdiely medzi skupinami boli hodnotené následne Tukeyho *post hoc* testom. Údaje boli analyzované v programe GraphPad Prism (verzia 7) (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) a rozdiely boli považované za štatisticky významné, keď $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

Účinok liečby na redukciiu hmotnosti cýst a pečeni v peritoneálnej dutine myši

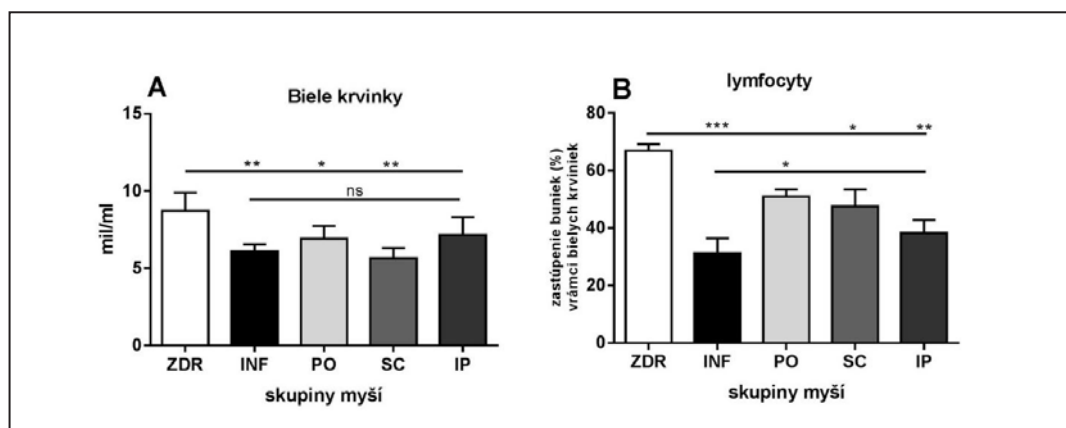
Účinok liečby DLE podávaného intraperitoneálne, subkutánne a perorálne sa porovnával s neliečenými infikovanými (INF) myšami. Priemerná hmotnosť cýst je znázornená na obr. 1A a hmotnosť pečeni na obr. 1B. Signifikantne nižšiu hmotnosť cýst sme zaznamenali v skupine liečenej PO ($p < 0,01$); pričom SC a IP aplikácia DLE viedla len k miernemu zníženiu. Po podávaní DLE bolo zaznamenané aj zníženie hmotností pečeni, najvýznamnejšie po SC aplikácii ($p < 0,001$).

Obr. 1: A – B. Účinky PO, SC a IP podávania DLE na hmotnosť cýst a pečeni infikovaných myši



Čísla predstavujú priemer $\pm$ SD ($n = 5$ myši/skupina). Reprezentatívne obrázky pečene a cysty z infikovanej a PO liečenej myši. Signifikantné rozdiely medzi infikovanými a liečenými myšami sú označené spojnicou, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$

Obr. 2: A – B. Účinky DLE podávania PO, SC a IP cestou na: A/ celkový počet leukocytov v krvi; B/ podiel lymfoidnej populácie v rámci populácie bielych krviniek



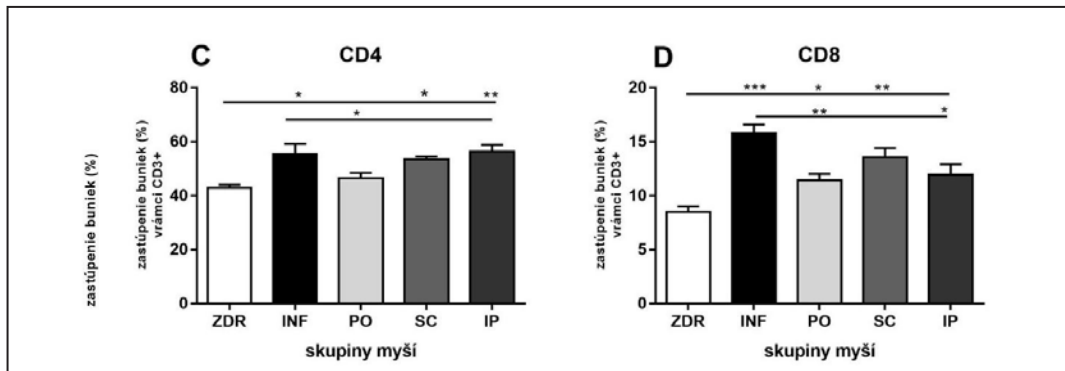
Údaje sú vyjadrené ako priemer $\pm$ SD. Rozdiely medzi skupinami sú znázornené spojovacími čiarami a signifikantne významné rozdiely sú uvedené ako * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns – nesignifikantné

Účinok DLE na leukocyty a proporcie lymfocytov v krvi

Celkové počty leukocytov v INF, PO a SC skupinách boli signifikantne nižšie v porovnaní so zdravou kontrolnou skupinou (viď obr. 2A). Podávanie DLE nemalo významný vplyv na celkový počet bielych krviniek v porovnaní s infikovanou skupinou. Metóda prietokovej cytometrie preukázala, že infekcia

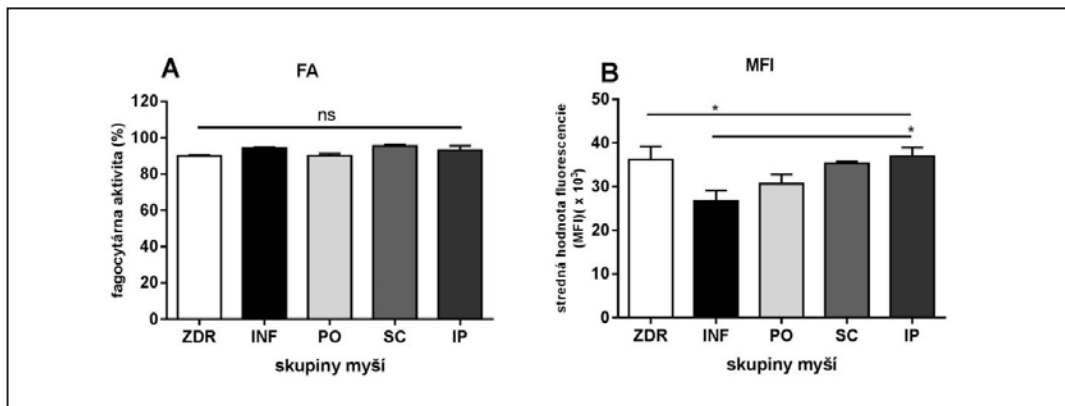
viedla k zníženiu celkového počtu lymfocytov v krvi (viď obr. 2B) a podaním DLE sa čiastočne obnovili ich proporcie, najviac po PO aplikácii ($p < 0,05$). V porovnaní so zdravými myšami boli podiely CD3+ T lymfocytov signifikantne zvýšené u všetkých infikovaných skupín ($p < 0,001$) a PO aplikácia čiastočne potlačila nárast populácie týchto buniek (viď obr. 3A). Opačný trend bol pozorovaný v prípade zastú-

Obr. 3: A – D. Zastúpenie subpopulácií lymfoidných buniek v periférnej krvi kontrolných (ZDR), infikovaných a infikovaných-liečených myší



A/ zastúpenie CD3+T lymfocytov, B /B220+ B lymfocytov; C/ zastúpenie pomocných CD4+T lymfocytov a D/ cytotoxických CD8+lymfocytov. Údaje sú vyjadrené ako priemer $\pm$ SD. Rozdiely medzi skupinami sú znázornené spojovacími čiarami a signifikantne významné rozdiely sú uvedené ako * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns – nesignifikantné

Obr. 4: A – B. Účinky podávania DLE na A/ fagocytárnu aktivitu a B/ MFI monocytov a neutrofilov v periférnej krvi myší



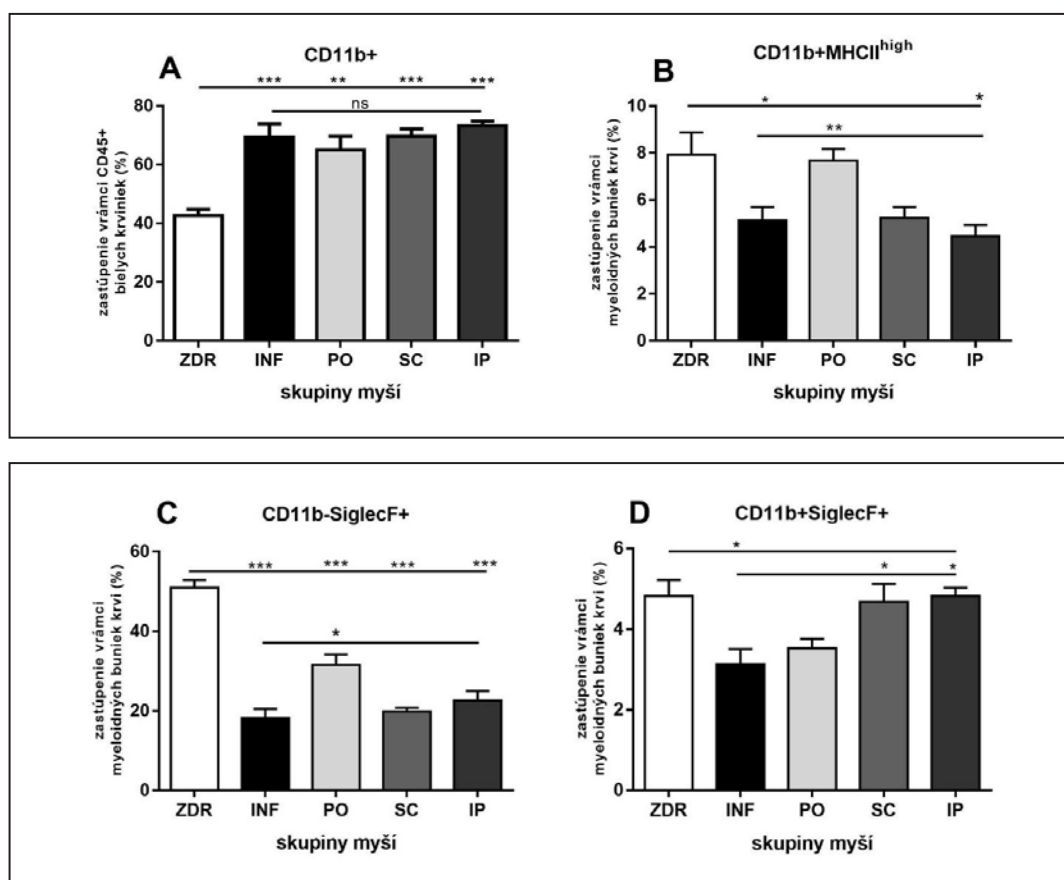
Rozdiely medzi skupinami sú znázornené spojovacími čiarami a signifikantne významné rozdiely sú uvedené ako * $p < 0,05$; ns – nesignifikantné

penia B220+ B lymfocytov u všetkých infikovaných skupín (viď obr. 3B) v porovnaní so zdravými myšami ($p < 0,001$). Perorálna liečba viedla k miernemu zvýšeniu ($p < 0,05$) v porovnaní s infikovanou neliečenou skupinou.

Je známe, že rast cýst je spojený s postupným nahradzovaním Th1 populácie lymfocytov typmi Th2 a T regulačnými, ako súčasť supresie a vnímavosti

k infekcii. Sledovali sa aj účinky DLE v rámci subpopulácií CD3+T lymfocytov na zastúpenie CD4+T pomocných lymfocytov (viď obr. 3C) a CD8+ cytotoxických T lymfocytov (viď obr. 3D). V porovnaní so zdravými myšami boli podiely CD4+ lymfocytov významne nižšie u infikovaných neliečených myší ($p < 0,01$) a všetky spôsoby aplikácie mierne zvýšili zastúpenie CD4+ lymfocytov. Infekcia viedla k vý-

Obr. 5: A – D. Zastúpenie subpopulácií myeloidných buniek v periférnej krvi kontrolných, infikovaných a infikovaných-liečených myší



A/ zastúpenie CD11b+ myeloidných buniek; B/ CD11b+MHCII^{high} monocytov, C/ CD11b-SiglecF+ eozinofiloidných buniek, D/ CD11b+SiglecF+ eozinofilov. Údaje sú vyjadrené ako priemer $\pm$ SD. Rozdiely medzi skupinami sú znázornené spojovacími čiarami a signifikantne významné rozdiely sú uvedené ako * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns – nesignifikantné

znamnému zvýšeniu podielu CD8⁺T lymfocytov ($p < 0,001$) v porovnaní so zdravou kontrolou. Podávanie DLE po všetkých spôsoboch aplikácie viedlo k redukcii zastúpenia týchto buniek v porovnaní s infikovanou skupinou, významne po PO a IP podaní ($p < 0,05$).

Fagocytárna aktivita

Účinok DLE na vrodenu bunkovú imunitu infikovaných myší bol v krvi skúmaný analýzou fagocytózy neutrofilov a monocytov (viď obr. 4A). Fagocytárna aktivita (FA) sa merala ako priemerný počet fluoresceínom značených *E. coli* pohltých jedným

fagocytom. V porovnaní s infikovanými neliečenými myšami DLE významne neovplyvnil FA. Priemerná intenzita fluorescencie (MFI) bola mierne potlačená v infikovanej neliečenej skupine ($p < 0,05$) a iba IP podávanie zvýšilo signifikantne ($p < 0,05$) túto funkciu fagocytov (viď obr. 4B).

Účinok terapie na proporcie myeloidných populácií buniek v krvi

Myeloidné populácie bielych krviniek boli identifikované protilátkami voči markeru CD11b, ktorý je súčasťou povrchového komplementového receptora detegovaného na monocytoch, makrofágoch, NK

bunkách a granulocytoch – väčšinou neutrofiloch a na niektorých populáciách eozinofilov počas zápalu (Stevens a kol., 2007; Lee a kol., 2012). Eozinofily boli identifikované protilátkami voči SiglecF, ktorý je považovaný za špecifický marker pre eozinofily myši (Lee a kol., 2012).

Podiely CD11b⁺ buniek v rámci leukocytov krvi (CD45⁺ buniek) sa výrazne zvýšili vo všetkých infikovaných skupinách v porovnaní so zdravou kontrolou (viď obr. 5A) a podávanie DLE významne nezmenilo ich zastúpenie. Boli analyzované aj proporcie antigén prezentujúcich buniek použitím protilátky voči povrchovému receptoru MHCII (viď obr. 5B). V súlade so supresívnym účinkom infekcie *E. multilocularis* na imunitný systém boli podiely buniek CD11b+MHCII^{high} významne znížené v porovnaní so zdravými myšami ($p < 0,05$) a iba PO aplikácia zmiernila tento supresívny účinok ($p < 0,01$) oproti INF myšiam. Pri analýze buniek pozitívnych na SiglecF a CD11b boli determinované dve subpopulácie, viac zastúpená populácia buniek: CD11b-SiglecF⁺ (viď obr. 5C) a menšia subpopulácia CD11b+SiglecF⁺ (viď obr. 5D). Infekcia signifikantne znížila podiely CD11b-SiglecF⁺ buniek v porovnaní so zdravými myšami ($p < 0,001$) a PO terapia zmiernila tento supresívny účinok. V porovnaní so zdravými myšami bol infekciou vyvolaný pokles eozinofilov CD11b+SiglecF⁺ ($p < 0,05$) menej redukovaný po SC a IP podaní DLE ($p < 0,05$); čo naznačuje rozdielnú úlohu populácií SiglecF⁺ buniek v imunitnej obrane proti metacestódam *E. multilocularis*.

DISKUSIA

Alveolárna echinokokóza (AE) je charakteristická chronickým progresívnym poškodením pečene spôsobeným kontinuálnym rastom a proliferáciou metacestódy. V tejto štúdii boli porovnávané imunomodulačné účinky humánneho DLE (Immodin) pozostávajúceho z biologicky aktívnej zmesi malých proteínových a neproteínových molekúl po troch spôsoboch podania myšiam kmeňa Balb/c s infekciou *E. multilocularis*. V klinických a experimentálnych

štúdiách bol DLE podávaný rôznymi cestami, čo môže ovplyvniť vplyv na imunitnú odpoveď hostiteľa a následnú patológiu. V našej štúdii bolo zistené významné zníženie hmotnosti peritoneálnych cýst po perorálnej aplikácii deviatich dávok DLE v porovnaní s neliečenou infikovanou skupinou. Subkutánne a intraperitoneálne podanie znížilo rast cýst parazita len mierne. S cieľom vysvetliť pozorovaný výsledok podávania DLE po rôznych cestách bol hodnotený účinok na leukocyty krvi. Lymfoidné bunky boli významne znížené u infikovaných neliečených myši a signifikantné zvýšenie proporcií týchto buniek bolo pozorované len po perorálnom podaní. U pacientov s bunkovými deficitmi spojenými s rôznymi patológiami dokázal DLE normalizovať počet CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytov krvi a zvýšiť potlačenú expresiu MHC (major histocompatibility complex) receptora na bunkách prezentujúcich antigén (Rovenský a kol., 2014). V našej štúdii infekcia vyvolala nárast populácie CD3⁺ T buniek a podávanie DLE neovplyvnilo signifikantne ich počet. V rámci celej populácie T lymfocytov infekcia redukovala podiel CD3+CD4⁺ T pomocných lymfocytov a DLE nemal významný účinok. Na rozdiel od toho populácia CD3+CD8⁺ T cytotoxických lymfocytov v krvi bola v infikovanej skupine signifikantne zvýšená a pokles bol pozorovaný po všetkých troch spôsoboch aplikácie DLE. CD4⁺ T pomocné lymfocyty sú po kontakte s parazitickými antigénmi polarizované na jednotlivé podskupiny, ktoré sú definované funkčnými schopnosťami a cytokínovými profilmi určujúcimi progresiu ochorenia. U ľudí je Th2 typ imunitnej odpovede spojený so zvýšenou náchylnosťou k ochoreniu, ktoré vedie k chronickej AE a progresívnemu priebehu u pacientov, zatiaľ čo aktivácia Th1 typu je spojená so zníženým rastom cýst a redukciou infekcie (Vuitton, 2003; Vuitton a kol., 2006). V práci autorov Kizaki a kol. (1993) sa zistilo, že protoskolexy *E. multilocularis* potláčajú proliferáciu CD4⁺ lymfocytov a naopak stimulujú proliferáciu CD8⁺ T lymfocytov, ktoré prispievajú k udržiavaniu imunosupresie. Výsledky našej štúdie môžu naznačovať, že DLE čiastočne znížil aktiváciu a proliferáciu CD8⁺ T buniek so sup-

resorovými účinkami a nevýznamne ovplyvnil celkovú populáciu Th lymfocytov. Naše nepublikované výsledky ukázali, že PO aplikácia viedla k stimulácii Th1 a redukcii Th2/Treg subpopulácií lymfocytov v slezine. Výsledky nášho kolektívu korelujú so štúdiou, v ktorej sa uvádza, že pacienti s progresívnymi parazitickými léziami vykazovali zvýšenú aktiváciu prevažne CD8⁺ T buniek, v porovnaní so zdravými kontrolami a pacientami s vyliečeným ochorením AE (Manfras a kol., 2004).

Imunosupresia vyvolaná metacestódami *Echinococcus* spp. je veľmi zložitý proces, pri ktorom sú jednotlivé bunky myeloidnej línie silne ovplyvnené tak na funkčnej, ako aj fenotypovej úrovni. Ako je znázornené na obr. 4A – B, ani infekcia, ani podávanie DLE neovplyvnili podiely fagocytujúcich buniek v porovnaní so zdravými myšami. Ukázalo sa, že krvné monocytov slúžia ako doplnok ku Kupfferovým bunkám a môžu sa podieľať na imunitnej odpovedi Th1 a Th2 typu, polarizáciou na makrofágy M1 alebo M2 typu v rôznych štádiách infekcie (Li a kol., 2020). Aby sa zistilo, či terapia DLE zmenila pomery monocytov a eozinofilov, krvné leukocyty sa označili protilátkami proti povrchovým markerom CD11b, MHCII a SiglecF. Myši reagovali v 9. týždni po infekcii významne zvýšeným podielom CD11b⁺ myeloidných buniek a proporcie zrelej CD11b⁺MHCII^{high} monocytov sa znížili v porovnaní so zdravými myšami. Pan a kol. (2013) uvádzajú, že v priebehu jedného roka infekcie *E. granulosus* sa výrazne zvýšilo zastúpenie CD11b⁺/Gr-1⁺ myeloidných supresorových buniek v krvi a slezine, a tieto bunky mali zníženú expresiu MHCII, čo naznačuje poškodenie antigén prezentujúcej kapacity. DLE významne nezmenil podiely CD11b⁺ myeloidných buniek, ale PO a SC aplikácie viedli k nárastu zrelej CD11b⁺MHCII^{high} monocytov. Zvýšené počty eozinofilov v krvi sú často pozorované počas mnohých infekcií pásomnicami. V prípade infekcie *E. multilocularis* veľmi nízke počty eozinofilov v krvi sú výsledkom proteolytického pôsobenia E/S produktov parazita voči eotaxínu, ktorý spúšťa mobilizáciu týchto buniek do miesta infekcie (Mejri a Gottstein, 2009).

V krvi myši s alveolárnou echinokokózou sme prietokovou cytometriou identifikovali dve populácie buniek CD11b-SiglecF⁺ a CD11b⁺SiglecF⁺, obe boli významne nižšie u infikovaných myši v porovnaní so zdravými myšami, ako je znázornené na obr. 5C a D. Eozinofily majú na svojom povrchu viaceré markery vrátane SiglecF (Zhang a kol., 2004) a CD11b integrín, ktorý je súčasťou komplementového receptora C3. Stevens a kol. (2007) opísali v pľúcnom parenchýme zdravých myši a myši senzibilizovaných ovalbumínom dve populácie, konkrétne CD11b⁺SiglecF⁺ eozinofily a CD11b-SiglecF⁺ pľúcne makrofágy. Keďže u naivných myši krvné monocytov predstavujú iba 2 – 6 % bielych krviniek, predpokladáme, že protilátka anti-SiglecF sa môže viazať aj na iné typy buniek, ktorým chýba marker CD11b, ako sú lymfocyty, alebo CD11b-SiglecF⁺ je populácia fenotypicky odlišných eozinofilov. Je potrebné poznamenať, že DLE podávaný PO významne zvýšil túto populáciu v krvi, čo naznačuje, že tento typ eozinofilov pravdepodobne prispel k najvyššej redukcii cýst. Populácia eozinofilov CD11b⁺SiglecF⁺ tvorila v krvi minoritnú populáciu, podobne ako to bolo zistené v inej štúdii (Yuan a kol., 2016) a bola zvýšená po SC a IP aplikácii, ale nie po PO podaní. Mechanizmus pôsobenia týchto typov eozinofilov v imunitnej obrane voči infekcii *E. multilocularis* je pravdepodobne odlišný ako v prípade CD11b-SiglecF⁺ eozinofilov a vyžaduje si ďalšie štúdium.

Neimúnny humánný DLE použitý v tejto štúdii obsahuje veľké množstvo malých molekúl proteínového a neproteínového charakteru až do 10 kDa s rôznymi biologickými a imunomodulačnými funkciami, ktoré, ako táto štúdia ukázala, sa prejavujú v závislosti od kinetiky absorpcie. Perorálne podávané liečivá sa primárne absorbujú v tenkom čreve, kde sú molekuly absorbované bunkovým epitelom jedným alebo viacerými transportnými mechanizmami, v závislosti od ich hydro/lipofilicity a molekulárneho charakteru. Po prechode črevným epitelom väčšina molekúl liečiva prechádza priamo do portálnej žily, ktorá ich prenáša do pečene a následne do systémového obehu (DeSesso a Jacobson, 2001).

Subkutánne podávanie je bežne používaný spôsob aplikácie, najmä pre molekuly, kde nízka biologická dostupnosť vylučuje perorálne použitie a veľkosť proteínov, liečiv a iných zlúčenín je kľúčovým determinantom absorpcie krvnou a lymfatickou cestou (McLennan a kol., 2005). Po IP podaní veľký povrch, mikrokľky na mezoteliálnych bunkách a bohaté krvné zásobenie uľahčujú rýchlu absorpciu látok (Kuzlan a kol., 1997). Experimentálne štúdie naznačujú, že malé až stredne veľké molekuly (MW – molekulová hmotnosť < 5000 Da) a tekutiny sú prevažne absorbované viscerálnou časťou peritonea, kde difúzia cez slezinové, dolné a horné mezenterické tepny odvádza tieto molekuly do portálnej žily (Williams a White, 1986). Na druhej strane, veľké molekuly (MW > 5000 Da), proteíny, krv a imunitné bunky sú vychytávané lymfatickým systémom (Surbone a Myers, 1986).

ZÁVER

Výsledky tejto štúdie naznačujú, že kinetika črevnej absorpcie molekúl po podaní DLE perorálnou cestou v priebehu infekcie *E. multilocularis* u myši uprednostňovala ich efektívnejšie interakcie s bunkami rôznych kompartmentov imunitného systému, najmä bielych krviniek. Zdá sa, že najvýznamnejší pokles hmotnosti cýst súvisel s významnou stimuláciou Th1 typu imunity, súbežne s redukciou Th2/Treg imunitnej odpovede, ktorá sa podieľa na imunosupresii. Predpokladáme, že po SC a IP podávaní DLE absorpcia niektorých veľkých molekúl a proteínov by mohla byť spomalená v regionálnych lymfatických uzlinách. To pravdepodobne viedlo len k miernej stimulácii odpovede typu Th1 a k významnému zvýšeniu podielu CD11b+SiglecF eozinofilov v krvi.

POĎAKOVANIE

Štúdia bola realizovaná v rámci projektu APVV 17-0410 a čiastočne v rámci projektu VEGA č. 02/0033/21.

Autori touto cestou ďakujú farmaceutickej firme

ImunaPharm, a. s. za poskytnutie prípravku IMMODIN (DLE) na výskumné účely.

ZOZNAM LITERATÚRY

Antolová, D., Reiterová, K., Miterpáková, M., Dinkel, A., Dubinský, P.: The first finding of *Echinococcus multilocularis* in dogs in Slovakia: an emerging risk for spreading of infection. *Zoonoses Public Health*, 2009, 56 (2), 53 – 58.

Craig, P.: *Echinococcus multilocularis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2003, 16 (5), 437 – 444.

Delgado, O., Romano, E. L., Belfort, E., Pifano, F., Scorza, J. V., Rojas, Z.: Dialyzable leukocyte extract therapy in immunodepressed patients with cutaneous leishmaniasis. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1981, 19 (3), 351 – 359.

DeSesso, J. M., Jacobson, C. F.: Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats *Food and Chemical Toxicology*, 2001, 39 (3), 209 – 228.

Dvorožňáková, E., Porubcová, J., Ševčíková, Z.: Immune response of mice with alveolar echinococcosis to therapy with transfer factor, alone and in combination with albendazole. *Journal of Parasitology Research*, 2009, 105 (4), 1067 – 1076.

Fernández-Ortega, C., Dubed, M., Ramos, Y., Navea, L., Alvarez, G., Lobaina, L., López, L., Casillas, D., Rodríguez, L.: Non-induced leukocyte extract reduces HIV replication and TNF secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 325 (3), 1075 – 1081.

Gottstein, B., Hemphill, A.: *Echinococcus multilocularis*: the parasite-host interplay. *Experimental Parasitology*, 2008, 119 (4), 447 – 452.

He, Y. B., Yao, G., Tuxun, T., Bai, L., Li, T., Zhao, J. M., Zhang, J. H., Wen, H.: Efficacy of radical and conservative surgery for hepatic cystic echinococcosis: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8 (5), 739 – 748.

Hillenbrand, A., Gruener, B., Kratzer, W.,

- Kern, P., Graeter, T., Barth, T. F., Buttenschoen, K., Henne-Bruns, D.: Impact of safe distance on long-term outcome after surgical therapy of alveolar echinococcosis. *World Journal of Surgery*, 2017, 41 (4), 1012 – 1018.
- Kern, P., Wen, H., Sato, N., Vuitton, D. A., Gruener, B., Shao, Y., Delabrousse, E., Kratzer, W., Bresson-Hadni, S.: WHO classification of alveolar echinococcosis: principles and application. *Parasitology International*, 2006, 55, 283 – 287.
- Kern, P., Da Silva, A. M., Akhan, O., Müllhaupt, B., Vizcaychipi, K. A., Budke, C., Vuitton, D. A.: The echinococcoses: diagnosis, clinical management and burden of disease. *Advances in Parasitology*, 2017, 96, 259 – 369.
- Kizaki, T., Ishige, M., Bingyan, W., Day, N. K., Good, R. A., Onoe, K.: Generation of CD8+ suppressor T cells by protoscoleces of *Echinococcus multilocularis* in vitro. *Immunology*, 1993, 79 (3), 412 – 417.
- Kuzlan, M., Pawlaczyk, K., Tobis, K. W., Korybalska, K., Breborowicz, A., Oreopoulos, D. G.: Peritoneal surface area and its permeability in rats. *Peritoneal Dialysis International*, 1997, 17 (3), 295 – 300.
- Lee, J. J., Jacobsen, E. A., Ochkur, S. I., McGarry, M. P., Condjella, R. M., Doyle, A. D., Lee, N. A.: Human versus mouse eosinophils: “that which we call an eosinophil, by any other name would stain as red”. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2012, 130 (3), 572 – 584.
- Li, B., Qi, X., Liu, Y., Yan, Y., Shan, J., Cai, X., Ma, X.: Monocyte-derived macrophages: the supplements of hepatic macrophage in *Echinococcus multilocularis* infected mice. *Immunity, Inflammation and Disease*, 2020, 10 (10), e699.
- Ma, X., Wang, L., Zhao, H., Pang, N., Zhang, F., Jiang, T., Liu, X., Mamuti, W., Wen, H., Ding, J.: Th17 cells are associated with the Th1/Th2-cell balance during *Echinococcus multilocularis* infection. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 10 (1), 236 – 240.
- Mačák Kubašková, T., Mudroňová, D., Velebný, S., Hřčková, G.: The utilisation of human dialyzable leukocyte extract (IMMODIN) as adjuvant in albendazole therapy on mouse model of larval cestode infection: Immunomodulatory and hepatoprotective effects. *International Immunopharmacology*, 2018, 65, 148 – 158.
- McLennan, D. N., Porter, C. J., Charman, S. A.: Subcutaneous drug delivery and the role of the lymphatics. *Drug Discovery Today. Technologies*, 2005, 2 (1), 89 – 96.
- Mejri, N., Gottstein, B.: *Echinococcus multilocularis* metacestode metabolites contain a cysteine protease that digests eotaxin, a CC pro-inflammatory chemokine. *Parasitology Research*, 2009, 105 (5), 1253 – 1260.
- Mendes, E. A., Mendes, T. A., dos Santos, S. L., Menezes-Souza, D., Bartholomeu, D. C., Martins, I. V., Silva, L. M., Lima, W. dos S.: Expression of IL-4, IL-10 and IFN- γ in the liver tissue of cattle that are naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 2013, 95 (1-2), 177 – 182.
- Pan, W., Zhou, H.-J., Shen, Y.-J., Wang, Y., Xu, Y.-X.: Surveillance on the status of immune cells after *Echinococcus granulosus* protoscoleces infection in Balb/c mice. *PLoS ONE*, 2013, 8 (3), e59746.
- Rovenský, J., Blažíčková, S., Hrubíško, M. (Eds.). *Transfer faktor v klinickej praxi včera a dnes* [Transfer factor in clinical practice – yesterday and today]. 1st edn., Bratislava: SAP-Slovak Academic Press s. r. o., 2014, 195 s.
- Schantz, P. M., Wilson, J. F., Wahlquist, S. P., Boss, L. P., Rausch, R. L.: Serologic tests for diagnosis and post-treatment evaluation of patients with alveolar hydatid disease (*Echinococcus multilocularis*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1983, 32 (6), 1381 – 1386.
- Siles-Lucas, M., Casulli, A., Cirilli, R., Carmena, D.: Progress in the pharmacological treatment of human cystic and alveolar echinococcosis: Compounds and therapeutic targets. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 2018, 12 (4), e0006422.
- Šnábel, V., D’Amelio, S., Mathiopoulou, K., Turčeková, L., Dubinský, P.: Molecular evidence for the presence of a G7 genotype of *Echinococcus gra-*

nulosus in Slovakia. *Helminthologia*, 2000, 74 (2), 177 – 181.

Stevens, W. W., Kim, T. S., Pujanauski, L. M., Hao, X., Braciale, T. J.: Detection and quantitation of eosinophils in the murine respiratory tract by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 2007, 327 (1 – 2), 63 – 74.

Surbone, A., Myers, C. E.: Principles and practice of intraperitoneal therapy. *Value in Health Regional Issues*, 1986, 40, 14 – 25.

Viza, D., Rosenfeld, F., Phillips, J., Vich, J. M., Denis, J., Bonissent, J. F., Dogbe, K.: Specific bovine transfer factor for the treatment of herpes infections. In *Immunobiology of Transfer Factor*. Academic Press, 1983, 245 – 259.

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

Vuitton, D. A.: The ambiguous role of immunity in echinococcosis: protection of the host or of the parasite? *Acta Tropica*, 2003, 85 (2), 119 – 132.

Vuitton, D. A., Zhang, S. L., Yang, Y., Godot, V., Beurton, I., Mantion, G., Bresson-Hadni, S.: Survival strategy of *Echinococcus multilocularis* in the human host. *Parasitology International*, 2006, 55, 51 – 55.

Vuitton, D. A., Gottstein, B.: *Echinococcus multilocularis* and its intermediate host: a model of parasite-host interplay. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 123 – 193.

Wen, H., Vuitton, L., Tuxun, T., Li, J., Vuitton, D. A., Zhang, W., McManus, D. P.: Echinococcosis: advances in the 21st century. *Clinical Microbiology Reviews*, 2019, 13, 32 (2), e00075-18.

Williams, R., White, H.: The greater omentum: its applicability to cancer surgery and cancer therapy. *Current Problems in Surgery*, 1986, 23 (11), 795 – 865.

Wilson, J. F., Rausch, R. L., Wilson, F. R.: Alveolar hydatid disease. Review of the surgical experience in 42 cases of active disease among Alaskan Eskimos. *Annals of Surgery*, 1995, 221 (3), 315 – 323.

Yuan, M., Luo, Y., Xin, Q., Gao, H., Zhang, G., Jing, T.: Efficacy of osthole for *Echinococcus granulosus in vitro* and *Echinococcus multilocularis in vivo*. *Veterinary Parasitology*, 2016, 226, 38 – 43.

Zhang, J. Q., Biedermann, B., Nitschke, L., Crocker, P. R.: The murine inhibitory receptor Siglec-E is expressed broadly on cells of the innate immune system whereas mSiglec-F is restricted to eosinophils. *European Journal of Immunology*, 2004, 34 (4), 1175 – 1184.

Zuniga-Navarrete, F., Zavala-Meneses, S.G., Zelnik, V., Kopacek, J., Skultety, J.: Initial proteomic characterization of IMMODIN, commercially available dialysable leukocytes extract. *Chemical Papers*, 2021, 75, 1959 – 1968.



HODNOTENIE BIOLOGICKEJ AKTIVITY PLODOV ROSA CANINA L.

EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF ROSA CANINA L. FRUITS

Bačkorová, Miriam; Lukáčová, Katarína

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

miriam.backorova@uvlf.sk

ABSTRACT

Ruža šípová (*Rosa canina* L.) je celosvetovo rozšírený trváci ker, známy svojimi antibakteriálnymi, protizápalovými a antioxidantnými vlastnosťami. Predložená štúdia sa zaoberá stanovením a porovnaním biologickej aktivity plodov ruže šípovej (*Cynosbati fructus*), pochádzajúcich z jedenástich lokalít Slovenska. Antioxidantná aktivita bola stanovená pomocou metódy FRAP, DPPH radikálu a sledovalo sa celkové množstvo polyfenolov. Okrem antioxidantnej aktivity sa skúmal aj obsah chlorofylu a (C_a), chlorofylu b (C_b) a karotenoidov (C_c). Obsah celkových polyfenolov bol stanovený v hodnotách 108,9 mg/100 g až 268,9 mg/100 g sušených plodov. Antioxidantná aktivita bola v 11 vzorkách stanovená v hodnotách 215,3 až 232,9 $\mu\text{mol.l}^{-1} \text{Fe}^{2+}$. Využitím DPPH radikálu bola určená antioxidantná aktivita v percentách úbytku v rozmedzí 77,14 % – 90,07 %. Obsah celkových karotenoidov sa pohyboval v hodnotách do 0,33 mg/

suchú hmotnosť. Terapeutický účinok plodov ruže šípovej (šípok) bol potvrdený vysokou antioxidantnou schopnosťou a vysokým obsahom celkových polyfenolov.

Kľúčové slová: antioxidantná aktivita; DPPH; FRAP; chlorofyly; *Rosa canina* L.

ABSTRACT

Rosehip (*Rosa canina* L.) is a worldwide widespread perennial shrub, known for its antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant properties. The presented study deals with the determination and comparison of the biological activity of the fruits of the dog rose (*Cynosbati fructus*), originating from eleven locations in Slovakia. The antioxidant activity was determined using the FRAP method, DPPH radical, and the total amount of polyphenols was monitored. In addition to antioxidant activity, the content of chlorophyll a (C_a),

chlorophyll b (C_b) and carotenoids (C_c) was also examined. The content of total polyphenols was determined at values of 108.9 mg/100 g to 268.9 mg/100 g of dried fruits. The antioxidant activity was determined in the 11 samples at values of 215.3 to 232.9 $\mu\text{mol.l}^{-1} \text{Fe}^{2+}$. Using the DPPH radical, the antioxidant activity was determined in the percentage of decrease in the range of 77.14 % – 90.07 %. The content of total carotenoids varied between 0.33 mg/dry weight. The therapeutic effect of rose hips (fruits) was confirmed by their high antioxidant capacity and high content of total polyphenols.

Key words: antioxidation activity; DPPH; FRAP; *Rosa canina* L.

ÚVOD

Ruža šípová (*Rosa canina* L.) je trváci, vzpriamený, ostnatý ker, ktorý dorastá do výšky 1,5 – 3,5 m. Priame zelené konáriky obsahujú dlhé internódiá. Ostne (trnie) sú pevné, hákovité alebo zakrivené. Listy sú nepárno-perovito zložené z 5 – 7 lístkov. Korunné lupienky sú biele až svetloružové, zriedka tmavoružové a majú veľkosť 15 – 25 mm (Ercisli, 2005). Kvety kvitnú v júni. Plodom je plodstvo nažiek, ktoré sa označuje ako šípka, s dĺžkou 10 – 20 mm, ktorá má vajcovitý, až guľatý tvar. Plody majú svetločervené až tmavočervené sfarbenie, lesklý a vráskavý povrch (Mártonfi, 2013).

Liekopisnú drogu *Rosae pseudo-fructus* (nepravý plod ruže) tvorí kvetná čiaska so zvyškami uschnutého kalicha, bez prítomnosti nažiek druhov *Rosa canina* L. – ruža šípová, *R. pendulina* – ruža previsnutá a ďalších druhov z čeľade *Rosaceae*. Európsky liekopis udáva minimálny obsah kyseliny askorbovej 0,3 %. Z hľadiska dôležitosti táto liekopisná droga nemá praktický význam, preto sa používa droga bez odstránenia nažiek, a to šípka *Cynosbati fructus*. Šípky obsahujú biologicky aktívne zlúčeniny ako sú sacharidy, organické kyseliny, pektíny, flavonoidy, triesloviny, karotenoidy, vitamíny (najmä vitamín C a tiež B_1 , B_2 , B_3 ,

K, P, silice) (Nagy a kol., 2017).

Rosa canina L. je známa vysokým obsahom fenolov. O týchto zlúčeninách je zrejme, že majú antioxidačné, antimutagénne a antiproliferatívne účinky. Polyfenolové zlúčeniny sú pôsobiace antioxidačné látky proti rozvoju civilizačných ochorení. *Cynosbati fructus* znižujú hladinu cholesterolu v krvi. Karotén obsiahnutý v plodoch má pozitívny vplyv na imunitný systém organizmu. Vitamín K zlepšuje zrážanlivosť krvi a pomáha pri tvorbe protrombínu. Vitamín P posilňuje steny kapilár a zlepšuje absorpciu vitamínu C (Kiliçgün a Altiner, 2010).

Plody ruže šípovej sa tradične využívajú v prevencii a terapii nachladnutí, ale aj iných infekcií, tiež ako diuretikum a na liečbu rôznych zápalových ochorení. Tradičná ľudová medicína a vedecké štúdie odhalili potenciál výživových a terapeutických výhod prírodných antioxidantov. Obsahové látky šípok sú nositeľmi adstringentných, cholagogénnych, choleretických, diuretických, antiulceróznych a antioxidačných vlastností. Pôsobia tiež ako antiarytmiká (Roman a kol., 2013).

Cieľom predloženej štúdie bolo zistiť celkový obsah polyfenolov, kvantitatívne stanovenie chlorofylu *a* (C_a), chlorofylu *b* (C_b) a karotenoidov. Antioxidačná aktivita sa stanovila využitím metódy FRAP a pomocou DPPH radikálu v 11 vzorkách plodov *Rosa canina* L., pochádzajúcich z rozdielnych oblastí Slovenska.

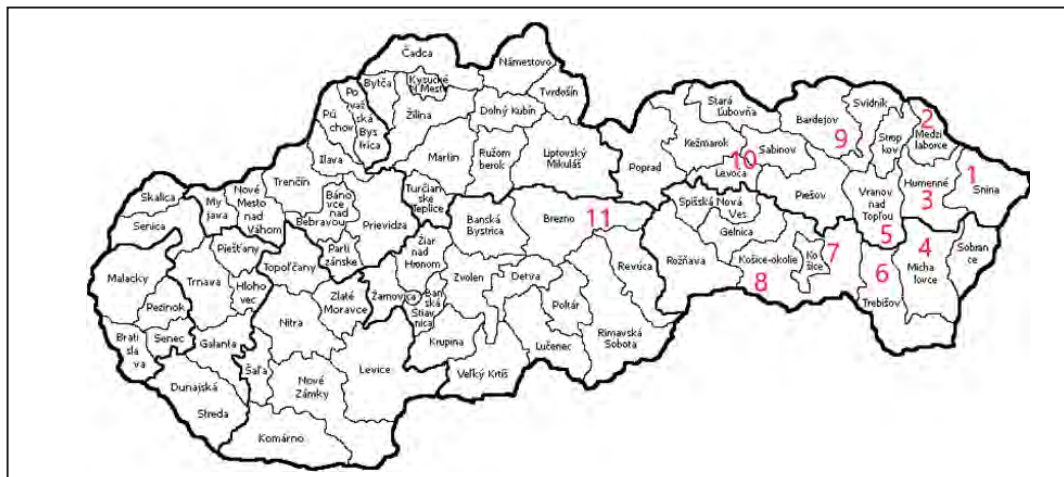
MATERIÁL A METÓDY

V experimentoch boli použité plody ruže šípovej zbierané v rovnakom termíne, z voľne rastúcich kríkov Košického, Prešovského a Banskobystrického kraja (vid' obr. 1). Nazbierané plody boli následne sušené umelým spôsobom v sušičke (Concept SO1030, Trenčín) pri teplote do 60 °C.

Príprava extraktov pre stanovenie antioxidačnej aktivity

Sušené plody ruže šípovej boli podrvené v trecej miske a rozomleté na menšie častice pomocou mixé-

Obr. 1: Mapa miest zberu plodov ruže šípacej



1. Snina, 2. Medzilaborce, 3. Humenné, 4. Strážske, 5. Vranov nad Topľou, 6. Sečovce, 7. Košice, 8. Rozhanovce, 9. Sabinov, 10. Levoča, 11. Brezno

ra. Následne sa 5 g drogy varilo vo vodnom kúpeli s objemom 100 ml po dobu 15 minút. Takto pripravený extrakt bol prefiltrovaný cez vatú do odmernej banky a objem bol doplnený destilovanou vodou na 50 ml. Rovnakým postupom sa pripravilo spolu 11 roztokov na analýzu.

Stanovenie celkového obsahu polyfenolov

Pre prípravu meraných roztokov bolo do skúmaviek napipetovaných 250 μ l roztoku, ktorý bol pripravený zmiešaním Folin-Ciocalteuho činidla a destilovanej vody v rovnakom pomere. Následne sa do každej skúmavky napipetovalo 500 μ l 20 % roztoku uhličitanu sodného a 4 ml destilovanej vody. Pripravené roztoky sa inkubovali v tme po dobu 20 minút. Do pripravených roztokov sa napipetovalo 250 μ l z každého extraktu. Pripravené vzorky sa centrifugovali pri 3000 rpm po dobu 10 minút. Do kvety sa odobralo 100 μ l supernatantu, pridalo sa 900 μ l vody a merala sa absorbancia (A) pri 750 nm, oproti vode ako kontrolnej vzorke (Naczka a Shahidi, 2006). Výsledky boli vyjadrené ako ekvivalent kyseliny galovej GAE v mg/100 g. Meranie absorbancií sa uskutočnilo pomocou spektrofotometra (UV-VIS – Beckman DU530, USA).

Stanovenie antioxidačnej aktivity FRAP metódou

TPTZ pracovný roztok bol čerstvo pripravený a pozostával zo zmesi TPTZ roztoku (koncentrácia 0,01 mol.l⁻¹ v kyseline chlorovodíkovej, s koncentráciou 0,04 mol.l⁻¹), z roztoku chloridu železitého s koncentráciou 0,02 mol.l⁻¹ a destilovanej H₂O v pomere 1 : 1 : 10. Vzorka s objemom 100 μ l bola zmiešaná s 1,5 ml destilovanej H₂O a absorbancia zmesi sa merala pri vlnovej dĺžke 593 nm s označením ako A₀. Zmiešaním 100 μ l vzorky s pracovným roztokom TPTZ s objemom 1,5 ml bola po 4 minútach zmeraná absorbancia a označená ako A_{4min}. Ako štandard bol použitý roztok síranu železnatého s koncentráciou 100 μ mol.l⁻¹. Meranie absorbancií sa uskutočnilo pomocou spektrofotometra (UV-VIS – Beckman DU530, USA). Antioxidačná aktivita bola vyjadrená pomocou vzťahu vo FRAP jednotkách, pričom 1 FRAP jednotka = 100 μ mol.l⁻¹ Fe²⁺ TPTZ (Aktumsek a kol., 2011).

$$\text{FRAP} = \frac{A_{\text{vzorka}} (A_0 - A_{4\text{min}})}{A_{\text{štandard}} (A_0 - A_{4\text{min}})}$$

Stanovenie antioxidačnej aktivity DPPH metódou

Metóda DPPH je založená na princípe redukcie DPPH radikálu (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) a vzniká DPPH-H, pričom dochádza k zmene farby z fialovej na žltú, zodpovedajúcej vzniknutému hydrazínu (Pyrzynska a Pekal, 2013). Zásobný roztok DPPH (0,1 mmol.l⁻¹) bol pripravený rozpustením 2 mg DPPH (Sigma Aldrich, USA) v kryštalickej forme v 100 ml metanolu. Kontrolný roztok DPPH (A₀) bol pripravený zmiešaním 20 µl rozpúšťadla a 1,0 ml pracovného roztoku DPPH. Po 30 minútach inkubácie pri izbovej teplote, v tme boli merané absorbancie (A) pri 515 nm oproti metanolu. Meranie absorbancií sa uskutočnilo pomocou UV-VIS – Beckman DU530, USA. Výsledky meraní podľa Chen a kol. (2013) boli vyjadrené ako percentuálny úbytok radikálu I (%), ktorý bol vypočítaný ako zníženie absorbancie extraktov (A) relatívne ku kontrole (A₀):

$$I (\%) = ((A_0 - A)/A_0) \times 100$$

Spektrofotometrické stanovenie chlorofylu a (C_a), chlorofylu b (C_b) a karotenoidov (C_c)

Na stanovenie asimilačných pigmentov boli použité spektrofotometrické metódy, pomocou ktorých sa získali hodnoty pre chlorofyl a (C_a), pre chlorofyl b (C_b) a pre celkové karotenoidy (C_c). K 0,2 g rozpráškovanej drogy *Cynobati fructus* sa pridalo malé množstvo oxidu horečnatého a 10 ml 80 % acetónu. Po filtrácii bol supernatant 10 minút centrifugovaný pri otáčkach 4000 rpm. Supernatant sa analyzoval spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 663,2 nm pre chlorofyl a (C_a); 646,8 nm pre chlorofyl b (C_b) a 470 nm pre celkové karotenoidy (Kumar a kol., 2010)

$$C_a = 12,25 \cdot A_{663,2} - 2,79 \cdot A_{646,8}$$

$$C_b = 21,50 \cdot A_{646,8} - 7,34 \cdot A_{663,2}$$

$$C_c = (1000 \cdot A_{470} - 1,82 \cdot C_a - 85,2 \cdot C_b) / 198$$

Štatistické spracovanie výsledkov

Všetky experimenty boli trikrát nezávisle opakované pri rovnakých podmienkach. Pomocou softvéru Excell funkcie AVERAGE bola určená priemerná

hodnota vzoriek a využitím funkcie STDEV ich smerodajná odchýlka.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Ruža šíповá je celosvetovo rozšírený ker. Oficiálnu liekopisnú drogu tvorí podľa Európskeho liekopisu Ph. Eur. 10 nepravý šípkový plod – *Rosae pseudo-fructus*, získavaný z druhu *Rosa canina* L. Pre plody je charakteristický najmä vysoký obsah vitamínu C. Medzi ďalšie dôležité obsahové zložky patria polyfenoly, karotenoidy, flavonoidy, organické kyseliny, pektíny. Šípky sú nositeľmi antioxidačných, antiproliferatívnych, hepatoprotektívnych, protizápalových a antidiabetických účinkov (European Pharmacopoeia: 10th Edition, 2020; Butkevičiūtė a kol., 2022).

Polyfenoly patria k hlavným bioaktívnym zlúčeninám v plodoch *Rosa canina* L. a biogeneticky vznikajú fenylypropanoidovou cestou odvodenou z kyseliny šikimovej. Obsahujú najmenej dve hydroxylové skupiny pripojené k aromatickému kruhu. Najznámejšie z nich sú flavonoidy (Galazka-Czarnecka a kol., 2019). V ľudskom organizme vykazujú vlastnosti antioxidačné, protinádorové, protizápalové, antiaterosklerotické a antitrombotické nielen u pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami. Chránia bunky pred škodlivými účinkami vonkajšieho prostredia (napríklad UV žiarenie) a vnútorného prostredia. Prostredníctvom hydroxylových skupín deaktivujú voľné kyslíkové radikály a ovplyvňujú expresiu detoxikačných enzýmov (Kosiorek a kol., 2013). Celkový obsah polyfenolových látok sa stanovil využitím Folin-Ciocalteuho činidla. Metóda sa zakladá na reakcii Folin-Ciocalteuho činidla (fosfowolframu a fosfomolybdenanu) s fenolmi nachádzajúcimi sa v rastlinnej vzorke. Princípom je oxidácia fenolov za vzniku chromogénov, modrých produktov, ktoré sa stanovujú spektrofotometricky. Intenzita modrého zafarbenia komplexu je závislá od koncentrácie polyfenolových látok vo vzorke (Hara a kol., 2018). Ako štandard bola použitá kyselina galová, na základe ktorej boli výsledky vyjadrené ako ekvivalent kyseliny galovej v mg/100 g plodov. Najvyššie hodnoty 268,9 mg/

Tab. 1: Kvantitatívne stanovenie polyfenolov a antioxidačnej aktivity v *Cynosbati fructus*

Vzorka	Celkové polyfenoly [mg/100 g]	FRAP metóda [$\mu\text{mol.l}^{-1} \text{Fe}^{2+}$]	DPPH metóda [% úbytku]
1 (Snina)	178,4 $\pm$ 0,003	221,6 $\pm$ 0,027	82,14 $\pm$ 0,001
2 (Medzilaborce)	206,0 $\pm$ 0,003	227,4 $\pm$ 0,067	87,14 $\pm$ 0,008
3 (Humenné)	255,5 $\pm$ 0,005	229,3 $\pm$ 0,051	88,57 $\pm$ 0,004
4 (Strážske)	118,3 $\pm$ 0,002	215,3 $\pm$ 0,031	80,71 $\pm$ 0,011
5 (Vranov n. Topľou)	133,6 $\pm$ 0,003	223,4 $\pm$ 0,029	84,29 $\pm$ 0,006
6 (Sečovce)	268,9 $\pm$ 0,002	232,9 $\pm$ 0,047	90,07 $\pm$ 0,002
7 (Košice)	108,9 $\pm$ 0,001	217,6 $\pm$ 0,041	77,86 $\pm$ 0,009
8 (Rozhanovce)	201,2 $\pm$ 0,003	218,4 $\pm$ 0,020	78,57 $\pm$ 0,006
9 (Bardejov)	185,0 $\pm$ 0,004	219,4 $\pm$ 0,043	84,29 $\pm$ 0,005
10 (Levoča)	234,6 $\pm$ 0,004	225,2 $\pm$ 0,051	85,71 $\pm$ 0,002
11 (Brezno)	181,2 $\pm$ 0,003	217,1 $\pm$ 0,064	77,14 $\pm$ 0,003

Údaje zobrazujú priemerné hodnoty a smerodajné odchýlky SD (n = 3)

100 g boli namerané vo vzorke 6 zo Sečoviec (viď tab. 1). Duda-Chodak a kol. (2011) analyzovali v 15 rastlinných vzorkách obsah základných bioaktívnych zlúčenín. Pre *Cynosbati fructus* stanovili priemerne 110 mg/100 g polyfenolov v sušených plodoch. Vzhľadom na preukázané hodnoty sú plody ruže šíповej, v porovnaní s inými ovocnými druh najlepším zdrojom polyfenolových látok. Najmenej polyfenolov sa nachádzalo vo vzorke 4, pochádzajúcej zo Strážskeho, 5 z Vranova nad Topľou a 7 z Košíc. Nakoľko nami analyzované vzorky boli zbierané v rovnakom čase, odlišnosti v obsahu polyfenolových látok v plodoch ruže šíповej môžu byť spôsobené genetickými príčinami. Scalzo a kol. (2005) experimentálne potvrdili, že celkový obsah polyfenolov je podmienený genotypom, miestom pestovania, geologickým podloží, kvalitou pôdy, technikou zberu, spôsobom sušenia a spracovania plodov.

Antioxidačná aktivita fenolových zlúčenín je sprostredkovaná hlavne redoxnými vlastnosťami, ktoré im umožňujú pôsobiť ako redukčné činidlá. Fenoly sú považované za hlavné biologicky aktívne látky zodpovedné za antioxidačnú aktivitu rastlinných materiálov. Viacerými štúdiami bola dokázaná korelácia medzi antioxidačnou schopnosťou a obsa-

hom celkových polyfenolov, preto je smerodajné skúmanie obsahu celkových polyfenolov (Butkevičiūtė a kol., 2021). Rôzne fenoly vykazujú rôznu antioxidačnú aktivitu. Závisí to od ich chemickej štruktúry. Schopnosť vychytávania voľných radikálov jednej zlúčeniny môže byť odlišná, takže rovnaké koncentrácie tejto zlúčeniny nemusia vykazovať rovnaké antioxidačné schopnosti (Ghazghazi a kol., 2010).

Princíp fungovania FRAP metódy spočíva v meraní rýchlosti redukcie železitého tripyridyltriazínového (TPTZ) komplexu pod vplyvom antioxidačných účinkov na železnatý komplex. Bezfarebné činidlo sa mení pôsobením vzorky na intenzívne modrý roztok s maximálnou absorbanciou pri vlnovej dĺžke 593 nm. Rozdiel absorbancií Δ je priamo úmerný koncentrácii antioxidantov (Aktumsek a kol., 2011). Roman a kol. (2013) stanovili metódou FRAP antioxidačnú aktivitu vo vzorkách šíпов v rozmedzí od 63,35 μmol Trolox/100 g vzorky (var. *Assiensis*) do 127,8 μmol Trolox/100 g (var. *Transitoria*). Ghazghazi a kol. (2010) stanovili 12,5 μg Trolox/ml až 22,6 μg Trolox/ml. Mihaylova a kol. (2015) namerali hodnoty antioxidačnej aktivity v rozmedzí 344.85 $\pm$ 7.25 až 771.86 $\pm$ 5.25 $\mu\text{mol.g}^{-1}$. Antioxidačná aktivita metódou FRAP bola v nami testovaných vzorkách porovnateľná s uve-

Tab. 2: Obsah chlorofylu *a* (C_a), chlorofylu *b* (C_b) a karotenoidov (C_c) v jednotlivých vzorkách *Rosa canina* L.

Vzorka	Obsah chlorofylu <i>a</i> (C_a) [mg/g s. hm.]	Obsah chlorofylu <i>b</i> (C_b) [mg/g s. hm.]	Obsah celkových karotenoidov (C_c) [mg/g s. hm.]
1 (Snina)	0,02 ± 0,03	0,33 ± 0,11	0,14 ± 0,07
2 (Medzilaborce)	0,02 ± 0,02	0,23 ± 0,08	0,14 ± 0,06
3 (Humenné)	0,06 ± 0,14	0,23 ± 0,14	0,18 ± 0,06
4 (Strážske)	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,04	0,21 ± 0,02
5 (Vranov n. Topľou)	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,23	0,00 ± 0,00
6 (Sečovce)	0,08 ± 0,07	0,05 ± 0,04	0,31 ± 0,01
7 (Košice)	0,01 ± 0,01	0,09 ± 0,09	0,15 ± 0,05
8 (Rozhanovce)	0,05 ± 0,04	0,05 ± 0,07	0,20 ± 0,05
9 (Bardejov)	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,28 ± 0,02
10 (Levoča)	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,18 ± 0,01
11 (Brezno)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,27 ± 0,01

Údaje zobrazujú priemerné hodnoty a smerodajné odchýlky SD ($n = 3$)

denými meraniami. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu dosahovala vzorka 6, pochádzajúca zo Sečoviec, ktorá vykazovala hodnotu 232,9 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ železnatých iónov (viď tab. 1). Najnižšiu schopnosť vychytávať voľné radikály pomocou FRAP metódy mala vzorka 4 zo Strážskeho. Dosahovala hodnotu 215,3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ železnatých iónov. Rozdiely vo vzorkách mohli byť spôsobené rozličným stupňom zrelosti plodov, alebo odlišnými geologickými a klimatickými podmienkami.

Pre posúdenie schopnosti odstraňovať voľné radikály v zmesiach, ale aj v čistých látkach je často používaná metóda využívajúca DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl) hydrazyl) radikál. Založená je na reakcii skúmanej vzorky so stabilným DPPH radikálom. DPPH radikál má maximálnu absorpciu pri vlnovej dĺžke 515 až 520 nm (Chen a kol., 2013). Plody ruže šípovej sú známe vysokou schopnosťou vychytávať voľné radikály. Podľa Daels-Rakotoariason a kol. (2002) môže extrakt šípkov inhibovať reaktívne formy kyslíka (ROS) testované v nebunkových a bunkových systémoch. Kilicgun a Altiner (2010) stanovili antioxidačnú aktivitu ako priemernú hodnotu 84,69 % DPPH inhibície v závislosti od koncentrácie extraktu. Oliveira a kol. (2009) stanovili v čerstvých

plodoch ruže šípovej hodnotu antioxidačnej aktivity 90,58 %. Naopak, najnižšiu antioxidačnú aktivitu (36,53 %) určili v plodoch sušených prirodzene na slnku. Fattahi a kol. (2012) zaznamenali vo svojich meraniach 87,8 % úbytku DPPH radikálu. V nami testovaných vzorkách boli zaznamenané hodnoty antioxidačnej aktivity metódou DPPH v rozmedzí 77,14 – 90,07 %. Najnižšie hodnoty boli zaznamenané vo vzorkách z Košíc (77,86 %) a zo Strážskeho (80,71 %) (viď tab. 1). Možno predpokladať nepriamy súvis s rastom a dozrievaním plodov v znečistenom životnom prostredí, keďže v blízkosti sa nachádzajú veľké chemické závody.

Vzťah medzi obsahom polyfenolov a antioxidačnou kapacitou sa stanovil pomocou lineárnych korelácií. Medzi celkovým obsahom polyfenolov a antioxidačnou aktivitou šípkov bola zaznamenaná pomerne vysoká korelácia ($R^2 = 0,6218$, $p < 0,05$). Tento výsledok potvrdzuje možný súvis medzi antioxidačnou aktivitou a obsahom polyfenolových látok, resp. ich hydroxylových skupín. V prípade voľne rastúcich plodov boli zaznamenané pozitívne korelácie medzi celkovými fenolmi a antioxidačnou aktivitou (Ghazghazi a kol., 2010). Vysoká antioxidačná schopnosť voľne rastúcich plodov by mohla byť pripísaná aj prí-

tomnosti iných bioaktívnych zložiek, ako sú vitamín C, tokoferol, pigmenty, ako aj interakciám týchto zlúčenín (Barros, 2010).

Hlavnou funkciou fotosyntetických pigmentov, medzi ktoré patria chlorofyly *a* (C_a) a karotenoidy, je absorpcia svetelnej energie. Chlorofyl *a* (C_a) je najdôležitejší fotosynteticky aktívny pigment, ktorý je nevyhnutný pre vlastnú premenu energie. Ostatné pigmenty, ako sú karotenoidy, majú pomocnú a ochrannú funkciu. Ich úlohou je zachytiť dopadajúce žiarenia a energiu svojho excitovaného stavu presúvajú na chlorofyl *a* (C_a). Pre karotenoidy je charakteristická absorpcia žiarenia pri vlnovej dĺžke 480 – 570 nm, pre chlorofyly 380 – 470 nm a 650 – 680 nm. Funkcia chlorofylov teda spočíva v pohlcovaní a následnom prenášaní energie. Tak zabezpečujú priebeh procesov nevyhnutných pre fotosyntézu (Repčák a kol., 2015). V sledovanom experimente najvyššie hodnoty chlorofylu *a* (C_a) boli zaznamenané vo vzorke 6, ktorá pochádzala zo Sečoviec (viď tab. 2). Najvyšší obsah karotenoidov vyjadrených v mg na suchú hmotnosť dosiahla vzorka 6 (Sečovce). Özpınar a Yalçın (2013) skúmali základné fyziologické parametre v podobe chlorofylov a karotenoidov v listoch *Rosa canina* L. v priebehu mesiacov júl a august. Zistili, že prípadné zmeny jednotlivých parametrov fotosyntézy boli spôsobené biotickým stresom. Rozdiely v jednotlivých vzorkách mohli byť spôsobené rozličným stupňom zrelosti plodov, alebo odlišnými geologickými a klimatickými podmienkami.

ZÁVER

Predložená štúdia sa zaoberá biologickým potenciálom plodov *Rosa canina* L. Zo získaných výsledkov v experimentálnej časti štúdie možno konštatovať, že najvyšší obsah celkových polyfenolov bol zaznamenaný vo vzorke 6 pochádzajúcej zo Sečoviec. Najvyššia antioxidačná aktivita bola určená prostredníctvom DPPH radikálu aj prostredníctvom FRAP opäť vo vzorke 6 s hodnotou $232,9 \mu\text{mol.l}^{-1} \text{Fe}^{2+}$ opäť zo Sečoviec. Obsah celkových karotenoidov dosiahol najvyššiu hodnotu opäť vo vzorke 6, pochádzajúcej

zo Sečoviec. Schopnosť vychytávať voľné radikály predurčuje využitie šípok ako prírodného liečiva aj u pacientov s diagnostikovanou osteoartrózou.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia vznikla v rámci riešenia projektov Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky VEGA č 1/0071/21, Kultúrnej a edukačnej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky KEGA č. 010UVLF-4/2021.

ZOZNAM LITERATÚRY

Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G. O., Cakmak, Y. S., Duran, A.: Screening for *in vitro* antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea* L. species from Turkey flora. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49 (11), 2914 – 2920.

Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., Ferreira, I. C.: Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food chemistry*, 2010, 120 (1), 247 – 254.

Butkevičiūtė, A., Urbšaitė, R., Liaudanskas, M., Obelevičius, K., Janulis, V.: Phenolic content and antioxidant activity in fruit of the genus *Rosa* L. *Antioxidants*, 2002, 11 (5), 912.

Daels-Rakotoarison, D. A., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Luyckx, M., Dine, T., Cazin, J. C.: Effects of *Rosa canina* fruit extract on neutrophil respiratory burst. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 2002, 16 (2), 157 – 161.

Duda-Chodak, A., Tarko, T., Rus, M.: Antioxidant activity and total polyphenol content of selected herbal medicinal products used in Poland. *Herba Polonica*, 2011, 57 (1).

Ercisli, S.: Rose (*Rosa* spp.) germplasm resources of Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2005, 52 (6), 787 – 795.

- European Pharmacopoeia Commission. *European pharmacopoeia 10th edition: Supplement 10.0*. Strasburg: Council of Europe. 2020.
- Fattahi, S., Jamei, R., Hosseini, S. S.: Antioxidant and antiradical activities of *Rosa canina* and *Rosa pimpinellifolia* fruits from West Azerbaijan. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 2012, 523 – 529.
- Gałązka-Czarnecka, I., Korzeniewska, E., Czarnecki, A., Politowski, K.: Modyfikacja zawartości polifenoli w winach z wykorzystaniem impulsowego pola elektrycznego. *Przegląd Elektrotechniczny*, 2019, 95 (1), 89 – 92.
- Ghazghazi, H., Miguel, M. G., Hasnaoui, B., Sebei, H., Ksontini, M., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G.: Phenols, essential oils and carotenoids of *Rosa canina* from Tunisia and their antioxidant activities. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9 (18), 2709 – 2716.
- Hara, K., Someya, T., Sano, K., Sagane, Y., Watanabe, T., Wijesekara, R. G. S.: Antioxidant activities of traditional plants in Sri Lanka by DPPH free radical-scavenging assay. *Data in Brief*, 2018, 17, 870 – 875.
- 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.
- Kılıçgün, H., Altın, D.: Correlation between antioxidant effect mechanisms and polyphenol content of *Rosa canina*. *Pharmacognosy Magazine*, 2010, 6 (23), 238.
- Kosiorek, A., Oszmiański, J., Golański, J.: Podstawy do zastosowania polifenoli roślinnych jako nutraceutyków o właściwościach przeciwpłytkowych. *Postępy fitoterapii*, 2013, 2, 108 – 117.
- Kumar, P., Ramakritinan, C. M., Kumaraguru, A. K. Solvent extraction and spectrophotometric determination of pigments of some algal species from the Shore of Puthumadam, Southeast Coast of India. *International Journal of Oceans and Oceanography*, 2010, 4 (1), 29 – 34.
- Mártonfi, P.: *Systematika cievnatých rastlín* [Systematics of Vascular Plants]. 4. vyd. Košice: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, 2013. 222 s.
- Nacz, M., Shahidi, F.: Phenolics in cereals, fruits and vegetables. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41 (5), 1523 – 1542.
- Nagy, M., Mučaji, P., Grančai, D. *Farmacognózia – biologicky aktívne rastlinné metabolity a ich zdroje* [Pharmacognosy – Biologically Active Plant Metabolites And Their Sources]. 2. vyd. Bratislava: Herba, 2017. 399 s.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J. A.: Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46 (7), 2326 – 2331.
- Özpınar, H., Yalçın, İ.: Investigation of the physiological changes in (*Rosa canina* L.) plant members comprising and not creating the gall. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2013, 34 (2), 49 – 66.
- Pyrzyska, K., Pekal, A.: Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 2013, 5 (17), 4288 – 4295.
- Repčák, M., Bačkor, M., Paľove-Balang, P., Gajdošová, S.: *Návody na cvičenia z fyziológie rastlín* [Instructions For Exercises In Plant Physiology]. 4. vyd. Košice: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, 2015. 86 s.
- Roman, I., Stănilă, A., Stănilă, S.: Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. *Chemistry Central Journal*, 2013, 7 (1), 1 – 10.
- Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., Battino, M.: Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, 2005, 21 (2), 207 – 213.



OPTIMALIZÁCIA PODMIENOK STANOVENIA 5-FLUÓRURACILU METÓDOU UHPLC

OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR THE UHPLC DETERMINATION OF 5-FLUOROURACIL

Hudák, Alexander; Šuleková, Monika; Váhovská, Lucia

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

alexander.hudak@uvlf.sk

ABSTRACT

Štúdia je zameraná na optimalizáciu metódy vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (UHPLC) s cieľom nájsť vhodné podmienky pre jednoduché a rýchle stanovenie liečiva 5-fluóruracil (5-FU). Na základe experimentálnych meraní bola pre stanovenie 5-FU zvolená metóda izokratickej elúcie na kolóne Hypersil C18 s reverznou fázou. Mobilná fáza pozostávala z metanolu a fosfátového tlmivého roztoku ($\text{pH} = 6,9$); v objemovom pomere 3 : 97 (v/v). Meranie sa uskutočnilo pri prietokovej rýchlosti $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, nástreku vzorky s objemom 20 μL a teplote kolóny 25°C . Na meranie absorbancie pri vlnovej dĺžke 268 nm bol použitý detektor diódového poľa (DAD). Optimalizovaná chromatografická metóda sa môže využiť v biomedicínskych aplikáciách, pri štúdiu kontrolova-

ného uzatvorenia a následného uvoľňovania 5-FU z mezopórovitej siliky ako nosiča liečiva.

Kľúčové slová: analýza; 5-fluóruracil; HPLC

ABSTRACT

This study is focused on the optimization of the method of high-performance liquid chromatography (UHPLC), with the aim to find suitable conditions for simple and fast determination of the drug 5-fluorouracil (5-FU). Based on the experimental measurements, the method of isocratic elution on a Hypersil C18 column with a reverse phase was chosen for the determination of 5-FU. The mobile phase consisted of methanol and phosphate buffer solution ($\text{pH} = 6.9$), in a volume ratio of 3 : 97 (v/v). The measurement was performed at a flow rate of

1.0 ml.min⁻¹, sample injection with a volume of 20 µl and a column temperature of 25 °C. A Diode Array Detector (DAD) was used for measurement of absorbance at 268 nm. The optimized chromatographic method can be useful in biomedical applications, for the study of controlled loading and subsequent releasing of 5-FU from mesoporous silica as a drug carrier.

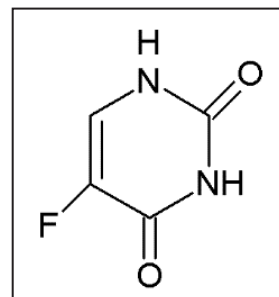
Key words: analysis; 5-fluorouracil; HPLC

ÚVOD

Pri liečbe rôznych nádorových ochorení sa už viac ako 20 rokov používa jeden z najaktívnejších antineoplastických liekov, 5-fluóruracil (5-FU). Táto látka bola prvýkrát syntetizovaná z acyklických prekurzorov v roku 1957 Duschinskym (Duschinsky a kol., 1957). Je jedným z mála klinicky využívaných liekov, ktoré boli racionálne navrhnuté na základe získaných poznatkov o biochémii nádorov (Diasio a Harris, 1989). Experimentálne štúdie u potkanov ukázali, že niektoré nádorové bunky využívali exogénny uracil ako substrát pre syntézu nukleovej kyseliny potrebnej na rast nádoru, zatiaľ čo zdravé bunky sa takto nesprávali (Rutman a kol., 1954). To viedlo k hypotéze, že syntézou vhodného analógu uracilu s podobnými fyzikálno-chemickými vlastnosťami by sa mohla doceliť inhibícia syntézy nukleových kyselín, a tým aj blokovanie rastu nádoru (Heidelberger, 1975). Pri návrhu vhodného analógu sa vychádzalo zo skorších štúdií, ktoré preukázali, že nahradením vodíka fluórom by sa relatívne netoxická zlúčenina mohla premeniť na zlúčeninu so zvýšenou toxicitou (Liebecq a Peters, 1949). Okrem toho, polomer atómu fluóru (1,35 Å) je podobný polomeru atómu vodíka (1,2 Å), čím sa minimalizuje zmena molekulárnej konformácie a zvyšuje pravdepodobnosť, že takáto molekula by mohla byť metabolizovaná rovnakými enzýmami ako uracil (Diasio a Harris, 1989).

5-FU je vo vode rozpustný fluoridový analóg pyrimidinovej bázy uracilu (viď obr. 1), antimetabolit, ktorý sa používa prevažne v intravenózne forme naj-

Obr. 1: Štruktúra 5-FU



mä pri liečbe kolorektálneho karcinómu (Meyerhardt a Mayer, 2005); karcinómu pankreasu (Wang a kol., 2014) a v kombináciách s inými antineoplastickými liekmi tiež na liečbu rakoviny prsníka, vaječníkov (Cameron a kol., 1994); pľúc (Tatsumura a kol., 1993) a močového mechúra (Hussain a kol., 2001). Niekoľko desaťročí bol 5-FU jedinou chemoterapeutickou látkou klinicky aktívnou voči kolorektálnemu karcinómu. 5-fluóruracil sa môže použiť aj lokálne (ako krém) na liečbu solárnych keratóz, niektorých typov bazaliómov kože a na liečbu bradavíc v kombinácii s kyselinou salicylovou vo forme roztoku (Hansova a kol., 2011).

Aj napriek dobrej rozpustnosti vo vode má použitie 5-FU niekoľko obmedzení. Pri orálnom podaní sa pozoroval krátky polčas rozpadu liečiva v plazme (5 – 20 min), čo zákonite vedie k zvyšovaniu dávky liečiva a z toho vyplývajúcej vyššej toxicity (Mundargi a kol., 2010). K obmedzeniam prispieva aj nejednotná a neúplná absorpcia liečiva pri orálnej aplikácii, rezistencia nádorov na podávané liečivo, neselektívne pôsobenie liečiva na zdravé bunky jedincov (Arias a kol., 2010; Kevadyia, 2012) a v neposlednom rade aj rozdiely v metabolizme 5-FU u rôznych pacientov (Grem, 2000; Malet-Martino a Martino, 2002). Aktivita 5-FU je limitovaná jeho rýchlosťou degradáciou na 5,6-dihydro-5-fluóruracil pôsobením cytozolového enzýmu dihydropyrimidindehydrogenázy (DPD). Zistilo sa, že tento enzým deaktivuje viac ako 85 % injekčne podaného 5-FU. Okrem toho sa pozorovali značné rozdiely v aktivite tohto enzýmu u zdravých nádorových buniek u jedného pacienta, ale aj medzi

rôznymi pacientami (Diasio a Johnson, 1999; Guimbaud a kol., 2000). Z tohto vyplýva, že biologická dostupnosť 5-FU, najmä po perorálnom podaní, je značne nepredvídateľná. V niektorých prípadoch, keď má DPD silnú aktivitu, je k dispozícii málo 5-FU a jeho účinnosť je následne nízka. Na druhej strane, ak má DPD slabú aktivitu, hladiny 5-FU sú zvýšené, čo môže viesť k toxicite z predávkovania. Okrem orálnej aplikácie 5-FU existuje niekoľko ďalších spôsobov podávania tohto liečiva, vrátane jednorazového intravenózneho bolusu, kontinuálnej (niekoľkodňovej) infúzie, ale aj „predĺženej“ infúzie prostredníctvom pumpy po dobu 1 až 2 týždňov alebo dlhšie (Diasio a Harris, 1989). V súčasnosti sa najčastejšie využíva kontinuálne intravenózne podanie 5-FU, ku ktorému sa pristúpilo z dôvodu rýchleho poklesu koncentrácie liečiva v plazme po jednorazovom podaní (Haq a kol., 2013).

Z uvedených faktov je zrejmé, že použitie 5-FU pri liečbe nádorových ochorení je sprevádzané aj nežiaducimi vedľajšími účinkami. Medzi najčastejšie sa vyskytujúce vedľajšie účinky patrí bolesť úst, ťažkosti s prehĺtaním, hnačky, bolesť žalúdka, nízky počet bielych krviniek, nízky počet krvných doštičiek a anémia (Zhu a kol., 2012). Okrem toho bolo potvrdené, že ak by sa v ľudskom sére po intravenóznom podaní počas niekoľkých hodín vyskytlo veľké množstvo 5-FU, ten by sa úplne nemetabolizoval a ohrozil by zdravie pacientov (Grem, 2000; Malet-Martino a Martino, 2002). V snahe znížiť negatívny dopad a toxicitu protirakovinového liečiva na zdravé bunky, sa pozornosť vedeckej komunity sústreďuje na cieľný transport liečiva do miesta nádoru a jeho následné uvoľňovanie prostredníctvom rôznych nosičov, akými sú napríklad mezopórovitá organosilika (Moorthy a kol., 2012); magnetické nanočastice (Arias a kol., 2010) alebo zeolity (Larsen, 2007; Petushkov, 2009).

Pri štúdiu transportu, distribúcie a koncentračných hladín 5-FU v rôznych druhoch vzoriek je potrebné mať k dispozícii vhodnú kvantitatívnu analytickú metódu. V odbornej literatúre bolo popísaných množstvo metód na kvantifikáciu 5-FU. Používali sa separačné metódy ako tenkovrstvová chromatografia, plynová

chromatografia, izotachoforéza, vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (UHPLC) alebo detekčné techniky ako rádioaktivita, plameňová ionizácia, fluorescencia, ultrafialová spektrofotometria alebo hmotnostná spektrometria (Breda a Barattè, 2010). V súčasnosti sa najčastejšie používajú metódy kvapalinovej chromatografie. Použitie jednotlivých metód závisí od druhu vzorky, matrice, náročnosti spracovania vzorky a obsahu stanovovaného analytu.

Cieľom tejto štúdie bolo vyvinúť jednoduchý a časovo nenáročný postup stanovenia 5-FU pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s DAD detektorom (detektor diódového poľa, Diode Array Detector) pri izokratice elúcii. Táto metodika bude následne využitá v ďalších experimentoch zaoberajúcich sa stanovením množstva 5-FU, uvoľneného z nosiča liečiva zhotoveného z mezopórovitej siliky.

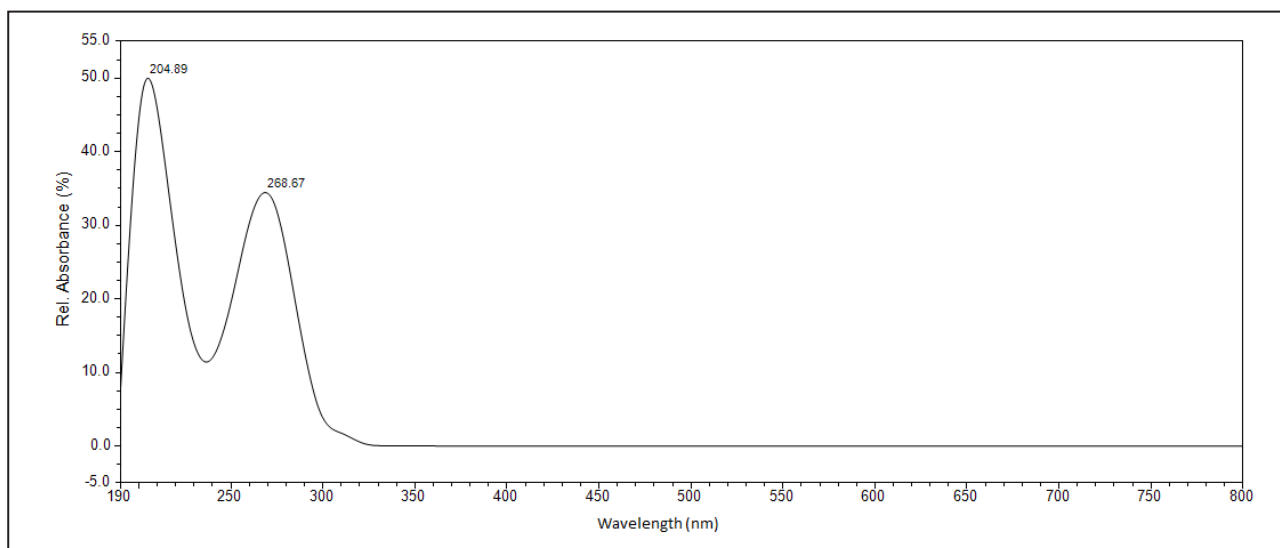
MATERIÁL A METÓDY

Na prípravu vodných roztokov bola použitá ultračistá voda ISO 1, pripravená reverznou osmózou. Zásobný roztok štandardu bol pripravený odvážením a rozpustením 50 mg 5-FU (Sigma-Aldrich, USA) vo vode v 50 ml odmernej banke o koncentrácii 1 mg. ml^{-1} . V ďalšom kroku sa zo zásobného roztoku štandardu pripravilo päť kalibračných roztokov, v koncentračnom rozsahu 1 – 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ pre kvantitatívne stanovenie liečiva.

Fosfátový tlmivý roztok ako zložka mobilnej fázy bol pripravený zmiešaním dvoch roztokov Na_2HPO_4 (11,9391 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Nemecko) rozpustených vo vode v 500 ml odmernej banke) a KH_2PO_4 (4,539 g KH_2PO_4 (Merck, Nemecko) rozpustených vo vode v 500 ml odmernej banke). Po zmiešaní týchto dvoch roztokov bol pripravený tlmivý roztok s pH = 6,9. Druhou zložkou mobilnej fázy bol metanol pre kvapalinovú chromatografiu (Merck, Nemecko). Takto pripravená mobilná fáza v zložení metanol a fosfátový tlmivý roztok (pH = 6,9) v pomere 3 : 97 (v/v) bola degasovaná po dobu 10 min.

Chromatografické stanovenie liečiva 5-FU bolo realizované metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chro-

Obr. 2: Absorpčné spektrum štandardu 5-FU



matografie s reverznou fázou (RP-UHPLC). Analýza sa uskutočnila na prístroji Dionex UltiMate 3000RS HPLC s DAD detektorom a kolónou ODS Hypersil C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m). Získané výsledky boli vyhodnotené pomocou programu Chromeleon 7.2 (Thermo Fisher Scientific, Nemecko).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom štúdie bolo po slede optimalizačných krokov vyvinúť jednoduchú a rýchlu UHPLC metódu stanovenia liečiva 5-FU s DAD detektorom, ktorá mala poslúžiť pre následné experimenty zamerané na štúdium uvoľňovania 5-FU z mezopórovitej siliky SBA-15. Pred analýzou vzorky sa uskutočnila optimalizácia podmienok merania. Hľadalo sa najoptimálnejšie zloženie mobilnej fázy, rýchlosť prietoku mobilnej fázy, dávkovaný objem na kolónu a takisto aj teplota na kolóne. Ako zložky mobilnej fázy boli odskúšané bežné organické rozpúšťadlá metanol a acetonitril. Najlepšie podmienky separácie 5-FU boli získané pri použití metanolu (zložka A) a fosfátového tlmivého roztoku, pH = 6,9 (zložka B) v pomere 3 : 97 (v/v), pričom pík prislúchajúci 5-FU bol symetrický, zodpovedajúci Gaussovej krivke. Meranie sa uskutočnilo v izokratickom móde, s prietokom

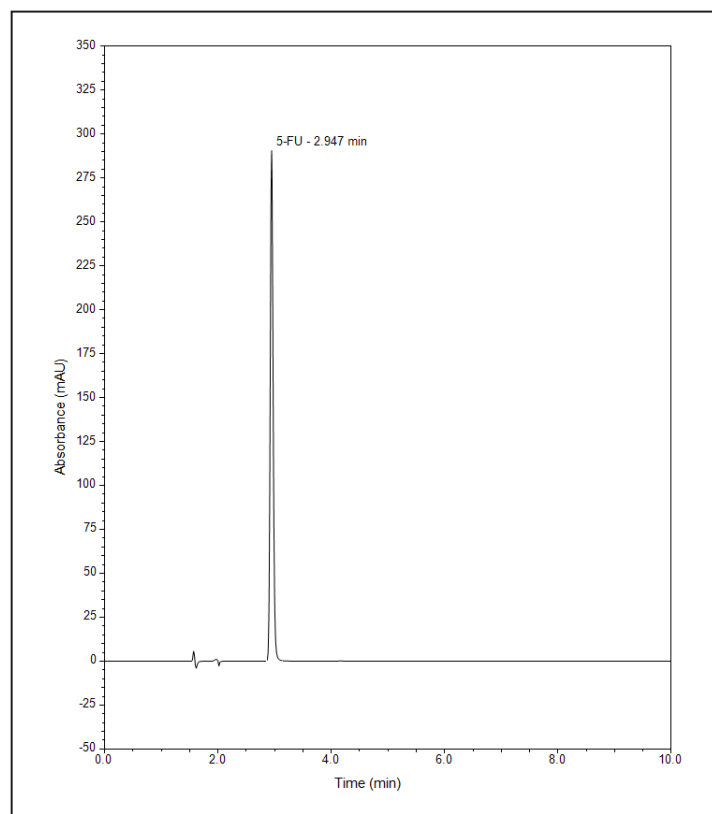
1 ml.min⁻¹. Na kolónu bol autosamplérom dávkovaný objem 20 μ l. Kolóna bola termostatovaná na 25 °C. 5-FU bol detegovaný pri vlnovej dĺžke 268 nm.

Identifikácia analyzovaného liečiva 5-FU sa uskutočnila na základe nameraných absorpčných spektier štandardu 5-FU v UV oblasti spektra. Absorpčné spektrum liečiva bolo zaznamenané v rozmedzí od 190 a 800 nm. 5-FU vykazuje dve absorpčné maximá pri 204 a 268 nm (viď obr. 2). UV žiarenie pod 200 nm (vákuová oblasť) sa rutinne nepoužíva z dôvodu technickej náročnosti takýchto meraní. Žiarenie v tejto oblasti je silne absorbované vzdušným kyslíkom, teda merania v blízkosti vlnovej dĺžky 200 nm sú veľmi problematické. Z tohto dôvodu bol druhý absorpčný pás s vlnovou dĺžkou $\lambda_{\text{max}} = 268$ nm vybraný ako optimálny na stanovenie množstva 5-FU.

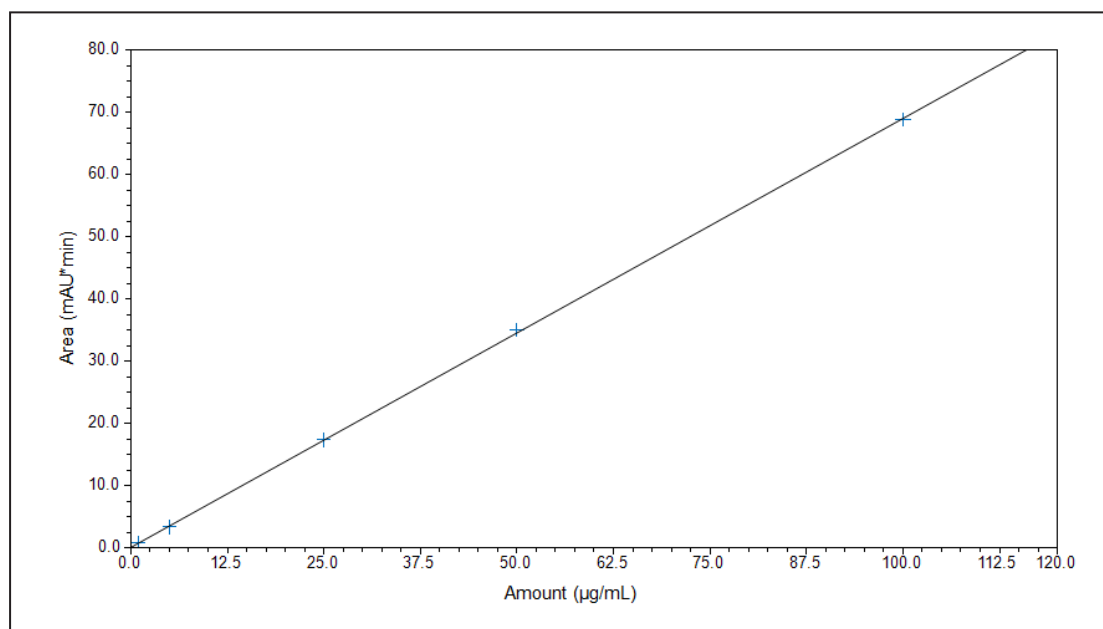
Pri najvhodnejších podmienkach separácie boli pripravené a analyzované štandardy 5-FU, v koncentračnom rozmedzí 1 – 100 μ g.ml⁻¹. Všetky roztoky štandardu 5-FU vykazujú jeden symetrický pík s retenčným časom 2,9 min. Na nasledujúcom obrázku je znázornený chromatogram roztoku štandardu s koncentráciou 25 μ g.ml⁻¹ (viď obr. 3).

Optimalizované podmienky HPLC analýzy popísané vyššie slúžili ako základ pri slede meraní, ktoré viedli ku konečnému zostrojeniu kalibračnej priamky

Obr. 3: Chromatogram roztoku štandardu 5-FU ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)



Obr. 4: Kalibračná závislosť 5-FU



(vid' obr. 4). Štandardné roztoky 5-FU boli pripravené a analyzované v troch opakovaníach a výsledky boli spracované pomocou softvéru Chromeleon 7.2. Kalibračná priamka bola získaná ako závislosť plochy píku a koncentrácie 5-FU pre päť štandardných vodných roztokov s rovnicou priamky $y = 0,6892x + 0,1062$. Linearita bola posúdená pomocou hodnoty korelačného koeficienta $R^2 = 0,99996$ a na základe tejto hodnoty môžeme potvrdiť, že kalibračná závislosť je lineárna v koncentračnom rozsahu 1 – 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Citlivosť metódy HPLC bola stanovená pomocou LOD a LOQ. Experimentálne získané hodnoty LOD a LOQ pre 5-FU boli 0,1134 a 0,3742 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Nami optimalizovaná a validovaná metóda bola overená pri stanovení 5-FU uvoľneného zo vzorky mezopórovitej siliky SBA-15, ktorá nám bola poskytnutá pracoviskom PF UPJŠ.

ZÁVER

Na stanovenie liečiva 5-FU sa využíva mnoho, najmä chromatografických metód. Každá z nich zohľadňuje rôzne špecifikácie a charakter vzorky, v ktorých sa stanovenie uskutočňuje. Pri riešení problematiky uvoľňovania 5-FU z mezopórovitej siliky SBA-15 ako nosiča liečiva vznikla požiadavka na vypracovanie spoľahlivej a jednoduchšej metódy jeho stanovenia. Na základe experimentálnych skúšok bola optimalizovaná jednoduchá chromatografická metóda stanovenia 5-FU, využívajúca vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu s DAD detekciou pri 268 nm. Táto metóda s izokratickou elúciou je selektívna a poskytuje dobrú presnosť a citlivosť, čomu zodpovedajú hodnoty LOD a LOQ. Získané výsledky analýzy poslúžia ako základ pre ďalšie experimenty zaoberajúce sa kinetikou uvoľňovania liečiva z nosiča na báze modifikovanej/nemodifikovanej mezopórovitej siliky SBA-15.

ZOZNAM LITERATÚRY

Arias, J. L., López-Viota, M., Delgado, Á. V., Ruiz, M. A.: Iron/ethylcellulose (core/shell)

nanoplatfrom loaded with 5-fluorouracil for cancer targeting, *Colloid Surface B*, 2010, 77 (1), 111 – 116.

Breda, M., Barattè, S.: A review of analytical methods for the determination of 5-fluorouracil in biological matrices. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 397 (3), 1191 – 1201.

Cameron, D. A., Gabra, H., Leonard, R. C.: Continuous 5-fluorouracil in the treatment of breast cancer. *Br. J. Cancer*, 1994, 70 (1), 120 – 124.

Diasio, R. B., Harris, B. E.: Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clinical Pharmacokinetics*, 1989, 16 (4), 215 – 237.

Diasio, R. B., Johnson, M. R.: Dihydropyrimidine dehydrogenase: its role in 5-fluorouracil clinical toxicity and tumor resistance. *Clin. Cancer Res.*, 1999, 5 (10), 2672 – 2673.

Duschinsky, R., Plevén, E., Heidelberger, C.: The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 79 (16), 4559 – 4560.

Grem, J. L.: 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest. New Drugs*, 2000, 18 (4), 299 – 313.

Guimbaud, R., Guichard, S., Dusseau, C., Bertrand, V., Aparicio, T., Lochon, I., Chatelut, E., Couturier, D., Bugat, R., Chaussade, S., Canal, P.: Dihydropyrimidinedehydrogenase activity in normal, inflammatory and tumour tissues of colon and liver in humans. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2000, 45 (6), 477 – 482.

Hansova, B., Synek, S., Opatřilova, R.: 5-Fluorouracil – Characteristics and analytical determination. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2011, 7 (1), 1 – 11.

Haq, N., Shakeel, F., Alanazi, F. K., Radwan, A. A., Ali, M., Alsarra, I. A.: Development and validation of an isocratic, sensitive and facile RP-HPLC method for rapid analysis of 5-fluorouracil and stability studies under various stress conditions. *Asian J. Chem.*, 2013, 25 (13), 7177 – 7182.

Heidelberger, C.: Fluorinated pyrimidines and their nucleosides. In Sartorelli & Johns (Eds.). *Antineoplastic and immunosuppressive agents. Part*

II. New York: Springer – Verlag, 1975. 193 – 231.

Hussain, M. H. A, Glass, T. R., Forman, J., Sakr, W., Smith, D. C., Al-Sarraf, M., Jones, J., Balcerzak, S. P., Crawford, E. D., Grossman, H. B.: Combination cisplatin, 5-fluorouracil and radiation therapy for locally advanced unresectable or medically unfit bladder cancer cases: a southwest oncology group study. *J. Urol.*, 2001, 165 (1), 56 – 61.

Kevadiya, B. D., Patel, T. A., Jhala, D. D., Thumbar R. P., Brahmabhatt, H., Pandya, M. P., Rajkumar, S., Jena, P. K., Joshi, G. V., Gadhia, P. K., Tripathi, C. B., Bajaj, C. H.: Layered inorganic nanocomposites: A promising carrier for 5-fluorouracil (5-FU). *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2012, 81, 91 – 101.

Larsen, S. C.: Nanocrystalline zeolites and zeolite structures: Synthesis, characterization, and applications. *J. Phys. Chem. C*, 2007, 111 (50), 18 464 – 18 474.

Liebecq C., Peters R. A.: The toxicity of fluoroacetate and the tricarboxylic acid cycle. *Biochimica Biophysica Acta*, 1949, 3, 215 – 230.

Malet-Martino, M., Martino, R. L. Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (Capecitabine, UFT, S-1): a review. *Oncologist*, 2002, 7 (4), 288 – 323.

Meyerhardt J., Mayer, R. J.: Systemic therapy for colorectal cancer. *New. Engl. J. Med.*, 2005, 352 (5), 476 – 487.

Moorthy, M. S., Park, S. S., Fuping, D., Hong, S. H., Selvaraj, M., Ha, C. S.: Step-up synthesis of amidoxime-functionalised periodic mesoporous organosilicas with an amphoteric ligand in the framework for drug delivery. *J. Mater. Chem.*, 2012, 22, 9100 – 9108.

Mundargi, R. C., Rangaswamy, V., Aminabhavi, T. M.: A novel method to prepare 5-fluorouracil, an anticancer drug, loaded microspheres from poly(N-vinylcaprolactam-co-acrylamide) and controlled release studies. *Des. Monomers. Polym.*, 2010, 13, 25 – 336.

Petushkov, A., Intra, J., Graham, J. B., Larsen, S. C., Salem, A. K.: Effect of crystal size and surface functionalization on the cytotoxicity of silicalite-1 nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.*, 2009, 22 (7), 1359 – 1368.

Rutman, R. J., Cantarow, A., Paschkis, K. E.: Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis III. The utilization of uracil-2-¹⁴C by preneoplastic rat liver and rat hepatoma. *Cancer Research*, 1954, 14 (2), 119 – 134.

Tatsumura, T., Koyama, S., Tsujimoto, M., Kitagawa, M., Kagamimori, S.: Further study of nebulisation chemotherapy, a new chemotherapeutic method in the treatment of lung carcinomas: fundamental and clinical. *British J. Cancer*, 1993, 68 (6), 1146 – 1149.

Wang, W.-B., Yang, Y., Zhao, J.-P., Zhang, T. P., Quan, L., Hong, S.: Recent studies of 5-fluorouracil resistance in pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.*, 2014, 20 (42), 15 682 – 15 690.

Zhu, L., Shen, G.-J., Ding, S.-Q., Hua, X.: Determination of 5-Fluorouracil in 5-Fluorouracil Injection and Human Serum by HPLC. *J. Food Drug Anal.*, 2012, 20 (4), 947 – 950.

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 čierobielej 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.

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

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

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

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

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

v štandardnom ISO zozname skrátených názvov časopisov. ISSN číslo sa nevyžaduje:

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

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

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

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

Kniha (editovaná, needitovaná):

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

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

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 *Paenicibacillus larvae* and *Paenicibacillus alvei*. In *Proceedings of the International Probiotic Conference: Probiotics for the 3rd Millenium, High Tatras*, Slovakia, June 4 – 7, 2008, 28 – 29.

Online časopis:

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

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

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

Online website:

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

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 rozborov odborného diela (napr. knihy, článku), ktoré obsahujú odôvodnené hodnotenie. Odporúčaná štruktúra recenzie je nasledovná:

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

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

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

Redakčná rada