

FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis
UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609

ISSN 2729-790X



1
VI • 2024



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:

Jozef Nagy

Jana Koščová

Abu-Darwish, M. S. (Shoubak, Jordan), Boknik, P. (Münster, Germany), Castejon, A. M. (Fort Lauderdale, Florida, USA), Csöllei, J. (Brno, Czech Republic), Deelman, L. E. (Groningen, Netherlands), Devinyak, O. (Uzhhorod, Ukraine, El Naggat, El M. B. A. (Damanhour, Egypt), Getova, D. (Plovdiv, Bulgaria), Kyselovič, J. (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-vytlacky>.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

VYDÁVA
UNIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE V KOŠICIACH
SLOVAKIA



FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA
VI., 1, 2024

PUBLISHED BY
THE UNIVERSITY OF VETERINARY MEDICINE AND PHARMACY IN KOŠICE
2024

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, VI., 1, 2024

O B S A H

Marcinčáková, Dana; Kišíková, Viera:

HYPNOTIKÁ, SEDATÍVA A RIZIKÁ ICH NESPRÁVNEHO UŽÍVANIA HYPNOTICS AND SEDATIVES AND THE RISK OF THEIR INCORRECT USE	5
--	---

Mačková, Zuzana; Laca Megyesi, Štefánia:

OPTIMALIZÁCIA CHRONICKEJ FARMAKOTERAPIE U STARŠÍCH DOSPELÝCH PACIENTOV OPTIMIZATION OF CHRONIC PHARMACOTHERAPY IN OLDER ADULTS.....	14
--	----

Takáč, Peter; Bajusová, Eva; Váczi, Peter; Bedlovičová, Zdenka:

ANTIFUNGÁLNA AKTIVITA STRIEBORNÝCH NANOČASTÍČ PRIPRAVENÝCH BIOSYNTÉZOU POMOCOU RASTLINNÝCH EXTRAKTOV ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES PREPARED BY BIOSYNTHESIS WITH PLANT EXTRACTS.....	27
---	----

Bedlovičová, Zdenka; Sokoli, Libor; Váczi, Peter; Tkáčiková, Ludmila; Mojžiš, Ján:

FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI NOVOSYNTETIZOVANÝCH CHALKÓNOV PHARMACOLOGICAL PROFILE OF NEW-SYNTHEZIZED CHALCONES	39
---	----

Adamojurková, Klaudia; Beňová, Katarína; Lojdllová, Miriam:

MOŽNOSTI TERAPIE ALERGICKEJ RINITÍDY A ASTMY BRONCHIALE POSSIBILITIES OF THERAPY OF ALLERGIC RHINITIS AND BRONCHIAL ASTHMA.....	49
--	----

Gajdošová, Mária; Szabóová, Renáta; Mikulová, Anna:

TERAPEUTICKÝ EFEKT LYZÁTU <i>ESCHERICHIA COLI</i> U RECIDIVUJÚCICH CYSTITÍD CHRONICKÉHO PŮVODU U DETSKÉHO PACIENTA THERAPEUTICAL EFFECT OF <i>ESCHERICHIA COLI</i> LYSATE IN RECURRENT CYSTITIS OF CHRONIC ORIGIN IN A PEDIATRIC PATIENT.....	59
--	----

Kolesárová, Mária; Rohalová, Jana; Marcinčáková, Dana; Kolesár, Dalibor:

BIOLOGICKÁ TERAPIA DYSLIPIDÉMIÍ BIOLOGICAL TREATMENT IN DYSLIPIDEMIAS	73
--	----

Ungvarská Maľučká, Lucia; Drabiková, Anna; Salayová, Aneta:

STANOVENIE STABILITY NOVÝCH KARBAMÁTOVÝCH DERIVÁTOV AKO INHIBÍTOROV CHOLÍNESTERÁZ DETERMINATION OF STABILITY OF NEW CARBAMATE DERIVATES AS CHOLINESTERASE INHIBITORS	89
---	----

Sabová, Jana; Čoma, Matúš:

PRÍRODNÉ LÁTKY A EXTRAKTY V HOJENÍ RÁN NATURAL COMPOUNDS AND EXTRACTS IN WOUND HEALING.....	101
--	-----

Čižmárik, Martin; Čižmáriková, Martina:

UMELÁ INTELIGENCIA V MEDICÍNE A FARMÁCII ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN MEDICINE AND PHARMACY.....	115
---	-----

Pokyny pre autorov.....	128
-------------------------	-----



HYPNOTIKÁ, SEDATÍVA A RIZIKÁ ICH NESPRÁVNEHO UŽÍVANIA

HYPNOTICS AND SEDATIVES AND THE RISK OF THEIR INCORRECT USE

Marcinčáková, Dana; Kišíková, Viera

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

dana.marcincakova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Hypnotiká a sedatíva sú lieky, ktoré sa bežne používajú na liečbu nespavosti, úzkosti a iných porúch spánku. Hypnotiká aj sedatíva majú potenciálne nežiaduce účinky a riziká, preto je dôležité používať tieto lieky pod vedením zdravotníckeho pracovníka a prísne dodržiavať liečebný režim. V štúdiu bola na základe dotazníka hodnotená skupina 40 respondentov trpiacich rôznymi ochoreniami, ktorí boli liečení hypnotikami a/alebo sedatívami. Cieľom praktickej časti bolo zhodnotenie údajov získaných pomocou dotazníka, ktorý bol zameraný na preskripciu a užívanie hypnotík a sedatív. Výsledky štúdie ukazujú, že najčastejšie sa tieto skupiny liekov predpisujú pri insomnii a psychických poruchách ako sú úzkostná porucha, depresia, syndróm závislosti od alkoholu alebo adaptačná porucha. Najviac pacientov bolo vo vekovej kategórii 51 – 60 rokov. Najčastejšie predpisovaným liečivom bol zolpidem, potom es-

zopiklón a zopiklón, čiže Z-lieky. Eszopiklón vykazuje najmenšie riziko rozvoja závislosti, tolerancie a abstinčných príznakov ako ostatné nebenzodiazepínové hypnotiká. Z nežiaducich účinkov prevládala ospalosť v priebehu dňa. Zvolený spôsob terapie bol síce úspešný, keďže až 77,5 % pacientov uviedlo zlepšenie zdravotného stavu, avšak veľké množstvo pacientov užíva lieky dlhodobo. Nesprávnym a dlhodobým užívaním hypnotických a sedatívnych liekov dochádza k vzniku tolerancie a závislosti, čo si pacienti často ani neuvedomujú.

Kľúčové slová: insomnia; hypnotiká; sedatíva; riziká

ABSTRACT

Hypnotics and sedatives are drugs commonly used to treat insomnia, anxiety, and other sleep disorders. Both hypnotics and sedatives have potential side effects and risks, so it is important

to use these medications under the guidance of a healthcare professional and strictly adhere to the medication regimen. The study evaluated a group of 40 patients suffering from various diseases who were treated with hypnotics or sedatives, based on a questionnaire. The aim of the practical part was to evaluate the data obtained using the questionnaire, which was focused on the prescription and use of hypnotics and sedatives. The results of our study show that these groups of drugs are most often prescribed for insomnia and psychological disorders such as anxiety disorder, depression, alcohol dependence syndrome or adjustment disorder. Most patients were in the age category of 51 – 60 years. The most frequently prescribed drug was zolpidem, followed by eszopiclone and zopiclone, or Z-drugs. Eszopiclone has the lowest risk of developing dependence, tolerance and withdrawal symptoms than other non-benzodiazepine hypnotics. Among the side effects, drowsiness during the day prevailed. Although the chosen method of therapy was successful, as up to 77.5 % of patients reported an improvement in their health condition, however, we see that a large number of patients use the drugs for a long time. Improper and long-term use of hypnotic and sedative drugs leads to tolerance and addiction, which patients often do not even realize.

Key words: insomnia; hypnotics; sedatives; risks

ÚVOD

Nespavosť je porucha spánku, ktorá môže mať rôzne príčiny. Je dôležité identifikovať základnú príčinu nespavosti, aby sa vytvoril účinný plán liečby. Možnosti liečby môžu zahŕňať zmeny životného štýlu, behaviorálnu terapiu, lieky a riešenie akýchkoľvek základných zdravotných alebo psychologických stavov. V prípade pretrvávajúcej nespavosti, odporúča sa konzultovať s odborníkom v oblasti zdravotnej starostlivosti o správnom zhodnotení stavu a následnej

liečbe.

Hypnotiká a sedatíva sú liečivá so sedatívnymi účinkami závislými od dávky. Celosvetovo sú bežne predpisované najmä u starších ľudí. Predpisovanie hypno-sedatív si vyžaduje zváženie farmakokinetiky a farmakodynamiky týchto liekov, pochopenie ich účinnosti a bezpečnosti pre konkrétneho pacienta a zohľadnenie ich nežiaducich účinkov.

Medzi základné skupiny hypnotík patria barbituráty (v súčasnosti v indikácii hypnotiká a anxiolytiká obsolentné, kvôli ich toxicite, nežiaducim účinkom, autoindukcii vlastného metabolizmu a vysokému riziku vzniku závislosti), benzodiazepíny a nebenzodiazepínové „Z“ hypnotiká (Moťovský, 2009).

Hypnotiká a sedatíva sú liečivá, ktoré sa bežne používajú na liečbu porúch spánku a úzkosti. Tieto lieky pôsobia tak, že tlmia centrálny nervový systém, čo môže pomôcť podporiť relaxáciu, znížiť úzkosť a navodiť spánok. Užívanie hypnotík a sedatív by sa však malo starostlivo sledovať, pretože môžu mať aj potenciálne vedľajšie účinky a riziká. Medzi najčastejšie vedľajšie účinky patria ospalosť, *letargia* a únava. Pri vyšších dávkach sa môže vyskytnúť porucha motorickej koordinácie, závraty, *vertigo*, nezrozumiteľná reč, rozmazané videnie, zmeny nálady a eufória. Riziko vzniku závislosti je nižšie u „Z“ hypnotík ako u benzodiazepínov, ale môže vzniknúť pri terapii dlhšej ako 4 týždne (Griffin a kol., 2013).

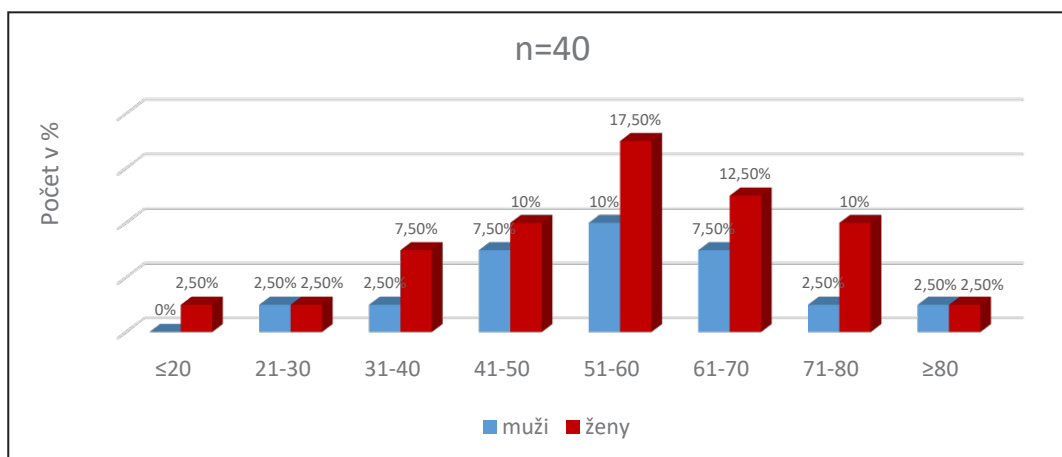
Celkovo by sa k užívaniu hypnotík a sedatív malo pristupovať opatrne a mali by sa používať len pod vedením zdravotníckeho pracovníka. Je dôležité dodržiavať správne protokoly o predpisovaní a dávkovaní, ako aj o možných vedľajších účinkoch a rizikách pri dlhodobom užívaní.

Predkladaná štúdia pomocou dotazníka vyhodnocuje preskripciu a užívanie hypnotík a sedatív v ambulantnej praxi na základe dotazníka vyplneného 40 respondentmi.

METODIKA PRÁCE A METÓDY SKÚMANIA

Údaje v tejto štúdii boli získané v období od sep-

Graf 1: Rozdelenie respondentov podľa veku a pohlavia



tembra 2022 do februára 2023 v psychiatrickej ambulancii MUDr. Miloša Buriča v Michalovciach na základe dotazníka vyplneného 40 respondentmi. Odpovede boli doplnené o informácie získané zo zdravotných záznamov, pričom boli dodržané postupy v zmysle zákona č. 18/2018 Z. z. o ochrane osobných údajov a o zmene a doplnení niektorých zákonov.

Hodnotené parametre:

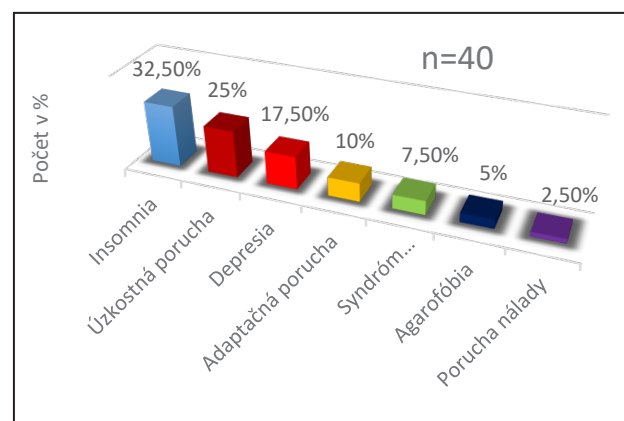
- pohlavie
- vek
- diagnóza
- užívaný liek zo skupiny hypnotík a sedatív
- zamieňanie predpísaného lieku v lekární
- dodržiavanie liečby určenej lekárom
- ďalšie diagnózy
- kombinácie s inými liekmi
- frekvencia predpisovania
- odbornosť lekára predpisujúceho hypnotiká a sedatíva
- dĺžka terapie
- subjektívny pocit respondenta na účinnosť terapie
- výskyt nežiaducich účinkov.

to, z nich bolo 26 žien (65 %) a 14 mužov (35 %). Priemerný vek bol 55 rokov. Najväčšiu časť tvorili pacienti vo veku od 51 – 60 rokov (27,5 %). Najmenej zastúpená bola skupina pod 20 rokov s 2,5 %. Vekové zastúpenie respondentov s ohľadom na pohlavie je znázornené v grafe 1.

Diagnózy respondentov

Najčastejšou zaznamenanou diagnózou bola nespavosť (32,5 %). Druhou najčastejšou bola úzkostná porucha (25 %), potom depresia (17,5 %). Adaptačná porucha, syndróm závislosti od alkoholu, agorafóbia a poruchy nálady boli zaznamenané u menej ako 10 % pacientov z celkového počtu respondentov (viď graf 2).

Graf 2: Najčastejšie diagnózy u sledovaných respondentov



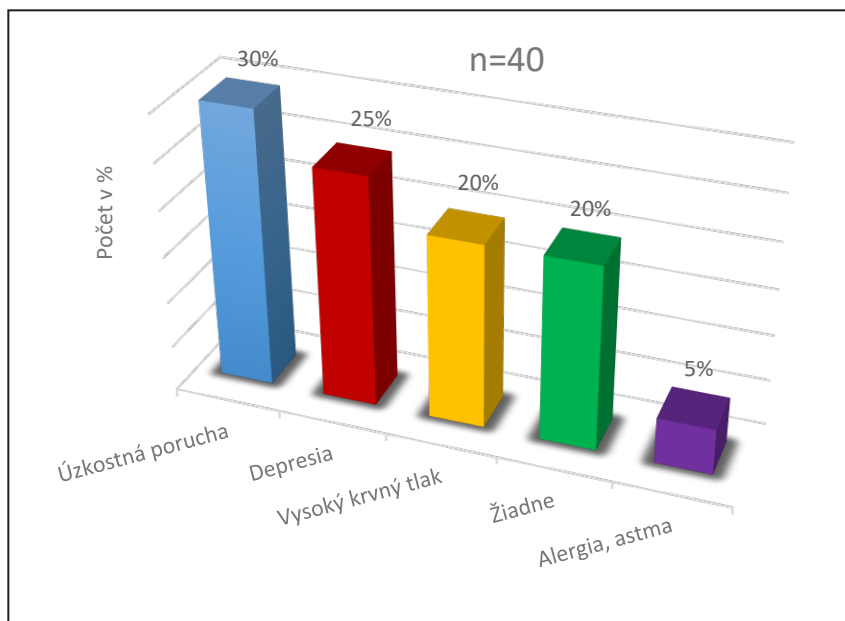
VÝSLEDKY

1. Charakteristika skupiny respondentov

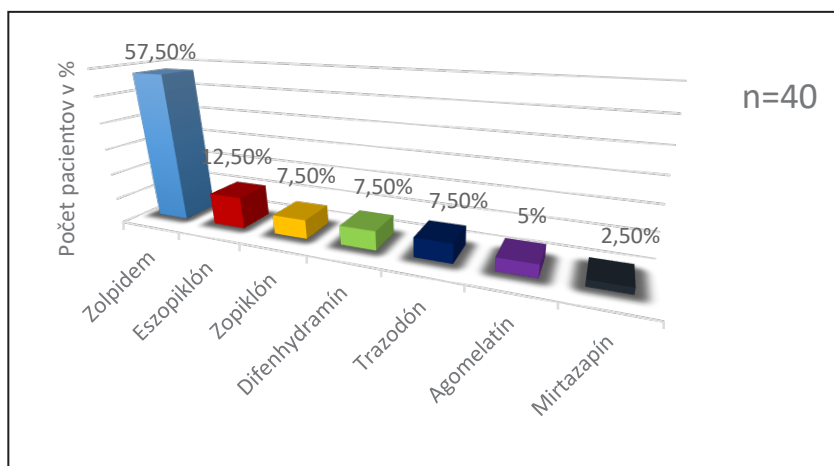
Rozdelenie podľa pohlavia a veku

Do sledovanej skupiny bolo zaradených 40 pacien-

Graf 3: Výskyt komorbidít u respondentov



Graf 4: Najčastejšie predpisované liečivá zo skupiny hypnotiká a sedatíva



Komorbidity

Skupina pacientov bola rozdelená podľa toho, či trpia aj iným pridruženým ochorením. Zastúpenie komorbidít je znázornené v grafe 3.

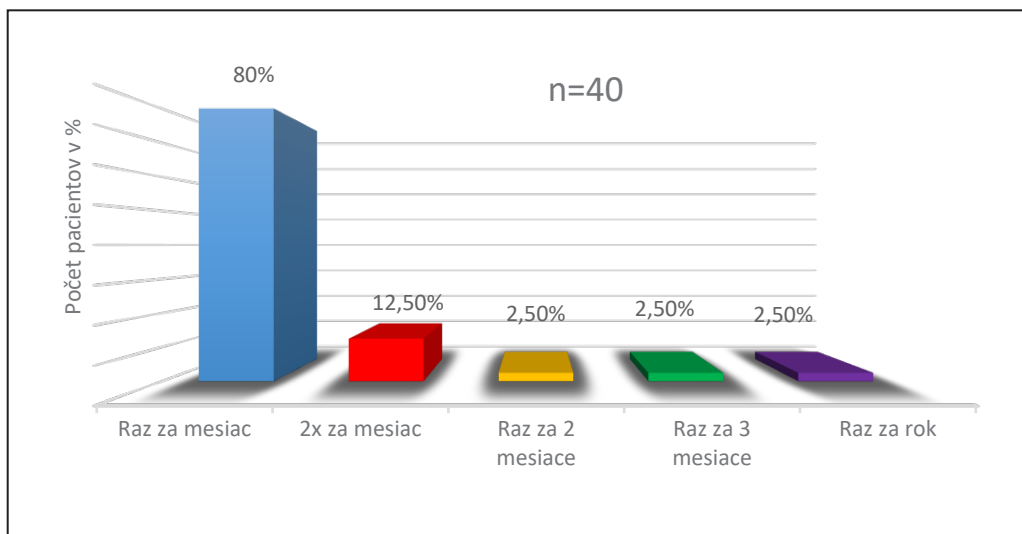
V skupine bolo zaradených 30 % pacientov s pridruženou úzkostnou poruchou, 25 % pacientov s depresiou, 20 % pacientov uviedlo, že trpia vysokým krvným tlakom, 20 % pacientov netrpelo žiadnym iným ochorením a 5 % trpelo astmou alebo alergiou.

2. Terapia pacientov

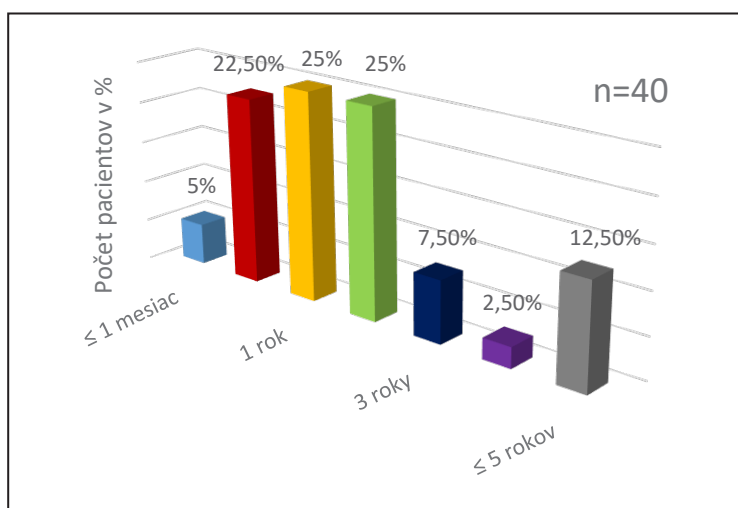
Najčastejšie predpisované liečivá

Liečivá predpisované respondentom sú zosumariované v grafe 4. Najčastejšie predpisovaným liečivom bol zolpidem (57,5 %). Z ďalších liečiv sa používali eszopiklón, zopiklón, difenhidramín, trazodón, agomelatín. Najmenej predpisovaný bol mirtazapín.

Graf 5: Frekvencia predpisovania hypnotík a sedatív



Graf 6: Dĺžka terapie



Frekvencia predpisovania

Najčastejšie si pacienti dávajú predpísať hypnotiká a sedatíva raz do mesiaca mesačnú dávku (až 80 % pacientov); 12,5 % uvádza, že lieky im predpisujú 2x do mesiaca viacerí lekári. Frekvencia predpisovania hypnotík a sedatív je znázornená v grafe 5.

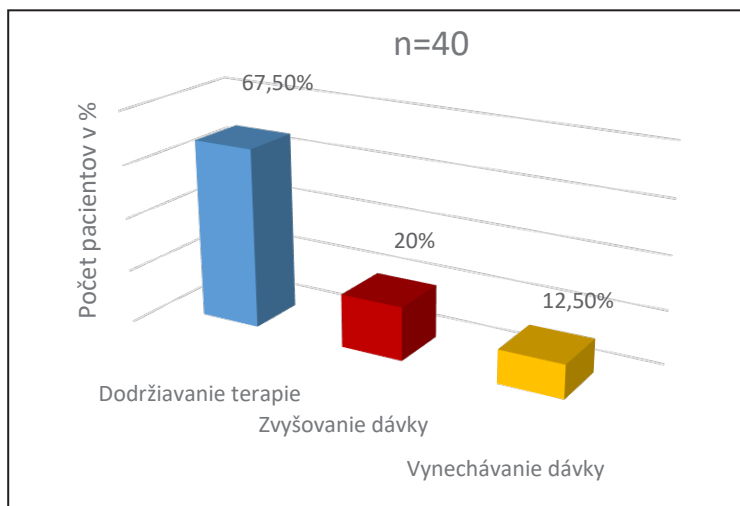
Dĺžka terapie

Najviac pacientov užíva tieto lieky 1 a 2 roky (25 %). Viac ako 5 rokov užíva lieky 12,5 % pacientov. Dĺžka terapie je uvedená v grafe 6.

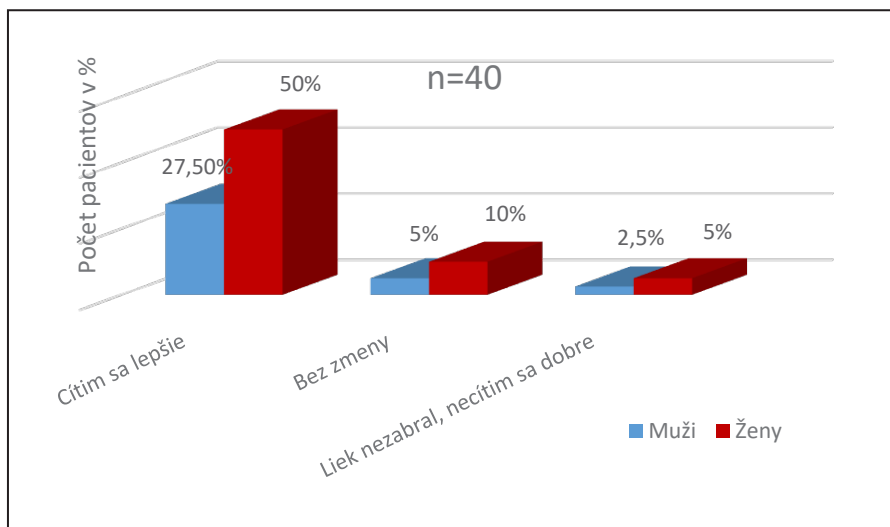
Dodržiavanie terapie

Účinnosť terapie bola ďalším hodnoteným parametrom, ktorý závisí hlavne od jej dodržiavania. Pri tejto otázke bolo viac zodpovedných pacientov (67,5 %). Liečbu porušuje 32,5 %. Najčastejším dôvodom k porušovaniu terapie bolo zvyšovanie dávky kvôli neúčinnosti (20 %). Dávku vynecháva 12,5 % pacientov. Terapiu zámernie prerušovalo 7 pacientov z celkového počtu 40. Percentuálne výsledky dodržiavania terapie sú znázornené v grafe 7.

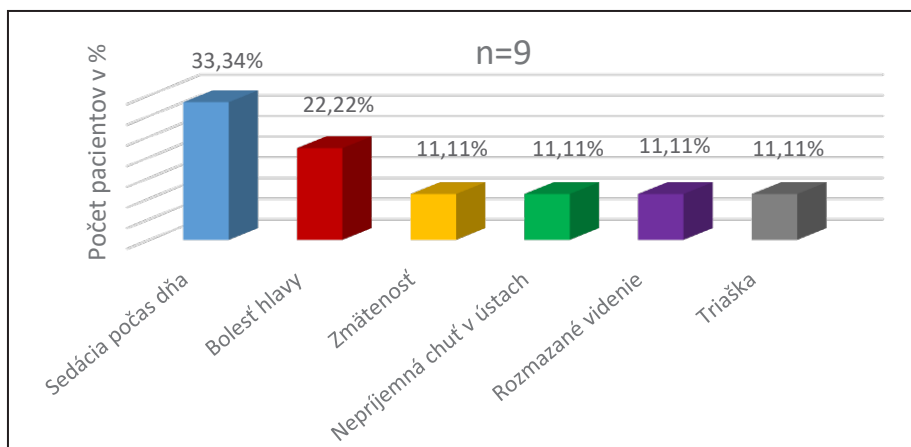
Graf 7: Dodržiavanie terapie



Graf 8: Subjektívny pocit pacientov na účinnosť terapie



Graf 9: Najčastejšie nežiaduce účinky sedatív a hypnotík



Subjektívny pocit respondentov na účinnosť terapie

Viac ako polovica pacientov bola spokojná s nastavenou terapiou; 77,5 % uviedlo, že sa cíti lepšie a ustúpili im primárne problémy (viď graf 8). Možnosť bez zmeny uviedlo 15 %. S účinkom lieku nebolo spokojných 7,5 %; ktorí uviedli, že im liek nezabral a necítia sa dobre.

Nežiaduce účinky

Pozitívnym zistením bolo, že len 22,5 % pacientov pociťovalo nežiaduce účinky liekov. Z 9 pacientov sa 3 pacienti (33,4 %) sťažovali na sedáciu počas dňa. Medzi ďalšie patrili bolesť hlavy, triaška, rozmazané videnie a nepríjemná chuť v ústach. Frekvenciu výskytu najčastejších nežiaducich účinkov znázorňuje graf 9.

Medzi závažné nežiaduce účinky patria aj tolerancia a závislosť, ktoré však ani jeden pacient neuviedol. Už z dĺžky terapie a frekvencie predpisovania vyplýva (viď graf 6 a 7), že pacienti, ktorí užívajú hypnotiká a sedatíva viac ako mesiac, môžu byť na nich závislí. Až 95 % pacientov užíva hypnotiká viac ako je predpísané (max. 4 týždne, aj so znižovaním dávky), dokonca 72,5 % viac ako rok. Tolerancia sa prejavuje zvyšovaním dávky, ktorú uviedlo 20 % pacientov, čo vidíme aj v grafe 8.

DISKUSIA

Do predloženej štúdie bolo zaradených 40 respondentov – 26 žien a 14 mužov, čo potvrdzuje, že nespavosťou a psychickými problémami s potrebou liečby hypnotikami a sedatívami trpia častejšie ženy ako muži. Vo všeobecnosti je u žien vyššia prevalencia nespavosti, syndrómu nepokojných nôh a nespokojnosti so spánkom. Výskum ukázal, že ženy hlásia viac ťažkostí so spánkom a sú vystavené väčšiemu riziku diagnózy nespavosti v porovnaní s mužmi (Nowakowski a kol., 2013).

Vytvorili sme skupiny rôznych vekových kategórií pre presnejšie porovnanie výsledkov. Najväčšiu skupinu tvorili pacienti od 51 do 60 rokov. V porovnaní

s mladšími dospelými je prevalencia nespavosti vyššia u stredných a starších dospelých a zvyšuje sa s vekom. Až 50 % starších dospelých uvádza príznaky nespavosti; to však neznamená, že nespavosť je normálnou súčasťou starnutia (Brewster a kol., 2018).

Hypnotiká a sedatíva sa najviac predpisujú pri terapii insomnie a úzkosti. Aj pri analýze dotazníkov sme zistili, že najviac pacientov bolo liečených na insomniu (32,5 %) a 25 % pacientov na úzkosť. Okrem liečby nespavosti sa môžu sedatíva a hypnotiká použiť aj na liečbu panických porúch, záchvatov a iných stavov, ktoré spôsobujú nepokoj alebo agitovanosť. Je však dôležité poznamenať, že tieto lieky by sa mali používať iba pod vedením zdravotníckeho pracovníka a nemali by sa používať na dlhodobú liečbu bez starostlivého sledovania (Guina a Merrill, 2018).

V rámci terapie bol najviac predpisovaný zolpidem (57,5 %). Ďalej to bol eszopiklón a zopiklón, čiže „Z“ lieky. Najviac používané nebenzodiazepínové hypnotiká ako zolpidem, eszopiklón, zopiklón významne znížili latenciu spánku v porovnaní s placebom v priemere o 20 minút a udržali tieto výsledky dlhodobo (Edinoff a kol., 2021).

Sledovaní respondenti trpeli rôznymi pridruženými ochoreniami. Medzi najčastejšie patrili úzkosť a depresia, ktoré sa objavili u 55 % respondentov. Anamnéza psychiatrických alebo fyzických ochorení a súbežné psychotropné alebo iné CNS lieky súviseli s vyššou prevalenciou užívania hypnotík (Blumstein a kol., 2012).

Až 65 % respondentov v našom prieskume užívalo hypnotiká a sedatíva viac ako rok (5 pacientov dokonca užívalo viac ako 5 rokov). Až 80 % oslovených pacientov uviedlo možnosť raz za mesiac. Celkovo možno povedať, že zatiaľ čo hypnotiká môžu byť účinné pri krátkodobej liečbe nespavosti, dlhodobému užívaniu sa treba vyhnúť vždy, keď je to možné. Dlhodobé užívanie je spojené s rizikom rozvoja tolerance, závislosti a abstinenčným príznakom. Môžu tiež spôsobiť celý rad nežiaducich účinkov, vrátane dennej ospalosti, problémov s pamäťou, zhoršenej koncentrácie a zvýšeného rizika pádov a nehôd. Nežiaduce účinky liekov pociťovalo 9 pacientov

(22,5 %). Z týchto pacientov sa 3 pacienti sťažovali na sedáciu počas dňa, keďže hypnotiká pôsobia tak, že tlmia centrálny nervový systém. Užívanie benzodiazepínov a nebenzodiazepínových hypnotík bolo spojené s významným kognitívnym poškodením, vrátane zníženej pamäti a pozornosti (Edinoff a kol., 2021).

Medzi najväčšie riziká bežne užívaných sedatív a hypnotík, ktoré sú na predpis, patrí vznik ako fyzickej, tak aj psychickej závislosti, ktoré si pacienti ani neuvedomujú. Psychická závislosť sa prejavuje najmä túžbou po látke, ktorú je ťažké prekonať. Pri náhlom vysadení lieku sa môžu vyskytnúť abstinenčné príznaky, ako je úzkosť, nespavosť a záchvaty. V priebehu času si telo môže vyvinúť toleranciu na hypnotiká, čo znamená, že na dosiahnutie rovnakého účinku sú potrebné vyššie dávky a sťažuje sa vysadenie týchto liekov. V našej skupine pacientov bolo 8 pacientov (20 %), ktorí si dávku zvyšovali samovoľne a 38 pacientov (95 %) užívalo lieky dlhodobo v dôsledku tolerancie a závislosti. Zvyšovanie dávky hypnotík bez lekárskeho dohľadu však môže byť nebezpečné a môže viesť k niekoľkým nežiaducim účinkom ako je útlm dýchania, kognitívne poruchy, alebo zhoršenie existujúcich zdravotných stavov. Hypnotiká môžu zhoršiť kognitívne funkcie vrátane pamäti, pozornosti a koncentrácie. To môže ovplyvniť každodenné fungovanie a zvýšiť riziko nehôd a zranení. Štúdie potvrdili, že dlhodobé užívanie hypnotík môže oslabiť imunitný systém, čím sa zvyšuje riziko infekcií. Klinické štúdie hodnotili hypnotiká verzus placebo, kde bola preukázaná o 44 % vyššia miera infekcie medzi účastníkmi, ktorým boli podávané hypnotiká. V kombinovaných klinických štúdiách trpeli účastníci užívajúci hypnotiká na 2,1-krát viac incidentov (nových) depresii ako tí, ktorí užívali placebo. Nešlo o opätovné prepuknutie už existujúcich depresii, ale o depresie spôsobené hypnotikami (Kripke, 2016).

Viac ako polovica pacientov bola spokojná s terapiou nastavenou lekárom. Najčastejšou odpoveďou na subjektívny pocit účinnosti liečby bolo „cítim sa lepšie“, ktorú uviedlo až 31 pacientov (77,5 %) a ustúpili im primárne problémy. Odpoveď bez zmeny

uviedlo 6 pacientov (15 %) a u 3 pacientov liek neúčinkoval (7,5 %).

Z výsledkov štúdie vyplýva, že riziko vzniku tolerancie a závislosti je vysoké, a aj napriek odporúčaniam lekárov a lekárnikov si pacienti často svojvoľne upravujú dávkovanie.

Behaviorálna terapia nespavosti sa často považuje za liečbu prvej línie chronickej nespavosti a ukázalo sa, že je účinná pre väčšinu ľudí s týmto stavom. Zahŕňa odporúčania na vytvorenie prostredia priaznivého pre spánok, vyhýbanie sa stimulantom pred spaním a vytvorenie pravidelného režimu spánku. Kognitívna terapia zahŕňa identifikáciu a zmenu negatívnych myšlienok a presvedčení o spánku, ktoré môžu prispieť k nespavosti. Celkovo je kognitívno-behaviorálna terapia bezpečná a účinná liečba chronickej nespavosti, ktorá môže ľuďom pomôcť zlepšiť kvalitu a kvantitu spánku bez potreby liekov (Rossman, 2019).

ZÁVER

Štúdia vyhodnocuje preskripciu a užívanie liekov zo skupiny sedatíva a hypnotiká u 40 respondentov s ohľadom na ich primárnu diagnózu, vek, pohlavie, dĺžku terapie, frekvenciu predpisovania, odbornosť predpisujúceho lekára, výskyt nežiaducich účinkov, a riziká ich nesprávneho užívania.

Zo zistení tejto práce vyplýva, že sedatíva a hypnotiká sú najviac predpisované pri nespavosti a psychických poruchách, ako je úzkostná porucha a depresia. Najčastejšie predpisovaným liečivom, či už pri samotnej nespavosti, prípadne pri iných ochoreniach, je zolpidem a častejšími užívateľmi sú ženy (65 %). Najviac pacientov bolo liečených vo vekovej kategórii od 51 do 60 rokov (27,5 %). Až 95 % užíva hypnotiká a sedatíva viac ako mesiac, dokonca 72,5 % viac ako rok, čo môže byť výsledok tolerancie a závislosti na týchto liekoch. Aj keď len malé percento pacientov (22,5 %) uviedlo výskyt nežiaducich účinkov, z ktorých prevládala ospalosť počas dňa (33,4 %); je potrebné o nich informovať pacientov. Až 20 % respondentov zvyšovalo dávku samovoľne

bez odporúčania lekára. Raz do mesiaca si dáva lieky predpisovať 80 % pacientov a 12,5 % pacientov má vyššiu spotrebu liekov za mesiac, preto oslovujú aj iných lekárov (všeobecný lekár, internista). Po zahájení terapie sa 77,5 % pacientov cítilo lepšie, avšak je dôležité pacientov edukovať o rizikách dlhodobého a nesprávneho užívania, ktorými sú tolerancia a závislosť.

Pozitívom súčasnosti je e-Health, kde si môže lekár skontrolovať všetky predpísané lieky aj u iných lekárov a zabrániť tak ich zneužívaniu. Dôležité je nepredpisovať pacientom hneď hypnotiká na nespavosť, ale zvážiť aj iné možnosti ako sú rastlinné produkty, prípadne anxiolytiká, ktoré nevyvolávajú závislosť a môžu odstrániť príčinu nespavosti.

ZOZNAM LITERAÚRY

Blumstein, T., Benyamini, Y., Chetrit, A., Mizrahi, E. H., Lerner-Geva, L.: Prevalence and correlates of psychotropic medication use among older adults in Israel: cross-sectional and longitudinal findings from two cohorts a decade apart. *Aging & mental health*, 2012, 16 (5), 636 – 647.

Brewster, G. S., Riegel, B., Gehrman, P. R.: Insomnia in the older adult. *Sleep medicine clinics*, 2018, 13 (1), 13 – 19.

Edinoff, A. N., Nix, C. A., Hollier, J., Sagera, C. E., Delacroix, B. M., Abubakar, T., Cornett, E. M., Kaye, A. M., Kaye, A. D.: Benzodiazepines: uses, dangers, and clinical considerations. *Neurology international*, 2021, 13 (4), 594 – 607.

Griffin, C. E., Kaye, A. M., Bueno, F. R., Kaye, A. D.: Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner Journal*, 2013, 13 (2), 214 – 223.

Guina, J., Merrill, B.: Benzodiazepines I: upping the care on downers: the evidence of risks, benefits and alternatives. *Journal of clinical medicine*, 2018, 7 (2), 17.

Kripke, D. F.: Hypnotic drug risks of mortality, infection, depression, and cancer: but lack of benefit. *F1000Research*, 2016, 5, 918.

Moťovský, B.: Hypnotiká a anxiolytiká [Hypnotics and anxiolytics]. *Psychiatr. Prax.*, 2009, 10 (1), 42 – 45.

Nowakowski, S., Meers, J., Heimbach, E.: Sleep and women's health. *Sleep medicine research*, 2013, 4 (1), 1.

Rossman, J.: Cognitive-behavioral therapy for insomnia: an effective and underutilized treatment for insomnia. *American journal of lifestyle medicine*, 2019, 13 (6), 544 – 547.



OPTIMALIZÁCIA CHRONICKEJ FARMAKOTERAPIE U STARŠÍCH DOSPELÝCH PACIENTOV

OPTIMIZATION OF CHRONIC PHARMACOTHERAPY IN OLDER ADULTS

Mačková, Zuzana; Laca Megyesi, Štefánia

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

zuzana.mackova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Farmakoterapia pacientov vyššieho veku je veľmi špecifická. Stúpajúci vek so sebou prináša výskyt chronických ochorení, polyfarmáciu, pričom zmeny funkčnosti orgánov priamo ovplyvňujú farmakokinetiku a farmakodynamiku podávaných liečiv a tým sa zvyšuje riziko farmakoterapeutických problémov. Optimalizáciou farmakoterapie seniorov môžeme doceliť bezpečnú a zároveň účinnú liečbu. Cieľom našej štúdie bolo identifikovať nevhodné lieky v starobe a vyhodnotiť potenciálne liekové interakcie u zaradených pacientov a navrhnúť odporúčanie na riešenie identifikovaného farmakoterapeutického problému. U našich pacientov boli najčastejšie identifikované problémy v súvislosti s užívaním liekov: prekročenie dávky, užívanie nevhodných liekov v starobe, nedostatočná adhérenca pacientov, polyfarmácia a výskyt liekových interakcií vyžadujúcich manažment farmakoterapie.

Kľúčové slová: farmakoterapia; lekárenská starostlivosť; rizikové faktory; staroba; užívanie liekov

ABSTRACT

Pharmacotherapy in patients in the elderly is specific. Increasing age is associated with occurrence of chronic disorders, polypharmacy and age-related changes directly affect the pharmacokinetics and pharmacodynamics of elderly medications with high risk of drug-related problems. Optimization of elderly pharmacotherapy can achieve safe and effective treatment. The aims of our study were to identify potential inappropriate medication and to assess the potential drug interactions in chronic pharmacotherapy of study cohort and create their management. We concluded that in our sample overdosing, use of potential inappropriate medicines, polypharmacy, non-adherence of patients and occurrence of drug interactions

Tab. 1: Súhrn farmakokinetických zmien u geriatrických pacientov

Vekom podmienené zmeny vo farmakokinetike liečiv a klinické dôsledky		
Farmakokinetická fáza	Vekom podmienené zmeny	Klinické dôsledky
Absorpcia	znížené prekrvenie splachniku a periférie, znížená motilita tráviaceho traktu, pokles absorpčnej plochy, vzostup pH žalúdka	mierne predĺženie absorpčnej fázy u <i>p. o.</i> podaných kyslých liečiv a <i>i. m.</i> podaných liečiv (spomalený nástup účinku liečiv)
Distribúcia	pokles celkovej telesnej vody, zvýšenie celkového telesného tuku, pokles % zastúpenia svalového tkaniva, hypoalbuminémia	zvýšenie plazmatických hladín hydrosolubilných liečiv, riziko toxicity pri kumulácii liposolubilných liečiv v tukovom tkanive, zvýšenie voľnej frakcie liečiv s väzbou na albumín
Metabolizmus	atrofia pečenevého tkaniva a zníženie prietoku krvi pečeňou, pokles aktivity CYP 3A4 enzýmu (staršie ženy) a znížená glukuronidácia u osôb vo veku 80 a viac rokov	spomalenie biotransformácie, zvýšené riziko nežiaducich účinkov liekov, predovšetkým v dôsledku liekových interakcií pri polypragmázii, významný pokles metabolizmu liečiva pri prvom prechode pečeňou
Renálna eliminácia	znížený prietok krvi obličkami, pokles glomerulárnej filtrácie, pokles aktívnej tubulárnej sekrécie	nebezpečenstvo toxicity už pri fyziologickom, t. j. vekom podmienenom poklese glomerulárnej filtrácie u liečiv významne vylučovaných obličkami

Zdroj: Červený a kol., 2014

needing management of pharmacotherapy were present.

Key words: elderly; medication; pharmaceutical care; pharmacotherapy; risk factors

ÚVOD

Systémové a orgánové zmeny vplyvom starnutia môžu významne ovplyvniť farmakoterapeutickú odpoveď organizmu v dôsledku zmien na úrovni farmakokinetiky aj farmakodynamiky podávaných liečiv. Zmeny sa prejavujú jednak vo fáze absorpcie, distribúcie, biotransformácie, ako aj eliminácie liečiva (Červený a kol., 2014; Hegyi a Krajčík, 2015; Mačeková, 2016). Súhrn zmien na úrovni farmakokinetiky uvádza tabuľka 1.

Farmakodynamické zmeny v starnúcom organizme spôsobujú ich odlišnú reakciu na podávané lieky.

Môžu reagovať citlivejšie (napr. na benzodiazepíny, analgetiká) a na niektoré lieky alebo liekové kombinácie naopak menej senzitívne (napr. izoprenalín, propranolol) ako mladší organizmus (Hegyi, 2005; Hegyi a Krajčík, 2015). Starnutím dochádza k zhoršeniu hemostatických mechanizmov, zodpovedných napr. za termoreguláciu, obehovú reakciu na ortostázu, integritu kognitívnych funkcií, funkciu hladkých svalov. Zároveň dochádza k zmenám citlivosti a počtu receptorov pre špecifický účinok liečiv, zmenám prenosu signálu na postreceptorovej úrovni. K ďalším farmakodynamickým zmenám na úrovni CNS patrí pokles dopamínerných D_2 receptorov a vyššia citlivosť seniorov pri užívaní klasických neuroleptík (tras, rigidita, bradykinéza, porucha chôdze, posturálna dysfunkcia), ako aj ďalších antagonistov D_2 receptorov (metoklopramid, 9-hydroxyrisperidónu). Vekom sa zvyšuje riziko hypotermie, často počas užívania sedatív, vazodilatancií, myorelaxancií. Znižuje sa aj motilita GIT, klesá tonus hladkých svalov (hnač-

ky, zápchy, retencia moču, inkontinencia). Na receptorovej úrovni sa zvyšuje citlivosť receptorov napr. pre digoxín a heparín (Fialová a Topinková, 2002; Mačková, 2016).

Klinické dôsledky farmakodynamických zmien sa môžu prejavovať napr. ako **ortostatická hypotenzia**, ktorá je daná stratou citlivosti baroreceptorov, znížením schopnosti organizmu reagovať na reflexnú tachykardiu pri periférnej vazodilatácii. Najčastejšie sa prejavujú pri podávaní nitrátov, centrálnych antihypertenzív, klasických neuroleptík, tricyklických anti-depresív, diuretik, betablokátorov, a. i. Zmeny hemostatických rezerv kardiovaskulárneho systému (KVS) a centrálnej nervovej sústavy (CNS) môžu zase zapríčiniť **pády**, ktoré sa vyskytujú pomerne často pri užívaní sedatív. **Zhoršenie kognitívnych funkcií** je dôsledok straty cholinergických neurónov a zníženej aktivity acetylcholintransferázy. Zároveň sa znižuje aj citlivosť centrálnych parasimpatikových receptorov pre pôsobenie acetylcholínu a dochádza k narušeniu rovnováhy inhibičných a excitačných neurónov. Práve cholinergický deficit v starobe je spájaný s poklesom kognitívnych funkcií, rozvojom demencie, a náhlymi stavmi zmätenosti a delírií (Mačková, 2016). Tieto prejavy sú časté u geriatrických pacientov užívajúcich liečivá s anticholinergickým mechanizmom účinku ako napr. antihistaminiká, antidepresíva, klasické neuroleptiká, ako aj H₂-blokátory, cefuroxim, digoxín (Fialová a Topinková, 2002; Mačková, 2016).

Riziká farmakoterapie starších pacientov

Pre farmakoterapiu starších jedincov je charakteristická vysoká frekvencia výskytu nežiaducich účinkov indikovaných liekov, v dôsledku výraznej polyfarmácie a polypragmázie geriatrických pacientov (Rajec, 2012). Polyfarmácia je súbežné užívanie niekoľkých liekov jedným pacientom, z dôvodu polymorbidity pacienta. Polypragmázia je neracionálna kombinácia viacerých liekov užívaných jedným pacientom (Rajec, 2012; Mačková, 2016).

Riziko **nežiaducich účinkov liekov** (NÚL) sa zvyšuje

počtom súčasne užívaných liekov, ich incidencia u seniorov je všeobecne tri až päťnásobne vyššia ako v strednom veku vplyvom funkčných a orgánových zmien starnúceho organizmu (Weber a kol., 2004; Wawruch a kol., 2008; Rajec, 2012). NÚL sa často prejavujú atypicky, nešpecifickými príznakmi (depresie, apatia, poruchy vedomia, nechutenstvo) a patria k častým dôvodom hospitalizácie starších pacientov. Podľa citovaných zdrojov okolo 20 – 25 % hospitalizácií pacientov vo veku nad 65 rokov je práve z dôvodu výskytu NÚL (Weber a kol., 2004; Wawruch a kol., 2008; Rajec, 2012). NÚL sú pritom často nerozpoznané a podceňované v staršej populácii, pretože ich výskyt sa nezriedka pripisuje prejavom starnutia alebo patologickému stavu pri liečenej chorobe. Seniori si často ani sami nedokážu uvedomiť NÚL, ako je to napr. aj v prípade výskytu kognitívnych porúch (Assuncao a kol., 2018). Pri manifestácii NÚL sa často pristúpi k pridaniu ďalšieho liečiva, namiesto úpravy dávky lieku alebo ukončenia jeho podávania, ide o tzv. „preskripčnú kaskádu“, ktorú popisuje Weber (2004). Podľa publikovanej práce Topinková a kol. (2007), viac ako dve tretiny NÚL sú závislé na dávke podaného lieku a vhodnou korekciou dávky im môžeme úspešne predchádzať (Fialová a Topinková, 2002; Mačková, 2016).

Polyfarmácia a liekové interakcie

Polyfarmácia u pacientov vyššej vekovej skupiny úzko súvisí s predlžovaním života pacientov, u ktorých prevláda polymorbidita a prevaha chronickej symptomatickej liečby nad kauzálnou. Podľa citovaného zdroja, starší pacient užíva v priemere 3 – 12 liekov súčasne, pričom **riziko liekových interakcií** (LI) exponenciálne narastá so zvyšujúcim sa počtom súčasne užívaných liečiv (Magulová a kol., 2004). Riziko liekových interakcií sa zvyšuje pri chronickej liečbe, pri nevhodnom dávkovaní režime a kombinácii liečiv s podobným účinkom, pri duálnej preskripcii, pri samoliečbe liekmi dostupnými bez lekárskeho predpisu a pri užívaní výživových doplnkov (Kriška a kol., 2015; Mačková, 2016).

Pre pacientov vo vyššom veku sú obzvlášť nebez-

pečné LI u dlhodobu podávaných liečiv s vysokým interakčným potenciálom, ako napr. kyselina acetylsalicylová, amiodarón, perorálne antidiabetiká, anti-koagulancia, srdcové glykozidy (digoxín), antiepileptiká. Výsledkom liekových interakcií môže byť napr. akútne krvácanie, hypoglykémia, arytmie, centrálné kŕče, hypertenzná kríza (Kriška a kol., 2006; Kriška a kol., 2015; Mačková, 2016).

Prevenca farmakoterapeutických problémov u seniorov

Pre minimalizáciu nežiaduceho vplyvu farmakoterapie u starších pacientov je potrebná v prvom rade individuálna korekcia dávok so zohľadnením aktuálnej funkcie eliminačných orgánov, obmedzenie polypragmázie, dôsledné klinické monitorovanie pacienta, identifikácia a obmedzenie používania rizikových liečiv pre pacientov vyššieho veku, monitorovanie NÚL a LI (Lenander a kol., 2018; Milos a kol., 2018). Pre optimalizáciu farmakoterapie starších pacientov slúžia rôzne odporúčania, ktoré môžu výrazne pomôcť znížiť alebo úplne eliminovať negatívny dopad dlhodobého užívania liekov vo vyššom veku (Mačková, 2016). Nižšie sú uvedené najčastejšie používané odporúčania.

1. BEERSOVE kritériá

Prvý zoznam liekov potenciálne nevhodných v geriatrii zostavil Beers v roku 1991 (The American Geriatrics Society 2012 Beers Criteria Update Expert Panel. American Geriatrics Society – Updated Beers Criteria for Potentially Inappropriate Medication Use in Older Adults). Tento zoznam bol niekoľkokrát inovovaný. V roku 2012 bol publikovaný český zoznam, ktorý zahŕňa celkom 71 jednotlivých liečiv. Na Slovensku zatiaľ nie je vytvorený podobný zoznam (Beers a kol. 2000; Wawruch a kol., 2008b; Topinková a kol., 2012; Mačková, 2016; Zrubáková a kol., 2016).

2. STOPP/START kritériá (2008)

Írske kritériá sú alternatívou Beersových kritérií upravenou pre európske krajiny. Je to najznámejší a zároveň najpoužívanější program na zlepšenie pre-

skripcie z roku 2009 (O'Mahony, a kol., 2010; Mačková, 2016). Inovovaný bol v r. 2014 (O'Mahony a kol., 2014).

V časti **STOPP** (Screening Tool of Older People's potentially inappropriate Prescriptions) sú zhrnuté liečivá, ktorých podávanie je **nevhodné** alebo **rizikové**. Časť **START** (Screening Tool to Alert doctors to the Right Treatment) upozorňuje na vhodnosť zahájiť potenciálnu prospešnú liečbu u seniorov. START kritériá sa nevzťahujú na pacientov v paliatívnej starostlivosti a pacientov s krátkym očakávaním prežitia. Zoznam obsahuje 22 klinických situácií usporiadaných podľa jednotlivých fyziologických systémov (Mačková, 2016).

3. EXPERTNÝ KONSENZUS ČR 2012 (EK ČR 2012) v oblasti liečiv a liekových postupov potenciálne nevhodných v starobe

Vysoká variabilita dostupnosti registrovaných liekov v jednotlivých krajinách bola dôvodom pre vytvorenie novej koncepcie v roku 2012, ktorá bola vytvorená v Českej republike: „Národní kritéria léčiv a lékových postupů nevhodných ve stáří 2012“, ktoré zahŕňajú dve oblasti:

1. liečivá potenciálne nevhodné v starobe nezávislé na diagnózach pacienta vrátane dávkovacích schém
2. základné interakcie liek-choroba časté v starobe, pri zohľadnení hlavných komorbidít pacienta (Mačková, 2016).

Odporúčania publikované v zahraničí boli revidované v spolupráci s multidisciplinárnu expertnou komisiou 15 expertov z odboru geriatrie, internej medicíny, všeobecného lekárstva, klinickej farmácie a klinickej farmakológie, a doplnené o ďalšie kritériá nevhodných liekov a liekových postupov s očakávanou nízkou terapeutickou hodnotou, špecifické pre podmienky Českej republiky (Fialová a kol., 2012; Mačková, 2016).

4. Nízkodávkové režimy

Podľa zásad preskripcie liekov pre pacientov vo

Tab. 2: Nízkodávkový režim vybraných liečiv

Liečivo	Obvyklá doporučená dávka	Účinná dávka u seniorov
atorvastatín	10 mg/denne	5 mg/denne
diklofenak	100 – 200 mg/denne	75 mg/denne
enalapril	5 mg/denne	2,5 mg/denne
hydrochlórotiazid	400 – 800 mg 3 – 4× denne	200 mg 3 – 4× denne
kaptopril	50 – 75 mg/denne	12,5 mg 1 – 2× denne
metoprolol	100 mg/denne	50 mg/denne
omeprazol	20 mg/denne	10 mg/denne
ranitidín	150 mg 2× denne	100 mg 2× denne

Zdroj: Červený a kol., 2014

vyššom veku sa odporúča zahájenie liečby najnižšou možnou dávkou, ktorú sa odporúča postupne a pomaly zvyšovať. Za vhodnú úvodnú dávku sa obvykle považuje polovica obvyklej dávky pre dospelých (Mačková, 2016). U niektorých liekov sa odporúčaná korekcia dávok uvádza v súhrnnej charakteristike o lieku. Odporúčania pre korekciu rizikových liekov sumarizuje dokument: Doporučený diagnostický postup pre všeobecných lekárov (DDPT), ktorý bol vypracovaný pre optimalizáciu farmakoterapie starších pacientov (Červený a Topinková, 2014; Mačková, 2016). Odporúčania vychádzajú z farmakokinetických štúdií, ktoré potvrdzujú vyššie plazmatické koncentrácie liečiv a vyššiu účinnosť u starších osôb (Červený a kol., 2014; Mačková, 2016). Príklady nízkodávkových liekov uvádza tabuľka 2.

Cieľom predloženej štúdie bolo identifikovať potenciálne rizikové faktory, ktoré môžu prispieť k farmakoterapeutickým problémom, analýzou kompletnej liekovej anamnézy pacientov. Štúdia bola zameraná na identifikáciu potenciálne nevhodných liečiv v starobe, na identifikáciu potenciálnych liekových interakcií a návrh manažmentu zistených farmakoterapeutických problémov.

MATERIÁL A METÓDY

Štúdia trvala 6 mesiacov v anonymizovanej verejnej lekární v Košiciach. Do štúdie bolo zaradených 65 pacientov (46 % mužov a 53 % žien), vo veku 60

– 87 rokov s priemerným vekom 71,61 rokov. Pacienti sa prevažne liečili na chronické kardiovaskulárne ochorenia, s počtom komorbidít ≥ 3 (medián 6). Prehľad najviac predpisovaných liekov v našom súbore pacientov sumarizuje tabuľka 3 a počet komorbidít znázorňuje graf 1.

Zaznamenávali sme chronickú liekovú anamnézu pacientov, vrátane liekov, ktorých výdaj nie je viazaný na lekársky predpis, a výživových doplnkov. Konzultácie s pacientami boli zamerané na identifikáciu nevhodných liekov v starobe a na identifikáciu potenciálnych liekových interakcií.

Inklúzne kritériá štúdie: vek ≥ 60 rokov, chronická farmakoterapia kardiovaskulárnych ochorení, kompletná lieková anamnéza, súhlas pacienta so zaradením do štúdie.

Exklúzne kritériá štúdie: vek menej ako 60 rokov, pacienti/zákazníci lekárne s neúplnou liekovou anamnézou.

Na základe liekovej anamnézy pacientov sa vyhodnotila spotreba potenciálne nevhodných liečiv v starobe podľa Českého konsenzu z r. 2012 a liekové interakcie sa vyhodnotili pomocou počítačového programu Lexicomp, zaznamenali sa všetky potenciálne liekové interakcie typu D a X.

Liekové interakcie:

interakcia typ A – nie je známa interakcia liečiv

Tab. 3: Prehľad najviac predpisovaných liekov v našom súbore pacientov (N = 65)

1.	Antihypertenzíva	betablokátory, inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu
2.	Hypolipidemiká	atorvastatín
3.	Diuretiká	furosemid, indapamid
4.	Analgetiká	tramadol, metamizol
5.	Nesteroidné antiflogistiká	aceklofenak, nimesulid, diklofenak
6.	Antiarytmiká	propanolol, amiodarón
7.	Blokátory vápnikového vstupu	amlodipín
8.	Sedatíva, hypnotiká	bromazepam, alprazolam, zolpidem
9.	Liečivá gastrointestinálneho systému	omeprazol, pantoprazol, itoprid
10.	Antiagreganciá, antikoagulanciá	kyselina acetylsalicylová, warfarín, klopidogrel

interakcia typ B – nie je potrebné zasahovať do liečby

interakcia typ C – nutné monitorovať terapiu

interakcia typ D – potreba zvážiť terapiu

interakcia typ X – potreba vyvarovať sa danej kombinácii liečiv.

Na záver boli výsledky sumarizované a bolo vypracované odporúčanie pre riešenie identifikovaných farmakoterapeutických problémov (viď tab. 4).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom predloženej štúdie bolo identifikovať potenciálne rizikové faktory, ktoré môžu prispieť k farmakoterapeutickým problémom, analýzou kompletnej liekovej anamnézy pacientov. Štúdia bola fokusovaná na identifikáciu potenciálnych liekových interakcií a na identifikáciu potenciálne nevhodných liečiv v starobe.

Pri analýze farmakoterapie pacientov sme došli k nasledujúcim zisteniam:

- 1) odhalili sme výskyt potenciálnych liekových interakcií typu D a X v počte 97, čo znamená, že u každého zaradeného pacienta je minimálne v jednom prípade potrebné prehodnotiť predpísanú farmakoterapiu
- 2) identifikovali sme 12 potenciálne nevhodných lie-

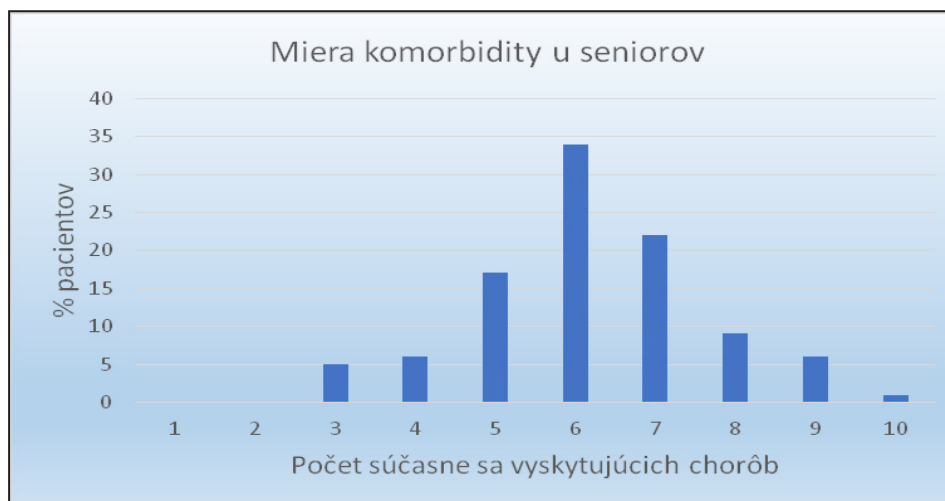
čiv v starobe, ktoré pacienti dlhodobo užívali v chronickej liečbe.

Súhrn všetkých potenciálnych interakcií typu D a X, vrátane manažmentu farmakoterapeutických problémov, uvádza tabuľka 4.

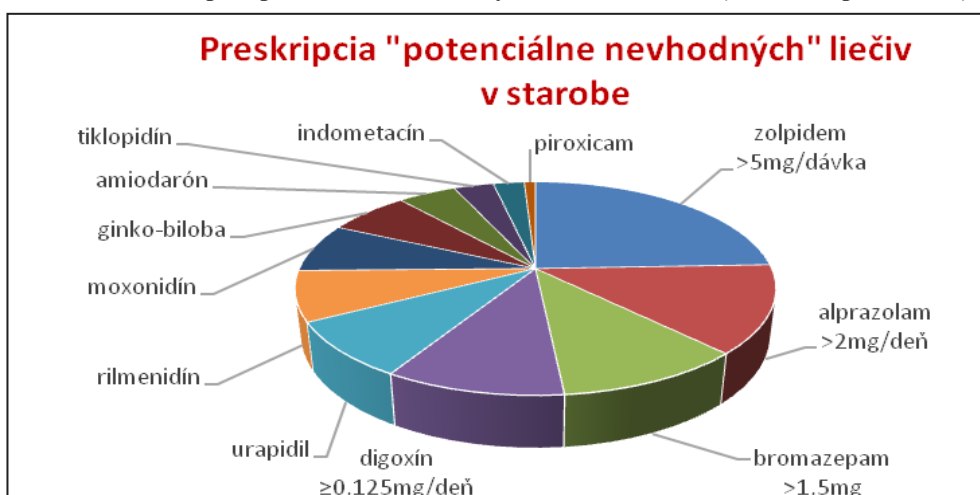
Vysoká prevalencia chronických ochorení je vo vyššom veku spojená s dlhodobým užívaním viacerých liekov (Haila a kol., 2020; Krustev a kol., 2022), tzv. polyfarmáciou. U staršej populácie je spotreba liekov nadpriemerná a náklady na lieky majú najvyšší podiel z celkových nákladov na zdravotnú starostlivosť v porovnaní s ostatnými vekovými skupinami (Beers a kol., 2000). Ako prezentuje zahraničná štúdia, aj v skupine seniorov žijúcich v domácych podmienkach užíva aspoň jeden liek 75 – 93 % seniorov, pričom priemerne užívajú 3,5 – 8 liekov (Guay a Schamader, 2003). Podľa štatistiky toho času seniori v ambulantnej starostlivosti užívajú v priemere 4 – 6 liekov, hospitalizovaní pacienti 5 – 8 liekov. Závery domácych a zahraničných štúdií sa významne nelíšia (Fialová a Topinková, 2002; Mačková, 2016). Pacienti v našom súbore priemerne užívali 6,7 liekov. Prehľad najčastejšie užívaných liekov u našich pacientov sumarizuje tabuľka 3 a mieru komorbidít pacientov znázorňuje graf 1.

Množstvo štúdií dokumentuje výskyt farmakoterapeutických komplikácií u starších pacientov (NÚL a LI), ktoré sa zvyšujú vekom a počtom súčasne užíva-

Graf 1: Miera komorbidity u seniorov (n = 65)



Graf 2: Preskripcia potenciálne nevhodných liečiv v starobe (N = 65 respondentov)



Zolpidem 24,4 %; alprazolam 13,3 %; bromazepam 10,7 %; digoxín 10,2 %; urapidil 8,5 %; rilmenidín 7,6 %; moxonidín 7,4 %; Ginko biloba 6,6 %; amiodarón 4,7 %; tiklopidín 3,2 %; indometacín 2,5 %; piracetam 0,9 %.

ných liekov (Fialová a Topinková, 2002; Mačková, 2016; Haila a kol., 2020; Krustev a kol., 2022). Mnohé zahraničné práce poukazujú na významný nárast hospitalizácií (hlavne rehospitalizácií) a zvýšenie celkových nákladov na liečbu v dôsledku problémov v súvislosti s užívaním liekov (Haila a kol., 2020). Poukazujú na vysoké percento hospitalizácií z dôvodu NÚL zapríčinených buď užívaním nevhodných liekov v starobe, v dôsledku liekových interakcií, ale-

bo kontraindikovaných liečiv (Fialová a Topinková, 2002; Haila a kol., 2020). Slovenská štúdia z roku 2023 (Jankyová a kol., 2023) uvádza, že medzi počtom užívaných liekov a počtom nevhodných liekov v starobe (PIM) je silná pozitívna korelácia. Polyfarmácia až 9,5-násobne zvyšuje riziko PIM (OR 9,51; 95 % CI 4,86 – 18,61; $P < 0,001$ (Jankyová a kol., 2023).

Farmakoterapeutické problémy – potenciálne nevhodné liečivá (PIM) a liekové interakcie (LI)

Pri analýze chronickej farmakoterapie pacientov bolo identifikovaných 12 potenciálne nevhodných liečiv (PIM) v starobe (viď graf 2). Zolpidem, alprazolam a bromazepam nie sú síce zakázané podľa kritérií Expertného konsenzu ČR z roku 2012 (EK ČR 2012), ale sú pre ne stanovené maximálne dávky aj dĺžka užívania, ktoré boli v našom prípade u všetkých pacientov prekročené. Český konsenzus 2012 pri benzodiazepínoch uvádza, že vyššie dávky nie sú spojené s vyššou účinnosťou (Fialová a kol. 2012; Mačková, 2016); ale s vyšším výskytom NÚL. Zariadení pacienti ho pritom užívali dlhodobo, niekoľko rokov. Alprazolam je jedným z najčastejšie predpisovaným PIM na Slovensku v dlhodobej liečbe (Jankyová a kol., 2023).

V našom súbore bol ďalším identifikovaným PIM digoxín v dávke 0,250 mg. Podľa EK ČR 2012 je potrebná korekcia dávky na max. 0,125 mg denne. U starších pacientov je odporúčané terapeutické monitorovanie sérových hladín kardioglykozidu z dôvodu celkovej straty svalovej hmoty v organizme a kvôli zníženým funkciám eliminačných orgánov. U našich pacientov neboli monitorované hladiny digoxínu ani v jednom prípade. Medzi závažné nežiaduce prejavy vysokých sérových koncentrácií digoxínu patria srdcové arytmie a hypokaliémia (Suchý, 2011; Mačková, 2016); ktoré sú často umocnené dehydratáciou u starších pacientov.

Amiodarón patrí medzi najúčinnnejšie antiarytmiká, súčasne ale patrí aj medzi liečivá potenciálne nevhodné v starobe. Má dlhý eliminačný čas, vysokú lipofilitu, s ktorou je spojená výrazná kumulácia v tukovom tkanive (Suchý, 2011; Mačková, 2016). Vyvoláva celú škálu nežiaducich účinkov, ktoré sa manifestujú hlavne u starších pacientov. Podľa EK ČR 2012 amiodarón je potenciálne nevhodným pre seniorov a jeho podávanie u starších sa má dôkladne zvážiť. Výraznou limitáciou v klinickej praxi je však skutočnosť, že amiodarón stále nemá vyhovujúcu alternatívu, ktorú by sme mohli spoľahlivo preferovať u starších. U našich pacientov bola zaznamenaná

kombinácia amiodarónu s digoxínom a famotidínom. V oboch prípadoch išlo o liekové interakcie typu D s prejavmi tachykardie, ako prejav zvýšenej toxicity digoxínu. U pacientov sme v liekovej anamnéze zaznamenali liečivá (bromazepam, zolpidem), ktorých indikácia môže súvisieť s liečbou nežiaduceho prejavu tejto kombinácie. Pacient pravidelne užíval magnezium. LI amiodarónu s atorvastatínom sme u pacienta zaznamenali, ale bez klinického prejavu. Počas konzultácie vyplynulo, že v minulosti mal výrazné bolesti svalstva dolných končatín, t. č. lieky neužíva pravidelne (podľa udania obdeň, resp. maximálne 3x týždenne) z dôvodu obáv z NÚL (Mačková, 2016).

Najviac interakcií typu D sa zaznamenalo u našich pacientov v kombinácii s moxonidínom, pregabalínom, tramadolom. LI sa môžu prejavovať výraznou sedáciou, s vysokým rizikom pádov (Fialová a kol., 2012); pričom pády a fraktúry sú na 6. mieste ako príčiny úmrtia u starých ľudí (Grudmann, 2001). U 30 – 40 % ľudí starších ako 65 rokov a 50 % ľudí starších ako 80 rokov je zaznamenaná incidencia pádov aspoň raz za rok (Grudmann, 2001; Mačková, 2016; Yang a kol., 2023). U našich pacientov nebola zaznamenaná incidencia pádu za posledný rok ani v jednom prípade.

Ginkgo biloba L. EGb 761 najviac interagovala (LI typu D) s kyselinou acetylsalicylovou (KAS), indometacínom, a ďalšími nesteroidnými antiflogistikami (NSA), piracetamom, nandroparínom. Klinickým prejavom boli hlavne nadmerné krvácavé stavy, jednak po poranení, alebo v ústnej dutine, či tvorbou podliatin. EK ČR 2012 odporúča terapeutickú zdržanlivosť. Dlhodobé užívanie vazodilatancií má diskutabilnú účinnosť. Pacienti, u ktorých sa zaznamenala lieková interakcia častejšie, užívali rutozid v kombinácii s vitamínom C (Ascorutin tbl.) indikovaný od ošetrojúceho lekára a lokálne formy heparínu (Mačková, 2016).

U našich pacientov sme zaznamenali klopido-rel v kombinácii s omeprazolom a pantoprazolom. V oboch prípadoch ide o LI typu X, ktorému sa odporúča vyhnúť. Hrozilo riziko zlyhania antiagregačnej liečby a rozvinutie život ohrozujúceho stavu, trom-

Tab. 4: Liekové interakcie (typ D, X) vybraných liečiv podľa ATC skupín a ich manažment

INTERAGUJÚCE LIEČIVÁ		VÝSLEDOK INTERAKCIE	ODPORÚČANIE
TRÁVIACI TRAKT A METABOLIZMUS			
omeprazol	klopidogrel	riziko trombózy, opuchy	prehodnotiť indikáciu omeprazolu, resp. časový odstup min. 2 h ^{1,2)}
famotidín	amiodarón	arytmie	famotidín znížiť dávku ⁴⁾ prehodnotiť indikáciu amiodarónu ³⁾
kyselina thioktová	uhličitan horečnatý	neuropatické bolesti	časový odstup min. 2 h ^{1,2)}
glimepirid	sitagliptín	výrazná hypoglykémia	úprava dávok, resp. voľba jedného perorálneho antidiabetika ¹⁾
chlorid draselný (KCl)	kálium šetriace diuretiká	hyperkaliémia	vysadiť KCl, monitorovať hl. K ⁺ ¹⁾
	cetirizín, loratadín desloratadín	↑ulcerogénny efekt KCl	alternatívne antihistaminikum dimetindén – krátkodobo ¹⁾
			terapeutická zdržanlivosť ³⁾
KRV A KRVOTVORNÉ ORGÁNY			
kyselina acetylsalicylová	ibuprofén diklofenak	↑riziko krvácania, GIT a nefrotoxicity	vyhýbať sa kombinácii ^{1,2)}
			diklofenak 75mg/deň, ibuprofén 200 mg/dávka (príležitostne) ⁵⁾
tiklopidín	karbamazepín	riziko trombózy, opuchy	alternatíva: klopidogrel ³⁾
nandroparín	Ginkgo biloba L. EGb 761	↑riziko krvácania	vyhýbať sa kombinácii ^{1,2)}
	KAS		
KARDIOVASKULÁRNY SYSTÉM			
amiodarón	atorvastatín simvastatín	myalgie	↓dávku statínu na 10 mg ⁵⁾
	digoxín v dávke ≥0,125 mg/dávka	↑ sérové hl. dig.- ↑ toxicita digoxínu	↓dávku digoxínu a monitorovať hladiny digoxínu ¹⁾
			zvážiť náhradu digoxínu: betablokátory ³⁾
			dávka digoxínu do 0,125mg/deň
bisoprolol	karbamazepín	↓ úč. betablok. >hypertenzné stavy	dostatočný časový odstup min. 2 – 3 h ¹⁾
nitredipín	kyselina ursodeoxycholová	↓ absorpcia nitredipínu, >hypertenzné stavy	
perindopril	valsartan	↑hl. ACEI- ↑toxicita, hypotenzia, hyper K ⁺	zmeniť antihypertenzívum, monitorovať hl. K ⁺ ¹⁾
amilorid	chlorid draselný	hyperkaliémia	vysadiť KCl, ↑hydratáciu, monitorovať hl. K ⁺ ¹⁾
spironolaktón			
furosemid	NSA ibuprofén diklofenak	↓ úč.diuretika, ↑uvoľň. vazodil. prostaglandínu ↑toxicita NSA	monitorovať renálne funkcie, tlak krvi, hladiny K ⁺ ¹⁾
atorvastatín	amiodarón	myalgie	↓dávku atorvastatínu 10 mg ⁵⁾
simvastatín	verapamil	myalgie	↓dávku simvastatínu 10 mg ⁵⁾ fluvastatín ³⁾
	karbamazepín	↓hladina simvastatínu	fluvastatín ¹⁾
ezetimib + simvastatín	verapamil	myalgie	↓dávku simvastatínu 10 mg ⁵⁾
			fluvastatín ³⁾

σίran železnatý	uhl. vápenatý + vitamín D	↓ absorpcia železa	časový odstup od podania Fe ²⁺ min. 2 – 4 h ¹⁾
			σίran železnatý podávať max. do 325 mg/deň ³⁾
SYSTÉMOVÉ HORMÓNY S VÝNIMKOU POHLAVNÝCH HORMÓNOV			
prednizón	uhl. vápenatý	↓ absorpcia prednisónu	minimálny odstup 2 h ¹⁾
MUSKULOSKELETÁLNY SYSTÉM			
ibuprofén diklofenak nimesulid	diklofenak KAS, indometacín	riziko krvácania, GIT a nefrotoxicity	terapeutická duplikácia, voľba jedného NSA ¹⁾
allopurinol	ramipril/HCT	ACEI ↑ hypersenz. reakciu na allopurinol – riziko prudkej anaf. reakcie	monitorovať pacienta, ¹⁾ korigovať dávku liečiva
	uhl. horečnatý	↓ absorpcia allopurinolu	časový odstup min. 3 h ¹⁾
CENTRÁLNA NERVOVÁ SÚSTAVA			
hypnotiká, sedatíva anxiolytiká centrálne AH zolpidem moxonidín	tramadol a jeho kombinácie antihistaminiká anxiolytiká	výrazná sedácia	1. Vyhýbať sa týmto kombináciám ¹⁾ 2. u seniorov indukovať ½ a nižšie dávky, a to max: zolpidem < 5 mg/dávka alprazolam < 2 mg/deň bromazepam < 1,5 mg ³⁾ oxazepam < 30 mg/deň
paroxetín (SSRI)	diklofenak (nes. NSA)	↑protidošt. úč. NSA – zvýšená krvácavosť, riziko zlyhania antidepresívnej liečby	voliť alternatívu NSA, napr. paracetamol ^{1,3)}
kvetiapín	mirtazapín donepezil	srdcové arytmie	vyhýbať sa kombinácií s kvetiapínom, uprednostniť monoterapiu depresie, napr. SSRI – citalopram, sertralín ^{1,3)}
RESPIRAČNÝ SYSTÉM			
cetirizín desloratadín loratadín	ipratropín + fenoterol chlorid draselný zolpidem	↑riziko NÚL s anticholinérgickým mechanizmom zvýšená sedácia	dimetindén ¹⁾ terapeutická zdržanlivosť ³⁾ dimetindén, monitorovať hl. K ⁺ , zvažiť potrebu suplementácie ³⁾ terapeutická zdržanlivosť ³⁾ ↓dávky hypnotika do 5 mg/dávka ³⁾

¹⁾ Lexicomp; ²⁾ SmPC; ³⁾ Expertný konsenzus Českej republiky 2012; ⁴⁾ Beersove kritériá, ⁵⁾ Doporučený diagnostický postup pre všeobecných lekárov.

ACEI – inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu, AH – antihypertenzíva, KAS – kyselina acetylosalicylová, GIT – gastrointestinálny trakt, HCT – hydrochlórotiazid, NSA – nesteroidné antiflogistiká, NÚL – nežiaduce účinky liekov, SSRI – selektívne inhibítory spätného vychytávania sérotonínu.

bózy. U pacienta, ktorý mal indikovaný pantoprazol sme nezaznamenali žiadne klinické prejavy LI, z dôvodu nedostatočnej adherencie k liečbe, ako to vyplynulo počas konzultácie. Pacient, ktorý užíval omeprazol, mal výrazné opuchy a bolesti dolných končatín. V samoliečbe dlhodobo užíval topické lieky s obsa-

hom heparínu a mal indikovaný furosemid od ošetrojúceho lekára. Môžeme predpokladať, že diuretikum bolo pridané na zmiernenie opuchov, teda na liečbu nežiaducich prejavov farmakoterapie (Mačeková, 2016). Lieková interakcia bola konzultovaná s hematológom, pacient bol poučený a liečba bola upravená.

Potenciálne nevhodné liečivá – **urapidil, moxonidín, rilmenidín**, sa tiež vyskytovali v liekových anamnézach našich pacientov. Z nich bola zaznamenaná iba jedna LI typu D medzi hypnotikom (zolpidem) a moxonidínom, LI typu X sa nevyskytovala. Podľa EK ČR 2012 tieto liečivá nie sú vhodné pre seniorov, odporúča sa voliť iné, bezpečnejšie liečivo, napr. zo skupiny betablokátorov. LI je možné vyriešiť jednak znížením dávky zolpidemu na optimálnu dávku pre starších, t. j. max. 5 mg/dávka, alebo voľbou iného antihypertenzíva. Moxonidín patrí medzi liečivá, ktoré negatívne vplyvajú na kognitívne funkcie pacientov. Zhoršené kognitívne funkcie pacientov môžu výrazne ovplyvniť *compliance* pacientov (Grundmann, 2001). Ak sa však užíva moxonidín súčasne s hypnotikom, hrozí výrazná hypotenzia a zvyšuje sa riziko pádov a fraktúr (Mačková, 2016). U týchto pacientov boli zaznamenané prejavy LI ako bolesti hlavy, závraty, ktoré boli riešené podávaním ďalšej medikácie ako analgetiká (ibuprofén, paracetamol).

Ďalej sme zistili, že 37 % respondentov v našej kohorte užívalo rizikové lieky pre starších, u ktorých je odporúčaná korekcia dávky (viď graf 2). Všetci pacienti užívali lieky v bežných dávkach pre dospelých, ktoré sú aj o 50 % vyššie ako odporúča Doporučený diagnostický postup pre všeobecných lekárov (DDTP) publikovaný autorským kolektívom Červený a kol. (2014). V prípade omeprazolu je odporúčaná dávka pre starších pacientov (10 mg/deň), pričom 3 pacienti užívali dlhodobo v dávke 40 mg/deň. V tomto prípade išlo až o štvornásobné prekročenie dávky.

Môžeme teda skonštatovať, že starší pacienti sú právom označení za vysokorizikóvu skupinu pacientov, ktorá veľmi citlivo reaguje na farmakoterapiu. Pre minimalizáciu nežiaducich reakcií v súvislosti s užívaním liekov je vhodné systematické liekové poradenstvo, ktoré by malo zahŕňať aj záznamy všetkých nežiaducich reakcií pacienta, ako aj stále revidovaný zoznam liekov, ktoré pacient v danom období reálne užíva.

ZÁVER

Rapidným starnutím obyvateľstva prudko stúpajú aj náklady na poskytovanú zdravotnú starostlivosť. Náklady na farmakoterapiu starších pacientov predstavujú zhruba tretinu celkových nákladov vynaložených na lieky. Optimalizácia farmakoterapie starších pacientov má preto kľúčový význam. Lekárnik a klinický farmaceut sú odborníci pre posúdenie terapeuticko-hodnoty lieku, výskyt nežiaducich účinkov liekov s komplexným zohľadnením individuálnych potrieb pacienta, aby sa docielil minimálny výskyt farmakoterapeutických problémov. Prínos lekárnikov v tejto oblasti potvrdzujú výsledky mnohých prieskumov realizovaných v zahraničí aj na Slovensku.

V našej štúdii boli najčastejšie identifikované problémy u starších pacientov v súvislosti s užívaním liekov ako prekročenie odporúčanej dávky, užívanie nevhodných liekov v starobe, výrazná polypragmázia, polyfarmácia s výskytom početných liekových interakcií a neadherencia pacientov. Pri analýze farmakoterapie pacientov sme odhalili, že vyše 20 % našich pacientov užíva aspoň jeden nevhodný liek v starobe a identifikovali sme výskyt liekových interakcií vyžadujúcich dôsledné monitorovanie pacientov alebo prehodnotenie (zmenu) farmakoterapie. U vyše tretiny pacientov sme odhalili nepravidelné užívanie liekov a nedostatočnú adhérenciu k predpísanej liečbe. Farmakoterapia starších pacientov by mala byť pritom účinná a bezpečná, zahájená s čo najmenším počtom podávaných liekov. Pri systematickom liekovom poradenstve lekárnici dokážu odhaliť potenciálne farmakoterapeutické problémy aj u starších pacientov. Optimalizácia farmakoterapie a edukácia pacientov o správnom užívaní liekov následne môže znížiť výskyt očakávaných komplikácií v súvislosti s užívaním liekov a zlepšiť aj adhérenciu pacientov.

ZOZNAM LITERATÚRY

Beers, M. H., Baran, R. W., Frenia, K.: Drugs and the elderly, Part 1: The problems facing managed care. *The American Managed Care*, 2000, 6

(12), 1313 – 1320.

Červený, R., Topinková, E. a kol.: *Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře* [Recommended diagnostic and therapeutic procedures for general practical treatment]. Praha: CDP-PL, 2014. <http://www.svl.cz/files/files/Doporucene-postupy-od-2013/DP-Geriatrie-2014.pdf>. [cit. 8-9-2016].

Fialová, D., Topinková, E.: Specifické rysy geriatrické farmakoterapie z pohledu farmakokinetických a farmakodynamických změn ve stáří [Specific features of geriatric pharmacotherapy from the point of view of pharmacokinetic and pharmacodynamic changes in elderly]. *Remedia*, 2002, 12 (6), 434 – 440.

Grundmann, M.: Problémy s podáváním léků ve stáří III. – Compliance [Drug-related problems III. – Compliance]. *Interní medicína pro praxi*, 2001b, 3 (3), 136 – 137.

Guay, H., Schamader, K.: The pharmacology of aging. In Tallis R. C, Fillit, K. R., Young, J. B.: *Brocklehurst's textbook of geriatric medicine and gerontology*. 6th edn. London: Churchill Livingstone, 2003. 1568 p.

Hailu, B. Y., Berhe, D. F., Gudina, E. K. Gidey, K., Getachew, M.: Drug related problems in admitted geriatric patients: the impact of clinical pharmacist interventions. *BMC Geriatr.*, 2020, 13 (20). <https://doi.org/10.1186/s12877-020-1413-7>. Accessed January 18, 2024.

Hegyí, L., Krajčík, Š.: *Geriatría pre praktického lekára*. [Geriatrics for General Practitioner] 3. vyd. Bratislava: Herba, 2015. 408 s.

Hegyí, L.: Compliance vo vyššom veku [Compliance in older age]. *Geriatría*, 2005, 11 (2), 78 – 82.

Jankyova, S., Rubintova, D., Foltanova, T.: The analysis of the use of potentially inappropriate medications in elderly in the Slovak Republic. *Int. J. Clin. Pharm.*, 2020, 42 (1), 100 – 109. Doi: 10.1007/s11096-019-00944-x.

Kriška, M. a kol.: *Memorix klinickej farmakológie a liekov*. [Memorix of Clinical Pharmacy].

Bratislava: Slovak Academic Press, 2006, 119 – 126.

Kriška, M. a kol.: *Zlyhanie farmakoterapie možnosti prevencie*. [Failure of Medication, Options of Prevention]. Bratislava: Slovak Academic Press, 2015, 183 – 233.

Kriška, M., Wawruch, M.: *Dilema farmakoterapie v geriatrici*. Problém polypragmázie a interakcií [Questions of medication in Geriatrics. Problems of polypragmasia]. *Geriatría*, 2002, 8 (3), 132 – 137.

Krustev T., Milushewa P., Tachkov K.: Impact of polypharmacy, drug-related problems, and potentially inappropriate medications in geriatric patients and its implications for Bulgaria-narrative review and meta-analysis. *Front. Public Health*, 2022, 3 (10), 743 138. Doi: 10.3389/fpubh.2022.743138.

Lenander, C., Bondesson, Å., Viberg, N., Beckman, A., Midlöv, P.: Effects of medication reviews on use of potentially inappropriate medications in elderly patients; a cross-sectional study in Swedish primary care. *BMC Health Serv. Res.*, 2018, 616. <https://doi.org/10.1186/s12913-018-3425-y>. Accessed January 16, 2024.

Mačeková, Z.: *Negatívny vplyv farmakoterapie na pacientov vo vyššom veku* [Negative impact of pharmacotherapy in elderly]. Špecializačná práca. Bratislava: SZU, 2016, 66 s.

Magulová, L., Božeková, V., Kriška, M. a kol.: *Interakcie liečiv v klinickej praxi* [Interactions in Clinical Practice]. Bratislava: Slovak Academic Press, 2004, 51 – 54.

Milos, V., Rekman, E., Bondesson, Å., Eriksson, T., Jakobsson, U., Westerlund, T., Midlöv, P.: Improving the quality of pharmacotherapy in elderly primary care patients through medication reviews: a randomised controlled study. *Drugs Aging*, 2013, 30 (4), 235 – 246. Doi: 10.1007/s40266-013-0057-0.

O'Mahony, D., Sullivan, D., Byrne, S., O'Connor, M. N., Ryan, C., Gallagher, P.: STOPP/START criteria for potentially inappropriate prescribing in older people: version 2. *Age in Ageing*, 2014, 0, 1 – 6. <https://doi.org/10.1093/ageing/afu145>. Accessed August 25, 2016.

Rajec, J.: Špecifiká a princípy farmakote-

rapie v geriatrii [Specifics and principles of pharmacotherapy in geriatrics]. *Onkológia*, 2012, 7 (5), 318 – 320.

Suchý, D., Hromádka, M.: Příspěvek k problematice geriatrické farmakoterapie [Drug-related problems of elderly pharmacotherapy]. *Praktické lékařnictvo*, 2011, 1 (4), 175 – 178.

Topinková, E., Holmerová, I., Býma, S., Doležalová, I., Fialová, D., Holmerová, I., Jurašková, B., Kalvach, Z., Kubešová, H.: Farmakoterapie geriatrických pacientů [Pharmacotherapy of geriatric patients]. *Geriatric*, 2010, 28s.

Karen, I., Souček, M., Bláha, V., Pelikánová, T., Rosolová, H., Soška, V., Sucharda, P.: *Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře 2007* [Recommendations for diagnostic and treatment in general practice]. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2007, 7 – 14.

Wawruch, M., Fialová, D., Žikavská, M., Kuželová, M., Ježová, D., Vinšová, J., Kristová, V., Topinková, E.: Používanie potenciálne nevhodných liečiv pre starších pacientov v regióne bývalého ČS [Use of potentially inappropriate medicine in elderly patients in the region of the former Czechoslovakia]. *Klinická farmakologie a farmácie*, 2008b, 22 (2), 81 – 85.

Weber, P., Křiška, M., Meluzínová, H. a kol.: Polyfarmakoterapie v klinické gerontologii [Polypharmacotherapy in clinical gerontology]. *Časopis lékařů českých*, 2004, 143 (8), 547 – 551.

Yang, Y. K., Kor, C. T., Sun, Y. W., Wang, H., Y., Yang, Y. T., Liu, S. Y.: Associations between doses of fall-risk-increasing drugs (FRIDs) and falls of hospitalized patients. *Sci. Rep.*, 2023, 13, 14 380. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41568-6>. Assesed January 18, 2024.

Zrubáková, K., Krajčík, Š. a kol.: *Farmakoterapie v geriatrii* [Pharmacotherapy in Elderly]. Praha: Grada, 2016, 224 s.



ANTIFUNGÁLNA AKTIVITA STRIEBORNÝCH NANOČASTÍC PRIPRAVENÝCH BIOSYNTÉZOU POMOCOU RASTLINNÝCH EXTRAKTOV

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES PREPARED BY BIOSYNTHESIS WITH PLANT EXTRACTS

Takáč, Peter¹; Bajusová, Eva; Váczi, Peter¹; Bedlovičová, Zdenka²

¹Katedra farmakológie a toxikológie,
Univerzita Veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

²Katedra chémie, biochémie a biofyziky
Univerzita Veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

peter.takac@uvlf.sk

ABSTRAKT

Obsah štúdie je zameraný na hľadanie nových možností liečby. Zameriava sa na syntézu nanočastíc, ktoré môžu mať antifungálne účinky.

Praktická časť štúdie je zameraná na syntézu nanočastíc striebra metódou zelenej syntézy s použitím prekursorového roztoku dusičnanu strieborného pripraveného v dvoch koncentráciách 5,5 mmol.l⁻¹ a 2,2 mmol.l⁻¹ a troch druhov levandulového extraktu. Syntézy sa monitorovali pomocou spektrofotometra Cary 60 UV/Vis s Peltierovým ohrievačom a termostatom a uskutočňovali sa pri 75 °C a 80 °C. Novovzniknuté nanočastice striebra boli pozorované pomocou spektrofotometra a výsledky boli zobrazené v grafoch. Následne sa v práci rozoberá stanovenie antifungálnej aktivity novosyntetizovaných nanočastíc striebra na kmeni *Candida albicans*. Testovali sme 12 pripravených vzoriek s nanočasticami striebra. Stanovenie

antimykotickej aktivity bolo vykonané mikroriedením overenou metódou M27 – A3. Výsledky boli zaznamenané do tabuliek a boli stanovené hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie nanočastíc striebra voči *Candida albicans*.

Najvyššia antifungálna aktivita bola pozorovaná u nanočastíc pripravených z 5,5 mM (934,285 µg.ml⁻¹ roztoku AgNO₃ a levandulového extraktu pripraveného pri laboratórnej teplote a reakcii prebiehajúcej pri 75 °C a tiež u nanočastíc pripravených z 5,5 mM (934,285 µg.ml⁻¹). Roztok AgNO₃ a levandulový extrakt bol pripravený 15 min ultrazvukom a reakcia prebiehala pri 80 °C. Nameraná hodnota MIC bola v oboch prípadoch 10,9845 µg.ml⁻¹.

Kľúčové slová: *Candida albicans*; minimálna inhibičná koncentrácia; nanočastice striebra; zelená syntéza

ABSTRACT

The content of the study is focused on the search for new treatment options. It focuses on the emergence of nanoparticles that may have antifungal effects.

The practical part of the study focuses on the synthesis of silver nanoparticles by the green synthesis method, using a precursor solution of silver nitrate prepared at two concentrations of 5.5 mmol.l⁻¹ and 2.2 mmol.l⁻¹ and three types of lavender extract. The syntheses were monitored using a Cary 60 UV/Vis spectrophotometer with a Peltier heater and thermostat and were performed at 75 °C and 80 °C. The newly formed silver nanoparticles were observed using spectrophotometer and the results were displayed in graphs. Subsequently, the determination of antifungal activity of the newly synthesized silver nanoparticles on *Candida albicans* is discussed in this work. We tested 12 prepared samples with silver nanoparticles. The determination of antifungal activity was performed by the microdilution validated method M27 – A3. The results were tabulated and the values of minimum inhibitory concentration of silver nanoparticles against *Candida albicans* were determined.

The highest antifungal activity was observed for nanoparticles prepared from 5.5 mM (934.285 µg.ml⁻¹ AgNO₃ solution and lavender extract prepared at laboratory temperature and reaction run at 75 °C, and also for nanoparticles prepared from 5.5 mM (934.285 µg.ml⁻¹) AgNO₃ solution and lavender extract prepared at 15 min ultrasonication and reaction run at 80 °C. The measured MIC value in both cases was 10.9845 µg.ml⁻¹.

Key words: *Candida albicans*; green synthesis; minimum inhibitory concentration; silver nanoparticles

ÚVOD

V posledných desaťročiach bol zaznamenaný výrazný nárast mykotických infekcií, a tým sa stali jednou z hlavných hrozieb pre verejné zdravie. Viac ako 300 miliónov ľudí trpí vážnymi plesňovými ochoreniami a viac ako 2 milióny ľudí ročne zomiera na rôzne mykózy, vďaka čomu sú mykotické chorenia jednou z hlavných príčin úmrtí na celom svete. Riziko mykóz navyše zhoršuje výskyt nových patogénnych druhov húb, ale aj rezistencia na obmedzené dostupné antimykotické lieky, čo výrazne znižuje účinnosť liečby (Denning a kol., 2017). Najčastejším a najvýznamnejším pôvodcom plesňových ochorení u človeka je rod *Candida*, hlavne *C. albicans*. Kvasinky tohto rodu sú pôvodcami orálnej kandidózy, kandidózy kože a nechtov, vulvovaginálnej kandidózy, ale aj veľmi nebezpečnej kandidémie a systémovej kandidózy (Kayser, 2005).

Nárast multirezistentných kmeňov húb spolu s obmedzeným počtom klinicky dostupných antimykotík zdôrazňuje potrebu vývoja nových antimykotík. Vďaka preukázanej antifungálnej aktivite nanočastíc striebra (AgNPs) rastie záujem o ich použitie pri liečbe plesňových infekcií. Nanočastice sa zvyčajne syntetizujú prostredníctvom rôznych fyzikálnych a chemických procesov, ktoré sú nákladné a znečisťujú životné prostredie. Z tohto dôvodu sa biogénna (zelená) syntéza javí ako technológia šetrná k životnému prostrediu, je pomerne jednoduchšia a lacnejšia. Nové stratégie liečby sú čoraz viac založené na použití biogénnych AgNPs ako antifungálnych činidiel na klinické použitie (Mussin, 2019).

Hlavným cieľom našej práce bola syntéza strieborných nanočastíc a následné hodnotenie ich antifungálnej aktivity. V štúdiu sme venovali pozornosť dostupnej farmakologickej a nefarmakologickej liečbe, ale hlavne novým postupom pri liečbe, kde zohráva dôležitú úlohu oblasť nanotechnológie, ktorou sa cestou biogénnej (zelenej) syntézy vyrábajú nanočastice vhodné ako alternatívna liečba pri rôznych druhoch kandidóz.

MATERIÁL A METÓDY

Metodika syntézy strieborných nanočastíc

- **Príprava extraktov levandule lekárskej**

Extrakty sme pripravili navážením 200 mg rozomletej sušiny vňate levandule lekárskej (*Lavandula angustifolia*, Agrokarpaty, Plavnica, Slovensko) a jej rozsuspendovaním v 4 ml destilovanej vody. Podľa typu extrakcie sme potom zmes nechali miešať pri laboratórnej teplote v priebehu dvoch hodín, resp. sonifikovali počas 15 a 30 minút. Následne sme extrakty odfiltrovali a použili na zelenú syntézu strieborných nanočastíc.

- **Syntéza strieborných nanočastíc**

Ako prekursor syntézy strieborných nanočastíc sme použili roztoky dusičnanu strieborného (AgNO_3) (Mikrochem, Pezinok, Slovensko), ktoré sme si pripravili v dvoch koncentráciách: $5,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ (do 50 ml banky sme navážili 0,0467 g AgNO_3 a doplnili po rysku destilovanou vodou) a $2,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ (do 50 ml banky sme navážili 0,0187 g AgNO_3 a doplnili po rysku destilovanou vodou) v deň merania. Banky sme pred svetlom chránili hliníkovou fóliou a uložili na tmavé miesto.

Do troch kremenných kyviet sme pomocou automatických mikropipiet postupne napipetovali 2700 μl pripraveného roztoku dusičnanu strieborného s koncentráciou $2,2 \text{ mmol.l}^{-1}$ ako prekursora strieborných nanočastíc a postupne sme do každej pridali po 300 μl z troch pripravených extraktov levandule (poměr extraktu a prekursora bol 1 : 9). Priebeh syntézy strieborných nanočastíc sme monitorovali prostredníctvom UV/Vis spektrofotometra Cary 60 (Agilent Technologies, USA) s Peltierovým ohrevom *in situ* priamo v kyvete. Syntézy sme vykonali so všetkými tromi typmi extraktu najprv pri teplote 75°C a následne pri 80°C . Rovnakým spôsobom sme postupovali aj pri roztoku AgNO_3 s koncentráciou $5,5 \text{ mmol.l}^{-1}$.

Následne sme jednotlivé vzorky nasyntetizovaných nanočastíc odobrali, zapečatili, označili koncentráciou roztoku AgNO_3 , z ktorého boli pripravené,

typom extraktu a teplotou, pri ktorej daná syntéza prebiehala a pokračovali na stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC), teda stanovenie antifungálnej aktivity AgNPs.

Metodika práce stanovenia antifungálnej aktivity

- **Príprava inokula**

Pri testovaní sme použili referenčný kmeň *Candida albicans* ATCC 10231 (Česká sbírka mikroorganizmů, Brno, Česká republika).

Z čistých, 24-hodinových kultúr *C. albicans* rastúcich na Sabouraudovom dextrózovom agare s chloramfenikolom pri 35°C sme za pomoci sterilného fyziologického roztoku pripravili suspenziu inokula. Pomocou denzitometra sme hustotu upravili na hodnotu 0,5 McFarland. Táto suspenzia obsahovala 10^6 CFU v 1 ml. Riedením 1 : 50 a 1 : 20 v Sabouraudovom bujóne zo základnej koncentrácie suspenzie testovaných kmeňov kandid, ktorá obsahovala 10^6 CFU/ml, sme pripravili inokulum s obsahom $1 - 5 \times 10^3$ CFU/ml.

- **Testovanie antimykotickej aktivity strieborných nanočastíc**

Na testovanie citlivosti buniek *Candida albicans* voči strieborným nanočasticiam sme použili 96-jamkové mikrotitračné platničky typu U (s konkávnym dnom). Stanovenie antifungálnej aktivity bolo vykonané mikrodilučnou validovanou metódou M27 – A3 (CSLI, 2008). Testovali sme **12 vzoriek so striebornými nanočasticami**:

1. Nanočastice pripravené z $2,2 \text{ mM}$ ($373,714 \mu\text{g.ml}^{-1}$) roztoku AgNO_3 a levanduľového extraktu pripraveného pri laboratórnej teplote, reakcia prebiehala pri 75°C

2. Nanočastice pripravené z $2,2 \text{ mM}$ ($373,714 \mu\text{g.ml}^{-1}$) roztoku AgNO_3 a levanduľového extraktu pripraveného pri 15 minútovom ultrazvuku, reakcia prebiehala pri 75°C

3. Nanočastice pripravené z $2,2 \text{ mM}$ ($373,714 \mu\text{g.ml}^{-1}$) roztoku AgNO_3 a levanduľového extraktu pripraveného pri 30 minútovom ultrazvuku, reakcia prebiehala pri 75°C

4. Nanočastice pripravené z 2,2 mM (373,714 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) roztoku AgNO_3 a levanduľového extraktu pripraveného pri laboratórnej teplote, reakcia prebiehala pri 80 °C

5. Nanočastice pripravené z 2,2 mM (373,714 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) roztoku AgNO_3 a levanduľového extraktu pripraveného pri 15 minútovom ultrazvuku, reakcia prebiehala pri 80 °C

6. Nanočastice pripravené z 2,2 mM (373,714 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) roztoku AgNO_3 a levanduľového extraktu pripraveného pri 30 minútovom ultrazvuku, reakcia prebiehala pri 80 °C

7. Nanočastice pripravené z 5,5 mM (934,285 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) roztoku AgNO_3 a levanduľového extraktu pripraveného pri laboratórnej teplote, reakcia prebiehala pri 75 °C

8. Nanočastice pripravené z 5,5 mM (934,285 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) roztoku AgNO_3 a levanduľového extraktu pripraveného pri 15 minútovom ultrazvuku, reakcia prebiehala pri 75 °C

9. Nanočastice pripravené z 5,5 mM (934,285 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) roztoku AgNO_3 a levanduľového extraktu pripraveného pri 30 minútovom ultrazvuku, reakcia prebiehala pri 75 °C

10. Nanočastice pripravené z 5,5 mM (934,285 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) roztoku AgNO_3 a levanduľového extraktu pripraveného pri laboratórnej teplote, reakcia prebiehala pri 80 °C

11. Nanočastice pripravené z 5,5 mM (934,285 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) roztoku AgNO_3 a levanduľového extraktu pripraveného pri 15 minútovom ultrazvuku, reakcia prebiehala pri 80 °C

12. Nanočastice pripravené z 5,5 mM (934,285 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) roztoku AgNO_3 a levanduľového extraktu pripraveného pri 30 minútovom ultrazvuku, reakcia prebiehala pri 80 °C.

Pracovný postup

Do jamiek 2. – 12. stĺpca (viď obr. 1) sme aplikovali po 100 μl Sabouraudovho bujónu. Do prvého stĺpca sme napipetovali 200 μl jednotlivých testovaných roztokov 1. – 12. (každý roztok v 2 radoch), pričom rady G a H obsahovali vždy kontrolný roztok AgNO_3 .

Kvôli zabezpečeniu sterility sme pred aplikáciou do mikrotitračnej platničky prefiltrovali roztoky nanočastíc cez sterilný 0,22 μm filter. Následne sme priamo v platničke vykonali dvojkové riedenie: zo stĺpca 1 sme preniesli 100 μl roztoku nanočastíc do stĺpca 2, párkrát premiešali a 100 μl preniesli do stĺpca 3. Takýmto princípom sme postupovali až po stĺpec 10, čím sme získali nasledovné výsledné koncentrácie: 50 %; 25 %; 12,5 %; 6,25 %; 3,12 %; 1,6 %; 0,8 %; 0,4 %; 0,2 % až 0,1 %. Do takto pripravených platničiek sme do stĺpcov 1 – 11 pridali 100 μl inokula. Pre každú vzorku roztoku boli vymedzené 2 riadky. Stĺpec 11 predstavoval negatívnu (bez nanočastíc a bez inokula) a 12. stĺpec pozitívnu kontrolu (bez nanočastíc a s inokulom). Platničky sme inkubovali pri teplote 35 °C a po 24 hodinách sme odčítali MIC. Pre lepšie vyhodnotenie výsledkov MIC sme do všetkých jamiek platničky aplikovali po 5 μl 0,15 %-ného resazurínu, ktorý sme nechali pôsobiť 2 hodiny pri teplote 35 °C. Takéto ofarbenie slúži na lepšiu vizualizáciu prítomnosti, resp. neprítomnosti mikroorganizmov. Živé bunky sú metabolicky aktívne a prostredníctvom enzýmu mitochondriálnej reduktázy redukujú nefluorescenčné farbivo resazurín na silne fluorescenčné farbivo resorufín. Na základe zmeny zafarbenia je možné lepšie vizuálne alebo spektrofotometricky vyhodnotiť prítomnosť živých buniek oproti negatívnej kontrole.

Výhodou tejto metódy oproti formazánovým postupom je netoxickosť.

Testovanie antifungálnej aktivity sme kvôli štatistickému vyhodnoteniu vykonali duplicitne.

VÝSLEDKY

• Syntéza strieborných nanočastíc

Priebeh syntézy AgNPs sme pozorovali spektrofotometricky. Rozpätie vlnových dĺžok UV/Vis spektrofotometra bolo nastavené na hodnoty od 350 – 750 nm (predpokladaná vlnová dĺžka objavenia absorpčného pásu zodpovedajúceho povrchovej plazmónovej rezonancii, ktorý sa prejavuje pri vzniku AgNPs). Ak absorbancia už viac nestúpala, syntéza strieborných

Tab. 1: Absorpčné maximá a reakčný čas syntézy Ag nanočastíc

Extrakt	Koncentrácia prekurzora AgNO ₃ [mM]	Reakčný čas [min]	Absorpčné maximum $\lambda_{\max}$ [nm]	Reakčný čas [min]	Absorpčné maximum $\lambda_{\max}$ [nm]
		75 °C		80 °C	
RT 2h	2,2	35	419	20	416
RT 2h	5,5	10	409	10	415
USG 15'	2,2	40	424	35	425
USG 15'	5,5	25	421	15	423
USG 30'	2,2	40	419	25	415
USG 30'	5,5	15	416	10	411

nanočastíc sa ukončila. Tento jav sme sledovali v oblasti vlnovej dĺžky približne okolo 418 nm. Okrem toho sme vznik AgNPs pozorovali aj vizuálne, kedy došlo k zmene farby zo žltej na tmavohnedú (viď tab. 1).

Rýchlosť syntézy nanočastíc závisí od koncentrácie prekursora, typu vyrábaných nanočastíc aj od druhu použitého extraktu. Rýchlosť tejto reakcie do veľkej miery ovplyvňujú aj látky v extrakte, ktoré sú zodpovedné za redukciu a tvorbu nanočastíc.

Pri sledovaní priebehu syntézy AgNPs sme pozorovali rýchly nárast absorbancie a reakciu sme mohli v prípade extraktov získaných maceráciou pri laboratórnej teplote ukončiť už po 10 minútach pri 2,2 aj 5,5 mM roztoku prekursora strieborných nanočastíc, ako aj u roztoku pripraveného sonifikáciou počas 30 minút. Z hľadiska vplyvu koncentrácie prekursora na rýchlosť reakcie, spôsob extrakcie nemal výrazný vplyv na biosyntézu AgNPs. Pri 75 °C u koncentrácie prekursora 2,2 mM bolo časové rozpätie 35 – 40 minút u všetkých typov extraktu, avšak v prípade koncentrácie dusičnanu strieborného 5,5 mM bol čas reakcie značne rozličný, pričom najrýchlejšie prebehla reakcia použitím extraktu získaného pri laboratórnej teplote (10 minút), najpomalšie u extrakcie ultrazvukom počas 15 minút (25 minút). Predpokladáme, že to súvisí s dĺžkou extrakcie, keďže vo všetkých prípadoch bola na extrakciu použitá destilovaná voda, súvis s typom rozpúšťadla možno vylúčiť. Čo sa týka vplyvu teploty, tak všeobecne známym fak-

tom je, že s rastúcou teplotou rastie aj reakčná rýchlosť, čo sa nám potvrdilo aj v našom prípade, kedy pri 80 °C prebehla reakcia približne o tretinu rýchlejšie.

Zo získaných výsledkov možno konštatovať, že syntéza strieborných nanočastíc prebehla u všetkých troch typoch extraktu levandule úzkolistej a v prípade obidvoch koncentrácií dusičnanu strieborného úspešne, čo nám potvrdzuje jednak farebná zmena roztoku, ako aj pozorovanie povrchovej plazmónovej rezonancie.

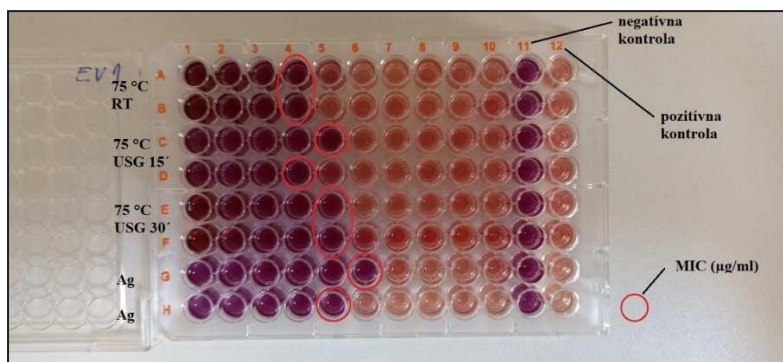
• Stanovenie antifungálnej aktivity

Následne sme sa v štúdiu venovali stanoveniu antimykotickej aktivity novozískaných strieborných nanočastíc na kmeni *Candida albicans*. Testovali sme 12 pripravených vzoriek so striebornými nanočasticami. Výsledky sme zapísali do tabuliek (viď tab. 2 – viď tab. 5) a stanovili hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) strieborných nanočastíc voči *Candida albicans*.

Pri vzorke 1 bola stanovená **MIC 23,357 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** . Pri vzorke 2 bola stanovená **MIC 17,518 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** . Pri vzorke 3 bola stanovená **MIC 11,679 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** . Kontrolný roztok AgNO₃ vykazoval antifungálnu aktivitu s **MIC 8,759 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** (viď tab. 2).

Pri vzorke 4 bola stanovená **MIC 23,357 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** . Pri vzorke 5 bola stanovená **MIC 17,518 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** . Pri vzorke 6 bola stanovená **MIC 11,679 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** . Kontrolný roztok AgNO₃ vykazoval antifungálnu aktivitu s **MIC 11,679 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** (viď tab. 3).

Obr. 1: Hodnoty MIC roztoku nanočastíc (2,2 mM, 75 °C) voči *C. albicans* ATCC 10231



Tab. 2: Hodnoty MIC roztoku nanočastíc (2,2 mM, 75 °C) voči *C. albicans* ATCC 10231

MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	RT	USG 15'	USG 30'	AgNO ₃
Min. – max.	23,357	11,679 – 23,357	11,679	5,839 – 11,679
Priemer	23,357	17,518	11,679	8,759
SD	0	5,839	0	2,92
Mo	23,357	11,679	11,679	5,839
Me	23,357	17,518	11,679	8,759

Tab. 3: Hodnoty MIC roztoku nanočastíc (2,2 mM, 80 °C) voči *C. albicans* ATCC 10231

MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	RT	USG 15'	USG 30'	AgNO ₃
Min. – max.	23,357	11,679 – 23,357	11,679	11,679
Priemer	23,357	17,518	11,679	11,679
SD	0	5,839	0	0
Mo	23,357	23,357	11,679	11,679
Me	23,357	17,518	11,679	11,679

Tab. 4: Hodnoty MIC roztoku nanočastíc (5,5 mM, 75 °C) voči *C. albicans* ATCC 10231

MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	RT	USG 15'	USG 30'	AgNO ₃
Min. – max.	7,299 – 14,598	14,598	14,598	29,196
Priemer	10,9485	14,598	14,598	29,196
SD	3,6495	0	0	0
Mo	14,598	14,598	14,598	29,196
Me	10,9485	14,598	14,598	29,196

Tab. 5: Hodnoty MIC roztoku nanočastíc (5,5 mM, 80 °C) voči *C. albicans* ATCC 10231

MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	RT	USG 15'	USG 30'	AgNO ₃
Min. – max.	14,598	7,299 – 14,598	14,598	29,196
Priemer	14,598	10,9485	14,598	29,196
SD	0	3,6495	0	0
Mo	14,598	7,299	14,598	29,196
Me	14,598	10,9485	14,598	29,196

Pri vzorke 7 bola stanovená **MIC 10,9485 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** . Pri vzorke 8 bola stanovená **MIC 14,598 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** . Pri vzorke 9 bola stanovená **MIC 14,598 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** . Kontrolný roztok AgNO_3 vykazoval antifungálnu aktivitu s **MIC 29,196 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** (viď tab. 4).

Pri vzorke 10 bola stanovená **MIC 14,598 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** . Pri vzorke 11 bola stanovená **MIC 10,9485 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** . Pri vzorke 12 bola stanovená **MIC 14,598 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** . Kontrolný roztok AgNO_3 vykazoval antifungálnu aktivitu s **MIC 29,196 $\mu\text{g.ml}^{-1}$** (viď tab. 5).

DISKUSIA

Záujem o aplikácie nanotechnológií sa v poslednej dobe rapídne zvyšuje, keďže materiály s nanorozmermi umožnili veľký prielom vo výskume, vrátane diagnostiky a terapie mnohých ochorení. Nanomateriály sa vyznačujú mechanickými, tepelnými, fyzikálno-chemickými, biologickými a ďalšími vlastnosťami, ktoré sa líšia v závislosti od surovín v dôsledku ich veľkého pomeru povrchu k veľkosti a kvantového efektu (Chaturvedi a kol., 2012). Existuje viacero spôsobov výroby nanomateriálov, napr. mechanický a chemický, ale tie nie sú bezpečné pre životné prostredie. V dôsledku toho vedci hľadali bezpečné spôsoby výroby nanomateriálov, napríklad pomocou húb (Taha a kol., 2019); baktérií alebo rastlín (Karnani a Chowdhary, 2013). Kvôli obmedzeniam chemických a fyzikálnych metód, ktoré sa používajú na výrobu nanomateriálov, ako sú výrobné náklady, výskumníci vyvinuli alternatívne biologické prístupy, ktoré sú čisté, ekonomické a šetrné k životnému prostrediu (Rai a kol., 2009).

Viacere fytochemikálie prítomné v rastlinách, ako je napr. polyfenol, flavonoidy, rôzne proteíny a cukry, pôsobia ako redukčné a obalové činidlá v NPs. Kovové nanočastice majú niekoľko vlastností vrátane termickej stability a aktivity a ich odlišná povrchová plazmónová rezonancia z nich robí účinné nosiče liečiv s možnosťou využitia ako v diagnostike, tak aj v terapii ochorení. Skonštruované kovy sa používajú na syntézu NPs modifikáciou tvaru a veľkosti ich povrchu. Za účelom produkcie kovových NPs pomocou

zelenej syntézy boli uskutočnené viaceré biomedicínske štúdie a syntetizované NPs boli následne využité ako protinádorové, antimikrobiálne, protizápalové a antioxidačné činidlá (Saleem a kol., 2017; Saravanan a kol., 2021). Najbežnejšie kovové NPs používané ako nosiče liečiv sú strieborné a zlaté, a to vďaka svojim jedinečným vlastnostiam, ako napr. termálnej stabilite, ako aj schopnosti znižovať proliferáciu buniek a podporovať bunkovú smrť (Chaturvedi a kol., 2012; Karnani a Chowdhary, 2013; Patra a Baek, 2014; Taha a kol., 2019).

Cieľom štúdie bola syntéza nových strieborných nanočastíc (AgNPs) metódou zelenej syntézy s využitím troch levanduľových extraktov pripravených za rôznych podmienok, a následné testovanie ich antifungálnej aktivity.

Diskusia k cieľu 1: Syntéza AgNPs metódou zelenej syntézy

V priebehu syntézy sme zaznamenali vizuálnu zmenu spôsobenú vznikajúcimi AgNPs. Nanočastice sfarbili roztok z počiatočnej hnedožltej farby na tmavohnedú. V grafoch 1 – 12 môžeme vidieť UV-Vis spektrá pre syntézu AgNPs pre sledované teploty 75 °C a 80 °C. Nárast absorbie prebiehal pri všetkých vlnových dĺžkach, najmä však okolo 418 nm. Syntézu sme považovali za ukončenú, keď už nedochádzalo k nárastu absorbie. Ultrafialovo-viditeľná (UV-Vis) spektroskopia je jednoduchá a široko používaná analytická technika na monitorovanie tvorby AgNPs. Pri interakcii s elektromagnetickým poľom vodivé elektróny prítomné v najvzdialenejšom orbitáli kovových NPs spoločne oscilujú v rezonancii s určitými vlnovými dĺžkami, aby vykazovali jav nazývaný povrchová plazmónová rezonancia (SPR). Excitácia SPR je zodpovedná za tvorbu farby a absorbie v koloidnom roztoku AgNPs. Píky SPR pri približne 435 nm sa zvyčajne berú na potvrdenie redukcie dusičnanu strieborného na AgNPs. Vo všeobecnosti sférické NPs vykazujú iba jeden SPR pás v absorpčnom spektre, zatiaľ čo dva alebo viac SPR pásov boli pozorované pre anizotropné častice v závislosti od tvaru. Neprítomnosť píku v oblasti 335 a 560 nm v

UV-Vis spektrách sa niekedy používa ako indikácia neprítomnosti agregácie v NP (Durán a kol., 2007; Kora a kol., 2010; Vanlalveni a kol., 2018).

Vo všeobecnosti sa za faktory modifikujúce rýchlosť syntézy NPs ako aj štruktúru a vlastnosti vzniknutých nanočastíc považujú tieto: chemické zloženie rastlinného extraktu, koncentrácia rastlinného extraktu, koncentrácia roztoku prekursora syntézy NPs (napr. AgNO_3), extrakčné rozpúšťadlo, čas a teplota extrakcie, pH, reakčný čas a reakčná teplota (Merugu a kol., 2022).

V našej štúdii sme modifikovali tri faktory, a to: a) koncentráciu roztoku prekursora syntézy NPs – AgNO_3 , b) teplotu reakcie a c) typ extraktu (pripravený pri laboratórnej teplote, pri 15 minútovom ultrazvuku a 30 minútovom ultrazvuku). Pri syntéze nanočastíc je preto potrebné zvážiť všetky parametre, ktoré riadia ich veľkosť, ako aj vedieť tieto parametre ovplyvniť tak, aby vznikli nanočastice optimálnej veľkosti pre úspešné prenikanie do buniek.

a) Modifikácia koncentrácie prekursora:

Podľa autorov Mohammad Ali a kol. (2016) sa počet AgNPs zvyšoval so zvyšujúcou sa koncentráciou AgNO_3 až na úroveň, kedy sa všetka soľ AgNO_3 spotrebováva, t. j. všetky Ag^+ sú redukované na Ag^0 , čo sa dá ľahko monitorovať zvyšovaním intenzít v UV-Vis spektroskopii. Po spotrebovaní všetkého AgNO_3 sa dosiahne rovnováha. Preto je potrebné vidieť rovnováhu medzi AgNO_3 a množstvom redukčného činidla prítomného v extrakte.

b) Modifikácia teploty reakcie:

Na dosiahnutie úplnej redukcie AgNO_3 na AgNPs pomocou chemickej cesty je zvyčajne potrebná vysoká teplota, hoci z perspektívy ekonomickej a zelenej chémie je najlepšou voľbou RT reakcia. Pokiaľ však ide o syntézu zelených NPs, proces RT, napriek niektorým výnimkám, zvyčajne poskytuje NPs sférického tvaru, ktoré sú menej náchylné na mikróby, ako už bolo uvedené. Medzitým je veľmi žiaduca syntéza rôznych tvarov NPs na špecifické účely. Prehľad literatúry odhalil, že k tvorbe kubických, päťuholní-

kových, šesťuholníkových, trojuholníkových nanodrôtových AgNPs v tvare tyčinky dochádza zvyčajne nad RT, aj keď je potrebné dbať na niektoré ďalšie parametre, ako je koncentrácia uzatváracích činidiel a stabilizátorov (Piñero a kol., 2017; Stavinskaya a kol., 2019; Hongyu a kol., 2020).

Preto okrem zvýšenia rýchlosti reakcie a zníženia veľkosti NPs s teplotou je potrebné zvážiť reakčnú teplotu, aby sa vyrobili NPs s rôznym tvarom na konkrétny účel, najmä ako silné antimikrobiálne činidlo. Z hľadiska vplyvu teploty je všeobecne známe, že s rastúcou teplotou sa zvyšuje aj reakčná rýchlosť, čo sa nám potvrdilo aj v našom prípade, keď pri 80 °C prebehla reakcia približne o tretinu rýchlejšie.

c) Modifikácia typu extraktu:

V práci sme pri príprave dvoch levandulových extraktov využili aj účinky ultrazvuku (15, resp. 30 minút). Sonochemická syntéza (syntéza, pri ktorej sa aplikuje ultrazvuk) AgNPs nedávno získala prítlačnosť vďaka uľahčeniu reakcie a poskytnutiu podmienok pre veľmi rýchlu syntézu NPs. Výsledkom je syntéza nanočastíc s veľmi malou veľkosťou (okolo 8 nm) (Calderón-Jiménez a kol., 2022).

Z literatúry je známe, že antibakteriálna a tiež katalytická aktivita AgNPs je závislá od veľkosti, kde nanočastice s malou veľkosťou s úzkou distribúciou preukázali lepší účinok, pokiaľ ide o antibakteriálnu efektivitu. Autori Nouri a kol. (2020) ukazujú, že aplikáciou ultrazvuku počas syntézy došlo k vytvoreniu menších AgNPs (8 nm) so zvýšenou antibakteriálnou aktivitou voči vybraným G⁺ aj G⁻ mikróbov.

Rýchlosť reakcie, počas ktorej vznikajú NPs, do veľkej miery ovplyvňujú aj látky v extrakte, ktoré sú zodpovedné za redukciu a tvorbu nanočastíc. Predpokladá sa, že oxidácia rôznych biomolekúl, ako sú flavonoidy, ketóny, aldehydy, taníny, karboxylové kyseliny, fenolové a rastlinné proteíny, sú zodpovedné hlavne za redukciu Ag^+ na Ag^0 . Okrem toho stabilita a veľkosť produkovaných AgNPs závisí od biomolekúl pôsobiacich ako uzatváracie činidlo. Preto je pre úspešnú syntézu AgNPs potrebné najprv preskúmať biomolekuly prítomné v rastlinnom extrakte a jeho

uzatváraciu účinnosť.

Vo všeobecnosti platí, že čím väčšia je krycia aktivita, tým je väčšia stabilita a menšia je priemerná veľkosť častíc NPs. V niektorých prípadoch to však nie je pravda (Sidhu a kol., 2022; Kordy a kol., 2022). Špecifická interakcia biomolekúl a vytvorených NPs si preto vyžaduje pozornosť od prípadu k prípadu.

Tvar a veľkosť syntetizovaných AgNPs závisia aj od koncentrácie použitého rastlinného extraktu. Pri zriedenej koncentrácii k tvorbe NPs ani nemusí dôjsť; preto treba pozorne skúmať. Tvorba AgNPs je zvyčajne sprevádzaná zmenou farby a výraznou absorpciou UV-Vis pri približne 430 nm. Zvýšenie koncentrácie extraktu vedie k vytvoreniu veľkého počtu NPs na určitú úroveň. Avšak zatiaľ čo požadovaná koncentrácia extraktu môže poskytnúť vysoko disperzné AgNPs s vysokou antimikrobiálnou aktivitou, vysoká koncentrácia extraktu často vedie k aglomerácii a veľkým NPs, pretože nadbytok redukčného činidla spôsobil sekundárny redukčný proces na povrchu vopred vytvorených jadier (Ahmed a kol., 2016; Netai Mukaratirwa-Muchanyereyi a kol., 2022).

Sumárne teda možno povedať, že modifikácia niektorých faktorov mohla viesť k ovplyvneniu rýchlosti reakcie, ako aj k syntéze nanočastíc s odlišnou štruktúrou a vlastnosťami.

V štúdiu sme na syntézu AgNPs využili tri levanduľové extrakty. Extrakt z rastliny Levandule úzkolistá (*Lavandula angustifolia*) je možné použiť ako redukčné činidlo na syntézu AgNPs, vďaka veľkému množstvu flavonoidu kaempferol malonyl glukozidu. Okrem toho v nižších koncentráciách obsahuje aj nasledujúce antioxidačné zlúčeniny: kyselinu ursolovú, kyselinu chlorogenovú, kyselinu kávovú, kyselinu ferulovú-4-O-glukozid, kyselinu rozmarínovú, apigenín ramnosyl glukozid a i-vitexín kaempferol-3-kumaroyl glukozid. Rastlina *Lavandula angustifolia* rastie na suchých a slnečných pôdach, čo uľahčuje jej pestovanie a biologickú dostupnosť. Od staroveku sa liečivý extrakt používa ako protizápalový a ako sedatívum v boji proti stresu a nespavosti, ale hlavne ako aróma v parfumérii, kozmetike a čistiacich prostriedkoch. Okrem toho sa používa na eradikáciu dege-

neratívnych, infekčných a karcinogénnych ochorení (Spiridon a kol., 2011; Bunghez a kol., 2015; Kumar a kol., 2016; Sofi a kol., 2019; Huq, 2020).

Diskusia k cieľu 2: Stanovenie antifungálnej aktivity

Stanovenie antifungálnej aktivity AgNPs bolo realizované na kmeni *Candida albicans* ATCC 10231 (Česká sbírka mikroorganizmů, Brno, Česká republika) mikrodilučnou validovanou metódou M27 – A3 (CLSI 2017, CLSI 2020), ktorá sa uskutočňuje v 96-jamkových mikrotitračných platničkách. Pre odlišenie antifungálneho účinku AgNO₃ a nanočastíc pripravených z roztoku bola sledovaná aj aktivita čistých roztokov.

Najvyššiu antifungálnu aktivitu sme zaznamenali u nanočastíc pripravených z 5,5 mM (934,285 µg.ml⁻¹) roztoku AgNO₃ a levanduľového extraktu pripraveného pri laboratórnej teplote a reakcii prebiehajúcej pri 75 °C a taktiež pri nanočasticiach pripravených z 5,5 mM (934,285 µg.ml⁻¹) roztoku AgNO₃ a levanduľového extraktu pripraveného pri 15 minútovom ultrazvuku a reakcii prebiehajúcej pri 80 °C. Nameovaná hodnota MIC bola v oboch prípadoch 10,9845 µg.ml⁻¹. Naopak, najnižšiu antifungálnu aktivitu sme zaznamenali u nanočastíc pripravených z 2,2 mM (373,714 µg.ml⁻¹) roztoku AgNO₃ a levanduľového extraktu pripraveného pri laboratórnej teplote a reakcii prebiehajúcej pri 75 °C a taktiež pri nanočasticiach pripravených z 2,2 mM (373,714 µg.ml⁻¹) roztoku AgNO₃ a levanduľového extraktu pripraveného pri laboratórnej teplote a reakcii prebiehajúcej pri 80 °C. Nameovaná hodnota MIC bola v oboch prípadoch 23,357 µg.ml⁻¹.

Antifungálne účinky boli pozorované pre AgNPs pripravené rôznymi metódami. Najčastejší mechanizmus antimykotickej aktivity Ag nanomateriálov je založený na princípe povrchovej interakcie nanočastíc s bunkami húb alebo pôsobením Ag⁺ iónov vznikajúcich počas rozpúšťania Ag⁰ nanoštruktúr. Zvyšovanie koncentrácie voľných radikálov v prostredí je ďalším potenciálnym mechanizmom narušovania mikrobiálnych bunkových membrán a vnútorných štruktúr (El-

gorban a kol., 2016, Yassin a kol., 2022).

Na syntézu nanočastíc striebra (AgNPs) použili Dobrucka a Długaszevska (2015) vodný extrakt *Arnica anthodium*. V práci dokázali antimikrobiálnu aktivitu novosyntetizovaných nanočastíc striebra proti testovaným kmeňom (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) a rovnako aj aktivitu proti *Candida albicans*.

Naše výsledky potvrdili antifungálnu aktivitu pri všetkých testovaných vzorkách AgNPs, ktorá bola porovnateľná alebo vyššia ako antifungálna aktivita testovaného roztoku AgNO₃. V štúdií autorov Hasnin a kol. (2022) AgNPs vykazovali vynikajúce výsledky antifungálnej aktivity proti testovaným izolátom v porovnaní s extraktom *Lavandula coronopifolia* a antifungálnym štandardom (ketokonazol) s $p < 0,01$. AgNPs vykazovali veľmi významné výsledky voči *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Aspergillus fumigatus* a *Aspergillus niger* s rozsahmi MIC 1,7 – 0,7 µg.ml⁻¹ ($p < 0,01$).

V našej štúdií sme sa pokúsili poukázať na možnosť syntézy NPs použitím metódy, ktorá je časovo aj cenovo výhodná, ale hlavne nepredstavuje environmentálnu záťaž pre životné prostredie. Z našich výsledkov je zrejmé, že takto pripravené AgNPs majú široké uplatnenie a sú relevantným príspevkom k danej problematike biosyntézy nanočastíc.

ZÁVER

V rámci nášho výskumu sme syntetizovali nové strieborné nanočastice AgNPs, ktoré sme následne testovali a stanovovali ich antifungálnu aktivitu mikrodilučnou validovanou metódou M27 – A3 (CSLI, 2008). Výsledky môžeme zhrnúť do nasledujúcich bodov:

- Najvyššiu antifungálnu aktivitu sme zaznamenali u nanočastíc pripravených z 5,5 mM (934,285 µg.ml⁻¹) roztoku AgNO₃ a levanduľového extraktu pripraveného pri laboratórnej teplote a reakcii prebiehajúcej pri 75 °C a taktiež pri nanočasticiach pripravených z 5,5 mM (934,285 µg.ml⁻¹) roztoku AgNO₃ a levanduľového extraktu pripraveného pri 15 mi-

nútovom ultrazvuku a reakcii prebiehajúcej pri 80 °C. Nameraná hodnota MIC bola v oboch prípadoch 10,9845 µg.ml⁻¹.

- Najnižšiu antifungálnu aktivitu sme zaznamenali u nanočastíc pripravených z 2,2 mM (373,714 µg.ml⁻¹) roztoku AgNO₃ a levanduľového extraktu pripraveného pri laboratórnej teplote a reakcii prebiehajúcej pri 75 °C a taktiež pri nanočasticiach pripravených z 2,2 mM (373,714 µg.ml⁻¹) roztoku AgNO₃ a levanduľového extraktu pripraveného pri laboratórnej teplote a reakcii prebiehajúcej pri 80 °C. Nameraná hodnota MIC bola v oboch prípadoch 23,357 µg.ml⁻¹.
- Ostatné pripravené nanočastice vykazovali antifungálnu aktivitu v hodnotách MIC od 11,679 µg.ml⁻¹ do 17,518 µg.ml⁻¹.
- Antifungálna aktivita všetkých novosyntetizovaných nanočastíc bola porovnateľná alebo vyššia ako antifungálna aktivita u testovaných roztokov AgNO₃.
- Z našich výsledkov je zrejmé, že takto pripravené AgNPs majú dokázanú antifungálnu aktivitu a sú relevantným príspevkom k danej problematike biosyntézy nanočastíc.

Na zavedenie nanočastíc do medicínskej praxe je potreba ďalšieho výskumu a vedeckého skúmania tejto oblasti, pretože sa jedná o aktuálnu tému vzhľadom na narastajúcu antimykotickú rezistenciu.

ZOZNAM LITERATÚRY

Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L., Ikram, S.: A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 2016, 7, 17 – 28.

Ali, M., Kim, B. D., Belfield, K., Norman, D., Brennan, M., Ali, G. S.: Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Artemisia absinthium* aqueous extract – a comprehensive study. *Materials Science and Engineering: C*, 2016, 58, 359 – 365.

Bunghez, I. R., Fierascu, R. C., Dumitrescu,

- O., Fierascu, I., Ion, R. M.: Characterization of silver nanoparticles obtained by *Lavandula angustifolia* extract. *Revue Roumaine de Chimie*, 2015, 60, 515 – 519.
- Calderón-Jiménez, B., Montoro, Bustos, A. R., Pereira, Reyes, R., Paniagua, S. A., Vega-Baudrit, J. R.: Novel pathway for the sonochemical synthesis of silver nanoparticles with near-spherical shape and high stability in aqueous media. *Scientific Reports*, 2022, 12, 882.
- CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. 4th edn. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.
- CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. 2nd edn. CLSI supplement M60. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- Clinical and Laboratory Standards Institute: M27 – A3*. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. Third edition, 2008, 1 – 13.
- Denning, D. W., Perlin, D. S., Muldoon, E. G., Colombo, A. L., Chakrabarti, A., Richardson, M. D., Sorrel, T. C.: Delivering on antimicrobial resistance agenda not possible without improving fungal diagnostic capabilities. *Emerging infectious diseases*, 2017, 23, 177 – 183.
- Dobrucka, R., Długaszewska, J.: Antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized by using water extract of *Arnicae anthodium*. *Indian Journal of Microbiology*, 2015, 55, 168 – 174.
- Durán, N., Simões, M. B., De Moraes, A. C. M., Fávaro, W. J., Seabra, A. B.: Nanobiotechnology of carbon dots: a review. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2016, 12, 1323 – 1347.
- Elgorban, A. M., El-Samawaty, A. E., Yassin, M. A., Sayed, S. R., Adil, S. F., Elhindi, K. M., Bakri, M., Khan, M.: Antifungal silver nanoparticles: synthesis, characterization and biological evaluation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2016, 30, 56 – 62.
- Hasanin, M. S., Emam, M., Soliman, M. M. H., Abdel, Latif, R. R., Salem, M. M. M., El Raey, M. A., Eisa, W. H.: Green silver nanoparticles based on *Lavandula coronopifolia* aerial parts extract against mycotic mastitis in cattle. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2022, 42, 102 350.
- Liu, H., Zhang, H., Wang, J., Wei, J.: Effect of temperature on the size of biosynthesized silver nanoparticle: Deep insight into microscopic kinetics analysis. *Arabian Journal of Chemistry*, 2020, 13, 1011 – 1019.
- Huq, M. A.: Green synthesis of silver nanoparticles using *Pseudoduganella eburnea* MA-HUQ-39 and their antimicrobial mechanisms investigation against drug resistant human pathogens. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21, 1510.
- Chaturvedi, S., Dave, P. N., Shah, N. K.: Applications of nano-catalyst in new era. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2012, 16, 307 – 325.
- Karnani, R. L., Chowdary, A.: Biosynthesis of silver nanoparticle by eco-friendly method. *Indian Journal of Nanoscience*, 2013, 1, 25 – 31.
- Kayser, F. H.: Fungi as human pathogens. In: Kayser F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M. (Eds.). *Medical Microbiology*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2005, 726.
- Kora, A. J., Sashidhar, R. B., Arunachalam, J.: Gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A template for the green synthesis and stabilization of silver nanoparticles with antibacterial application. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82, 670 – 679.
- Kordy, M. G. M., Abdel-Gabbar, M., Soliman, H. A., Aljohani, G., BinSabt, M., Ahmed, I. A., Shaban, M.: Phyto-capped Ag nanoparticles: green synthesis, characterization, and catalytic and antioxidant activities. *Nanomaterials*, 2022, 12, 373.
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L.: Biosynthesis of silver nanoparticles using lavender leaf and their applications for catalytic, sensing, and antioxidant activities. *Nanotechnology Reviews*, 2016, 5,

- Merugu, R., Gothalwal, R., Velamakanni, R. P., Velamakanni, R. S., Chitturi, K. L., Naz, F.: Green synthesis of nanoparticles by plants and their renewable energy applications. In: Srivastava, M., Malik, M. A., Mishra, P. (Eds.). *Green Nano Solution for Bioenergy Production Enhancement. Clean Energy Production Technologies*. Singapore: Springer, 2022.
- Mussin, J. E., Roldán, M. V., Rojas, F., Sosa, M. D. L. Á., Pellegrini, N., Giusiano, G.: Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with ketoconazole against *Malassezia furfur*. *AMB Express*, 2019, 9, 131.
- Netai, M. M., Cecilia, G., Munyaradzi, M., Upenyu, G., Stephen, N.: Synthesis of silver nanoparticles using plant extracts from *Erythrina abyssinica* aerial parts and assessment of their anti-bacterial and anti-oxidant activities. *Results in Chemistry*, 2022, 4, 100 402.
- Nouri, A., Yarak, M. T., Lajevardi, A., Rezaei, Z., Ghorbanpour, M., Tanzifi, M.: Ultrasonic-assisted green synthesis of silver nanoparticles using *Mentha aquatica* leaf extract for enhanced antibacterial properties and catalytic activity. *Colloid and Interface Science Communications*, 2020, 35, 100 252.
- Patra, J. K., Baek, K.-H.: Green nanobiotechnology: factors affecting synthesis and characterization techniques. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 2014, 1 – 12.
- Piñero, S., Camero, S., Blanco, S.: Silver nanoparticles: Influence of the temperature synthesis on the particles' morphology. *Journal of Physics: Conference Series*, 2017, 786, 012 020.
- Rai, M., Yadav, A., Gade, A.: Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 2009, 27, 76 – 83.
- Saleem, S., Ahmed, B., Khan, M. S., Al-Shaeri, M., Musarrat, J.: Inhibition of growth and biofilm formation of clinical bacterial isolates by NiO nanoparticles synthesized from *Eucalyptus globulus* plants. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 111, 375 – 387.
- Saravanan, M., Barabadi, H., Vahidi, H., Webster, T. J., Medina-Cruz, D., Mostafavi, E., Vermet-Crua, A., Cholula-Diaz, J. L., Periakaruppan, P.: Chapter 19 – Emerging theranostic silver and gold nanobiomaterials for breast cancer: present status and future prospects. *Handbook on Nanobiomaterials for Therapeutics and Diagnostic Applications*, 2021, 439 – 456.
- Sidhu, A. K., Verma, N., Kaushal, P.: Role of biogenic capping agents in the synthesis of metallic nanoparticles and evaluation of their therapeutic potential. *Frontiers in Nanotechnology*, 2022, 3, 801 620.
- Sofi, H. S., Akram, T., Tamboli, A. H., Maheed, A., Shabir, N., Sheikh, F. A.: Novel lavender oil and silver nanoparticles simultaneously loaded onto polyurethane nanofibers for wound-healing applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 569, 118 590.
- Spiridon, I., Colceru, S., Anghel, N., Teaca, C. A., Bodirlau, R., Armatu, A.: Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania. *Natural Product Research*, 2011, 25, 1657 – 1661.
- Stavinskaya, O., Laguta, I., Fesenko, T., Krumova, M.: Effect of temperature on green synthesis of silver nanoparticles using *Vitex agnus-castus* extract. *Chemistry Journal of Moldova*, 2019, 14, 117 – 121.
- Taha, Z. K., Hawar, S. N., Sulaiman, G. M.: Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles from *Penicillium italicum* and its antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities. *Biotechnology Letters*, 2019, 41, 899 – 914.
- Vanlalveni, C., Rajkumari, K., Biswas, A., Adhikari, P. P., Lalfakzuala, R., Rokhum, L.: Green synthesis of silver nanoparticles using *Nostoc linckia* and its antimicrobial activity: a novel biological approach. *Bionanoscience*, 2018, 8, 624 – 631.
- Yassin, M. T., Mostafa, A. A.-F., Al-Askar, A. A., Al-Otibi, F. O.: Synergistic antifungal efficiency of biogenic silver nanoparticles with itraconazole against multidrug-resistant candidal strains. *Crystals*, 2022, 12, 816.



FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI NOVOSYNTETIZOVANÝCH CHALKÓNOV PHARMACOLOGICAL PROFILE OF NEW-SYNTHESED CHALCONES

Bedlovičová, Zdenka¹; Sokoli, Libor²; Váczi, Peter²; Tkáčiková, Ľudmila³; Mojžiš, Ján⁴

¹ Katedra chémie, biochémie a biofyziky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie
v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

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

³ Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie
v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

⁴ Ústav farmakológie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
Tr. SNP 1, 040 11 Košice
Slovenská republika

zdenka.bedlovicova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Liečba nádorových, bakteriálnych, vírusových a plesňových ochorení sa stáva čoraz viac problematickou. Mnohé doteraz používané liečivá znamenávajú pokles účinnosti v liečbe ochorení v dôsledku rôznych mechanizmov, medzi ktoré môžeme zaradiť aj vznik rezistencií. Táto štúdia je zameraná na syntézu chalkónov odvodených od kumarínu. Takto nasyntetizované chalkóny boli následne opísané pomocou 1D a 2D NMR a infračervenej spektroskopie a boli podrobené sérii farmakologických skúšok so zameraním na antiproliferatívnu, antioxidačnú, antimikrobiálnu a antifungálnu aktivitu. Pripravené zlúčeniny vykazovali antiproliferatívnu, antifungálnu aj antioxidačnú aktivitu, avšak antimikrobiálny účinok pozorovaný nebol.

Kľúčové slová: farmakologické vlastnosti; chalkóny; NMR spektroskopia; syntéza

ABSTRACT

Many civilization diseases, such as tumorous, bacterial, viral, parasitic, or fungal diseases, represent an increasing problem in their treatment. Many drugs used have been showing a decrease in effectivity in the treatment of diseases by various mechanisms, among which we can also include the emergence of resistance. The presented study is focused on the synthesis of chalcones derived from coumarin. The synthesized chalcones were described by 1D and 2D NMR and infrared spectroscopy, and were subjected to a series of pharmacological tests focused on antiproliferative, antioxidant, antibacterial, and antifungal activity.

Prepared compounds showed antiproliferative, antifungal, and antioxidant activity, but antibacterial effect was not observed.

Key words: chalcones; NMR spectroscopy; pharmacological properties; synthesis

ÚVOD

Chalkóny tvoria jednu z najväčších skupín bioaktívnych prírodných látok. Potenciálne protinádorové, antiflogistické, antibakteriálne, antioxidačné a antiparazitické vlastnosti prirodzene sa vyskytujúcej chalconov a ich jedinečné chemické štruktúrne vlastnosti inšpirovali syntézu mnohých derivátov (Kim a kol., 2020). Ukázalo sa, že mnohé z týchto syntetických derivátov disponujú podobnými biologickými vlastnosťami ako ich prírodné analógy, ale často so zvýšenou účinnosťou a zníženou toxicitou. Pozornosť sa však naďalej zameriava na kritické hodnotenie syntetizovaných chalconov a ich derivátov z hľadiska ich biologickej aktivity, v prípade potreby s prepojením s ich interakciami na biomolekulovej úrovni a odhalením ich možných mechanizmov pôsobenia (Jasim a kol., 2021).

Napríklad chalkón [(*E*)-1,3-difenyl-prop-2-én-1-ón], ktorý sa pripravuje synteticky kondenzáciou acetofenónu s benzaldehydom v prítomnosti vhodných kondenzačných činidiel môže poskytovať reakcie, ktoré vedú k príprave rôznych heterocyklických zlúčenín so zaujímavými farmakologickými vlastnosťami. Hoci mechanizmus biologického pôsobenia chalconov stále nie je úplne známy, rôzne farmakologické využitie chalconov je pripísané α,β -nenasýtenému systému (Al-Saheb a kol., 2020). Základné mechanizmy účinku chalconov preukázali ich schopnosť ovplyvňovať množstvo rakovinových bunkových línií, inhibovať patologické mikroorganizmy a parazity a kontrolovať množstvo signálnych molekúl a kaskád súvisiacich s modifikáciou ochorenia. Klinické štúdie za použitia chalconov odhalili všeobecnú absenciu nežiaducich účinkov okrem zníženia klinických príznakov a symptómov s dobrou biologickou dostup-

nosťou (Salehi a kol., 2021).

Cieľom štúdie je syntéza a štúdium derivátov kumarínu obsahujúcich chalkónové zoskupenie vo svojej štruktúre a stanovenie ich antiproliferatívnej aktivity proti humánnemu kolorektálnemu karcinómu (HCT 116), adenokarcinómu krčka maternice (HeLa) a humánnemu kolorektálnemu adenokarcinómu (Caco-2). Antimikrobiálna aktivita bola stanovená voči bakteriálnym kmeňom *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Antifungálna aktivita bola študovaná na referenčnom kmeni *Candida albicans* a antioxidačná aktivita bola stanovená ako schopnosť látok vychytať stabilný voľný radikál DPPH (2,2-difenylylpyridylhydrazyl radikál).

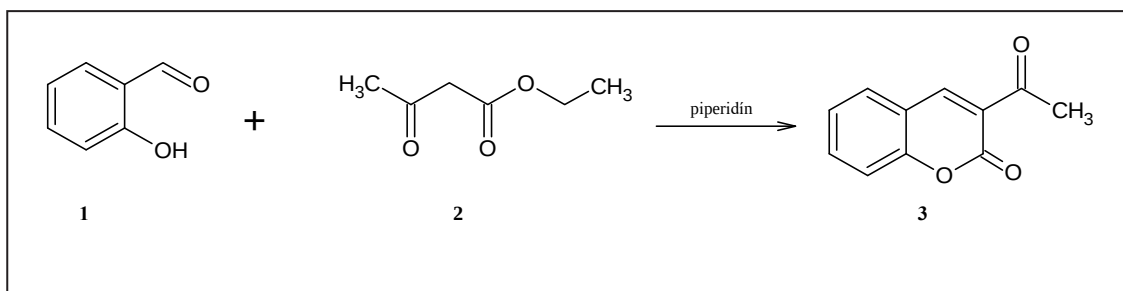
MATERIÁL A METÓDY

Všetky použité chemikálie a rozpúšťadlá použité pri syntéze boli komerčne dostupné (Merck, Nemecko; Sigma Aldrich, Nemecko; Slavus, Slovenská republika). Priebeh chemických reakcií bol monitorovaný použitím TLC platní (TLC – tenkovrstvová chromatografia) (TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Nemecko) pod UV svetlom pri vlnovej dĺžke 254 nm. Infračervené spektrá boli namerané na prístroji IR-Affinity (Shimadzu) v rozmedzí 4000 – 400 cm⁻¹ metódou KBr (Fisher Chemicals, Veľká Británia). 1D a 2D NMR spektrá boli namerané na spektrometri Varian Mercury Plus NMR s pracovnou frekvenciou 400 MHz pre ¹H a 100 MHz pre ¹³C NMR. Ako rozpúšťadlo sa použil deuterovaný dimetylsulfoxid – DMSO-*d*₆ a ako vnútorný štandard bol použitý tetrametylsilán (TMS) ($\delta_{\text{TMS}} = 0$ ppm) pri 298 K. Teploty topenia boli stanovené na bodotávku Electrothermal IA9200.

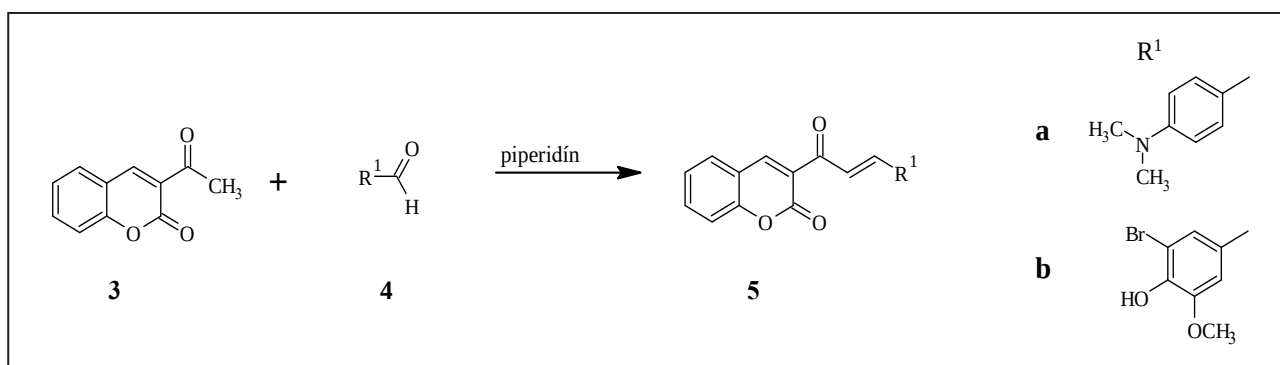
Syntéza chalkónov

Pri chemickej syntéze sme sa zamerali na prípravu chalconov obsahujúcich kumarínový skelet. Zlúčeniny obsahujúce kumarínový zvyšok boli syntetizované z 3-acetylkumarínu a príslušného aldehydu v bázi-
kom prostredí.

Obr. 1: Schéma syntézy 3-acetylkumarínu



Obr. 2: Schéma syntézy nových chalkónov



Syntéza 3-acetylkumarínu

Ku 0,01 mol salicylaldehydu **1** bolo pridané ekvimolárne množstvo etylacetoacetátu **2** a 0,1 ml (1 mmol) piperidínu. Reakčná zmes sa miešala pri laboratórnej teplote do ukončenia reakcie maximálne 30 minút. Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou TLC (viď obr. 1).

Syntéza chalkónov odvodených od 3-acetylkumarínu

1,1 mmol príslušného aldehydu **4** v bezvodom etanole (3 ml) sa zmiešalo s ekvimolárnym množstvom 3-acetylkumarínu **3**. K reakčnej zmesi bolo pridané katalytické množstvo piperidínu (0,5 mmol) a reakčná zmes sa refluxovala do ukončenia reakcie (v prípade produktu **5a** 10 h a **5b** 4 h). Priebeh reakcií bol sledovaný pomocou TLC. Po ukončení reakcie bolo rozpúšťadlo odparené použitím rotačnej vákuovej odparky (IKA, Nemecko) a produkty boli chromatograficky prečistené, ako eluent bola použitá zmes hexánu a etylacetátu v pomere 3 : 1.

Stanovenie antiproliferatívnej aktivity

Na stanovenie antiproliferatívnej aktivity bola použitá 96-jamková platnička (Sarstedt, Nemecko), jednokanálová pipeta 20 – 200 μl /100 – 1000 μl , spektrofotometer Cytation™ 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek, Winooski, VT, USA), MTS – (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxifenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazólium) a nádorové bunkové línie: humánny kolorektálny karcinóm (HCT 116), adenokarcinóm krčka maternice (HeLa), humánny kolorektálny adenokarcinóm (Caco-2).

Antiproliferatívny účinok syntetizovaných látok **5a** a **5b** bol stanovený pomocou kolorimetrického testu MTS, pri ktorom je MTS redukované NAD(P)H-dependetnými dehydrogenázami viabilných buniek na farebný formazán. Vzniknutá farebná zmena bola následne kvantifikovaná pomocou absorbancie média u kontrolných vzoriek a vzoriek ovplyvnených pomocou testovaných látok.

Na testovanie boli použité 3 línie nádorových bu-

niek (HeLa, Caco – 2 a HCT 116), ktoré boli nasadené na 96-jamkovú platničku o hustote 5×10^3 buniek/jamka. Takto nasadené bunky boli následne inkubované v termostate pri 37°C v priebehu 24 h v atmosfére CO_2 s koncentráciou 5 %. K pripraveným bunkám bolo po 24 h pridaných 20 μl syntetizovaných látok (v tripletoch) o rôznych koncentráciách (1, 5, 10, 50 a 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$). Nádorové línie boli ďalej inkubované počas 72 h v termostate pri 37°C v 5 % atmosfére CO_2 , následne sme do každej jamky pridali 10 μl MTS (5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) s následnou inkubáciou v termostate v priebehu 2 h pri 37°C (5 % atmosféra CO_2). Po ukončení inkubácie boli bunky položené na trepačku na 20 minút pri otáčkach 20 rpm. Následne boli vyhodnotené metabolické aktivity buniek meraním absorbancie pri vlnovej dĺžke 490 nm. Absorbancia jamiek, ktoré obsahovali kontrolné skupiny, bola braná ako 100 % a výsledky boli vyjadrené ako násobok kontroly. IC_{50} (polovičná maximálna inhibičná koncentrácia) každého chalkónu boli stanovené pomocou troch nezávislých experimentov.

Stanovenie antioxidačnej aktivity metódou DPPH

Metóda DPPH je opísaná v literatúre (Brand-Williams, Cuvelier, Berset, 1995). Stanovili sme antioxidačnú aktivitu syntetizovaných chalkónov voči stabilným radikálom DPPH, pričom podmienky merania boli upravené oproti pôvodnému postupu. Na stanovenie antioxidačnej aktivity boli použité DPPH (2,2-difenylypikryl hydrazyl), kyselina L-askorbová a metanol.

K 2 ml čerstvo pripraveného $0,001 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku DPPH bolo pridaných 0,250 ml štandardných roztokov kyseliny L-askorbovej s koncentráciou 1 – 20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, resp. syntetizovaných chalkónov s koncentráciou 0,125 – 1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Roztoky boli premiešané a inkubované v tme počas 30 minút pri laboratórnej teplote. Ako slepá vzorka pre stanovenie bol použitý metanol a ako kontrolná vzorka bol použitý roztok DPPH s prídavkom 0,250 ml metanolu. Sledovali sme pokles absorbancie pri vlnovej dĺžke 517 nm v dôsledku reakcie voľného radikálu so vzorkou. Každé stanovenie bolo opakované trikrát. Antioxi-

dačná aktivita (AA) bola vypočítaná podľa vzťahu:

$$AA (\%) = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \cdot 100 \quad (1)$$

kde A_0 je absorbancia kontrolnej vzorky a A_x je absorbancia vzorky.

Stanovenie antibakteriálnej aktivity

Na stanovenie antibakteriálnej aktivity boli použité Petriho misky (priemer 90 mm), agarová platňa (Oxoid, Veľká Británia), softvér ImageJ, tekutý agar (Oxoid, Veľká Británia), bujón BHI (Brain Heart Infusion broth, Oxoid, Veľká Británia), štandardný roztok gentamicín sulfátu (50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), dimetylsulfoxid (DMSO) a bakteriálne kmene z Českej zbierky mikroorganizmov – *Staphylococcus aureus* (SA; CCM 4223) a *Escherichia coli* (EC; CCM 3954).

Metodika stanovenia antibakteriálnej aktivity

Na stanovenie antimikrobiálnej aktivity bola použitá platňová agarová difúzna metóda podľa Rojas (Rojas a kol., 2006). Baktérie boli kultivované v bujóne BHI a inokulované do tekutého agaru. Ako pozitívna kontrola bol použitý gentamicín sulfát s koncentráciou 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, ako negatívna kontrola bol použitý DMSO, resp. jeho 50 % roztok. Jednotlivé chalkóny boli použité s koncentráciou 100 a 50 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Pre stanovenie veľkosti inhibičných zón sme použili softvér ImageJ (Schneider a kol., 2012) a pre výpočet antimikrobiálnej aktivity bol použitý vzťah:

$$\% RIZD = \left[\frac{IZD_{\text{vzorka}} - IZD_{\text{negatívna kontrola}}}{IZD_{\text{pozitívna kontrola}}} \right] \cdot 100 \quad (2)$$

kde IZD je priemer inhibičnej zóny v mm a $RIZD$ vyjadruje percento priemernej relatívnej inhibičnej zóny (%). Hodnoty sú vyjadrené ako stredná hodnota $\pm$ štandardná odchýlka (SD).

Stanovenie antifungálnej aktivity

Pri stanovení antifungálnej aktivity boli využité živné médiá a roztoky: Sabouraudov dextrózový bujón (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Bombaj, India), fyziologický roztok, 60 % etanol. Ďalej boli použité:

96-jamková titračná platnička (Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Nemecko), filter sterilný 0,22 µm, jednorazové sterilné kľučky, pipeta jednokanálová 20 – 200 µl/100 – 1000 µl, sterilné jednorazové injekčné striekačky, sterilné špičky a vaničky, pipeta 8 kanálová 30 – 300 µl, sterilné kadičky, kahan plynový, sterilné skúmavky s uzáverom.

Antifungálna aktivita bola skúmaná pomocou mikrodilučnej validovanej metódy M27 – A3 (CLSI, 2008). Pomocou tejto metódy bola testovaná citlivosť referenčného kmeňa *Candida albicans* ATCC 102 31 (Česká zbierka mikroorganizmov, Brno, Česká republika) na syntetizované chalkóny.

Samotné inokulum bolo pripravené 24 hodín vopred z kultúr *Candida albicans* ATCC 102 31, ktoré rástli na Sabouraudovom dextrózovom agare s prídavným chloramfenikolom pri 35 °C. Odobratím kolónie a jej zmiešaním s fosfátovým tlmivým roztokom (PBS) bola vzniknutá suspenzia pomocou denzitometra upravená na hodnotu McFarlandovej stupnice 0,5; čo zodpovedá počtu 10⁶ CFU (kolónie tvoriacich jednotiek) v 1 ml suspenzie. Tá bola následne zriedená na polovicu (teda 10³ CFU/ml) pomocou Sabouraud-dextrózového tekutého živného média obohateného o glukózu (10 mmol.l⁻¹). Testovanie novosyntetizovaných chalkónov bolo uskutočnené v 96-jamkovej titračnej platničke. Do jamiek 1 – 12 bolo aplikovaných 100 µl Sabouraudovho bujónu. Do jamky 1 bolo pipetovaných 200 µl 10 % roztoku syntetizovaných chalkónov. Pred aplikáciou boli dané látky prefiltrované cez sterilný 0,22 µm filter. Následne bolo po vložení vzorky do jamky 1 aplikované dvojité riedenie, pričom bolo použitých 100 µl látky, ktorá bola prenesená do jamky 2, niekoľkokrát premiešaná a následne z jamky 2 bolo prenesených 100 µl suspenzie, ktorá bola pridaná do jamky 3. Týmto spôsobom bolo postupované až k jamke 10.

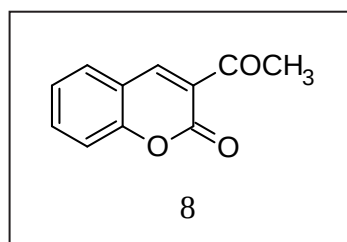
Jamka 11 predstavuje negatívnu kontrolu a jamka 12 predstavuje pozitívnu kontrolu.

VÝSLEDKY

Syntéza chalkónov

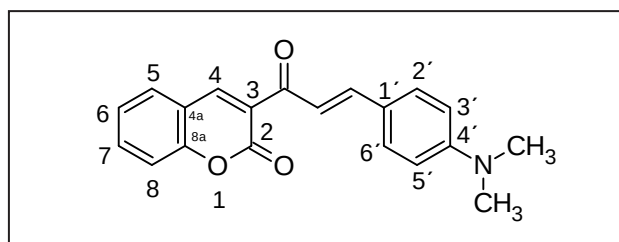
V nasledujúcom texte uvádzame fyzikálno-chemické vlastnosti syntetizovaných zlúčenín (viď obr. 3 – 5) a ich spektrálne charakteristiky pre zlúčeniny **3**, **5a** a **5b**.

Obr. 3: 3-acetylkumarín (**3**)



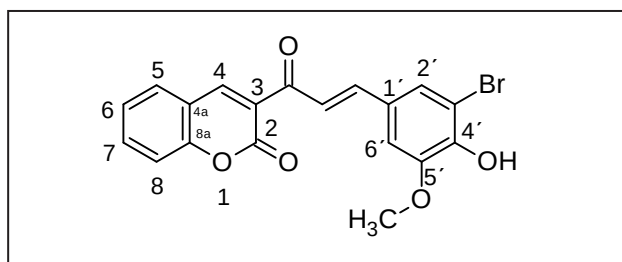
$C_{11}H_8O_3$; $M_r = 188,18 \text{ g.mol}^{-1}$; $R_f = 0,55$ (hexán/etylacetát 2/1); **Výťažnosť**: 89 %, teplota topenia: 120 °C, 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ ppm: 8,64 (s, 1H, H-4); 7,93 (d, 1H, $J=7,6 \text{ Hz}$, H-8); 7,72 (t, 1H, $J=7,8 \text{ Hz}$, H-7); 7,44 (d, 1H, $J=8,4 \text{ Hz}$, H-5); 7,39 (t, 1H, $J=7,2 \text{ Hz}$, H-6); 2,56 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ ppm: 195,64 C=O karbonylovej skupiny; 158,88 (C=O kumarínu); 155,03 (C-8a); 147,47 (C-4); 134,91 (C-7); 131,21 (C-8); 125,37 (C-6); 124,89 (C-3); 118,60 (C-4a); 116,55 (C-5); 30,48 (CH_3). **IC (KBr) v cm^{-1}** : 3110, 3093, 3079 a 3044 (arom. C-H), 2984, 2976 a 2930 (alifatické C-H); 1740 (C=O kumarínu), 1731 (C=O karboxylovej skupiny); 1614 a 1606 (C=C).

Obr. 4: 3-[(2E)-3-[4-(dimetylaminofenyl)prop-2-énol]kumarín (**5a**)



$C_{20}H_{17}NO_3$; $M_r = 319,35 \text{ g.mol}^{-1}$; $R_f = 0,46$ (hexán/etylacetát 3/2); **Výťažnosť**: 72 %, teplota topenia: 142 °C, 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ ppm: 8,57 (s, 1H, H-4); 7,91 (dd, 1H, $J_1=1,6 \text{ Hz}$, $J_2=7,6 \text{ Hz}$, H-5); 7,73 (m, 1H, H-7); 7,67 (d, 1H, $J=16 \text{ Hz}$, =C-H v susedstve C-1'); 7,57 (d, 2H, $J=8,8 \text{ Hz}$, H-2',6'); 7,46 (d, 1H, $J_2=8,4 \text{ Hz}$, H-8); 7,42 (m, 1H, H-6); 7,36 (d, 1H, $J=15,6 \text{ Hz}$, =C-H v susedstve C=O); 6,73 (d, 2H, $J=8,8 \text{ Hz}$, H-3',5'); 2,99 (s, 6H, $2 \times CH_3$). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ ppm: 187,02 (C=O chalkónu); 158,97 (C=O kumarínu); 154,70 (C-8a); 152,65 (C-4'); 146,32 (=C-H v susedstve C-1'); 146,19 (C-4); 134,24 (C-7); 131,22 (C-2',6'); 130,62 (C-5); 126,67 (C-8); 125,31 (=C-H v susedstve C=O); 124,69 (C-5); 122,29 (C-1'); 118,95 (C-4a); 116,68 (C-3); 112,32 (C-3',5'); 40,5 (CH_3).

Obr. 5: 3-[(2E)-3-(3-bróm-4-hydroxy-5-metoxyfenyl)prop-2-énonyl]kumarín (5b)

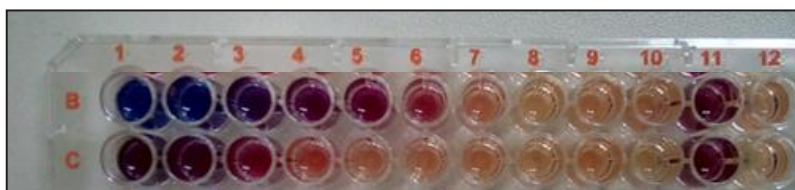


$C_{19}H_{13}BrO_5$; $M_r = 401,20 \text{ g.mol}^{-1}$; $R_f = 0,35$ (hexán/etylacetát 2/1); **Výťažnosť**: 65 %, teplota topenia: 78°C , $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ ppm: 8,57 (s, 1H, H-4); 7,91 (dd, 1H, $J_1=1,6 \text{ Hz}$, $J_2=8 \text{ Hz}$, H-5); 7,72 (t, 1H, $J=7,2 \text{ Hz}$, H-7); 7,65 (d, 1H, $J=16 \text{ Hz}$, =C-H v susedstve C-1'); 7,55 (d, 1H, $J=7,2 \text{ Hz}$, H-8); 7,37 – 7,14 (m, 3H, H-6,2',6'); 7,44 (d, 1H, $J=15,6 \text{ Hz}$, =C-H v susedstve C=O); 3,87 (s, 3H, CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ ppm: 188,18 (C=O chalkónu); 158,73 (C=O kumarínu); 154,71 (C-8a); 148,92 (C=4'); 146,43 (C-4); 144,59 (=C-H v susedstve C-1'); 134,38 (C-7); 130,65 (C-5); 127,19 (C-1'); 126,56 (C-8); 126,50 (C-3'); 125,38 (=C-H v susedstve C=O); 123,64 (C-6); 122,29 (C-1'); 118,82 (C-4a); 116,66 (C-6'); 111,21 (C-3); 110,01 (C-2'); 56,81 (CH_3).

Tab. 1: Hodnoty IC_{50} [$\mu\text{mol.l}^{-1}$] $\pm$ SD testovaných chalkónov

Bunková línia	HCT 116	HeLa	Caco-2
Chalkón 5a	$33,48 \pm 1,48$	$87,11 \pm 0,73$	>100
Chalkón 5b	$14,66 \pm 1,34$	$57,03 \pm 1,38$	>100

Obr. 6: Stanovenie antifungálnej aktivity pomocou mikrodilučnej validovanej metódy M27 – A3 (CSLI, 2008)



Antiproliferatívna aktivita

Antiproliferatívna aktivita bola stanovovaná pomocou kolorimetrického skríningového testu MTS na nádorových bunkách (HCT 116, HeLa a Caco-2). Hodnoty IC_{50} syntetizovaných chalkónov sú uvedené v tab. 1.

Antifungálna aktivita

Stanovenie antifungálnej aktivity (vid' obr. 6) bolo vykonané mikrodilučnou validovanou metódou M27 – A3 (CSLI, 2008). Pozitívna kontrola je vyobrazená v jamke 12 a negatívna kontrola v jamke 11. Antifungálna aktivita bola pozorovaná v prípade oboch študovaných látok 5a a 5b, pričom sme

stanovili aj minimálnu inhibičnú koncentráciu MIC. Chalkón 5a vykazoval antifungálnu aktivitu s MIC 8 mg.ml^{-1} , naopak, pri chalkóne 5b bola stanovená MIC na 62 mg.ml^{-1} .

Antibakteriálna aktivita

Výsledky získané použitím diskovej difúznej metódy poukazujú na to, že ani jedna vzorka nevykazovala antimikrobiálnu aktivitu, či už voči gram-negatívnemu kmeňu *Escherichia coli*, alebo voči gram-pozitívnemu kmeňu *Staphylococcus aureus*.

Antioxidačná aktivita

Antioxidačná aktivita bola stanovená metódou vy-

Tab. 2: Antioxidačná aktivita syntetizovaných chalkónov

$c_{\text{chalkónu}}$ [mg.ml ⁻¹]	A ± SD	Antioxidačná aktivita [%]	Ekvivalenty kyseliny askorbovej [mg.ml ⁻¹]
5a 1,000 0,500 0,250 0,125	0,0413 ± 0,0011	95,3	200,0
	0,0901 ± 0,0027	89,8	188,1
	0,7699 ± 0,0254	12,6	22,3
	0,7899 ± 0,0425	10,3	14,7
5b 1,000 0,500 0,250 0,125	0,1537 ± 0,0163	82,5	172,6
	0,3899 ± 0,0787	55,7	114,9
	0,5749 ± 0,0444	34,7	69,9
	0,7061 ± 0,0171	19,8	37,9

chytania voľného DPPH radikálu. Princípom stanovenia je pokles absorpčného maxima pri vlnovej dĺžke pri 517 nm, pričom z pôvodne fialového roztoku vznikol žltý roztok 2,2-difenylypikrylhydrazínu.

Ako štandard pre stanovenie vychytávania radikálu DPPH bola zvolená kyselina L-askorbová. Z rovnice kalibračnej priamky bola vypočítaná antioxidačná aktivita chalkónov ako ekvivalentov kyseliny askorbovej (viď tab. 2).

DISKUSIA

Syntéza chalkónov

Chalkóny vo svojej štruktúre obsahujú dva arylóvé zvyšky spojené cez α,β -nenasýtenú karbonylovú skupinu (Alam, Rahman, Lee, 2015). Chalkóny podliehajú mnohým chemickým reakciám a používajú sa aj na syntézu heterocyklických zlúčenín. Kondenzačnou reakciou aromatických aldehydov s arylketónmi je možné syntetizovať širokú škálu chalkónových derivátov (Kumar a kol., 2010). Chalkóny sú medziproduktom v niekoľkých biosyntetických dráhach ako intermediáty pri produkcii flavonoidov, izoflavonoidov a aurónov. Vedecký výskum je zameraný na prírodné aj syntetické chalkóny z dôvodu ich rozmanitého farmakologického potenciálu (Lakshminarayanan, Kannappan, Subburaju, 2020).

Priebeh syntézy 3-acetylkumarínu sa najčastejšie

popisuje pomocou Knoevenagelovej reakcie, pri ktorej reaguje 2-hydroxybenzaldehyd s etylacetoacetátom v bázičkom prostredí (Dalessandro a kol., 2017). Syntéza samotných chalkónov vychádzala z bázičky katalyzovanej reakcie aldolového typu (Claisen-Schmidtova reakcia). Ako katalyzátor bol použitý piperidín. Reakcia vychádza z ataku zásady na uhlík ketónu, ktorý sa správa ako C-kyselina. Na uhlíku je potom záporný náboj, a tak je schopný atakovať karbonylový uhlík aldehydu, ktorý nesie parciálny kladný náboj a dochádza ku kondenzačnej reakcii.

Pre určenie štruktúry syntetizovaných látok boli využité moderné 1D a 2D NMR experimenty ako aj infračervená spektroskopia. Signály v ¹H a ¹³C NMR spektrách pre jednotlivé kruhy kumarínového, resp. benzénového skeletu boli priradené na základe analýzy H,H-COSY experimentu, pomocou ktorého sme odlišili jednotlivé spinové systémy v molekule a pomocou gHMBC a gHSQC bolo možné priradiť jednotlivé chemické posuny atómov vodíka a uhlíka.

Antiproliferatívna aktivita

Kolorektálny karcinóm sa vyvíja v hrubom čreve a/alebo konečníku. Vyznačuje sa vysokou invazivitou a metastatickým potenciálom, ktorý významne prispieva k zvýšeniu úmrtnosti (Schluter a kol., 2006). Úmrtnosť v dôsledku tohto karcinómu môže byť znížená včasnou diagnózou a odstránením prekursorov

benígnych polypov. Väčšina pacientov je však diagnostikovaná v neskorom štádiu, keď sa karcinóm už nedá liečiť chirurgicky (De Wit a kol., 2013). V predkladanej práci sme poukázali na značný inhibičný potenciál viability buniek nádorovej línie kolorektálneho karcinómu HCT 116 pôsobením chalkónov **5a** ($IC_{50} = 33,48 \pm 1,475 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a **5b** ($IC_{50} = 14,66 \pm 1,34 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

Niektoré skupiny aminochalkónov v *in vitro* štúdiách vykazovali vysoký potenciál antiproliferatívneho účinku, ktorý bol skúmaný na nádorových líniiach kolorektálneho karcinómu HCT 116 (Lu a kol., 2020). V predloženej štúdii sme túto skutočnosť pozorovali aj v prípade chalkónu **5a**, ktorý má v postrannom reťazci prítomnú substituovanú amino skupinu.

Karcinóm krčka maternice sa celosvetovo radí medzi štyri najrozšírenejšie malignity z hľadiska incidence aj mortality (Bray a kol., 2018). Hlavnou príčinou progresie rakoviny krčka maternice je HPV infekcia epiteliálnych buniek a neefektívna imunitná odpoveď v prostredí krčka maternice (Cho a kol., 2014).

Kuruc a kol. (2021) v štúdii niekoľkých novosyntetizovaných chalkónov, ktoré obsahovali hydroxylovú skupinu, vykonali sériu pozorovaní viability buniek pomocou MTS testu. Test bol vykonaný na nádorovej línii HeLa buniek, pričom určili IC_{50} chalkónu na $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Táto koncentrácia sa použila v nasledujúcich analýzach spolu s „netoxickou“ koncentráciou IC_{10} $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Okrem toho koncentrácie vyššie ako hodnota IC_{50} nevykazovali žiadne ďalšie významné zníženie životaschopnosti buniek. Vo výsledkoch z MTS testov v tejto štúdii môžeme túto skutočnosť pozorovať aj v prípade chalkónu **5b**, ktorého aktivita bola skúmaná na nádorových bunkách HeLa. V tomto prípade sme IC_{50} stanovili na $57,03 \pm 1,38 \mu\text{mol.l}^{-1}$. V prípade aminochalkónu **5a** bola stanovená IC_{50} na hodnotu $87,11 \pm 0,73 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

V prípade nádorovej línie Caco-2 bola IC_{50} stanovená na hodnotu $>100 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

Antifungálna aktivita

Výskyt invazívnych mykotických infekcií predsta-

vuje ohrozenie pre ľudské zdravie, ktoré je obzvlášť závažné u pacientov s oslabenou imunitou. Obmedzený počet antifungálnych liečiv, ktoré nemajú nežiaduce toxické účinky, viedol k zvýšenému dopytu po nových liečivách. Niektoré nové zlúčeniny chalkónov sa javia ako potenciálne zlúčeniny účinné voči *C. albicans* ATCC 102 31 a množstvo takýchto zlúčenín silne inhibovalo rast kvasiniek v netoxických koncentráciách (Bonvici a kol., 2019).

Veľmi častým mykotickým ochorením je aj orálna kandidóza (OC). Je to oportúnna plesňová infekcia s vysokou prevalenciou medzi pacientmi s oslabenou imunitou. *C. albicans* je najbežnejším plesňovým patogénom zodpovedným za OC, ktorá sa často prejavuje pri stomatitíde, zubných náhradách a aftách v ústach. Faktory virulencie, ako je tvorba biofilmov a sekrécia proteolytických enzýmov, sú kľúčovými zložkami patogenity *C. albicans*. Vzhľadom na obmedzený počet dostupných antifungálnych terapií a nárast antimykotickej rezistencie je potrebné hľadať nové bezpečné a účinné antimykotické liečivá (Selem a kol., 2016). Antifungálna aktivita bola pozorovaná u oboch pripravených chalkónov, pričom bola stanovená aj minimálna inhibičná koncentrácia (MIC). Chalkón **5a** vykazoval antifungálnu aktivitu s MIC 8 mg.ml^{-1} , naopak, pri chalkóne **5b** bola stanovená MIC na 62 mg.ml^{-1} .

Antioxidačná aktivita

Z hľadiska biológie voľných radikálov a medicíny môžu byť chalkóny spojené s antioxidačnými vlastnosťami (Li a kol., 2016). Výskumy poukazujú na to, že napríklad chalkóny, akými sú floretín, floridzín a neohesperidín vykazujú antioxidačné účinky (Zuo a kol., 2014). Dihydrochalkóny sa dokonca ukázali ako silnejšie antioxidanty ako zodpovedajúce flavóny vďaka prítomnosti 2'-OH skupiny (Nakamura a kol., 2003).

U oboch chalkónov bola pozorovaná schopnosť vychytať voľný radikál DPPH. V prípade chalkónu **5b** je vidieť koreláciu medzi koncentráciou vzorky a antioxidačnou aktivitou. Pri chalkóne **5a** takáto korelácia nebola pozorovaná.

ZÁVER

V predkladanej štúdií bola syntetizovaná séria chalkónov odvodených od kumarínu, ktoré boli následne podrobené 1D a 2D NMR experimentom a nameraniu infračervených spektier, pomocou ktorých bola určená ich štruktúra. Chalkóny boli následne testované rôznymi metódami pre stanovenie ich antiproliferatívnej, antibakteriálnej, antioxidačnej a antifungálnej aktivity.

V závere možno poukázať na zaujímavé farmakologické vlastnosti pripravených chalkónov. V prípade oboch chalkónov boli dokázané ich antiproliferatívne a antifungálne vlastnosti. Žiaden z novosyntetizovaných chalkónov nevykazoval antibakteriálnu aktivitu v použitých koncentráciách na vybraných kmeňoch G⁺ (*S. aureus*) a G⁻ baktérií (*E. coli*).

Avšak pre úplné pochopenie mechanizmov antiproliferatívnej a antifungálnej aktivity sú potrebné ďalšie štúdie, nakoľko výskumy v danej oblasti neustále pokračujú a jedná sa tak o aktuálnu tému smerovania budúcich experimentov.

ZOZNAM LITERATÚRY

Alam, M. S., Rahman, S. M., Lee D. U.: Synthesis, biological evaluation, quantitative-SAR and docking studies of novel chalcone derivatives as antibacterial and antioxidant agents. *Chemical Papers*, 2015, 69 (8), 1118 – 1129. Doi: 10.1515/chem-pap-2015-0113.

Al-Saheb, R., Makharza, S., Al-Battah, F., Abu-El-Halawa, R., Kaimari, T., Abu Abed, O. S.: Synthesis of new pyrazolone and pyrazole-based adamantyl chalcones and antimicrobial activity. *Biosci. Rep.*, 2020, 40 (9). Doi: 10.1042/BSR20201950.

Bonvici, F., Gentilomi, G. A., Bressan, F., Gobbi, S., Rampa, A., Bisi, A., Belluti, F.: Functionalization of the chalcone scaffold for the discovery of novel lead compounds targeting fungal infections. *Molecules*, 2019, 24 (2), 372. Doi: 10.3390/molecules24020372.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Ber-

set, C.: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 1995, 28 (1), 25 – 30. Doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

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. *CA Cancer J. Clin.*, 2018, 68, 394 – 424. Doi: 10.3322/caac.21492.

Clinical and Laboratory Standards Institute: M27 – A3. Reference method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. 3rd edn. 2008, 1 – 13.

Dallesandro, E., Collin, H. P., Guimares, L. G. L., Valle, M. S., Pliego, R. J.: Mechanism of the piperidine-catalyzed Knoevenagel condensation reaction in methanol: the role of iminium and enolate ions. *J. Phys. Chem. B*, 2017, 121 (20), 5300 – 5307. Doi: 10.1021/acs.jpcc.7b0319.

De Wit, R. J., Fijneman, R. J. A., Verheul, H. M. W., Meijer, G. A., Jimenez, C. R.: Proteomics in colorectal cancer translational research: biomarker discovery for clinical applications. *Clin. Biochem.*, 2013, 46 (6), 466 – 479.

Cho, H., Chung, J. Y., Kim, S., Braunschweig, T., Kang, T. H., Kim, J., Chung, E. J., Hewitt, S. M., Kim, J. H.: MICA/B and ULBP1 NKG2D ligands are independent predictors of good prognosis in cervical cancer. *BMC Cancer*, 2014, 14, 957. Doi: 10.1186/1471-2407-14-957.

Jasim, H., Nahar, L., Jasim, M. A., Moore, S. A., Ritchie, K. J., Sarker, S. D.: Chalcones: synthetic chemistry follows where nature leads. *Biomolecules*, 2021, 11 (8), 1203. Doi: 10.3390/biom11081203.

Kim, H. J., Jang, B. K., Park, J. H., Choi, J. W., Park, S. J., Byeon, S. R., Pae, A. N., Lee, Y. S., Cheong, E., Park, K. D.: A novel chalcone derivatives as Nrf2 activator attenuates learning and memory impairment in a scopolamine-induced mouse model. *Eur. J. Med. Chem.*, 2020, 185, 111 777. Doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111777.

Kumar, S., Nepali, K., Sapra, S., Suri, O. P.,

- Dhar, K. L., Sarma, G. S., Saxena, A. K.: Synthesis and biological evaluation of chalcones having heterosubstituent(s). *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 72 (6), 801. Doi: 10.4103/0250-474X.84602.
- Kuruc, T., Kello, M., Petrová, K., Kudličková, Z., Kubatka, P., Mojžiš, J.: The newly synthesized chalcone L1 is involved in the cell growth inhibition, induction of apoptosis and suppression of epithelial-to-mesenchymal transition of HeLa cells. *Molecules*, 2021, 26 (5), 1356. Doi: 10.3390/molecules26051356.
- Lakshminarayanan, B., Kannappan, N., Subburaju, T.: Synthesis and biological evaluation of novel chalcones with methanesulfonyl end as potent analgesic and anti-inflammatory agents. *Int. J. Pharmaceutical Res. Biosci.*, 2020, 11 (10), 4974 – 4981. Doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.11(10).4974-81.
- Li, X., Han, L., Li, Y., Zhang, J., Chen, J., Lu, W., Zhao, X., Lai, Y., Chen, D., Wei, G.: Protective effect of sinapine against hydroxyl radical-induced damage to mesenchymal stem cells and possible mechanisms. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 2016, 64, 319 – 325. Doi: 10.1248/cpb.c15-00850.
- Lu, C. F., Wang, S. H., Pang, X. J., Zhu, T., Li, H. L., Li, Q. R., Li, Q. Y., Gu, Y. F., Mu, Z. Y., Jin, M. J., Li, Y. R., Hu, Y. Y., Zhang, Y. B., Song, J., Zhang, S. Y.: Synthesis and biological evaluation of amino chalcone derivatives as antiproliferative agents. *Molecules*, 2020, 25 (23), 5530. Doi: 10.3390/molecules25235530.
- Nakamura, Y., Watanabe, S., Miyake, N., Kohno, H., Osawa, T.: Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging. *Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 3309 – 3312. Doi: 10.1021/jf0341060.
- Rojas, J. J., Ochoa, V. J., Ocampo, S. A., Munoz, J. F.: Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary Alternat. Med.*, 2006, 6, 2. Doi: 10.1186/1472-6882-6-2.
- Salehi, B., Quispe, C., Chamkhi, I., El Omari, N., Balahbib, A., Sharifi-Rad, J., Bouyahya, A., Akram, M., Iqbal, M., Docea, A. O., Caruntu, C., Leyva-Gómez, G., Dey A., Martorell, M., Calina, D., López, V., Les, F.: Pharmacological properties of chalcones: a review of preclinical including molecular mechanisms and clinical evidence. *Front Pharmacol.*, 2021, 11, 592 654. Doi: 10.3389/fphar.2020.592654.
- Seleem, D., Benso, B., Noguti, J., Pardi, V., Murata, R. M.: *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of lichochalcone-A against *Candida albicans* biofilms. *PLoS One*, 2016, 11 (6), e0157188. Doi: 10.1371/journal.pone.0157188.
- Schluter, P., Gassmann, P., Enns, A., Korb, T., Hempling-Bovenkerk, A., Holzen, J., Haier, J.: Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential. *Am. J. Pathol.*, 2006, 169 (3), 1064 – 1073.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W.: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 2012, 9 (7), 671 – 675.
- Zuo, A. R., Yu, Y. Y., Shu, Q. L., Zheng, L. X., Wang, X. M., Peng, S. H., Xie, Y. F., Cao, S. W.: Hepatoprotective effects and antioxidant, antityrosinase activities of phloretin and phloretin isonicotinyl hydrazone. *J. Chin. Med. Assoc.*, 2014, 77, 290 – 301. Doi: 10.1016/j.jcma.2014.01.007.



MOŽNOSTI TERAPIE ALERGICKEJ RINITÍDY A ASTMY BRONCHIALE POSSIBILITIES OF THERAPY OF ALLERGIC RHINITIS AND BRONCHIAL ASTHMA

Adamojurková, Klaudia¹; Beňová, Katarína¹; Lojdlová, Miriam²

¹ Katedra biológie a fyziológie

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

² MEDITOM, s. r. o., Ambulancia klinickej imunológie a alergológie

Partizánska 4, 085 01 Bardejov

Slovenská republika

katarina.benova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Alergická rinitída a *astma bronchiale* sú zápalové ochorenia chronického pôvodu, ktoré majú negatívny účinok na každodenný život pacientov, ktorí týmto ochorením trpia. Nevyhnutná je ich terapia v dôsledku nebezpečenstva zhoršenia zdravotného stavu, ktorý môže viesť k hospitalizácii pacienta, v najhoršom prípade až k smrti.

Naša štúdia je sústredená na analýzu kazuistík pacientov z ambulancie alergológie a imunológie v Bardejove. Celkovo išlo o päť anonymizovaných zdravotných záznamov pacientov rôzneho pohlavia a rôznych vekových kategórií. Imunoterapia lieči príčinu ochorení, a tým zlepšuje kvalitu života pacientov. Táto liečba bola predmetom analýzy preskripcie za rok 2022 vo verejnej lekární v Bardejove. Získali sme 118 preskripčných záznamov.

Zo získaných údajov sme zistili, že najčastejšie používaným liekom v rámci imunoterapie je Staloral 300 (zmes alergénových extraktov z peľov rastlín a roztočov) s percentuálnym zastúpením 58 %.

Kľúčové slová: alergény; alergická rinitída; *astma bronchiale*; farmakoterapia; imunoterapia

ABSTRACT

Allergic rhinitis and bronchial asthma are inflammatory diseases of chronic origin that have a negative effect on the daily life of patients who suffer from these diseases. Their therapy is necessary due to the danger of deterioration of the state of health, which can lead to hospitalization of the patient, in the worst case, up to death.

Our study is focused on the analysis of case re-

ports of patients from the outpatient clinic of allergy and immunology in Bardejov. In total, there were five anonymised medical records of patients of different genders and wide range of ages. Immunotherapy treats the cause of the disease and thus improves the quality of life of patients. This treatment was the subject of a prescription analysis for the year 2022 in the public pharmacy in Bardejov. We obtained 118 prescribing records. From the data obtained, we found that Staloral 300 (a mixture of allergen extracts from plant pollens and mites) was the most commonly used drug in immunotherapy with a percentage of 58 %.

Key words: allergens; allergic rhinitis; *asthma bronchiale*; immunotherapy; pharmacotherapy

ÚVOD

Alergická rinitída a *astma bronchiale* sú úzko prepojené chronické zápalové ochorenia. Neliečená alergická rinitída je rizikovým faktorom pre rozvoj *astmy bronchiale*, z čoho vyplýva že *astma bronchiale* je najčastejšou komorbiditou alergickej rinitídy. Pojem komorbidita chápeme ako výskyt jedného alebo viac ochorení súčasne sa vyskytujúcich s primárnou chorobou. Prítomnosť oboch spomínaných diagnóz bola potvrdená u všetkých vekových kategórií. Prevalencia chorôb alergická rinitída a *astma bronchiale* v posledných desaťročiach naďalej stúpa, čo súvisí aj s dedičnosťou a so životným štýlom pacientov.

Alergická rinitída patrí medzi bežné ochorenie, ktoré je dobre diagnostikovateľné a tým aj účinne liečiteľné. Stále je v medicíne predmetom zisťovania skúmanie endotypov rinitídy, čím sa zabezpečia lepšie liečebné postupy a účinnosť liečby (Bozek a kol., 2020). Ochorením trpí približne 10 – 20 % populácie na celom svete, čo je v prepočte 500 miliónov ľudí (Alnori a kol., 2020). Podľa epidemiologických štúdií je alergická rinitída považovaná za rizikový faktor pre rozvoj *astmy bronchiale* (Tohidinik, Mallah a Takkouche, 2019). *Astma bronchiale* je ochorenie, ktorým trpí na celom svete viac ako 300 miliónov

ľudí, pričom do roku 2025 sa očakáva nárast až na 400 miliónov. Každý rok na astmu umrie približne 25 000 ľudí, čomu sa však dá zabrániť (Barcik a kol., 2020). Najviac ohrozenou skupinou pacientov, vzhľadom na dedičnosť, sú deti. V prípade, ak ochorením trpia obaja rodičia, riziko choroby u detí je až 60 %. Pravdepodobnosť sa znižuje na 20 %, ak sa *astma bronchiale* vyskytuje u jedného rodiča. Keď ochorením netrpí matka ani otec, je pravdepodobnosť oveľa nižšia, približne 5 % (Gutová, 2016).

Cieľom štúdie je priblíženie možností terapie ochorení alergická rinitída a *astma bronchiale*, ktorá je častou komorbiditou alergickej rinitídy. Podrobnejšie sme rozoberali reálne kazuistiky piatich pacientov liečených v ambulancii alergológie a imunológie v Bardejove. Analýza bola zameraná na priebeh ochorenia, liečbu a jej efektívnosť. Bližšie sme tiež analyzovali preskripciu liekov s obsahom extraktov alergénov z jednej verejnej lekárne v Bardejove za kalendárny rok 2022.

METODIKA PRÁCE A METÓDY SKÚMANIA

Naša štúdia pozostávala z kazuistík, ktoré boli poskytnuté v anonymizovanej podobe zo zdravotných záznamov pacientov. Informácie o pacientoch sme získavali v súlade so zákonom č. 18/2018 Z. z. o ochrane osobných údajov a o zmene a doplnení niektorých zákonov. Išlo o pacientov s diagnózami J30. a J40., kde sme bližšie sledovali ich vek, pohlavie, dôvod návštevy ambulancie, osobnú, rodinnú a sociálnu anamnézu a samotný priebeh ich celkového zdravotného stavu a liečby v ambulancii.

Súčasťou práce bola aj stručná analýza preskripcie zameraná na imunoterapiu extraktmi alergénov, ktorá je súčasťou kauzálnej liečby alergickej rinitídy a *astmy bronchiale*. Údaje sme získali z lekárne v Bardejove za obdobie od januára 2022 do konca decembra 2022. Celkovo sme získali 118 preskripčných záznamov, ktoré sme ďalej spracovali do grafickej podoby.

VÝSLEDKY

Kazuistika 1

Pacient: 46-ročná žena

Rodinná anamnéza: dcéra alergička, sestra a synovec alergici

Osobná anamnéza: Pacientka odoslaná na vyšetrenie od všeobecného lekára v decembri 2018 pre diagnózu *astma bronchiale* v anamnéze a alergia na pele v anamnéze. Bola liečená u alergológa liekmi Sere-tide diskus 50/250 mikrogramov 2 x 1, Cezera 5 mg 1 x 1, Monkasta 10 mg 1 x 1 a Pollinex (stromový a trávový). Liečená tiež na hematológii pre trombocytopéniu, operovaná na *deviatio septi nasi* (vybočenie nosovej priehradky).

Sociálna anamnéza: Býva vo vlhkom byte, periny zo syntetického vlákna, vankúš z umelého vlákna, v spálni má koberec, kvety v spálni nemá, zvieratá – pes.

Diagnózy: *Astma bronchiale in regres*; alergia na brezovité stromy, dub, trávy, ambróziu, vnútorné plesne, PNC; alergia na osí jed; potravinová alergia na arašidy, vlašské orechy, zeler, kiwi, lieskovce, mandle, jahodu, sóju, marhuľu, hrušku, čerešňu, paradajku, gaštany.

Zhrnutie: Pacientka navštívila ambulanciu MUDr. Lojdlovej s diagnózou *Astma bronchiale* a Alergie na pele v anamnéze. Postupne sa u nej vyvíjali a zistili ďalšie alergie na trávy, stromy, plesne, potraviny. Pacientka spočiatku užívala inhalačný kortikoid, perorálne antihistaminikum a antileukotrién, potom sa jej do liečby pridala sublingválna imunoterapia (100 % breza) s následným postupným vysadením inhalačného kortikosteroidu. Pacientka bola chvíľu liečená liekom na výnimku – Allergoval s obsahom kromoglykátu sodného, ktorý pôsobí ako stabilizátor žírnych buniek. U nás tento liek patrí do skupiny liekov na výnimku Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky. Momentálne sa čaká na vyjadrenie Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky o možnosti jeho ďalšieho používania. Pacientka je stabilizovaná na sublingválnej imunoterapii (Staloral 300, 100 % breza), ktorú užíva od januára do júna každý rok predse-

zónne a počas sezóny výskytu peľov brezy. V terapii má pridanú liečbu antihistaminikom levocetirizín na každodenné používanie. V mesiacoch zhoršenia príznakov užíva očné kvapky a nosný kortikoid. Kvôli množstvu alergií (najmä kvôli alergii na včelí jed) je nutné, aby mala pri sebe pohotovostný balíček s obsahom adrenalínového pera, ktoré sa aplikuje intramuskulárne. Aktuálne u nej prebieha štvrtý rok liečba Staloralom 300. Najbližšiu kontrolu má naplánovanú na máj 2023.

Kazuistika 2

Pacient: 8-ročná žena

Rodinná anamnéza: matka alergička na pele

Osobná anamnéza: Pacientka bola odoslaná od pediatričky v marci 2017 na alergológiu pre opakované rhinosinuitidy, tonsilitidy a laryngitidy. Pôrod spontánny, očkovanie podľa poradne, podaná vakcína Rotarix, varicellu nemala. V decembri 2017 bola pacientka prijatá do ambulancie na súde vyšetrenie pre sťažené dýchanie s pískaním v hrudníku (od septembra 2017 bola opakovane chorá).

Sociálna anamnéza: Býva v suchom dome, periny zo syntetického vlákna, kvety v izbe nemá, koberec nemá, zvieratá žiadne.

Diagnózy: Alergická rinitída (J30.3), *Astma bronchiale* (J45.8)

Zhrnutie: Pacientka prvýkrát navštívila ambulanciu alergológie ešte pred dovŕšením 3 rokov pre opakujúce sa ochorenia horných a dolných dýchacích ciest. Lekárka vykonávala krvné testy s následnou podporou imunity, najskôr hliva ustricová s obsahom betaglukánov a následne Imunoglukan sirup v kombinácii s roztokom s obsahom antihistaminika (desloratadín) a sprejmi do nosa (na prečistenie a kortikoidom na preliečenie). V decembri toho istého roka bola pacientka prijatá do ambulancie na súde vyšetrenie pre sťažené dýchanie s pískaním na hrudníku s pridaním antileukotriénu a imunoterapeutika. Kvôli nezlepšujúcemu sa stavu bola potrebná zmena antihistaminika desloratadín na levocetirizín a nasadenie inhalačných kortikosteroidov a bronchodilatancií so súčasným stimulovaním imunity. Používanie inhalátorov bolo

postupne plánované redukovať. Po dovŕšení 4 rokov bola pacientke nasadená sublingválna imunoterapia Staloral 300, 100 % roztoče, na ktoré jej bola zistená alerggia. Spočiatku boli prítomné nežiaduce účinky sublingválnej imunoterapie, ako je svrbenie podnebia, laktových záhybov, točenie v hlave, ktoré neskôr ustúpili. K terapii bol pridaný Allergodil sprej do nosa pôsobiaci ako lokálne antihistaminikum na potlačenie lokálnych príznakov v nose. Nepretržitá liečba Staloralom 300 znížila spotrebu inhalačných kortikosteroidov a bronchodilatancií. Pacientka je zatiaľ stabilizovaná s plánovanou terapiou Staloralu 300, 100 % roztoče približne do roku 2025.

Kazuistika 3

Pacient: 11-ročný muž

Rodinná anamnéza: starší súrodenec senná nádcha, stará mama z otcovej strany senná nádcha, otec alergik

Osobná anamnéza: Pacient odoslaný v júni 2015 od pediatra pre intermitentný dráždivý kašeľ v mesiacoch marec a apríl. V období dažďa kašeľ ustal. V októbri 2015 hospitalizovaný v nemocnici pre ťažšie dýchanie a horúčky (z pohotovosti Ventolin sirup, Rectodel čapík – nezlepšilo sa, tak sa vrátili na pohotovosť).

Prirodzený pôrod, očkovanie podľa očkovacieho kalendára, dieťa bývalo často choré odkedy začalo chodiť do kolektívu, dojčený 18 mesiacov.

Sociálna anamnéza: Bývajú v suchom slnečnom dome, periny zo syntetického vlákna, vankúš z umeleho vlákna, majú akváriové rybičky, pes vonku, kvety v izbe nemá, koberec má v izbe, kde spí.

Diagnózy: *Astma bronchiale* (J45.0), Alergická rinitída (J30.3)

Zhrnutie: Štvorročný pacient bol odoslaný z pediatrickej ambulancie v júni 2015 pre pretrvávajúci kašeľ s negatívnymi výtermi a CRP v hraniciach normy. V jeseni 2015 bol hospitalizovaný v nemocnici pre ťažšie dýchanie. Po hospitalizácii bol sledovaný v ambulancii MUDr. Lojdllovej s nasadením inhalačných kortikosteroidov, bronchodilatancií a ďalších liekov. Pacient je sledovaný v alergologickej ambu-

lancii už ôsmy rok. Nasadený Montelukast v auguste 2016 netoleroval, preto mu bol vysadený. Od septembra 2016 mu bol k liečbe nasadený Ribomunyl na podporu imunity, po ktorom bolo pozorované zvracanie a bolesť brucha, napriek tomu v liečbe pokračoval. Od augusta 2017 vo veku 6 rokov mu bola nasadená sublingválna imunoterapia Staloral 300, 100 % roztoče, pričom liečba musela byť prerušená, preto sa musela začať od znova s úvodnou dávkou v novembri 2017. Terapia pokračovala až do októbra 2018, kedy bola opäť prerušená, kvôli chýbajúcej vakcíne Staloral 300. Vtedy lekárka ordinovala zmenu na Staloral 300 50/50 roztoče s výskytom nežiaduceho účinku svrbenia uší. Pacient mal tiež prítomné lokálne nežiaduce účinky v dôsledku užívania inhalačných kortikosteroidov ako svrbenie jazyka, afty v ústach. Vo februári 2019 mu bolo zmenené antihistaminikum desloratadín na liek s obsahom liečiva rupatadín. Ďalšia zmena prišla v máji 2019, kedy mu bol zmenený inhalačný kortikosteroid na kombinovaný Fullhale s obsahom kortikosteroidu a bronchodilatátora v jednom. V septembri bol pacient na mesačnej kúpeľnej liečbe, po ktorej sa hlásil u alergológa. Stav chlapca bol stabilizovaný na liekoch, ktoré užíval. Celkovo prekonal COVID-19 až trikrát bez závažného priebehu. V októbri mu bola zvýšená dávka vakcíny Staloral 300 50/50 roztoče na dávku 4 vstreky na deň. Pacientov stav je stabilizovaný vďaka liekom, ktoré užíva. Očakáva sa postupné znižovanie dávky inhalačných kortikosteroidov.

Kazuistika 4

Pacient: 53-ročná žena

Rodinná anamnéza: brat astmatik a alergik na pele, sestra alergička

Osobná anamnéza: Pacientka bola v auguste 2012 odoslaná z ambulancie pneumológa. V mesiacoch december až február máva dráždivý, štekavý kašeľ už 3 – 4 roky. V minulosti liečená na alergológii pre alergiu na chlad. Nie je sledovaná v žiadnej odbornej ambulancii.

Sociálna anamnéza: Nefajčiarka, býva v dome, periny a vankúš má z peria, kvety v izbe nemá, koberec

áno.

Diagnózy: *Astma bronchiale* (J45.0), Alergická rinitída (J30.3)

Zhrnutie: Pacientka bola prijatá do ambulancie kvôli dráždivému až štekavému kašľu v období od decembra do februára. Od 17.09.2012 bola pravidelne vakcinovaná subkutánnou imunoterapiou Alutard SQ brezovité stromy podľa schémy. Subkutánnu imunoterapiu dobre znášala bez ťažkostí. V novembri 2013 jej bola zistená mierna alergická reakcia po konzumácii vlašských orechov a lieskovcov. Pacientka bola subkutánnou imunoterapiou liečená až do roku 2018. Od roku 2019 jej bola nasadená liečba sublingválnou imunoterapiou Staloral 300, 3 stromy, ktorú užíva dodnes, liečbu dobre toleruje. Kvôli zhoršeniu dýchania bol pacientke do liečby doplnený inhalačný kortikosteroid Alvesco, v prípade záchvatu kašľa a ťažšieho dýchania používa bronchodilatačný inhalátor Atimos. Na ľahšie zvládnutie príznakov nádchy používa nosný kortikoid v lieku Mometasone a antihistaminikum. V júni bola na mesačnej kúpeľnej liečbe s pozitívnym účinkom na jej zdravotný stav. Pacientka má imunitu v poriadku a pokračuje sublingválnou imunoterapiou Staloral 300 už štvrtý rok.

Kazuistika 5

Pacient: 15-ročná žena

Rodinná anamnéza: otec alergia na roztoče, babka alergička, teta z otcovej strany astmatička

Osobná anamnéza: Dieťa odoslané od pediatričky v decembri 2015 pre recidívy katary horných dýchacích ciest a herpes simplexlabialis. Od nástupu do materskej školy často chorá, občas febrilná – najmä pri angíne, máva často herpesy. V júli 2019 pacientka odoslaná na súde vyšetrenie z pediatrie kvôli záchvatom dušnosti trvajúcim 3 týždne najmä v noci a nad ránom. Predtým preliečená azitromycínom – teploty ustúpili, RTG sa zlepšil, agens nedokázaný. Začiatkom júla mala stav kolapsu, vitamín D mierne znížený, po behu *dyspnoe*.

Sociálna anamnéza: suchý slnečný byt, koberce majú v byte malé, perina a vankúš zo syntetického vlákna, v izbe, kde spí, má jeden kvet, žiadne zviera.

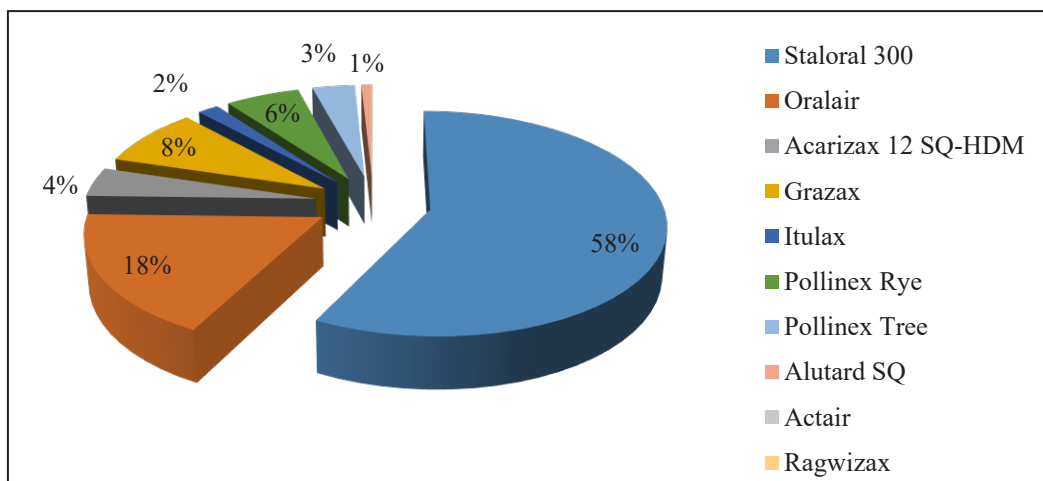
Diagnózy: *Astma bronchiale* (J45.8), Alergická rinitída (J30.1)

Zhrnutie: Pacientka prvýkrát navštívila ambulanciu alergológie a imunológie kvôli opakujúcim sa zápalom horných dýchacích ciest a opakovanému výskytu herpesu na pere. Terapia spočívala v posilnení imunity imunoterapeutikom Luivac a pri výskyte herpesu podanie Isoprinosinu, ktorý jej pomohol zabrániť prepuknutiu herpesu. V dôsledku vírusových infekcií, ktoré sa podieľajú na stiahnutí priedušiek, mala v apríli 2016 príznaky spojené so sťaženým dýchaním. Jej liečba bola založená na stimulácii imunity Imunorom aplikovaným jedenkrát týždenne. V júli 2019 bola odoslaná od pediatričky na súde vyšetrenie kvôli pretrvávajúcim záchvatom dušnosti hlavne v noci a nad ránom, začiatkom júla dokonca mala stav kolapsu. Vykonaná spirometria dokázala obštrukciu v dolných dýchacích cestách a prick kožnými testami sa potvrdila alergia na jarné stromy a trávy. V terapii jej bol nasadený inhalátor Ventilastin s obsahom liečiva patriaceho do skupiny bronchodilatancií, ktorý momentálne na SR už nie je dostupný od roku 2021. K liečbe bol pridaný inhalačný kortikosteroid Flixotide diskus a na večer Levocetirizín a Montelukast. Pri kontrole bolo potvrdené zlepšenie zdravotného stavu. Po stabilizácii a zlepšení imunity bol v septembri 2019 do liečby zaradený Staloral 300, 100 % breza s dávkovaním 4 vstreky denne. Pacientka alergénovú imunoterapiu toleruje a pravidelne užíva. Pravdepodobná dĺžka terapie je do júna 2024. Pri poslednej kontrole sa pacientka sťažovala na obturáciu nosa v jeseni, preto jej bol do liečby pridaný nosný kortikosteroid.

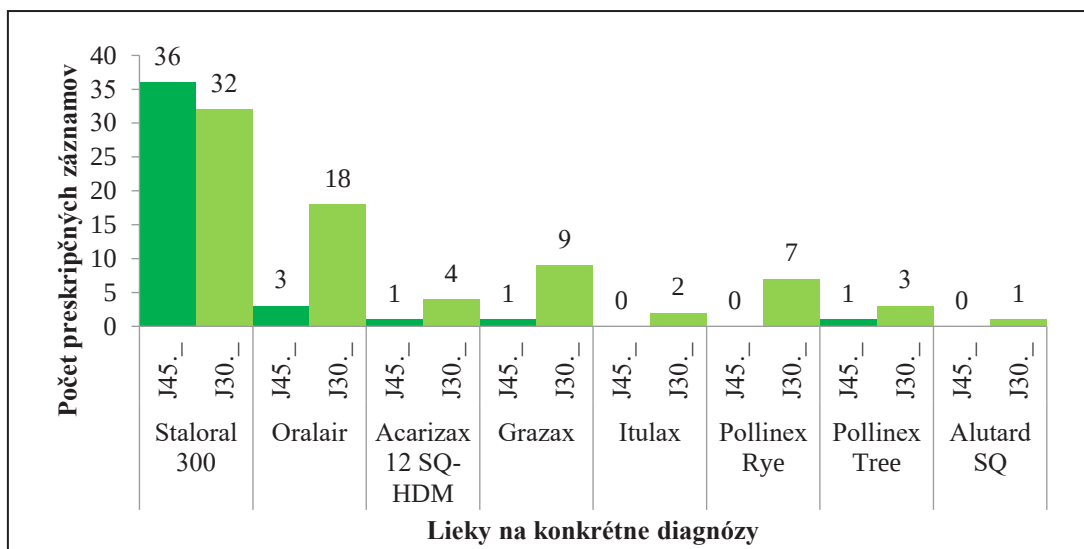
Analýza preskripcie

Pomocou lekárenského programu WinLSS sme spracovali lekárske predpisy na lieky zaradené podľa ATC klasifikácie do skupiny Extrakty alergénov, ktoré sa využívajú ako imunoterapeutiká. Výsledky sú zobrazené v nasledujúcich grafoch (1 až 5). Všetky preskripčné záznamy boli vystavené odborníkmi – alergológ a imunológ. Išlo o širokú vekovú kategóriu. Najmladší pacient mal 4 roky, kým najstarší mal 53

Graf 1: Lieky s obsahom extraktov alergénov



Graf 2: Preskripcia liekov na diagnózy J45._ a J30._



J45._ – Astma bronchiale, J30._ – Alergická rinitída

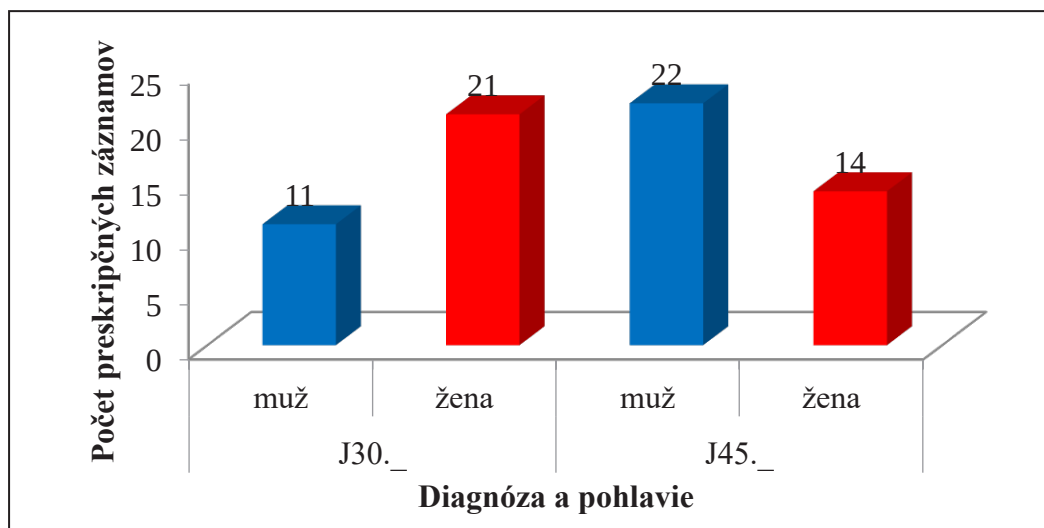
rokov. Vzhľadom na pohlavie boli preskripčné záznamy približne v polovičnom zastúpení oboch pohlaví.

Graf 1 zobrazuje percentuálne zastúpenie jednotlivých liekov dispenzovaných v lekárni v Bardejove za obdobie jedného kalendárneho roka na diagnózy J30._ a J45._. Tento graf znázorňuje lieky bez konkrétneho alergénu. Celkovo išlo o 118 dispenzačných záznamov. Lieky Ragwizax a Actair neboli v roku

2022 v danej lekárni na sledované diagnózy vydané pacientom ani raz, preto sa v grafe neuvádzajú v percentuálnom zastúpení.

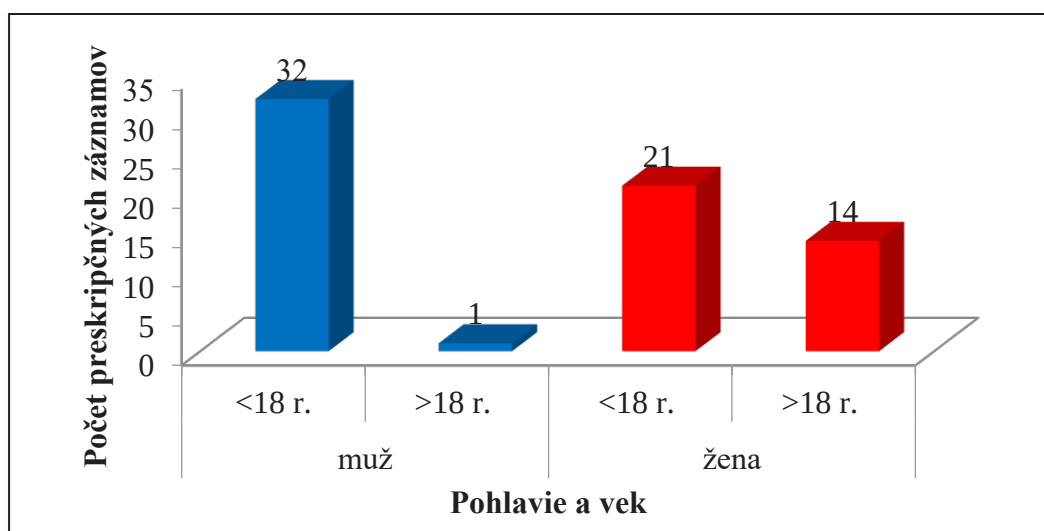
V grafe 2 je zobrazený počet preskripčných záznamov na lieky s obsahom extraktov alergénov na konkrétne diagnózy. Z grafu vyplýva, že vzhľadom na diagnózy je v prípade Staloralu 300 vyšší počet preskripčných záznamov na diagnózu *Astmy bronchiale*

Graf 3: Preskripcia Staloralu 300 podľa diagnózy a pohlavia



J45._ – Astma bronchiale, J30._ – Alergická rinitída

Graf 4: Preskripcia Staloralu 300 podľa pohlavia a veku



– J45._. U ostatných liekov prevládala diagnóza Alergická rinitída – J30._.

V nasledujúcich grafoch sme sa bližšie zamerali na liek Staloral 300, ktorý mal v preskripcii za rok 2022 zo skupiny extraktov alergénov najvyššie zastúpenie. Daný liek bol použitý aj v terapii všetkých piatich pacientov z kazuistik.

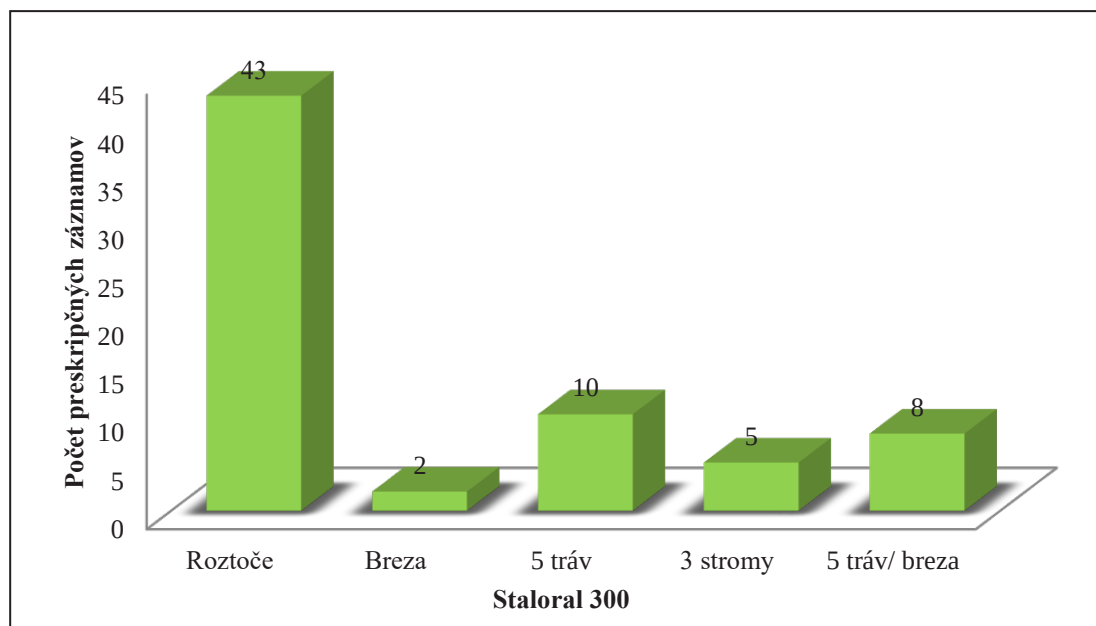
Graf 3 zobrazuje počet preskripčných záznamov na

liek Staloral 300 vzhľadom na diagnózy a pohlavie pacientov.

Z grafu 4 vyplýva, že vzhľadom na vek a pohlavie je u mužov viditeľný výrazný rozdiel.

Staloral 300 je liek s obsahom viacerých alergénov. Okrem štandardov je možné vyrobiť liek na objednávku priamo u výrobcu na základe požiadavky lekára v rôznom pomere alergénov. Najfrekvencovanejš-

Graf 5: Staloral 300 – konkrétne extrakty alergénov



ším alergénom boli v našej analýze preskripcie roztoče s počtom 43 preskripčných záznamov, čo predstavuje v prepočte približne 63 %. Druhý najčastejší alergén bol alergén 5 tráv s počtom 10 preskripčných záznamov, čo je v prepočte necelých 15 %. Hneď za ním nasleduje mix dvoch alergénov – 5 tráv a breza (8 preskripčných záznamov, 12 %). Ostatné alergény boli predpisované v menšom počte – 3 stromy (5 preskripčných záznamov, 7 %) a alergén brezy bol uvedený na 2 preskripčných záznamoch (3 %).

DISKUSIA

Astma bronchiale je chronické zápalové respiračné ochorenie charakterizované reverzibilným zúžením dýchacích ciest, vyvolané podráždením vplyvom infekcie, alergénov alebo iných dráždivých látok. Väčšina pacientov trpí astmou na alergickom podklade, ktorá je sprevádzaná ďalšou diagnózou – alergická rinitída (Patel a Teach, 2019). Naša štúdia tento fakt len potvrdzuje. Doposiaľ sa vykonalo množstvo štúdií na preskúmanie rizikových faktorov v súvislosti s astmou. U pacientov s astmou bola často identifikovaná pozitívna rodinná anamnéza potvrdzujúca vysokú

dedičnosť astmy. Pri všetkých našich pacientoch bola sledovaná rodinná anamnéza, kde sa potvrdilo, že minimálne jeden príbuzný je alergik, respektíve astmatik (Sio a Chew, 2021). Základným vyšetrením na zistenie senzibilizácie pri alergickom ochorení sprostredkovanom IgE u pacientov s astmou, rinokonjunktivitídou a inými diagnózami na alergickom podklade je kožné prick testovanie. Výhodou je rýchla interpretácia výsledkov do 15 až 20 minút (Heinzerling, 2013). Tieto kožné prick testy boli vykonané našim pacientom, vďaka čomu sa zistila senzibilizácia na alergén a následne mohla byť stanovená adekvátna liečba. Na dosiahnutie spokojnosti v terapii je potrebné využívať účinne liečebné postupy. Vykonávaním štúdií sa zistilo, že 19 – 38 % pacientov s alergickou rinitídou súčasne trpí aj *astma bronchiale*, pričom 30 – 80 % astmatických pacientov má aj diagnózu alergická rinitída. Z toho vyplýva, že vývoj jednej choroby môže predchádzať druhej. Symptomaticky sa často prejavujú súčasne (Belhassen, 2022). Tento fakt môžeme sledovať aj v prípade našich piatich pacientov, ktorí majú potvrdené obidve diagnózy.

Porovnaním výsledkov, ktoré sme získali analýzou preskripcie s kazuistikami sme zistili, že liek Staloral

300 je najčastejšie používaným liekom s obsahom extraktov alergénov. Alergénová imunoterapia sa používa v terapii *astma bronchiale*, ale aj alergickej rinitídy a je jedinou kauzálnou terapiou týchto ochorení. Roztoče domáceho prachu sú častou príčinou alergií na celom svete. Klasifikácia roztočov je na viac ako 50 000 druhov, pričom na alergických ochoreniach sa podieľajú najmä druhy *Dermatophagoides pteronyssinus* a *D. farinae* (Frati a kol., 2012). Práve tieto druhy sú obsiahnuté v lieku Staloral 300, ktorý bol aj v našej analýze najčastejšie používaným extraktom. Zároveň bol aj súčasťou terapie dvoch pacientov v kazuistikách. Alergénová špecifická imunoterapia sa používa od detského veku 5 rokov, výnimočne u mladších detí od 3 rokov. Všetky vykonávané štúdie sa zameriavajú na mladšiu populáciu, málo z nich je vykonávaných u starších pacientov. Liečbu u pacientov nad 60 rokov treba zvážiť, najmä u tých, ktorí užívajú betablokátory alebo inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu v dôsledku vyššieho rizika anafylaktického šoku (Bozek, 2017). Túto informáciu zo štúdie môžeme pozorovať aj v našej analýze preskripcie, kde najstarší pacient mal 53 rokov.

ZÁVER

Kazuistiky uvedené v tejto štúdii sa zaoberajú pacientmi s diagnózami uvádzanými podľa MKCH klasifikácie pod kódmi J30_ a J45_. Vybraní pacienti navštevovali ambulanciu v pravidelných naplánovaných kontrolách. Išlo o náhodnú vzorku pacientov, u ktorých bola potvrdená rodinná anamnéza s výskytom daného ochorenia minimálne u jedného člena rodiny. Veková skupina sa pohybovala od detského veku 3 rokov (prvá návšteva) až do 53 rokov. Samotná farmakoterapia sa odvíjala od zdravotného stavu každého pacienta individuálne. V konečnom dôsledku môžeme zhrnúť, že každý z pacientov bol liečený antihistaminikom, antileukotriénom a nevyhnutná bola aj inhalačná terapia kortikosteroidmi a bronchodilatátormi. Dôležité je spomenúť, že vo všetkých prípadoch bola použitá sublingválna imunoterapia. Z preskripčnej analýzy imunoterapie za rok 2022

vyplýva, že najčastejšie používaným liekom z tejto skupiny je Staloral 300. Zo všetkých alergénov boli najčastejšie predpisované extrakty domáceho prachu. Veková kategória sledovaných pacientov sa pohybovala v rozmedzí od 4 do 53 rokov. Záver zatiaľ nie je možné úplne vyvodiť, keďže pacienti zatiaľ neukončili odporúčaný 5-ročný cyklus sublingválnej imunoterapie. Môžeme však potvrdiť, že pacienti pozorujú účinok tejto liečby s pozitívne sa vyvíjajúcim účinkom. Imunoterapia je považovaná za jedinou kauzálnu terapiu v liečbe ochorení na alergickom podklade, kde zaraďujeme diagnózy, ktorým sme sa venovali. Aj napriek tomu, že ide o vysoko finančne náročnú liečbu, jej terapeutický prínos prevláda.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Alnori, H., Alassaf, F. A., Alfahad, M., Qazaz, M. E., Jasim, M., Abed, M. N.: Vitamin D and immunoglobulin E status in allergic rhinitis patients compared to healthy people. *Journal of Medicine and Life*, 2020, 13 (4), 463 – 468.

Barcik, W., Boutin, R. C. T., Sokolowska, M., Finlay, B. B.: The role of lung and gut microbiota in the pathology of asthma. *Immunity*, 2020, 52 (2), 241 – 255.

Belhassen, M., Bérard, M., Devouassoux, G., Dalon, F., Bousquet, J., Van Ganse, E.: Treatment of allergic rhinitis and asthma in primary care: dispensations do not align with prescriptions. *Journal of Asthma and Allergy*, 2022, 15, 1721 – 1729.

Bozek, A., Winterstein, J., Galuszka, B., Jarzab, J.: Different development forms of local allergic rhinitis towards birch. *BioMed Research International*, 2020, 2020, 1 – 9.

Bozek, A.: Pharmacological management of allergic rhinitis in the elderly. *Drugs Aging*, 2017, 34 (1), 21 – 28.

Gutová, V.: Dětské astma, rizika a možnosti prevence. [Childhood asthma, risks and possibilities of prevention.] *Pediatric pro praxi*, 2016, 17 (1), 7 – 12.

Frati, F., Incorvaia, C., David, M., Scurati,

S., Seta, S., Padua, G., Cattaneo, E., Cavaliere, C., Di Rienzo, A., Dell'Albani, I., Puccinelli, P.: Requirements for acquiring and high-quality house dust mite extract for allergen immunotherapy. *Drug Design, Development and Therapy*, 2012, 6, 117 – 123.

Heinzerling, L., Mari, A., Bergmann, K.-Ch., Bresciani, M., Burbach, G., Darsow, U., Durham, S., Fokkens, W., Gjomarkaj, M., Haahtela, T., Bom, A. T., Wöhrle, S., Maibach, H., Lockey, R.: The skin prick test – European standards. *Clinical and Translational Allergy*, 2013, 3 (3), 1 – 10.

Patel, S. J., Teach, S. J.: Asthma. *Paediatrics in review*, 2019, 40 (11), 549 – 567.

Sio, Y. Y., Chew, F. T.: Risk factors of asthma in the Asian population: a systematic review and meta-analysis. *Jourlan of Physiological Anthropology*, 2021, 40 (1), 1 – 17.

Tohidinik, H. R., Mallah, N., Takkouche, B.: History of allergic rhinitis and risk of asthma; a systematic review and meta-analysis. *World Allergy Organization Journal*, 2019, 12 (10), 1 – 17.



TERAPEUTICKÝ EFEKT LYZÁTU *ESCHERICHIA COLI* U RECIDIVUJÚCICH CYSTITÍD CHRONICKÉHO PÔVODU U DETSKÉHO PACIENTA

THERAPEUTICAL EFFECT OF *ESCHERICHIA COLI* LYSATE IN RECURRENT CYSTITIS OF CHRONIC ORIGIN IN A PEDIATRIC PATIENT

Gajdošová, Mária¹; Szabóová, Renáta¹; Mikulová, Anna²

¹Katedra biológie a fyziológie

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

²Nefrologická ambulancia, Obchodná 3, 071 01 Michalovce
Slovenská republika

renata.szaboova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Cystitída predstavuje zápalové ochorenie močového mechúra spojené so širokým spektrom symptómov, ktoré negatívnym spôsobom ovplyvňujú kvalitu života pacienta.

Cieľom štúdie bolo sledovať terapeutický účinok bakteriálneho lyzátu *Escherichia coli* v lieku Uro-vaxom u detských pacientov ($n = 20$) s rekurentnou cystitídou. V rámci stanoveného časového intervalu farmakoterapie (6 týždňov) boli porovnávané jednotlivé výsledky chemickej analýzy moču, analýzy močového sedimentu a hladín vybraných biochemických parametrov stanovovaných v krvi – kreatinínu, kyseliny močovej a glomerulárnej filtrácie získané od 20 detských pacientov. Vplyvom podávania Uro-vaxomu po dobu 6 týždňov bolo u všetkých pacientov pozorované zlepšenie zdravotného stavu, a to úpravou hodnôt

biochemických parametrov (pH, špecifická hmotnosť, prítomnosť leukocytov, erytrocytov, glukózy, ketónových látok) do ich fyziologickej normy ako aj signifikantnému ($P < 0,05$) zníženiu hladiny kyseliny močovej v krvi. Zo sledovania rozboru močového sedimentu vyplýva, že 6-týždňová terapia pomocou Uro-vaxomu taktiež potvrdila benefičný účinok lyzátu, keďže bola dokázaná ojedinelá prítomnosť baktérií, epitelových buniek, patologických valcov, erytrocytov a kryštálov v rámci ich referenčnej hodnoty. Počas mikrobiologického vyšetrenia vzoriek moču bola na konci terapie zaznamenaná redukcia *E. coli* u 90 % pacientov.

V práci bol taktiež porovnávaný vývoj výdaja lieku Uro-vaxom pacientom vo verejných lekárňach v Michalovciach počas dvoch po sebe nasledujúcich rokov, pričom najčastejší výdaj lieku sa pozoruje opakovane v mesiacoch október, november, december, január a február.

Výsledky štúdie poukazujú na potenciál účinku bakteriálneho lyzátu *E. coli* obsiahnutom v lieku Uro-vaxom pri liečbe detských pacientov s recidivujúcou cystitídou.

Kľúčové slová: cystitída; dieťa; terapia; zápal

ABSTRACT

Cystitis is an inflammatory disease of the urinary bladder associated with a wide spectrum of symptoms that negatively affect the patient's quality of life.

The aim of the study was to observe the therapeutic effect of bacterial lysate of *Escherichia coli* in the drug Uro-vaxom in pediatric patients (n = 20) with recurrent cystitis. Within the time interval of pharmacotherapy (6 weeks), individual results of chemical analysis of urine, analysis of urine sediment and selected biochemical parameters determined in blood – creatinine, uric acid and glomerular filtration obtained from 20 pediatric patients were compared. After 6 weeks of Uro-vaxom administration, an improvement of health status was observed in all patients, by adjusting the values of biochemical parameters (pH, specific gravity, presence of leukocytes, erythrocytes, glucose, ketones) into reference value, as well as a significant ($P < 0.05$) decrease in uric acid level in the blood. The analysis of the urine sediment showed that the 6-week therapy with Uro-vaxom also confirmed the beneficial effect of this drug; which means a rare amount of bacteria, epithelial cells, cylinders, erythrocytes and crystals within the reference value was demonstrated. During the microbiological examination of urine samples, a reduction of *E. coli* was recorded in 90 % of patients at the end of therapy.

Also, the development of the dispensing of the drug Uro-vaxom by patients in public pharmacies in Michalovce during two consecutive years was compared, while the most frequent dispensing of the drug was observed repeatedly in the months of

October, November, December, January and February.

The results of the study point to the potential effect of the *E. coli* bacterial lysate contained in the drug Uro-vaxom in the treatment of pediatric patients with recurrent cystitis.

Key words: cystitis; child; inflammation; therapy

ÚVOD

Zápal močového mechúra označovaný ako cystitída patrí k najčastejším infekciám postihujúcim urogenitálny trakt. V novorodeneckom období sú symptómy nešpecifické, častá je teplotná nestabilita, podráždenosť, apnoe. Alternatívne sa môže objaviť problém s dojčením, nauzea, vracanie či suboptimálny prírastok hmotnosti. Špecifické symptómy a znaky zahŕňujú častejšie močenie s malým objemom moču, zapáchajúci moč a nepríjemné pocity pri močení. Po druhom roku života sú symptómy špecifickejšie a zahŕňajú bolesť v suprapubickej oblasti, bolesť brucha, dyzúriu, nutkanie na močenie, zakalený a zapáchajúci moč, nočnú enurézu a citlivosť v suprapubickej oblasti (Leung a kol., 2019).

V 80 – 90 % prípadov cystitídy je pôvodcom ochorenia u detí *Escherichia coli*, tzv. UPEC (uropatogénna *E. coli*) (Leung a kol., 2019). Medzi ďalšie často sa vyskytujúce uropatogény patria *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis* a *E. faecium* (Martell a kol., 2019).

Počas prvého roku života je incidencia cystitídy 0,7 % u dievčat a 2,7 % u neobrezaných chlapcov. Chorobnosť dosahuje dva vrcholy, prvý je v prvom roku života a ďalší medzi 2. a 4. rokom života, čo zodpovedá veku učenia sa základných hygienických návykov na toalete. Cystitída postihuje vo veku 7 rokov 7,8 % dievčat a 1,7 % chlapcov. Vo veku 16 rokov je tento pomer zmenený, a to na 11,3 % u dievčat a len 3,6 % u chlapcov (Leung a kol., 2019). U detí je mieru rekurentných infekcií po prvej epizóde 13,6 %; čo

predstavuje incidencia 0,12 na osobu a rok (Khan a kol., 2019).

Podľa dĺžky trvania a priebehu je ochorenie opísané ako akútna a chronická forma, pričom sa zvyšuje aj frekvencia výskytu recidivujúcich cystitíd. Recidivujúce infekcie sú definované ako najmenej tri epizódy danej infekcie za dvanásť mesiacov alebo najmenej dve epizódy za šesť mesiacov (Beerepoot a kol., 2016). Pri rekurentných infekciách sú opísané dva primárne zdroje. Prvým zdrojom je črevný a vaginálny trakt predstavujúci rezervoár pre UPEC, ktorá opakovane infikuje močový trakt cez močovú rúru. Druhým zdrojom infekcie sú baktérie, ktoré sa nachádzajú latentne v epiteli močového mechúra, kde môžu pretrvávajú mesiace a potom opätovne vyvolávajú rekurentné infekcie (Madden-Fuentes a kol., 2015). Pri každom podozrení na infekciu močového traktu (IMT) je potrebné vykonať biochemickú a fyzikálnu analýzu moču ako aj kultiváciu moču (Leung a kol., 2019).

Liečba cystitídy by sa mala zamerať na obnovenie fyziologickej funkcie močového mechúra, prevenciu relapsu symptómov a zlepšenie kvality života pacientov (Sholan, 2018). Nefarmakologické možnosti terapie cystitídy zahŕňajú užívanie preparátov s obsahom D-manózy, brusníc a probiotík. Z farmakologického hľadiska sú liekom prvej voľby antibiotiká, pričom pri ich výbere je potrebné brať do úvahy lokálnu rezistenciu antimikrobiálnej látky. Amoxicilín bol tradične prvolíniovou terapiou pri ambulantnej liečbe cystitídy u detí, avšak zvýšená miera rezistencie *E. coli* v rámci antibiotickej farmakoterapie spôsobila, že je amoxicilín menej prijateľnou voľbou liečby ochorenia. Mnohé štúdie zároveň preukázali vyššiu mieru vyliečenia sa pri užívaní trimetoprim-sulfametoxazolu. Ďalšiu možnosť liečby cystitídy predstavuje užívanie cefalosporínov. Použitie fluorochinolónov, ktoré sú vo veľkom množstve používané u dospelých pacientov, je u detí obmedzené z dôvodu obáv z nežiaducich účinkov na vývoj muskuloskeletárnych kĺbov. Farmakoterapia v rámci hospitalizácie môže zahŕňať kombináciu ampicilínu a gentamicínu alebo cefalosporíny tretej generácie (Zorc a kol., 2005).

Napriek tomu, že súčasný štandard liečby cystitídy zahŕňa antibiotiká ako terapiu prvej voľby, existuje rastúci trend skúmať alternatívy na zníženie globálnej spotreby antibiotík s cieľom zamedziť škodlivým účinkom v mikrobióme sliznice močového mechúra a znížiť výskyt bakteriálnej rezistencie (Hernandez-Hernandez, 2023). Jednou z možných alternatív profylaxie rekurentných infekcií predstavujú bakteriálne lyzáty, ktoré patria do skupiny bakteriálnych imunomodulátorov. Na Slovensku je dostupný liek Uro-vaxom (OM-89), lyofilizovaný prípravok membránových proteínov z 18 rôznych uropatogénnych *E. coli*. V prípade rekurentných infekcií sa vakcína podáva denne ako perorálna kapsula počas troch mesiacov a po troch mesiacoch sa podáva posilňovacia dávka 10 kapsúl mesačne počas ďalších troch mesiacov (Leung a kol., 2019).

Táto štúdia bola zameraná na sledovanie vplyvu perorálneho podávania bakteriálneho lyzátu *E. coli* (obsiahnutom v lieku Uro-vaxom, OM-89) na vybrané parametre moču a krvného séra u detí s recidivujúcou cystitídou.

MATERIÁL A METÓDY

Účinok perorálne podávaného bakteriálneho lyzátu *Escherichia coli* bol pozorovaný u dvadsiatich detských pacientov ($n = 20$) s recidivujúcou cystitídou. Údaje o pacientoch boli poskytnuté neštátnou nefrologickou ambulanciou. Z dvadsiatich pacientov vo veku 6 – 12 rokov bolo 16 dievčat a 4 chlapci. Pacientom bolo nefrologické vyšetrenie odporúčané pediaterom na základe opakovaného výskytu cystitídy počas predošlých 6 mesiacov. Prvé vyšetrenie v sprievode dospelého osoby zahŕňalo zistenie anamnézy, chemické vyšetrenie odobranej vzorky moču (pH, špecifická hmotnosť, prítomnosť/neprítomnosť erytrocytov, leukocytov, glukózy a ketónových látok), vyšetrenie močového sedimentu (prítomnosť/neprítomnosť leukocytov, erytrocytov, valcov, patologických valcov, epitelových buniek, kryštálov, baktérií), kultivačné vyšetrenie a vyšetrenie vybraných parametrov krvi (kreatinín, kyselina močová, glomerulárna filtrácia).

Tab. 1: Interpretácia chemických parametrov v moči – referenčné hodnoty u detí

Parameter	Referenčný rozsah	Jednotky
pH	5 – 6	
Krv	Negatívne	Arb
Leukocyty	Negatívne	Arb
Ketóny	Negatívne	Arb
Glukóza	Negatívne	Arb
Špecifická hmotnosť	1015 – 1025	kg/m ³

Arb – arbitrárna jednotka

Zdroj: Matysová, 2019

Tab. 2: Interpretácia parametrov (počet/μl) močového sedimentu – referenčné hodnoty u detí

Parameter	Referenčný rozsah	
Leukocyty	pohlavie	
	chlapec	0 – 13,2
	dievča	0 – 16,9
Erytrocyty	chlapec	0 – 13,6
	dievča	0 – 22,7
Valce	chlapec/dievča	0 – 5
Patologické valce	chlapec/dievča	0 – 1,5
Malé guľaté epitélie	chlapec/dievča	0 – 10
Ploché epitélie	chlapec	0 – 5,2
	dievča	0 – 39,6
Kryštály	chlapec/dievča	0 – 30
Baktérie	chlapec	0 – 26,4
	dievča	0 – 130,7

Zdroj: Matysová, 2019

Tab. 3: Interpretácia parametrov v krvi – referenčné hodnoty u detí

	Pohlavie	Vek	Referenčný rozsah	Jednotka
kreatinín	chlapec/dievča	0 – 1 rok	13,00 – 30,00	μmol.l ⁻¹
	chlapec/dievča	1 – 5 rokov	19,00 – 38,00	μmol.l ⁻¹
	chlapec/dievča	5 – 10 rokov	27,00 – 52,00	μmol.l ⁻¹
	dievča	10 – 15 rokov	33,00 – 68,00	μmol.l ⁻¹
kyselina močová	chlapec/dievča	0 – 1 rok	95,00 – 300,00	μmol.l ⁻¹
	chlapec/dievča	1 – 11 rokov	130,00 – 320,00	μmol.l ⁻¹
	dievča	11 – 15 rokov	145,00 – 370,00	μmol.l ⁻¹
	chlapec	11 – 15 rokov	152,00 – 460,00	μmol.l ⁻¹
glomerulárna filtrácia	chlapec/dievča	0 – 14 dní	0,25 – 0,75	ml.s ⁻¹
	chlapec/dievča	14 dní – 6 mesiacov	0,58 – 1,43	ml.s ⁻¹
	chlapec/dievča	6 mesiacov – 1 rok	1,05 – 1,52	ml.s ⁻¹
	chlapec/dievča	1 – 3 roky	1,23 – 1,97	ml.s ⁻¹
	chlapec/dievča	3 – 13 rokov	1,57 – 2,37	ml.s ⁻¹

Zdroj: <https://docplayer.gr/43023178-Laboratorna-prirucka.html>

Tab. 4: Údaje o anamnéze pacientov (n = 20)

Pacient	Pohlavie	Vek	Bolesť a pálenie pri močení	Zvýšená teplota	Slabosť	Nechutenstvo, nevoľnosť	Zvýšená frekvencia močenia
1	dievča	9	A	A	N	N	A
2	dievča	9	A	N	N	N	N
3	dievča	9	A	N	A	A	A
4	dievča	6	A	A	A	A	A
5	dievča	11	A	N	N	N	N
6	dievča	7	N	A	N	A	A
7	dievča	12	A	N	A	N	N
8	dievča	12	A	N	N	N	N
9	dievča	8	A	A	N	N	A
10	dievča	11	N	N	N	N	A
11	dievča	8	A	N	N	A	N
12	dievča	9	A	N	A	A	A
13	dievča	11	A	A	N	N	N
14	dievča	9	A	A	N	A	N
15	dievča	11	A	N	A	N	A
16	dievča	11	A	A	N	N	A
17	chlapec	9	A	N	N	A	N
18	chlapec	9	N	A	N	N	A
19	chlapec	11	A	A	A	N	A
20	chlapec	11	A	A	N	N	A

A – prítomný, N – neprítomný

U pacientov bolo vykonané ultrasonografické vyšetrenie urogenitálneho traktu. Na základe potvrdenia diagnózy recidivujúcej cystitídy bol pacientom indikovaný bakteriálny lyzát *Escherichia coli*, konkrétne liek Uro-vaxom (Flavine Pharma France, Francúzsko), perorálne podávaný v dávke 1 kapsula denne počas šiestich po sebe nasledujúcich týždňov. Jednotlivé výsledky boli zaznamenané počas troch návštev nefrologickej ambulancie, a to pri prvom vyšetrení, po ktorom začala liečba s použitím lieku Uro-vaxom. Následne boli výsledky zaznamenané pri prvom kontrolnom vyšetrení v časovom intervale 2 týždne od začiatku liečby a pri druhom kontrolnom vyšetrení v časovom intervale 6 týždňov od začiatku liečby. Chemickú analýzu moču (viď tab. 1), analýzu močo-

vého sedimentu (viď tab. 2) a stanovenie vybraných parametrov v krvi (viď tab. 3) vykonalo laboratórium Alpha Medical, Stropkov.

Vyšetrenia hladín vybraných parametrov krvného séra, a to hodnoty kyseliny močovej v $\mu\text{mol.l}^{-1}$, kreatinínu v $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a glomerulárnej filtrácie podľa Schwartz v ml.s^{-1} (Dedíková a kol., 2001; viď tab. 3) odzrkadľujú aktuálny stav funkcie urogenitálneho systému.

Štatistická významnosť rozdielov/porovnaní parametrov krvného séra, a to medzi kontrolným, 1. a 2. kontrolným vyšetrením bola stanovená pomocou ANOVA štatistického testu s post-hoc Tukey testom (MiniTab, Česká republika). Stupeň štatistickej významnosti bol stanovený hodnotou P na úrovni $P <$

Tab. 5: Vyšetrenie močového sedimentu – prvé vyšetrenie

č.	leukocyty /μl	erytrocyty /μl	valce /μl	patologické valce /μl	baktérie /μl	ploché epitécie /μl	malé guľaté epitécie /μl	kryštály /μl
1	243,2	5,8	1,8	0,4	10041	0,8	0,1	34,0
2	5,1	15,2	0,4	0,1	281,8	7,9	3,2	32,6
3	100,5	14,0	0,0	0,0	325,6	8,6	6,1	4,1
4	26,3	16,8	0,7	0,2	169,3	7,1	3,0	0,2
5	170,3	3,1	5,3	0,3	71,6	7,6	8,9	0,0
6	69,4	1,9	3,2	0,0	412,7	18,7	0,2	0,0
7	94,4	0,1	2,1	0,1	149,3	6,5	0,2	3,1
8	47,1	0,4	0,6	0,3	117,8	3,9	3,1	15,6
9	98,2	7,1	6,4	1,2	32651	27,1	3,2	1,3
10	45,4	89,8	0,1	0,0	42,5	8,8	2,1	313,0
11	19,8	3,3	0,3	0,0	33,9	3,3	1,8	18,2
12	61,9	3,8	0,7	0,0	10000	3,3	0,6	0,1
13	6,7	0,9	0,3	0,0	48,4	1,0	0,1	0,0
14	240,2	18,8	0,7	0,0	151,1	6,9	2,1	31,5
15	68,7	37,3	0,4	0,1	5294,4	32,1	3,2	0,3
16	128,9	0,6	0,5	0,2	322,6	27,7	5,1	36,7
17	737,7	10,8	17,1	2,1	5418,1	46,9	39,8	116,5
18	149,5	8,7	0,1	0,0	74,3	6,4	1,1	0,0
19	63,1	12,9	2,3	0,2	112,3	3,2	1,1	17,6
20	101,3	16,3	4,7	1,1	76,9	2,5	2,1	3,2

referenčné hodnoty: leukocyty chlapci 0 – 13,2/μl; leukocyty dievčatá 0 – 16,9/μl; erytrocyty chlapci 0 – 13,6/μl; erytrocyty dievčatá 0 – 22,7/μl; valce 0 – 5/μl; patologické valce 0 – 1,5/μl; baktérie chlapci 0 – 26,4/μl; baktérie dievčatá 0 – 130,7/μl; malé guľaté epitécie 0 – 10/μl; ploché epitécie chlapci 0 – 5,2/μl; ploché epitécie dievčatá 0 – 39,6/μl; kryštály 0 – 30/μl; zvýraznené hodnoty predstavujú hodnoty nad referenčnou normou

0,05.

V tejto štúdii sa tiež sledoval výdaj lieku Uro-vaxom na lekárske predpis pacientom s cystitídou v 28 verejných lekárnach v meste Michalovce, a to v rokoch 2021 a 2022. Jednotlivé lekárne poskytli informácie o množstve vydaného lieku pacientom na základe údajov zo svojich lekárenských softvérov v mesačných intervaloch. Sumárny prehľad, ktorý uvádza celkové mesačne vydané množstvo lieku, je vyhodnotený formou tabuľky.

VÝSLEDKY

Na základe prvého vyšetrenia pri prvej návšteve

nefrologickej ambulancie bol spracovaný stručný prehľad anamnézy pacientov (viď tab. 4).

Z údajov je zrejmé, že rekurentná cystitída sa častejšie vyskytovala u dievčat (n = 16) ako u chlapcov (n = 4). Najčastejším opisovaným symptómom bola bolesť a pálenie pri močení, ktorú udávalo až 17 pacientov (85 %) a zvýšená frekvencia močenia, ktorú potvrdilo 12 pacientov (60 %). Zvýšená telesná teplota bola prítomná u 10 pacientov (50 %), nechutenstvo a nevoľnosť u 7 pacientov (35 %) a u 6 pacientov (30 %) sa zaznamenala celková slabosť.

Chemická analýza moču bola realizovaná pri všetkých troch návštevách nefrologickej ambulancie, pričom z jednotlivých výsledkov je zrejmé, že leu-

Tab. 6: Vyšetrenie močového sedimentu – 1. kontrolné vyšetrenie

č.	leukocyty /μl	erytrocyty /μl	valce /μl	patologické valce /μl	baktérie /μl	ploché epitélie /μl	malé guľaté epitélie /μl	kryštály /μl
1	38,0	0,5	1,2	0,7	71,1	0,4	0,0	3,0
2	6,3	3,1	0,1	0,0	19,6	1,2	0,1	2,5
3	11,5	0,2	0,0	0,0	102,3	2,3	0,0	0,0
4	430,2	12,3	0,2	0,0	125	0,7	0,2	0,0
5	11,7	0,0	2,1	0,1	45,2	5,2	4,6	0,0
6	19,9	5,0	0,3	0,0	68,7	6,4	0,3	8,2
7	1,2	2,9	0,3	0,0	67,2	4,4	0,1	0,0
8	13,2	4,3	0,1	0,0	57,6	3,9	0,1	2,1
9	6,5	2,9	4,3	0,2	43,1	17,2	1,2	1,7
10	8,5	85,8	0,0	0,0	12,1	4,5	1,1	17,5
11	2,0	2,6	0,1	0,0	39,5	0,6	0,4	0,0
12	11,1	3,6	0,1	0,0	142,1	0,3	0,1	0,0
13	1,7	0,1	0,1	0,0	35,4	2,1	0,0	0,0
14	84,4	5,5	0,2	0,0	105,1	15,4	0,4	0,0
15	112	26,4	0,0	0,0	171,7	12,3	1,8	0,2
16	3,2	21,3	0,0	0,0	87,5	7,3	2,1	2,3
17	70,0	3,3	6,1	0,0	69,6	9,5	10,2	18,3
18	41,0	2,8	2,1	0,3	29,5	3,8	0,2	0,0
19	9,2	5,5	1,1	0,2	23,2	1,1	0,6	0,8
20	7,6	3,2	2,1	0,1	17,1	0,5	0,8	0,0

referenčné hodnoty: leukocyty chlapci 0 – 13,2/μl; leukocyty dievčatá 0 – 16,9/μl; erytrocyty chlapci 0 – 13,6/μl; erytrocyty dievčatá 0 – 22,7/μl; valce 0 – 5/μl; patologické valce 0 – 1,5/μl; baktérie chlapci 0 – 26,4/μl; baktérie dievčatá 0 – 130,7/μl; malé guľaté epitélie 0 – 10/μl; ploché epitélie chlapci 0 – 5,2/μl; ploché epitélie dievčatá 0 – 39,6/μl; kryštály 0 – 30/μl; zvýraznené hodnoty predstavujú hodnoty nad referenčnou normou

kocytúria mimo referenčný rozsah bola zaznamenaná pri 1. vyšetrení u 11 pacientov (55 %), hematúria bola zaznamenaná u 4 pacientov (20 %), ketonúria bola prítomná iba u jedného z pacientov a glykozúria nebola preukázaná u žiadneho pacienta. Špecifická hmotnosť moču vyjadrená v kg/m³ bola zvýšená u 8 pacientov (40 %, v intervale od 1026 do 1042 kg/m³). Z hodnôt jednotlivých parametrov pri prvom kontrolnom vyšetrení je zrejme zlepšenie zdravotného stavu. Leukocytúria bola detegovaná len v prípade 4 pacientov (20 %), hematúria u jedného pacienta (5 %) a zvýšená glomerulárna filtrácia u 2 pacientov (10 %, v intervale od 1027 do 1031 kg/m³). Na základe výsledkov z druhého kontrolného vyšetrenia po

šiestich týždňoch užívania lieku Uro-vaxom môžeme konštatovať, že u všetkých pacientov (100 %) sa vybrané sledované parametre nachádzali v referenčnom rozsahu.

Prehľad výsledkov rozboru močového sedimentu z jednotlivých vyšetrení počas sledovaného obdobia je zaznamenaný v tabuľke 5, 6 a 7. Predmetom nášho záujmu bolo najmä porovnanie vybraných elementov detegovaných v močovom sedimente, najmä hodnota leukocytov a baktérií. Množstvo leukocytov v močovom sedimente bolo zvýšené pri prvom vyšetrení u 18 pacientov (90 %), po dvoch týždňoch (1. kontrolné vyšetrenie) u 7 pacientov (35 %). Vplyvom 6-týždňovej liečby (2. kontrolné vyšetrenie) bolo sledované

Tab. 7: Vyšetrenie močového sedimentu – 2. kontrolné vyšetrenie

č.	leukocyty /μl	erytrocyty /μl	valce /μl	patologické valce /μl	baktérie /μl	ploché epitécie /μl	malé guľaté epitécie /μl	kryštály /μl
1	7,7	0,0	0,3	0,1	23,3	0,1	0,0	0,1
2	2,3	2,1	0,0	0,0	12,0	0,5	0,1	0,1
3	5,3	0,0	0,0	0,0	31,2	0,3	0,0	0,0
4	25,0	11,8	0,0	0,0	67,3	0,1	0,0	0,0
5	2,7	0,0	1,1	0,1	37,9	2,1	1,1	0,0
6	5,6	22,5	0,1	0,0	24,8	0,4	0,1	1,2
7	0,1	0,1	0,1	0,0	12,1	0,2	0,0	0,0
8	8,5	2,2	0,0	0,0	8,9	3,6	0,1	0,2
9	3,5	1,1	1,1	0,2	3,2	0,5	0,1	0,1
10	3,4	10,0	0,0	0,0	6,2	0,0	0,0	1,0
11	0,9	0,3	0,0	0,0	18,5	0,0	0,0	0,0
12	7,2	3,0	0,0	0,0	97,3	0,2	0,0	0,0
13	0,2	2,8	0,0	0,0	16,2	0,3	0,1	0,0
14	15,6	1,1	0,1	0,1	40,1	0,3	0,1	0,0
15	16,3	13,4	0,0	0,0	130,2	0,1	0,0	0,1
16	3,1	0,8	0,0	0,0	44,80	0,1	0,0	0,2
17	25,5	3,1	3,1	0,2	10,6	2,1	0,2	4,9
18	14,0	2,5	1,2	0,2	9,5	0,0	0,0	0,0
19	2,9	0,2	0,1	0,0	6,2	0,1	0,0	0,1
20	2,0	0,0	1,0	0,2	2,1	0,2	0,0	0,0

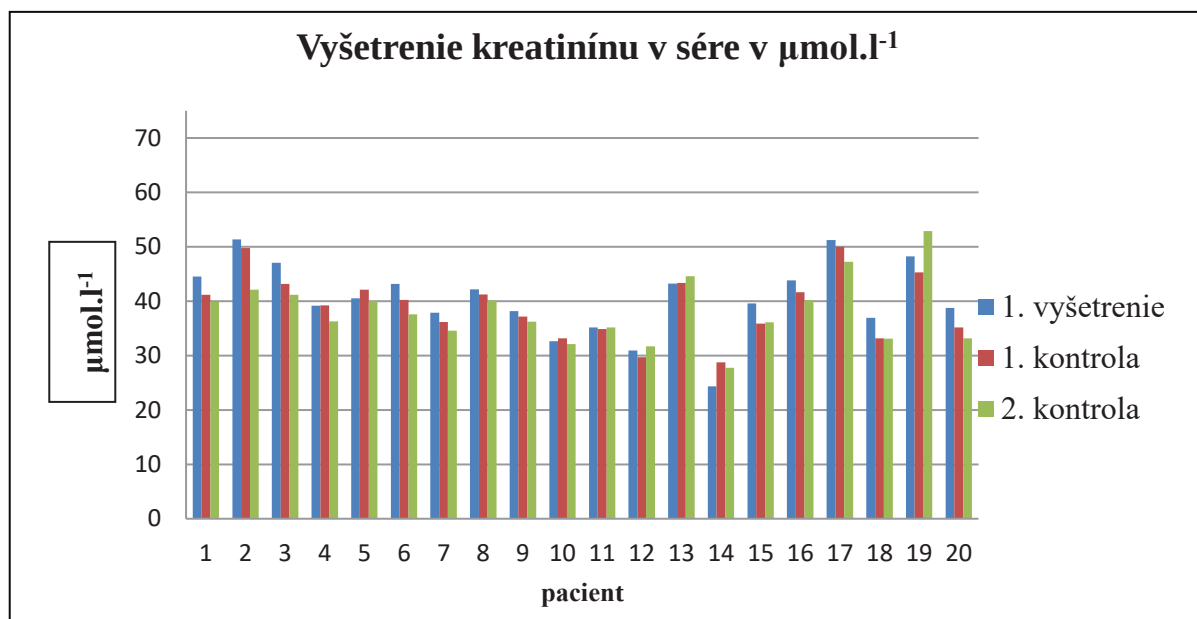
referenčné hodnoty: leukocyty chlapci 0 – 13,2/μl; leukocyty dievčatá 0 – 16,9/μl; erytrocyty chlapci 0 – 13,6/μl; erytrocyty dievčatá 0 – 22,7/μl; valce 0 – 5/μl; patologické valce 0 – 1,5/μl; baktérie chlapci 0 – 26,4/μl; baktérie dievčatá 0 – 130,7/μl; malé guľaté epitécie 0 – 10/μl; ploché epitécie chlapci 0 – 5,2/μl; ploché epitécie dievčatá 0 – 39,6/μl; kryštály 0 – 30/μl; zvýraznené hodnoty predstavujú hodnoty nad referenčnou normou

znížené množstvo leukocytov u všetkých pacientov (n = 20), mierne zvýšené hodnoty boli preukázané iba u dvoch pacientov. Prítomnosť baktérií v močovom sedimente nad referenčný rozsah bola pri prvom vyšetrení potvrdená u 16 pacientov (80 %), pričom významnú bakteriálnu redukciu je možné pozorovať už pri 1. kontrolnom vyšetrení, pri ktorom boli baktérie mimo referenčný rozsah iba u 3 pacientov (15 %). Podľa výsledkov získaných pri treťom vyšetrení (2. kontrolné vyšetrenie) je možné povedať, že Uro-vaxom mal pozitívny vplyv na všetky sledované parametre močového sedimentu, keďže bol pozorovaný návrat ich hodnôt/hladiŇ do intervalu referenčných fyziologických hodnôt.

Ďalším krokom bolo spracovanie výsledkov vybraných biochemických parametrov v krvnom sére, konkrétne hladina kreatinínu v μmol.l⁻¹, hladina kyseliny močovej v μmol.l⁻¹ a stanovenie glomerulárnej filtrácie v ml.s⁻¹. Meranie hladiny kreatinínu sa používa na stanovenie renálneho klírensu, a teda je jedným z ukazovateľov schopnosti filtrovať krv cez obličkové glomeruly, teda glomerulárnej filtrácie. Na stanovenie glomerulárnej filtrácie bol používaný výpočtový vzťah pre odhad glomerulárnej filtrácie podľa Schwartz (Dedíková a kol., 2001).

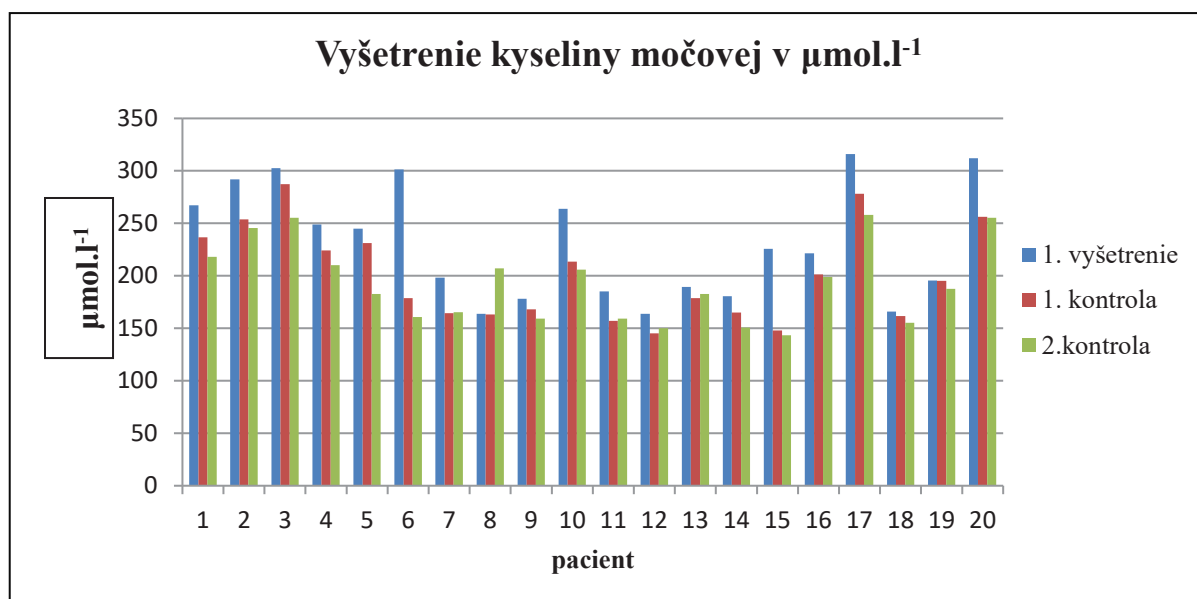
Ako je zrejmé z grafu 1, 2 a 3, sledovaná hodnota glomerulárnej filtrácie bola u všetkých pacientov v referenčnom intervale. Z pozorovania je tiež zrej-

Graf 1: Vyšetrenie kreatinínu v sére počas 1. vyšetrenia, 1. a 2. kontrolného vyšetrenia



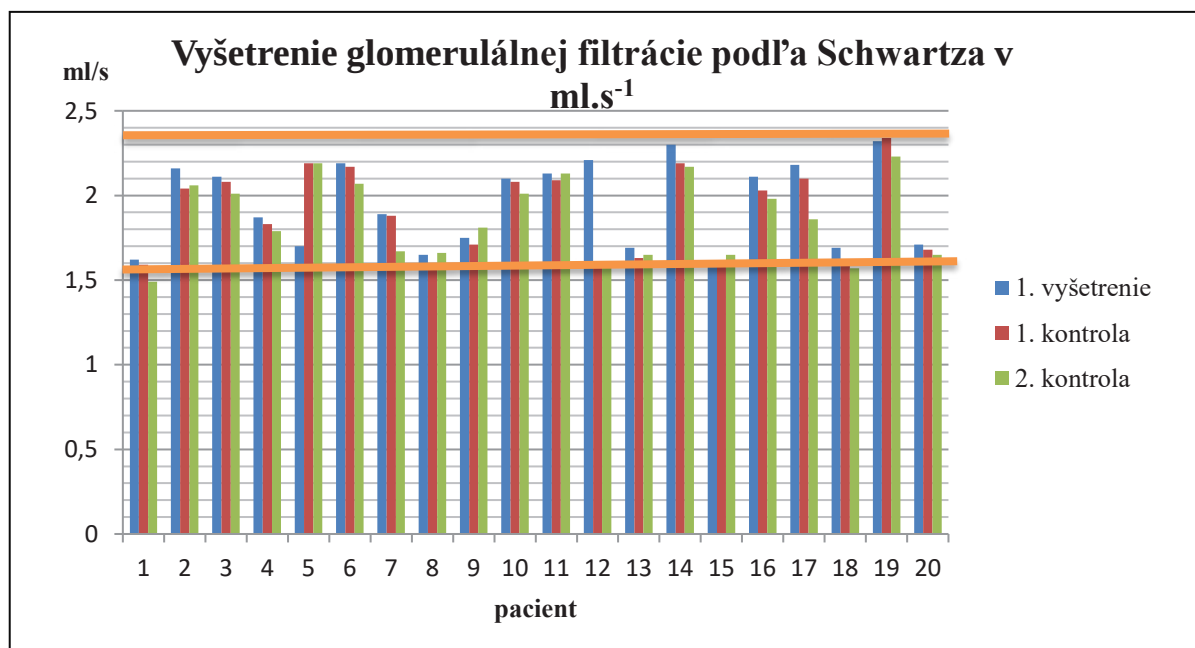
referenčné hodnoty: kreatinín vek 5 – 10 rokov: $27,0 - 52,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$; kreatinínu dievčat vo veku 10 – 15 rokov: $33,0 - 68,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$; kreatinín u chlapcov vo veku 10 – 15 rokov: $34,0 - 74,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$

Graf 2: Vyšetrenie kyseliny močovej v sére počas 1. vyšetrenia, 1. a 2. kontrolného vyšetrenia



referenčné hodnoty: kyselina močová vek 1 – 11 rokov: $130,0 - 320,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$; kyselina močová u dievčat vo veku 11 – 15 rokov: $145,0 - 370,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$; kyselina močová u chlapcov vo veku 11 – 15 rokov: $152,0 - 460,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$

Graf 3: Vyšetrenie glomerulárnej filtrácie podľa Schwartz počas 1. vyšetrenia, 1. a 2. kontrolného vyšetrenia



referenčná hodnota glomerulárna filtrácia vo veku 3 – 13 rokov: 1,57 – 2,37 ml.s⁻¹; vodorovné čiary oranžovej farby reprezentujú rozmedzie referenčnej hodnoty glomerulárnej filtrácie

Tab. 8: Priemerné hodnoty biochemických parametrov počas 1. vyšetrenia, 1. a 2. kontrolného vyšetrenia

č.	1. vyšetrenie	1. kontrolné vyšetrenie	2. kontrolné vyšetrenie
Kreatinín (μmol.l ⁻¹) ± SD	40,45 ± 6,71	39,01 ± 5,86	38,09 ± 5,84
Kyselina močová (μmol.l ⁻¹) ± SD	230,82 ± 54,00 ^a	200,39 ± 44,52	192,57 ± 38,33 ^a
Glomerulárna filtrácia podľa Schwartz (ml.s ⁻¹) ± SD	1,95 ± 0,25	1,89 ± 0,26	1,86 ± 0,23

SD – smerodajná odchýlka; rovnaké písmeno „a“ vyjadruje hladinu štatistickej významnosti na úrovni hodnoty P < 0,05

mé, že hladina kyseliny močovej sa nachádza u všetkých 20 pacientov v referenčnom rozmedzí a pri individuálnom hodnotení pacientov možno pozorovať len minimálne odchýlky počas sledovaného obdobia.

V rámci vyhodnotenia priemerných hodnôt sledovaných biochemických parametrov v celej skupine pacientov bol pozorovaný štatisticky významný účinok (P < 0,05) podávania Uro-vaxomu na hladinu kyseliny močovej v druhom kontrolnom vyšetrení v porovnaní so začiatkom terapie pacientov (viď tab. 8).

Mikrobiologickým vyšetrením vzoriek moču bola u všetkých pacientov (n = 20) pri prvom vyšetrení zachytená *E. coli*. Taktiež boli pri prvom vyšetrení detegované ďalšie patogény ako *Proteus mirabilis* u pacienta 2, *Streptococcus viridans* u pacienta 9 a 11, *Klebsiella pneumoniae* a *Enterococcus faecalis* u pacienta 14. Po 6-týždňovej imunomodulačnej liečbe bolo opakovane zrealizované mikrobiologické vyšetrenie, ktoré potvrdilo prítomnosť *E. coli* iba u pacienta 4 a 15.

Tab. 9: Výdaj lieku Uro-vaxom vo verejných lekárňach v meste Michalovce

Mesiac/Rok	2021		2022	
	Uro-vaxom 30 kapsúl	Uro-vaxom 90 kapsúl	Uro-vaxom 30 kapsúl	Uro-vaxom 90 kapsúl
Január	27	15	34	15
Február	35	10	32	7
Marec	19	9	13	10
Apríl	9	6	11	7
Máj	11	10	12	5
Jún	9	5	13	9
Júl	12	5	12	12
August	10	9	16	8
September	10	6	14	12
Október	25	13	18	13
November	27	24	34	19
December	24	18	26	11

Na základe údajov získaných z verejných lekární o množstve vydaného lieku Uro-vaxom pacientom môžeme skonštatovať, že najvyšší počet bol vydaný v mesiacoch január, február, a následne v mesiacoch október, november a december (viď tab. 9).

DISKUSIA

Infekcie močového traktu (IMT) sú dôsledkom zápalovej reakcie urotelu na inváziu mikroorganizmov (Marenčák, 2017). Za najčastejšieho pôvodcu IMT sa pokladá UPEC (Souček a kol., 2019); ktorá bola pri kultivácii potvrdená aj u všetkých pacientov v tejto štúdii.

Leung a kol. (2019) uvádzajú, že cystitída je v detstvom veku spojená s radom nešpecifických príznakov, ako to bolo zaznamenané aj v našej štúdii, kedy sa u pacientov objavili nasledovné nešpecifické symptómy: zvýšená telesná teplota (pacient 1, 4, 6, 9, 13, 14, 16, 18, 19, 20), celková slabosť (pacient 3, 4, 7, 12, 15, 19), nechutenstvo a nevoľnosť (pacient 3, 4, 6, 11, 12, 14, 17). Špecifické príznaky zahŕňali bolesť a pálenie pri močení (pacient 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11,

12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20) a zvýšenú frekvenciu močenia (pacient 1, 3, 4, 6, 9, 10, 12, 15, 16, 18, 19, 20).

Leung a kol. (2019) konštatujú, že výskyt cystitídy je častejší u dievčat ako u chlapcov, čo sa potvrdilo aj v praktickej časti štúdie, kde pacienti 1 – 16 boli dievčatá a 17 – 20 chlapci.

Pre stanovenie optimálneho terapeutického postupu je dôležitý individuálny prístup k pacientovi, je potrebné zohľadniť viacero faktorov ako sú druh a typ infekcie, lokalizácia infekcie, či prítomnosť iných faktorov ovplyvňujúcich stav pacienta (Krčméry, 2005a, b).

S cieľom znížiť spotrebu antibiotík kvôli nárastu rezistencie a výskytu nežiaducich účinkov sa liečba orientuje viac na profylaxiu recidivujúcich cystitíd, pričom je pacientom odporúčané užívať prípravky s obsahom probiotík, D-manózy a brusníc (Souček a kol., 2019).

Význam podávania probiotík a ich vplyv na recidívu cystitídy u detského pacienta sledovala randomizovaná kontrolná štúdia s 94 deťmi vo veku 1 – 12 rokov. Všetci pacienti podliehali rutinnému antibio-

tickému režimu. Po tejto liečbe boli prvej skupine podané probiotiká a druhej placebo. Pacienti boli sledovaní nasledujúcich 6 mesiacov. Celkovo u 39 zo 47 pacientov (83 %) v skupine s placebom a u 44 zo 47 pacientov (93,6 %) v skupine s probiotikami nedošlo k recidíve cystitídy. Výsledky štúdie poukázali na fakt, že užívanie probiotík malo významný preventívny účinok na recidívu ochorenia. Pravdepodobnosť recidívy u placebo-pacientov bola päťkrát vyššia v porovnaní s pacientmi s aplikáciou probiotík (Ghasemi a kol., 2021).

Ďalšia štúdia zameraná na vyhodnotenie vplyvu probiotík na prevenciu recidív cystitídy bola realizovaná so 181 pacientmi vo veku od 4 mesiacov do 5 rokov po zotavení sa z prvej cystitídy. Pacienti užívali probiotickú zmes s *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium lactis* alebo placebo počas 18 mesiacov. Primárnym cieľom štúdie bolo poukázať na potenciál probiotickej profylaxie a sekundárnym cieľovým ukazovateľom bol medián času do prvej recidívy. Po 18 mesiacoch sa vyliečilo 96,7 % pacientov z probiotickej skupiny a 83,3 % pacientov v skupine s placebom. Medián času do prvej incidencie recidívy cystitídy bol 3,5 mesiaca v skupine s probiotikami a 6,5 mesiaca v skupine s placebom (Sadeghi-Bojd, 2020).

Porovnaniu účinku brusnicovej šťavy s účinkami *Lactobacillus* spp. u detí s opakujúcimi sa infekciami močových ciest sa venovala štúdia s 84 dievčatami vo veku od 3 do 14 rokov. Pacientky boli rozdelené do troch skupín. Prvá skupina užívala 50 ml brusnicovej šťavy denne, druhá skupina 100 ml nápoja s obsahom *Lactobacillus* spp. 5 dní v mesiaci a tretia skupina bola kontrolná. Štúdia trvala 6 mesiacov. Aspoň jedna epizóda infekcie bola zaznamenaná u 18,5 % pacientov prvej skupiny; u 42,3 % druhej skupiny a u 48,1 % tretej skupiny. Tieto údaje naznačujú, že denná konzumácia koncentrovanej brusnicovej šťavy môže významne zabrániť recidíve symptomatickej infekcie u detí (Ferrara a kol., 2009).

V prípade rekurentných infekcií močového mechúra zohráva svoj význam imunoterapia, prípadne autovakcíny (Souček a kol., 2019). Brodie (2020)

uvádza, že Uro-vaxom významne znižuje mieru dysúrie, zvýšenej frekvencie močenia a pocit nedostatočne vyprázdneného močového mechúra, čo sa potvrdilo aj u všetkých našich pacientov v sledovanom časovom intervale. Martel a kol. (2019) uvádzajú, že u pacientov, ktorí perorálne užívali bakteriálny lyzát OM-89 s imunomodulačným efektom v dávke 6 mg denne počas troch mesiacov, bola frekvencia vzniku infekcie cystitídy znížená o 49 % v porovnaní s placebo-pacientmi. Súčasne daná profylaxia významne znížila používanie antibiotík počas celého skúšobného obdobia.

Tvrdenia Marenčáka (2021), že Uro-vaxom má pozitívny vplyv na zníženie počtu recidív, zmiernenie symptómov cystitídy a sledovanie hodnôt laboratórnych parametrov v referenčnom intervale potvrdila aj praktická časť štúdie. Priaznivý terapeutický účinok bakteriálneho lyzátu *Escherichia coli* na parametre vyšetrované pri chemickej analýze moču (Matysová, 2019) potvrdili aj výsledky našich pacientov – leukocytúria prítomná pri prvom vyšetrení u 55 % pacientov bola prítomná pri 1. kontrolnom vyšetrení už iba u 20 % pacientov. Rovnaký trend možno sledovať aj v rámci sledovania hematúrie, ktorá bola pri prvom vyšetrení prítomná u 20 % pacientov a pri 1. kontrolnom vyšetrení už iba u pacienta 10. Taktiež došlo aj k zníženiu špecifickej hmotnosti moču, ktorá bola zvýšená pri prvom vyšetrení u 40 % pacientov a pri 1. kontrolnom vyšetrení už iba u 2 pacientov (10, 17). Vyšetrenie moču po 6 týždňoch užívania lieku Uro-vaxom viedlo k úprave sledovaných parametrov do fyziologického referenčného intervalu.

Ďalším cieľom štúdie bolo sledovanie pôsobenia lieku Uro-vaxom na vybrané parametre pri vyšetrení močového sedimentu ako bakteriúria a leukocytúria. Leukocytúria potvrdená pri prvom vyšetrení u 90 % pacientov bola vplyvom užívania lieku pri 1. kontrole u 35 % pacientov a pri 2. kontrole sa preukázala prítomnosť leukocytúrie iba u 10 % pacientov. Prítomnosť baktérií v moči, bakteriúria, detegovaná u 80 % pacientov pri 1. vyšetrení bola pri 1. kontrole prítomná len u 20 % pacientov.

Marenčák (2017) vo svojej práci sumarizuje výho-

dy použitia lieku Uro-vaxom, ako sú dobrá tolerancia, minimálny výskyt nežiaducich účinkov, výrazný protizápalový účinok a fakt, že je možné použiť ho u detí starších ako 4 roky. Práve z tohto dôvodu by malo byť realizovaných viac vedeckých štúdií pri použití tohto lieku v indikácii recidivujúca cystitída u detí s cieľom skvalitnenia života, eliminácie nepríjemných symptómov a prevencie ďalších zdravotných komplikácií.

Porovnanie výdaja lieku Uro-vaxom (viď tab. 9) vo verejných lekárňach v Michalovciach nasvedčuje tomu, že frekvencia výdaja je vyššia v období október – február, následne klesá počas letných mesiacov a znovu má stúpajúci trend v jesenných a zimných mesiacoch. Na základe toho môžeme konštatovať, že v tomto období je aj zvýšené množstvo recidív cystitídy u detí, čo môže byť zapríčinené expozíciou chladnejšiemu počasiu, nedostatočným obliekaním a návratom detí do kolektívu, kde často dochádza k zníženiu štandardu režimových a hygienických opatrení. Naopak, v letných mesiacoch je recidíva spojená často s návštevou kúpalísk. Z toho dôvodu Leung a kol. (2019) upriamujú pozornosť na potrebu edukácie rodičov aj detí o dodržiavaní všeobecných hygienických a profylaktických zásad ako dôležitých metód prevencie recidívy cystitídy, ktoré sa dotýkajú správnej hygieny, dostatočného pitného režimu, diétnych opatrení a správania sa.

ZÁVER

Detský vek je vo všeobecnosti spojený s vyšším výskytom infekcií močových ciest, vrátane cystitídy, za čo môže rad rozličných príčin, počnúc anatomickými faktormi, toaletnými a hygienickými návykmi. Nakoľko môžu byť symptómy u detí nešpecifické, je dôležité klásť dôraz na správne stanovenie diagnózy.

Recidivujúce cystitídy sú závažným problémom najmä v detskom veku, pretože riziko ďalších zdravotných komplikácií vo forme zjazvenia obličkovej kôry, hypertenzie a chronického zlyhania obličiek sa zvyšuje s každou ďalšou infekciou. S cieľom predísť takýmto poškodeniam je možné využiť rad nefarmakologických a farmakologických intervencií. Napriek

tomu, že najbežnejšou metódou prevencie je nízko-dávková dlhodobá antibiotická profylaxia, ktorá so sebou prináša rad negatív, kam patrí výskyt nežiaducich účinkov a zvýšená rezistencia voči antibiotikám. Preto je nutné počas terapie používať alternatívne spôsoby, akým je napríklad imunomodulačná liečba rekurentných cystitíd s použitím bakteriálneho lyzátu *Escherichia coli*.

Priaznivý účinok lieku Uro-vaxom u detí s recidivujúcou cystitídou potvrdila aj praktická časť štúdie. U všetkých detských pacientov bola po ukončení liečby trvajúcej 6 týždňov zaznamenaná absencia nepríjemných príznakov a úprava sledovaných parametrov.

ZOZNAM LITERATÚRY

Beereppot, M., Geerlings, S.: Non-antibiotic prophylaxis for urinary tract infections. *Pathogens*, 2016, 5 (2), 36.

Brodie, A. El-Taji, O., Jour, I., Foley, Ch., Hanbury, D.: A retrospective study of immunotherapy treatment with Uro-Vaxom (OM-89) for prophylaxis of recurrent urinary tract infections. *Cur. Urol.*, 2020, 14, 130 – 134.

Dedíková, D., Červeňová, O., Vivodová, M.: Glomerulárna filtrácia stanovená 99mTc-DTPA diuretickou dynamickou scintigrafiou verzus výpočtom podľa Schwartz [Glomerular filtration determined by 99mTc-DTPA diuretic dynamic scintigraphy versus calculation according to Schwartz]. *Česko-slovenská pediatrie*, 2001, 8, 469 – 472.

Straková, B.: *Laboratórna príručka*, Alpha medical, 2012, 162. Dostupné na internete: <<https://docplayer.gr/43023178-Laboratorna-prirucka.html>>. [cit. 15.03.2023].

Ferrara, P. Romaniello, L., Vitelli, O., Gatto, A., Serva, M., Cataldi, L.: Cranberry juice for the prevention of recurrent urinary tract infections: a randomized controlled trial in children. *Scan. J. Urol. Nefrol.*, 2009, 43, 369 – 372.

Ghassemi, K., Montazeri, S., Moghateli, M. S., Shakibazad, N., Fariborzi, M.: Use of probiotics

for prophylaxis of urinary tract infection recurrence in children, a randomized controlled trial. *Ann. Rom. Soc. Cell Biol.*, 2021, 25, 20 767 – 20 772.

Hernandez-Hernandez, D., Ortega-Gonzales, Y., Padilla-Fernandez, B., Gutierrez-Hernandez, P. R., Castro-Diaz, D. M.: Management of acute cystitis in the era of COVID-19. *Curr. Bladd. Dysfunct. Rep.*, 2023, 18, 10 – 15.

Khan, A., Jhaveri, R., Seed, P. C., Arshad, M.: Update on Associated risk factors, diagnosis, and management of recurrent urinary tract infections in children. *J. Ped. Inf. Dis. Soc.*, 2019, 8, 152 – 159.

Krčméry, S.: Antibiotická liečba infekcií dolných močových ciest [Antibiotic treatment of lower urinary tract infections]. *Via Pract.*, 2005a, 10 (2), 286 – 289.

Krčméry, S.: Antibiotická liečba infekcií dolných močových ciest [Antibiotic treatment of lower urinary tract infections]. *Via Pract.*, 2005b, 10 (2), 386 – 388.

Leung, A. K. C., Wong, A. H. C., Leung, A. A. M., Hon, K. L.: Urinary tract infections in children. *Rec. Pat. Inflam. Allergy Drug Discov.*, 2019, 13, 2 – 18.

Madden-Fuentes, J. R., Arshad, M., Ross, S. S., Seed, P. C.: Efficacy of Fluoroquinolone-probiotic combination therapy to treat recurrent urinary tract infections in children. *Clin. Ther.*, 2015, 37, 2143 – 2147.

Marenčák, J.: Recidivujúce zápaly močových ciest, možnosti liečby a profylaxie [Recurrent urinary tract infection, treatment options and prophylaxis].

Via prac., 2017, 5 (14), 244 – 249.

Marenčák, J.: Súčasný trendy antibiotickej profylaxie v urológii [Current trends in antibiotic prophylaxis in urology]. *Urologie pro praxi*, 2021, 22, 13 – 18.

Martel, J. A. O., Naber, K. G., Haddad, J. M., Saucedo, J. T., Burgos, J. A. D.: Prevention of recurrent urinary tract infections: bridging the gap between clinical practice and guidelines in Latin America. *Ther. Adv. Urol.*, 2019, 11, 29 – 40.

Matysová, R.: Vyšetrenie močového sedimentu [Urine sediment examination]. *InVitro*, 2019, 2 (7), 70 – 77.

Sadeghi-Bojd, S.: Efficacy of probiotic prophylaxis after the first febrile urinary tract infection in children with normal urinary tracts. *J. Ped. Inf. Dis. Soc.*, 2020, 9, 305 – 310.

Sholan, R. F.: Interstitial cystitis: painful bladder syndrome. *Kazan Med. J.*, 2018, 99, 84 – 91.

Souček, M., Svačina, P.: *Vnitřní lékařství v kostce [Internal Medicine in a Nutshell]*. Praha: Grada Publishing, 2019, s. 464, ISBN 978-80-271-2289-9.

Zorc, J. J., Kiddoo, D. A., Shaw, K. N.: Diagnosis and management of pediatric urinary tract infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005, 18, 417 – 422.



BIOLOGICKÁ TERAPIA DYSLIPIDÉMIÍ

BIOLOGICAL TREATMENT IN DYSLIPIDEMIAS

Kolesárová, Mária¹; Rohaľová, Jana¹; Marcinčáková, Dana¹; Kolesár, Dalibor²

¹Katedra farmakológie a toxikológie

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

²Ústav anatómie, Lekárska Fakulta

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Šrobárova 2, 041 80 Košice
Slovenská republika

maria.kolesarova@uvlf.sk

ABSTRACT

Dyslipidémia ako metabolické ochorenie predstavuje závažný rizikový faktor pre rozvoj aterosklerotických kardiovaskulárnych ochorení. Ochorenia následkom aterosklerózy ako infarkt myokardu, ischemická choroba dolných končatín alebo cievná mozgová príhoda, zastávajú popredné miesta v príčinách morbidity a mortality, a to nielen u nás, ale vo všetkých vyspelých štátoch sveta. Cieľom štúdie bolo vyhodnotenie skúsenosti slovenských pacientov s inhibítormi proproteín konvertázy subtilizín/kexín typ 9 (PCSK9) pri podávaní liečiv evolokumab a alirokumab, v porovnaní s konvenčnou hypolipidemickou liečbou u 9 pacientov trpiacich rôznymi typmi dyslipidémií. Súbor pacientov tvorili siedmi muži a dve ženy s priemerným vekom 59 rokov. U týchto pacientov boli sledované hodnoty lipidového spektra pred a po 12-mesačnej terapii inhibítormi PCSK9.

Alirokumab a evolokumab buď nahradili terapiu konvenčnými hypolipidemikami, alebo boli pridané ku konvenčným hypolipidemikám. Výsledky ukázali, že náhrada alebo prídanie inhibítorov PCSK9 spôsobili po 12 mesiacoch terapie výrazný priemerný pokles celkového cholesterolu o 37 % (alirokumab) a 40 % (evolokumab) a LDL-cholesterolu o 55 % (alirokumab) a 56 % (evolokumab). Šesť pacientov (67 %) dosiahlo 50 % pokles LDL-cholesterolu v porovnaní s východiskovou hodnotou po 12 mesiacoch terapie alirokumabom alebo evolokumabom, čo môže prispieť k zníženiu kardiovaskulárneho rizika a poklesu KV príhod u pacientov. Výsledky štúdie potvrdili efektívnosť biologickej liečby, ktorá prináša benefit pre pacienta a môže tak prispieť k zlepšeniu prognózy jeho ochorenia.

Kľúčové slová: alirokumab; dyslipidémia; evolokumab; cholesterol; PCSK9 inhibítory

ABSTRACT

Dyslipidemia as a metabolic disease is a serious risk factor for the development of atherosclerotic cardiovascular diseases. Diseases resulting from atherosclerosis, such as myocardial infarction, ischemic disease of the lower limbs or stroke, occupy leading positions in the causes of morbidity and mortality, not only in our country, but in all developed countries of the world. The aim of the study was to evaluate the experience of Slovak patients with proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibitors when administering the drugs evolocumab and alirocumab, compared to conventional hypolipidemic treatment in 9 patients suffering from different types of dyslipidemia. The group of patients consisted of seven men and two women with an average age of 59 years. In these patients, the values of the lipid spectrum were monitored before and after 12 months of therapy with PCSK9 inhibitors. Alirocumab and evolocumab either replaced conventional lipid-lowering therapy or were added to conventional lipid-lowering agents. The results showed that the replacement or addition of PCSK9 inhibitors caused a significant mean decrease in total cholesterol by 37 % (alirocumab) and 40 % (evolocumab) and LDL-cholesterol by 55 % (alirocumab) and 56 % (evolocumab) after 12 months of therapy. Six patients (67 %) achieved a 50 % decrease in LDL-cholesterol compared to baseline LDL-cholesterol value after 12 months of alirocumab or evolocumab therapy, which may contribute to reduced cardiovascular risk and CV events in patients.

The results of the study confirmed the effectiveness of biological treatment, which could bring benefit to the patient and can thus contribute to improving the prognosis of his disease.

Key words: alirocumab; dyslipidemia; evolocumab; cholesterol; PCSK9 inhibitors

ÚVOD

Dyslipidémie (dyslipoproteinémie, DLP) predstavujú rôzne spektrum lipidových abnormalít, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v prevencii a terapii kardiovaskulárnych chorôb (Gavorník a kol., 2013). Ide o poruchu látkovej premeny lipoproteínov, ktorá sa prejaví zvýšením alebo znížením niektorej zložky lipoproteínového spektra, čo je spôsobené poruchou syntézy alebo znížením katabolizmu lipoproteínov (Fábryová, 2009a). Z etiologického hľadiska sa DLP rozdeľujú na primárne a sekundárne. Medzi primárne DLP, ktoré sú geneticky podmienené, patrí familiárna hypercholesterolémia, familiárna polygénová hypertriacylglycerolémia, polygénová hypercholesterolémia, familiárna kombinovaná hyperlipidémia. Sekundárne DLP sú prejavom iných základných chorôb a porúch, ako napr. tyreopatia, alkoholizmus, *diabetes mellitus* 2. typu, cholestáza, chronická renálna insuficiencia a i. (Gavorník a kol., 2013; Oleárová a kol., 2015).

DLP môžu byť zapríčinené buď genetickým defektom v metabolizme lipoproteínov, ale najčastejšie vznikajú kombináciou nezdravého životného štýlu a genetických faktorov (Mirossay a Mojžiš, 2021). DLP spolu s *diabetes mellitus* patria medzi hlavné rizikové faktory pre vznik kardiovaskulárnych ochorení (KVO). Niekoľko klinických štúdií demonštrovalo úlohu LDL-cholesterolu (LDL-C) v rozvoji aterosklerózy s následným vznikom KVO. Dokázali, že výrazný pokles LDL-C sa podieľa na znížení výskytu akútneho infarktu myokardu a chronického koronárneho syndrómu (Kosmas a kol., 2021).

Metaanalýza 38 štúdií primárnej a sekundárnej prevencie zistila, že pri každom 10 % znížení celkového cholesterolu klesá úmrtnosť na kardiovaskulárne ochorenia o 15 % a celková mortalita klesá o 11 % (Eaton, 2005). Za posledných 30 rokov bol demonštrovaný celý rad klinických štúdií, ktoré dokázali redukciiu kardiovaskulárneho rizika u pacientov pros-tredníctvom terapií, ktoré intenzívne znižovali lipidy v krvi, ako napr. statíny v kombinácii s ezetemibom (Colin a kol., 2015).

Štandardnou terapiou pri znižovaní LDL-C sú statíny, ktoré znižujú kardiovaskulárne riziko o 25 – 30 % (Colin a kol., 2015). Z klinických štúdií a z klinickej praxe vyplýva, že statíny dokážu priemerne znižovať hladiny LDL-C o 38 – 40 % (Laššánová a kol., 2005). Okrem toho majú statíny aj pleiotropné antiaterogénne účinky, medzi ktoré patria antioxidantné vlastnosti, zlepšenie funkcie endotelu, protizápalové, antiproliferačné a antitrombotické účinky (Davignon, 2004). Napriek tomu niektorí pacienti liečení vysokými dávkami statínov nedosahujú cieľové hodnoty LDL-C. Ďalší pacienti môžu mať skúsenosť so statínovou intoleranciou alebo vedľajšími účinkami, medzi ktoré patria myalgia, rabdomyolýza, kŕče a slabosť (Kosmas a kol., 2021).

Medzi konvenčné hypolipidemiká, ktoré sa využívajú v klinickej praxi, patrí aj ezetimib a fibráty. Ezetimib inhibuje vstrebávanie cholesterolu v tenkom čreve blokadou transportného proteínu (NPC1L1) v kefkovitom leme enterocytov. Následkom toho dochádza k poklesu obsahu cholesterolu v chylomikrónoch, a tak k zníženému prísunu cholesterolu do pečene. Hepatocyt reaguje zvýšenou expresiou LDL receptorov na svojej bunkovej membráne, čím dochádza k zvýšenému vychytávaniu LDL-C z plazmy. Z tohto dôvodu vedie pridanie ezetimibu do kombinácie so statínom k aditívnemu poklesu LDL-C minimálne o 20 % (Ballantyne, 2002). Kombinovaná hypolipidemická liečba s maximálnymi dávkami statínov a ezetimibu môže spôsobiť priemerný celkový pokles LDL-C až na úrovni 65 % (Margóczy, 2023). Vedľajšie účinky ezetimibu sú zdriedkavé a zahŕňajú hlavne dyspeptické ťažkosti ako je hnačka a nauzea.

Fibráty sa používajú v klinickej praxi od 70. rokov 20. storočia. Fibráty stimulujú α -receptor aktivovaný peroxizómovým proliferátorom (PPAR- α), ktorý patrí do rodiny nukleárných receptorov. Stimuláciou PPAR- α receptorov sa zvyšuje aktivita lipoproteínovej lipázy, zvyšuje sa oxidatívna degradácia mastných kyselín, čo spôsobí zníženie tvorby LDL-častíc bohatých na triacylglyceroly (TAG). Okrem toho majú fibráty aj pleiotropné účinky, ktoré zahŕňajú kontrolu protizápalovej odpovede a pozitívny efekt

pri koagulácii a fibrinolýze (Chapman, 2006). V klinickej praxi sa na Slovensku najviac používa fenofibrát predovšetkým pri izolovanej hypertriacylglycerolemii, v kombinácii so statínmi sa používajú hlavne pri kombinovaných DLP (Oleárová a kol., 2015). Pri kombinovanom podávaní statínov a fibrátov sa preukázal pokles LDL-C o 29 % a TAG o 42 %. Medzi nežiaduce účinky pri monoterapii fibrátmi patria nauzea, vracanie, hnačky. Pri kombinovanej terapii fibrátov a statínov sa môže prejaviť hepatálna toxicita a rabdomyolýza (Feher a kol., 1995).

Keďže významný počet kardiovaskulárnych príhod pretrváva aj pri maximálnych dávkach konvenčnej hypolipidemickej terapie, je potrebné kombinovať rôzne terapeutické postupy s využitím nových liečiv, ktoré by znižovali kardiovaskulárne riziko. Tieto nové stratégie zahŕňajú aj inhibítory proproteín konvertázy subtilizín/kexín typ 9 (PCSK9) (Muscoli a kol., 2022). PCSK9 proteíny sú serínové proteázy, nachádzajúce sa hlavne v pečeni, ktoré urýchľujú degradáciu LDL-receptorov, čoho následkom je vyššia hladina LDL-cholesterolu v cirkulácii. Inhibíciou proteínu PCSK9 nedochádza k degradácii LDL-receptora. V roku 2015 boli v USA a EÚ registrované monoklonálne protilátky proti PCSK9 – evolokumab a alirokumab, ktoré sa stali bežnou súčasťou liečby hypercholesterolémie a zmiešanej DLP (Oleárová a kol., 2015; Karásek, 2021). Ich podávanie vedie k zníženiu cirkulujúcej hladiny PCSK9, čo spôsobuje zvýšenú recykláciu LDL-receptorov na povrchu bunkovej membrány. Vďaka tomu klesá plazmatická koncentrácia LDL-C (Karásek, 2021). Inhibítory PCSK9 znižujú hladinu celkového cholesterolu (TC – total cholesterol) v priemere o 25 – 40 %, LDL-C o 50 – 65 %, TAG o 8 – 20 % a zvyšujú koncentráciu HDL-cholesterolu (HDL-C) o 5 – 9 % (Navarese a kol., 2015; Squizzato a kol., 2017). Z klinických štúdií FOURIER a ODYSSEY vyplýva, že majú nízky výskyt nežiaducich účinkov (Sabatine a kol., 2015; Robinson a kol., 2015). Podľa odporúčaní AHA (American Heart Association) a ESC (European Society of Cardiology) môžu byť inhibítory PCSK9 užívané samostatne alebo v kombinácii so statínmi a

ezetimibom (Arnett a kol., 2019; Mach a kol., 2020).

Cieľom štúdie bolo vyhodnotenie skúsenosti slovenských pacientov s inhibítormi PCSK9 alirokumabom a evolokumabom v porovnaní s konvenčnou hypolipidemickou liečbou.

METODIKA A METÓDY

Údaje boli získané počas roka 2021 zo zdravotných kariet 9 pacientov s rôznymi typmi dyslipidémií, ktorí navštevovali internú ambulanciu vo východoslovenskom meste. V rámci charakteristiky pacientov bolo sledované pohlavie, vek pacientov, typ dyslipidémie, komorbidity a indikovaná klasická hypolipidemická liečba. Všetci 9 pacienti boli liečení konvenčnou hypolipidemickou terapiou, pomocou ktorej však nedosiahli cieľové hodnoty lipidov, a preto bola 5 pacientom následne indikovaná biologická liečba (BL) **alirokumabom** v dávke 150 mg každé 2 týždne a jednému pacientovi (pacient 7) bol podaný alirokumab v dávke 75 mg každé 2 týždne. Ďalší 4 pacienti boli liečení **evolokumabom** v dávke 140 mg každé 2 týždne.

Táto biologická liečba sa buď pridala ku konvenčnej hypolipidemickej terapii alebo bola zamenená za pôvodne klasické hypolipidemiká (pacient 1, 4, 5, 8).

Sledované a porovnávané boli laboratórne hodnoty TC, LDL-C, HDL-C a TAG pred a po 12-mesačnej biologickej terapii. Výsledky boli spracované formou grafov a tabuliek pomocou programu Microsoft Ex-

cell. Pri získavaní a spracovaní výsledkov bol dodržaný zákon 18/2018 Z. z. (Zákon o ochrane osobných údajov).

VÝSLEDKY

Charakteristika pacientov

Terapia bola analyzovaná u 9 pacientov. Z toho boli 2 ženy a 7 mužov.

Priemerný vek pacientov bol 59 rokov. Najmladší pacient mal 31 rokov a najstarší pacient mal 77 rokov. Podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb 10 (MKCH 10) (ICD – 10 Version: 2016), 6 pacientov trpelo dyslipidémiou zmiešaného typu (E78.2), 3 pacientom bola diagnostikovaná izolovaná hypercholesterolémia (E78.0), v rámci toho mal pacient 1 diagnostikovanú familiárnu hypercholesterolémiu (E78.0). Všetci deväti pacienti mali pridružené ďalšie ochorenia. Najväčší počet komorbidít s počtom 13 bol zaznamenaný u pacienta 2 a najnižší počet komorbidít (4) mal pacient 5 (viď tab. 1).

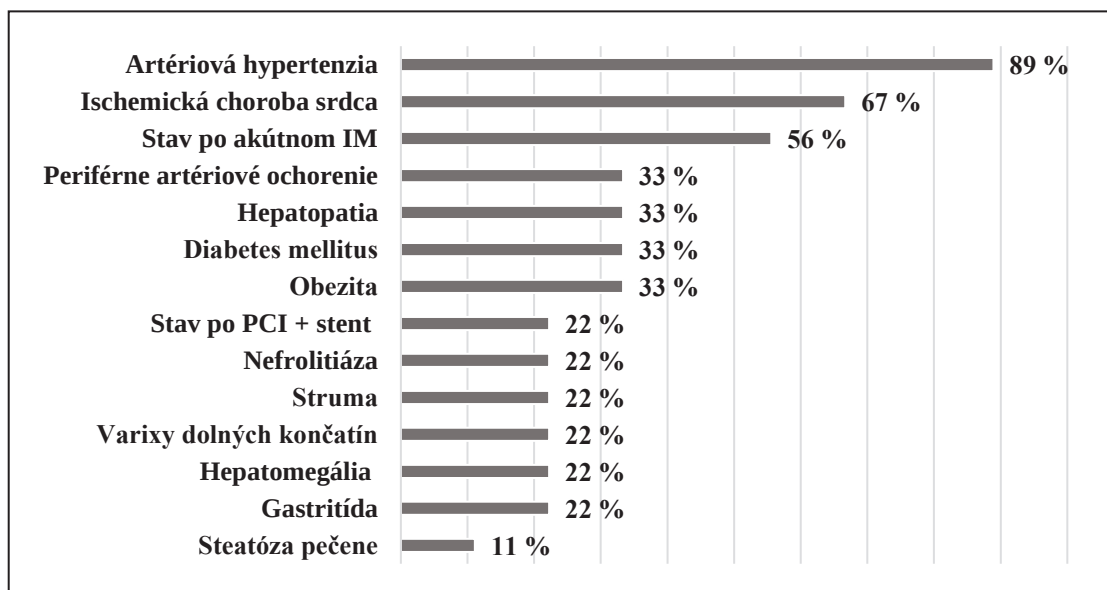
Najčastejšou komorbiditou u pacientov s dyslipidémiami bola artériová hypertenzia (89 %). Ischemickou chorobou srdca (ICHS) trpelo 67 % pacientov a akútny infarkt myokardu prekonalo 56 % pacientov. Ďalšími častými komorbiditami boli periférne artériové ochorenie, hepatopatia, *diabetes mellitus* 2. typu a obezita (33 %). U 22 % pacientov bola diagnostikovaná gastritída, nefrolitiáza, struma, varixy dolných končatín, hepatomegália alebo boli po

Tab. 1: Charakteristika pacientov

Pacient	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pohlavie	muž	muž	muž	muž	muž	muž	žena	žena	muž
Vek	31	42	58	59	62	66	68	71	77
Diagnóza	E78.0	E78.2	E78.2	E78.0	E78.2	E78.2	E78.2	E78.2	E78.0
Rizikový faktor – fajčenie	nie	áno	áno	nie	nie	nie	nie	nie	nie
Počet komorbidít	7	13	10	7	4	7	8	6	12

E78.0 Izolovaná hypercholesterolémia, E78.2 Zmiešaná hyperlipidémia

Graf 1: Zastúpenie jednotlivých komorbidít u pacientov



Tab. 2: Konvenčná hypolipidemická terapia

Konvenčná hypolipidemická monoterapia					
Pacient	1	3	4	5	7
Hypolipidemiká a denná dávka	ezetimib (10 mg)	atorvastatín (80 mg)	rosuvastatín (15 mg)	atorvastatín (80 mg)	ezetimib (10 mg)
Konvenčná kombinovaná hypolipidemická terapia					
Pacient	2	6	8	9	
Hypolipidemiká a denná dávka	atorvastatín (80 mg) a fenofibrát (145 mg)	atorvastatín (80 mg) a fenofibrát (215 mg)	atorvastatín (80 mg) a fenofibrát (145 mg)	ezetimib (10 mg) atorvastatín (40 mg)	

perkutánnej koronárnej intervencii (PCI). U jedného pacienta (11 %) bola diagnostikovaná steatóza pečene (viď graf 1).

Analýza farmakoterapie pacientov

Pred použitím biologickej liečby bolo 56 % (5) pacientov liečených monoterapiou konvenčnými hypolipidemikami a 44 % (4) pacientov užívalo kombinovanú hypolipidemickú liečbu (viď tab. 2).

Po zlyhaní konvenčnej farmakoterapie hypolipidemikami bola (56 %) (5) pacientom indikovaná terapia alirokumabom a 44 % (4) pacientom bol v terapii indikovaný evolokumab.

Efekt alirokumabu a evolokumabu na hodnoty celkového cholesterolu

Normálne hodnoty TC sú v rozpätí 2,9 – 5,0 mmol.l⁻¹ (Češka a kol., 2010). Aj po konvenčnej hypolipidemickej terapii boli zaznamenané zvýšené hodnoty TC u väčšiny pacientov. Pridanie alirokumabu ku konvenčným hypolipidemikám alebo zámena klasického hypolipidemika za alirokumab znížila po 12 mesiacoch priemere TC o 37 %. Terapia evolokumabom spôsobila pokles TC v priemere o 40 % (viď tab. 3).

Tab. 3: Hodnoty TC [mmol.l⁻¹] pred a po liečbe aliokumabom a evolokumabom

Pacient	Terapia s BL	Hodnota TC pred BL [mmol.l ⁻¹]	Hodnota TC po 12 mesiacoch liečby BL [mmol.l ⁻¹]	Zmena TC [%]
3	aliokumab (150 mg) atorvastatín (20 mg)	4,55	1,64	pokles o 64 %
4	aliokumab (150 mg)	6,6	3,66	pokles o 44,5 %
5	aliokumab (150 mg)	6,94	3,52	pokles o 49,2 %
7	aliokumab (75 mg) ezetimib (10 mg)	5,65	4,21	pokles o 25,4 %
9	aliokumab (150 mg) atorvastatín (40 mg)	3,88	4,34	nárast o 11,8 %
Priemer ± SD		5,52 ± 1,306	3,47 ± 1,083	pokles o 37 %
1	evolokumab (140 mg)	6,74	4,58	pokles o 32 %
2	evolokumab (140 mg) fenofibrát (200 mg) atorvastatín (80 mg)	7,34	3,68	pokles o 49,9 %
6	evolokumab (140 mg) atorvastatín (80 mg) fenofibrát (215 mg)	7,95	5,69	pokles o 28,4 %
8	evolokumab (140 mg)	7,29	3,62	pokles o 50,3 %
Priemer ± SD		7,33 ± 0,494	4,39 ± 0,970	pokles o 40 %

TC – celkový cholesterol, SD – smerodajná odchýlka, BL – Biologická liečba

Tab. 4: Hodnoty LDL-C v [mmol.l⁻¹] pred a po liečbe aliokumabom a evolokumabom

Pacient	Terapia s BL	Hodnota LDL-C pred BL [mmol.l ⁻¹]	Hodnota LDL-C po 12 mesiacoch liečby BL [mmol.l ⁻¹]	Zmena LDL-C [%]
3	aliokumab (150 mg) atorvastatín (20 mg)	3,3	0,6	pokles o 80 %
4	aliokumab (150 mg)	4,42	1,48	pokles o 66,5 %
5	aliokumab (150 mg)	4,8	1,34	pokles o 72,1 %
7	aliokumab (75 mg) ezetimib (10 mg)	3,8	2,44	pokles o 35,8 %
9	aliokumab (150 mg) atorvastatín (40 mg)	2,6	2,6	–
Priemer ± SD		3,78 ± 0,876	1,70 ± 0,723	pokles o 55 %
1	evolokumab (140 mg)	4,97	3,23	pokles o 35 %
2	evolokumab (140 mg) fenofibrát (200 mg) atorvastatín (80 mg)	4,28	2,14	pokles o 50 %
6	evolokumab (140 mg) atorvastatín (80 mg) fenofibrát (215 mg)	5	2,08	pokles o 58,4 %
8	evolokumab (140 mg)	4,86	0,95	pokles o 80,5 %
Priemer ± SD		4,77 ± 0,337	2,1 ± 0,931	pokles o 56 %

SD – smerodajná odchýlka, BL – Biologická liečba

Tab. 5: Hodnoty HDL-C v [mmol.l⁻¹] pred a po liečbe alirokumabom a evolokumabom

Pacient	Terapia s BL	Hodnota HDL-C pred BL [mmol.l ⁻¹]	Hodnota HDL-C po 12 mesiacoch liečby BL [mmol.l ⁻¹]	Zmena LDL-C [%]
3	alirokumab (150 mg) atorvastatín (20 mg)	0,83	0,72	pokles o 13,3 %
4	alirokumab (150 mg)	1,45	1,43	pokles o 1,4 %
5	alirokumab (150 mg)	1,71	1,66	pokles o 2,9 %
7	alirokumab (75 mg) ezetimib (10 mg)	1,59	1,32	pokles o 17 %
9	alirokumab (150 mg) atorvastatín (40 mg)	1,18	1,5	nárast o 27,1 %
Priemer ± SD		1,35 ± 0,352	1,32 ± 0,360	pokles o 2 %
1	evolokumab (140 mg)	1,27	1,29	pokles o 1,6 %
2	evolokumab (140 mg) fenofibrát (200 mg) atorvastatín (80 mg)	1,05	0,92	pokles o 12,4 %
6	evolokumab (140 mg) atorvastatín (80 mg) fenofibrát (215 mg)	1,38	0,82	pokles o 40,6 %
8	evolokumab (140 mg)	1,22	1,04	pokles o 14,8 %
Priemer ± SD		1,23 ± 0,137	1,01 ± 0,202	pokles o 18 %

STDEV – smerodajná odchýlka, BL – Biologická liečba

Efekt alirokumabu a evolokumabu na hodnoty LDL-cholesterolu

Normálne hodnoty LDL-C v krvnej plazme sa pohybujú od 1,2 do 3 mmol.l⁻¹ (Češka a kol., 2010). U všetkých pacientov, okrem pacienta 9, boli zaznamenané zvýšené hodnoty LDL-C pred BL. Po pridání alirokumabu alebo evolokumabu došlo skoro u všetkých pacientov k výraznému poklesu LDL-C. Pokles LDL-C minimálne o 50 % oproti východiskovej hodnote dosiahlo 67 % pacientov. Priemerný pokles LDL-C po 12 mesiacoch užívania alirokumabu bol na úrovni 55 % a podobne pri evolokumabe bol na úrovni 56 % (viď tab. 4).

Efekt alirokumabu a evolokumabu na hodnoty HDL-cholesterolu

Normálne hodnoty HDL-C sa pohybujú u mužov od 1,0 do 2,1 mmol.l⁻¹ a u žien od 1,2 mmol.l⁻¹ do 2,7 mmol.l⁻¹ (Češka a kol., 2010). V prípade sledovaných

pacientov boli hodnoty HDL-C pred a po biologickej terapii v norme, okrem pacienta 3, kde sú zaznamenané hodnoty HDL-C nižšie než 1 mmol.l⁻¹, čo predstavuje zvýšené riziko rozvoja kardiovaskulárnych ochorení. V prípade efektu alirokumabu bol u štyroch pacientov zaznamenaný pokles HDL-C a iba u pacienta 9 bol evidovaný nárast HDL-C po 12 mesiacoch liečby. Priemerný pokles HDL-C bol na úrovni 2 %. V prípade terapie evolokumabom došlo prevažne k poklesu HDL-C v priemere o 18 %. U pacientov 2 a 6 bola hodnota HDL-C menej ako 1 mmol.l⁻¹ (viď tab. 5).

Efekt alirokumabu a evolokumabu na hodnoty triacylglycerolov

Normálne hodnoty TAG sa pohybujú od 0,45 do 1,7 mmol.l⁻¹ (Češka a kol., 2010). U väčšiny pacientov boli priemerné hodnoty TAG pred BL zvýšené. Po 12 mesiacoch terapie alirokumabom došlo k poklesu

Tab. 6: Hodnoty TAG v [mmol.l⁻¹] pred a po liečbe aliokumabom a evolokumabom

Pacient	Terapia s BL	Hodnota TAG pred BL [mmol.l ⁻¹]	Hodnota TAG po 12 mesiacoch liečby BL [mmol.l ⁻¹]	Zmena TAG [%]
3	aliokumab (150 mg) atorvastatín (20 mg)	1,83	1,07	pokles o 41,5 %
4	aliokumab (150 mg)	3,39	3,03	pokles o 10,6 %
5	aliokumab (150 mg)	2,5	1,44	pokles o 42,4 %
7	aliokumab (75 mg) ezetimib (10 mg)	1,05	1,28	nárast o 21,9 %
9	aliokumab (150 mg) atorvastatín (40 mg)	0,84	0,96	nárast o 14,3 %
Priemer ± SD		1,92 ± 1,052	1,55 ± 0,844	pokles o 19 %
1	evolokumab (140 mg)	1,27	1,5	nárast o 18,1 %
2	evolokumab (140 mg) fenofibrát (200 mg) atorvastatín (80 mg)	8,01	3,44	pokles o 57,1 %
6	evolokumab (140 mg) atorvastatín (80 mg) fenofibrát (215 mg)	7,03	9,12	nárast o 29,7 %
8	evolokumab (140 mg)	3,39	2,33	pokles o 34,2 %
Priemer ± SD		4,92 ± 3,144	4,07 ± 3,458	pokles o 17 %

STDEV – smerodajná odchýlka, BL – Biologická liečba, TAG - triacylglyceroly

TAG v priemere o 19 % a pri terapii evolokumabom o 17 % (viď tab. 6).

DISKUSIA

Dyslipidémie patria medzi najzávažnejšie rizikové faktory rozvoja kardiovaskulárnych ochorení, hlavne ischemickej choroby srdca (ICHs). Výsledky z observačných štúdií, randomizovaných kontrolovaných štúdií a mendelovských randomizačných štúdií preukázali príčinnú súvislosť medzi LDL-C a aterosklerózou podmienenou kardiovaskulárnym ochorením (ASKVO) (Ference a kol., 2017; Benn a kol., 2018). Preto cieleňá klasická alebo biologická hypolipidemická liečba, či už v monoterapii alebo v synergicky pôsobiacich kombináciách, zohráva dôležitú úlohu v znížení kardiovaskulárneho rizika. Predovšetkým farmakoterapia zameraná na znižovanie LDL-C vedie k zníženiu mortality a morbiditu na kardiovaskulárne

ochorenia (Vráblik a Šnejdrová, 2010). V sledovanom súbore pacientov bolo 7 mužov a 2 ženy s priemerným vekom 59 rokov. V analyzovanej skupine pacientov malo 6 pacientov diagnostikovanú dyslipidémiu zmiešaného typu (E78.2), 2 pacientom bola diagnostikovaná hypercholesterolémia (E78.0) a 1 pacient (pacient 1) trpel familiárnou hypercholesterolémiou (FH) (E78.0). Pacienti s geneticky podmienenou hypercholesterolémiou majú od narodenia zvýšené sérové koncentrácie cholesterolu, čím dochádza k jeho ukladaniu v stenách tepien a rozvoju aterosklerózy. Následkom toho dochádza k predčasnej klinickej manifestácii aterosklerózy v podobe ischemickej kardiovaskulárnej príhody, ktorá v 1/3 prípadov končí fatálne (Goldstein a kol., 2001). Geneticky podmienená hypercholesterolémia sa vyskytuje buď ako autozomálne dominantná hypercholesterolémia (ADH) alebo autozomálne recesívna hypercholesterolémia (ARH). ADH predstavuje heterogénnu skupinu och-

rení. Táto heterozygotná forma FH sa vyskytuje v pomere 1 : 200 – 250 a klinicky sa manifestuje okolo 30. roku života. Najčastejšou formou je klasická FH, ktorá je spôsobená mutáciou génu, ktorý kóduje LDL receptor. To spôsobuje zvýšenie LDL-C v plazme, vznik šľachovitých a kožných xantómov a predčasnú a progresívnu aterosklerózu s následným výskytom kardiovaskulárnych ochorení a mortality (Bláha, 2014). Druhou formou ADH je FH spôsobená mutáciou génu pre apolipoproteín B, ktorý je ligandom pre LDL receptor, vyskytuje sa v 5 – 10 % prípadov (Bláha, 2014). Tretiu formu ADH predstavuje mutácia génu pre PCSK9 (Abifadel a kol., 2003).

U všetkých pacientov boli zistené aj pridružené ochorenia. Ich výskyt je dôležitý pri posúdení kardiovaskulárneho rizika a následného určenia stratégie hypolipidemickej liečby. Dvaja pacienti boli fajčiari (pacient 2 a 3). Fajčenie je jedným z rizikových faktorov, ktorý prispieva k rozvoju kardiovaskulárnych ochorení a zhoršuje kardiovaskulárne riziko. Kardiovaskulárne riziko znamená pravdepodobnosť, že u danej osoby dôjde k fatálnej alebo nefatálnej aterosklerotickej kardiovaskulárnej príhode v definovanom časovom intervale (Jánsky a kol., 2017). Podľa odporúčaní ECS a EAS (Európska spoločnosť pre aterosklerózu) všetky osoby s dokumentovaným kardiovaskulárnym ochorením, diabetom 1. alebo 2. typu, osoby s veľmi vysokými hodnotami individuálnych rizikových faktorov (napr. vysoký cholesterol, vysoký krvný tlak) a pacienti s chronickým ochorením obličiek sú zaradení medzi osoby s veľmi vysokým alebo vysokým celkovým kardiovaskulárnym rizikom. U týchto pacientov nie je potrebné používať model na odhad rizika, ale je potrebné aktívne intervenovať na úrovni všetkých rizikových faktorov (Jánsky a kol., 2017). Pri ostatných pacientoch sa kardiovaskulárne riziko odhaduje tabuľkou SCORE, ktorá využíva k stratifikácii kardiovaskulárneho rizika rizikové faktory ako vek, fajčenie, cholesterol, systolický krvný tlak. SCORE tabuľka odhaduje desaťročné kumulatívne riziko prvej fatálnej aterosklerotickej príhody, napr. infarktu myokardu, cievnej mozgovej príhody (Jánsky a kol., 2017).

Na základe týchto poznatkov môžeme konštatovať, že všetci deväti pacienti majú veľmi vysoké alebo vysoké kardiovaskulárne riziko. Pretože väčšina z nich okrem DLP trpela artériovou hypertenziou, ischemickou chorobou srdca alebo už prekonala infarkt myokardu, 3 pacienti trpeli diabetom 2. typu (pacient 3, 6, 9), alebo aj periférnym artériovým ochorením.

Z výsledkov rôznych klinických štúdií vyplýva, že LDL-C zostáva primárnym cieľom liečby a kľúčovým faktorom v prevencii rozvoja kardiovaskulárnych ochorení. Hladina LDL-C by sa mala čo najviac znížiť, aby sa zabránilo rozvoju kardiovaskulárnych ochorení, hlavne u pacientov s veľmi vysokým alebo vysokým kardiovaskulárnym rizikom. Redukcia rizika ASKVO závisí od poklesu LDL-C, ktorý je docielený nielen titráciou prvolíniových statínov, ale aj ich kombináciou s ezetimibom alebo inhibítormi PCSK9. Na základe medicíny založenej na dôkazoch došlo k zásadným zmenám cieľových hodnôt LDL-cholesterolu (Fábryová, 2021). U pacientov, hlavne diabetikov s veľmi vysokým rizikom je cieľom dosiahnuť LDL-C menej ako 1,4 mmol.l⁻¹ alebo najmenej 50 % redukcii oproti východiskovým hodnotám. U pacientov s vysokým kardiovaskulárnym rizikom je cieľom dosiahnuť hodnotu LDL-C menej ako 1,8 mmol.l⁻¹ alebo najmenej 50 % redukcii oproti východiskovým hodnotám LDL-C. Pre pacientov so stredným kardiovaskulárnym rizikom je cieľová hodnota LDL-C menej ako 2,6 mmol.l⁻¹ (Fábryová, 2021).

V prípade analyzovaných pacientov bolo 5 pacientov liečených klasickými hypolipidemikami v monoterapii a 4 pacientom bola predpísaná kombinovaná hypolipidemická liečba. To poukazuje na to, že terapia DLP je individuálna. V monoterapii sa použili v troch prípadoch statíny a 2 pacienti boli liečení iba ezetimibom. Súčasné štandardy prevencie kardio-cerebrovaskulárnych ochorení odporúčajú ako primárny cieľ ovplyvniť LDL-C statínmi. Zníženie LDL-C statínmi zohráva významnú úlohu aj v primárnej, tak aj v sekundárnej prevencii, ako u diabetikov, tak aj nediabetikov (Mach a kol., 2020; Cosentino a kol., 2020). Podľa kategórie kardiovaskulárneho rizika sa predpisuje vysoko intenzívna statínová terapia

(atorvastatín 40 – 80 mg, rosuvastatín 20 – 40 mg) alebo stredne intenzívna statínová terapia (atorvastatín 10 – 20 mg, rosuvastatín 5 – 10 mg, simvastatín 20 – 40 mg, fluvastatín 80 mg) (Fábryová, 2021). Na základe týchto údajov sa dá potvrdiť, že statínová monoterapia, ktorá bola predpísaná pacientom pred BL bola vysoko intenzívna. V rámci kombinovanej terapie bola najčastejšie indikovaná liečba statín + fibrát, ktorá bola predpísaná hlavne pacientom so zmiešanou DLP. Táto kombinácia hypolipidemík sa javí ako najúčinnnejšia voľba pri zmiešanej DLP, pri ktorej sa očakáva pokles LDL cholesterolu o 24 – 50 % (Vráblik a Šnejdrlová, 2010). Jeden pacient mal indikovanú kombinovanú terapiu ezetimibu a statínu. Ezetimib sa pridáva do liečby DLP, ak maximálne tolerované dávky statínov nevedú k dosiahnutiu cieľových hodnôt LDL-cholesterolu (Vráblik a Šnejdrlová, 2010). Táto kombinácia spôsobuje tzv. duálnu inhibíciu sprostredkovanú jednak zablokovaním absorpcie exogénneho cholesterolu v tenkom čreve a jednak inhibíciu syntézy cholesterolu v pečeni, tým sa zvýši účinok na pokles LDL cholesterolu, ktorý sa očakáva až na úrovni 39 – 60 %. Dvaja pacienti (1 a 7) mali pred BL indikovaný ezetimib aj v monoterapii, ktorý je väčšinou predpísaný u pacientov netolerujúcich statíny. Hypolipidemická účinnosť ezetimibu je v porovnaní so statínmi výrazne nižšia, prináša približne 15 – 20 % zníženie hladín LDL-C, čo prispieva k podstatnému zníženiu kardiovaskulárneho rizika (Vráblik a Šnejdrlová, 2010). Ako ukazujú výsledky hodnôt lipidového spektra u pacientov, táto vysoko-intenzívna terapia konvenčnými hypolipidemikami nedosiahla cieľové hodnoty LDL-C. Z tohto dôvodu bola pacientom indikovaná BL inhibítormi PCSK9.

Inhibícia PCSK9 poskytuje príležitosť znížiť LDL-C na nižšiu úroveň, ktorá bola nedosiahnuteľná statínmi a/alebo ezetimibom. Inhibítory PCSK9 alirokumab a evolokumab sú vhodnou terapiou u vysokorizikových pacientov alebo u pacientov s intoleranciou statínov (Fábryová, 2021). Na dosiahnutie cieľových hodnôt pre LDL-C sa u pacientov s veľmi vysokým rizikom a vysokým rizikom odporúča kombinovaná hypolipidemická liečba (intenzifikovaná statínová

liečba v kombinácii najprv s ezetimibom a potom s inhibítormi PCSK9) (Fábryová, 2019). PCSK 9 inhibítory v priemere znižujú hladinu celkového cholesterolu o 25 – 40 %, LDL-C o 50 – 65 %, TAG o 8 – 20 % a zvyšujú koncentráciu HDL-C o 5 – 9 % (Navarese a kol., 2015; Squizzato a kol., 2017). Tieto výsledky potvrdzuje aj naša analýza, keď 12-mesačná terapia alirokumabom, či už v monoterapii alebo kombinovanej hypolipidemickej liečbe, spôsobila priemerný pokles TC o 37 % a 12-mesačná terapia evolokumabom v monoterapii alebo v kombinovanej hypolipidemickej liečbe spôsobila priemerný pokles TC o 40 %.

Zároveň z výsledkov našej štúdie vyplýva, že pridanie alebo náhrada konvenčných hypolipidemík alirokumabom alebo evolokumabom po 12 mesiacoch splnila požadovanú 50 % redukciiu LDL-C oproti východiskovej hodnote u 67 % sledovaných pacientov. Priemerne 12-mesačná terapia alirokumabom spôsobila 55 % pokles LDL-C a 12-mesačná terapia evolokumabom spôsobila 56 % pokles LDL-C. Tieto výsledky môžu prispieť k zníženiu kardiovaskulárneho rizika a poklesu kardiovaskulárnych príhod u pacientov. Túto skutočnosť potvrdzujú aj publikované výsledky v roku 2015 ročného podávania alirokumabu, ktoré ukázali, že dochádzalo nielen k ovplyvneniu lipidového spektra, ale najmä k poklesu kardiovaskulárnych príhod o 54 % (Fábryová, 2016). U pacienta 7 a 1 pridaná BL spôsobila v priemere pokles LDL-C oproti východiskovej hodnote o 35 %. V prípade pacienta 9 nedošlo k žiadnej zmene LDL-C po 12-mesačnej terapii 150 mg alirokumabom v kombinácii s 40 mg atorvastatínom. Vo všetkých troch prípadoch by bolo možné prehodnotiť terapiu, či už zvýšením dávky alirokumabu v prípade pacienta 7, alebo pridaním ďalšieho konvenčného hypolipidemika k indikovanej terapii DLP.

Výsledky štúdie ODYSSEY, ktoré hodnotili dlhodobý efekt alirokumabu na výskyt hlavných KV príhod, potvrdili účinnosť alirokumabu. Táto štúdia sledovala 18 924 pacientov po nedávno prekonanom akútnom koronárnom syndróme. Liečba alirokumabom viedla k 15 % redukcii primárneho end-pointu

(úmrtie pre ICHS, nefatálny infarkt myokardu, hospitalizácia pre nestabilnú angínu pectoris a ischemické cievne mozgové príhody) a 14 % redukcii ďalšieho trojbodového kompozitného cieľa (úmrtie z akejkoľvek príčiny, nefatálny infarkt myokardu a cievna mozgová príhoda) (Schwartz a kol., 2018). Alirokumab prispel k zníženiu KV príhod u pacientov s viacpočetným cievnyim postihnutím aj u pacientov po aortokoronárnom bypasse (Goodman a kol., 2019). Podobne ako evolokumab, aj alirokumab znížil kardiovaskulárne riziko bez ohľadu na prítomnosť *diabetes mellitus* a jeho podávanie nebolo spojené s vývojom nových prípadov *diabetes mellitus* (Ray a kol., 2019). Alirokumab znižoval riziko končatinových príhod v závislosti od vstupnej hodnoty a redukcie lipoproteínu [(a) (Lp(a))] (Schwartz a kol., 2020). Lp(a) má rovnakú molekulárnu štruktúru ako LDL častice. Lp(a) je vysoko aterogénny a kumuluje sa v subendotelovom priestore ciev podobne ako LDL (Fábryová, 2009b). Dôkazy z epidemiologických a mendelovských randomizačných štúdií podporujú vzťah Lp(a) k ICHS. U jedincov s veľmi vysokou hladinou Lp(a) ($> 430 \text{ mmol.l}^{-1}$), s geneticky podmienenou poruchou metabolizmu lipidov pravdepodobne existuje celoživotné vysoké riziko vzniku ASKVO, podobne ako je to u pacientov s heterozygotnou FH. V súčasnosti sú možnosti liečby vysokého Lp(a) obmedzené na inhibítory PCSK9, u ktorých sa dokázalo, že v priemere znižujú hladiny Lp(a) o 25 – 30 % s/alebo bez liečby statínmi (Kamstrup, 2017; Tsimikas a kol., 2018, Ray a kol., 2019). Účinok alirokumabu nastupuje rýchlo, už po niekoľkých týždňoch liečby a má pretrvávajúci charakter. Až 80 % zaradených vysokorizikových pacientov pri liečbe alirokumabom v kombinácii so zavedenou terapiou dosahovalo cieľové hodnoty pre LDL-cholesterol (Fábryová, 2016).

Ďalšie výsledky štúdie FOURIER potvrdili, že liečba evolokumabom viedla k signifikantnej redukcii zloženého end-pointu: KV úmrtie, infarkt myokardu, cievna mozgová príhoda, hospitalizácia pre nestabilnú angínu pectoris alebo koronárna revaskularizácia s 15 % redukciou relatívneho rizika počas 2,2 roka a 1,5 % redukciou absolútneho rizika (Fábryová,

2021). Následná subanalýza ukázala, že čím má pacient rozsiahlejšie postihnutie koronárneho riečišťa, tým viac profituje z liečby evolokumabom (Sabatine a kol., 2018). Evolokumab významne znížil výskyt hlavných kardiovaskulárnych príhod u pacientov s ischemickou chorobou dolných končatín. Evolokumab v závislosti od poklesu LDL-C redukoval výskyt hlavných končatinových príhod, napr. urgentných revaskularizácií, akútnych ischemií dolných končatín, a vysokých amputácií dolných končatín (Bonaca a kol., 2018). Štúdia FOURIER potvrdila, že čím boli dosiahnuté nižšie hladiny LDL-C evolokumabom, tým bola dosiahnutá vyššia redukcia KV rizika (Giugliano a kol., 2017). Evolokumab znižoval kardiovaskulárne príhody konzistentne bez ohľadu na vek, pohlavie, prítomnosť diabetu alebo chronické ochorenie obličiek (Sabatine a kol., 2017; Charytan a kol., 2019). Ako demonštrovali výsledky štúdie ODYSSEY a FOURIER, inhibítory PCSK9 sú dobre tolerované, vykazujú nízky výskyt miernych nežiaducich účinkov, ktoré boli v podobe infekcií respiračného traktu, nazofaryngitídy a reakcií v mieste vpichu (Chaudhary a kol., 2017; Kosmas a kol., 2020).

V našej štúdii spôsobila 12-mesačná terapia alirokumabom alebo evolokumabom priemerný pokles TAG o 18 % (alirokumab) a o 17 % (evolokumab) u sledovaných pacientov. Tento výsledok koreluje so štúdiami, ktoré preukazujú, že PCSK9 inhibítory redukovávajú TAG o 8 – 20 % (Navarese a kol., 2015; Squizzato a kol., 2017). U pacientov so zvýšeným kardiovaskulárnym rizikom (diabetikov 2. typu, u pacientov s prediabetom, metabolickým syndrómom) býva bežne prítomná mierna hypertriacylglycerolémia (hTAG) ($1,7 - 2,3 \text{ mmol.l}^{-1}$). V našej štúdii bola hTAG prítomná pred BL u 67 % pacientov. Po 12-mesačnej terapii alirokumabom alebo evolokumabom sa vyskytovala hTAG u 44 % (4) pacientov. Zvýšené hodnoty TAG sa spájajú s množstvom ďalších potenciálnych rizikových faktorov vrátane obezity, inzulínovej rezistencie, zvýšenými hladinami všetkých lipoproteínových častíc obsahujúcich apoproteín B a s nízkymi hladinami HDL-C (Chait a kol., 2020). Nedávne genetické a klinické štúdie s fibrátmi podporujú hypotézu úlohy

TAG v kardiovaskulárnych ochoreniach (Sanderasa a kol., 2019). Pri hTAG ostávajú liečbou 1. voľby statíny, prípadne ich kombinácia s fibrátmi. V ďalšom postupe sú vhodné omega 3 mastné kyseliny, hlavne u vysokorizikových pacientov s trvalo zvýšenými TAG ($1,5 - 5,6 \text{ mmol.l}^{-1}$) (Mach a kol., 2020; Cosentino a kol., 2020). Súčasťou terapie DLP by mala byť aj intervencia zameraná na životný štýl, ako napr. zníženie príjmu alkoholu a jednoduchých sacharidov, redukcia hmotnosti.

V našej štúdii boli sledované aj hodnoty HDL-C, ktoré u väčšiny sledovaných pacientov boli pred a po BL v rámci normy. Avšak naše výsledky nekorelujú s výsledkami klinických štúdií, ktoré uvádzajú, že PCSK9 inhibítory zvyšujú koncentráciu HDL-C o 5 – 9 % (Navarese a kol., 2015, Squizzato a kol., 2017). Dvanásťmesačná terapia alirokumabom spôsobila pokles HDL-C u väčšiny pacientov, okrem pacienta 9, kde bol zaznamenaný nárast o 27,1 %. Z toho vyplýva, že priemerná hodnota HDL-cholesterolu po 12 mesiacoch terapie alirokumabom vykazovala iba mierne zníženie o 2 %. Podobne aj 12-mesačná terapia evolokumabom spôsobila u 3 pacientov pokles HDL-C a u jedného pacienta mierny nárast HDL-C. Nízka koncentrácia HDL cholesterolu je spojená s vyšším rizikom ochorenia koronárnych ciev srdca (Sniderman a Stowasser, 2018). Kardiovaskulárne ochorenia sú aj napriek zlepšenej liečbe stále hlavnou príčinou morbidita a mortality. Stále viac pacientov prežíva prvú kardiovaskulárnu príhodu a zostáva vo vysokom riziku recidívy. Okrem toho sa zvyšuje prevalencia rizikových faktorov, hlavne diabetu a obezity. Preto význam prevencie kardiovaskulárnych ochorení je veľmi dôležitý. Prevencia sa môže vykonávať či už na úrovni celej populácie alebo na úrovni jednotlivca. Prevencia by mala byť zameraná na ovplyvnenie životosprávy, napr. nevhodné diéty, fyzická inaktivita, fajčenie a zníženie zvýšených kardiovaskulárnych rizikových faktorov, ako je napr. zvýšenie lipidových hodnôt alebo zvýšenie krvného tlaku. Odstránenie rizikových návykov by umožnilo predísť aspoň 80 % kardiovaskulárnych ochorení, 40 % nádorových ochorení a tiež by pomohlo znížiť

výskyt iných chronických ochorení (Jánsky a kol., 2017).

ZÁVER

Farmakoterapia DLP je základom v znižovaní kardiovaskulárneho rizika. V súčasnosti sa v klinickej praxi používa široká škála hypolipidemík vrátane BL, ktoré sú zamerané na znižovanie hladiny LDL-C. Podľa súčasných európskych a amerických odporúčaní sa inhibítory PCSK9 stávajú súčasťou liečby dyslipidémií v primárnej aj sekundárnej prevencii nad rámec štandardnej terapie. Z výsledkov našej štúdie vyplýva, že terapia DLP je individuálna, a že BL alirokumabom a evolokumabom bola efektívna. Prídanie alebo náhrada konvenčných hypolipidemík alirokumabom alebo evolokumabom po 12 mesiacoch splnila požadovanú 50 % redukciu LDL-C oproti východiskovej hodnote u 67 % sledovaných pacientov. Priemerne 12-mesačná terapia alirokumabom spôsobila 55 % pokles LDL-C a 12-mesačná terapia evolokumabom spôsobila 56 % pokles LDL-C. Navyše došlo k poklesu TC a TAG skoro u všetkých pacientov. Tieto výsledky môžu prispieť k zníženiu kardiovaskulárneho rizika a poklesu kardiovaskulárnych príhod u pacientov.

Efektívna BL prináša benefit pre pacienta a môže prispieť k zlepšeniu prognózy jeho ochorenia. Pre úspešnosť liečby je okrem farmakoterapie dôležitá aj adherencia pacienta k liečbe a implementácia zdravého životného štýlu.

POĎAKOVANIE

Podakovanie patrí MUDr. Adriane Krajňákovej z internej ambulancie v Bardejove za poskytnutie potrebných informácií o pacientoch a ich terapii.

ZOZNAM LITERATÚRY

Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J. P. Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derré, A., Villé-

- ger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J. M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N. G., Boileau, C.: Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.*, 2003, 34, 154 – 156.
- Arnett, D. K., Blumenthal, R. S., Albert, M. A., Buroker, A. B., Goldberger, Z. D., Hahn, E. J., Himmelfarb, C. D., Khera, A., Lloyd-Jones, D., McEvoy, J. W., Michos, E. D., Miedema, M. D., Muñoz, D., Smith, S. C Jr., Virani, S. S., Williams, K. A. Sr., Yeboah, J., Ziaeian, B.: 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 2019, 140, E596 – E646.
- Ballantyne, C. M.: Ezetimibe efficacy and safety in clinical trials. *Eur. Heart. J. Supplements*, 2002, 4 (Suppl J), J9 – J18.
- Benn, M., Nordestgaard, B. G.: From genome-wide association studies to Mendelian randomization: novel opportunities for understanding cardiovascular disease causality pathogenesis, prevention, and treatment. *Cardiovasc. Res.*, 2018, 114, 1192 – 1208.
- Bláha, V.: Léčba hypercholesterolemie inhibitory PCSK9 [Treatment of hypercholesterolemia with PCSK9 inhibitors]. *Interní Med.*, 2014, 15 (5), 179 – 183.
- Bonaca, M. P., Nault, P., Giugliano, R. P., Keech, A. C., Pineda, A. L., Kanevsky, E., Kuder, J., Murphy, S. A., Jukema, J. W., Lewis, B. S., Tokgozoglu, L., Somaratne, R., Sever, P. S., Pedersen, T. R., Sabatine, M. S.: Low-density lipoprotein cholesterol lowering with evolocumab and outcomes in patients with peripheral artery disease: insights from the FOURIER trial (Further Cardiovascular Outcomes Research With PCSK9 Inhibition in Subjects With Elevated Risk). *Circulation*, 2018, 137, 338 – 350.
- Colin, S., Chinetti-Gbaguidi, G., Kuivenhoven, J. A., Staels, B.: Emerging small molecule drugs. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2015, 224, 617 – 630.
- Cosentino, F., Grant, P. J., Aboyans, V., Bailey, C. J., Ceriello, A., Delgado, V., Federici, M., Filippatos, G., Grobbee, D. E., Hansen, T. B., Huikuri, H. V., Johansson, I., Jüni, P., Lettino, M., Marx, N., Mellbin, L. G., Östgren, C. J., Rocca, B., Roffi, M., Sattar, N., Seferović, P. M., Sousa-Uva, M., Valensi, P., Wheeler, D. C., ESC Scientific Document Group: 2019 Guidelines on Diabetes, Pre-Diabetes and Cardiovascular Diseases developed in collaboration with the EASD. *Eur. Heart J.*, 2020, 41 (2), 255 – 323.
- Češka, R. a kol.: *Interna* [Internal Medicine]. 1. Praha: Triton, 2010, s. 256.
- Davignon, J.: Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation*, 2004, 109 (23 Suppl. 1), III 39 – 43.
- Eaton, B. Ch.: Hyperlipidemia. *Prim. Care Clin. Office Pract.*, 2005, 32 (4), 1027 – 1055.
- Fábryová, E.: Hypolipidemická liečba v prevencii aterosklerózy u diabetikov [Hypolipidemic treatment in the prevention of atherosclerosis in diabetics]. *Forum Diab.*, 2021, 10 (Suppl. 1), 28 – 36.
- Fábryová, E.: Inhibitory PCSK9v manažmente pacientov s vysokým kardiovaskulárnym rizikom-efektívna liečba na dosah [PCSK9 inhibitors in the management of patients with high cardiovascular risk - effective treatment within reach]. *Athero-Rev.*, 2016, 1 (1), 42 – 48.
- Fábryová, E.: Novinky v ESC/EAS odporúčaniach 2019 pre manažment dyslipidémií [News in the 2019 ESC/EAS recommendations for the management of dyslipidemias] *Via pract.*, 2019, 16 (6), 242 – 246.
- Fábryová, E.: Etiopatogenéza aterosklerotického procesu [Etiopathogenesis of the atherosclerotic process]. *Via pract.*, 2009, 6 (2), 69 – 75.
- Fábryová, E.: Klasifikácia dyslipoproteinémií: 1. časť – primárne dyslipoproteinémie [Classification of dyslipoproteinemias: Part 1 – primary dyslipoproteinemias]. *Via pract.*, 2009a, 6 (5), 205 – 210.
- Feher, M. D., Foxton, J., Banks, D., Lant, A. F., Wray, R.: Long-term safety of statin-fibrate combination treatment in the management of hyper-

cholesterollaemia in patients with coronary artery disease. *Br. Heart J.*, 1995, 74, 14 – 17.

Ference, B. A., Ginsberg, H. N., Graham, I., Ray, K. K., Packard, C. J., Bruckert, E., Hegele, R. A., Krauss, R. M., Raal, F. J., Schunkert, H., Watts, G. F., Borén, J., Fazio, S., Horton, J. D., Masana, L., Nicholls, S. J., Nordestgaard, B. G., van de Sluis, B., Taskinen, M. R., Tokgözoğlu, L., Landmesser, U., Laufs, U., Wiklund, O., Stock, J. K., Chapman, M. J., Catapano, A. L.: Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart J.*, 2017, 38, 2459 – 2472.

Gavorník, P., Dukát, A., Gašpar, E.: Manažment dyslipidémií – prítomnosť a budúcnosť. Odporúčania Angiologickej sekcie Slovenskej lekárskej komory (2013) [Management of dyslipidaemias – present and future. Recommendations of the Angiology Section of the Slovak Medical Chamber (2013)]. *Vnitř. Lék.*, 2013, 59 (10), 932 – 938.

Giugliano, R. P., Pedersen, T. R., Park, J. G., De Ferrari, G. M., Gaciong, Z. A., Ceska, R., Toth, K., Gouni-Berthold, I., Lopez-Miranda, J., Schiele, F., Mach, F., Ott, B. R., Kanevsky, E., Pineda, A. L., Somaratne, R., Wasserman, S. M., Keech, A. C., Sever, P. S., Sabatine, M. S.: FOURIER Investigators. Clinical efficacy and safety of achieving very low LDL-cholesterol concentrations with the PCSK9 inhibitor evolocumab: a prespecified secondary analysis of the FOURIER trial. *Lancet*, 2017, 390, 1962 – 1971.

Goldstein, J. L., Hobbs, H. H., Brown, M. S.: Familial hypercholesterolemia. In: Scriver, Ch., Beaudet, A., Sly, W. S., Walle, D. (Eds.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th edn. New York: McGraw-Hill, inc., 2001, 3, 2863 – 2914.

Goodman, S. G., Aylward, P. E., Szarek, M., Chumburidze, V., Bhatt, D. L., Bittner, V. A., Diaz, R., Edelberg, J. M., Hanotin, C., Harrington, R. A., Jukema, J. W., Kedev, S., Letierce, A., Moryusef, A., Pordy, R., Ramos, López, G. A., Roe, M. T., Viigimaa,

M., White, H. D., Zeiher, A. M., Steg, P. G., Schwartz, G. G.: ODYSSEY OUTCOMES Committees and Investigators. Effects of alirocumab on cardiovascular events after coronary bypass surgery. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2019, 74, 1177 – 1186.

Chait, A., Ginsberg, H. N., Vaisar, T., Heinecke, J. W., Goldberg, I. J., Bornfeldt, K. E.: Remnants of the triglyceride-rich lipoproteins, diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes*, 2020, 69 (4), 508 – 516.

Chapman, M. J.: Fibrates: therapeutic review. *British Journal of Diabetes and Vascular Disease*, 2006, 6 (1), 11 – 18.

Charytan, D. M., Sabatine, M. S., Pedersen, T. R., Im, K., Park, J. G., Pineda, A. L., Wasserman, S. M., Deedwania, P., Olsson, A. G., Sever, P. S., Keech, A. C., Giugliano, R. P.: FOURIER Steering Committee and Investigators. Efficacy and safety of evolocumab in chronic kidney disease in the FOURIER trial. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2019, 73, 2961 – 2970.

Chaudhary, R., Garg, J., Shah, N., Sumner A.: PCSK9 Inhibitors: a new era of lipid lowering therapy. *World J. Cardiol.*, 2017, 9, 76 – 91.

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

Jánský, P., Rosolová, H., Vrablík, M.: 2016 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: Summary of the document prepared by the Czech Society of Cardiology, *Cor et Vasa*, 59, 2017, e389 – e415.

Kamstrup, P. R.: Lipoprotein(a): the common, likely causal, yet elusive risk factor for cardiovascular disease. *J. Lipid Res.*, 2017, 58, 1731 – 1732.

Karásek, D.: Biologická léčba dyslipidemií [Biological treatment of dyslipidemia]. *Vnitř. Lék.*, 2021, 67 (4), 206 – 211.

Kosmas, C. E., Skavdis, A.; Sourlas, A., Papakonstantinou, E. J., Peña Genao, E., Echavarría Uceta, R., Guzman, E.: Safety and tolerability of

PCSK9 inhibitors: current insights. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.*, 2020, 12, 191 – 202.

Kosmas, C. E., Pantou, D., Sourlas, A., Papakonstantinou, E. J., Echavarria Uceta, R., Guzman, E.: New and emerging lipid-modifying drugs to lower LDL cholesterol. *Drugs Context*, 2021, 10, 1 – 22.

Laššánová, M., Tisoňová, J., Kriška, M.: Môžu byť problémy pri liečbe statínmi? [There may be problems with statin therapy?] *Klin. Farmakol. Farm.*, 2005, 19, 160 – 164.

Mach, F., Baigent, C., Catapano, A. L., Koskinas, K. C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M. J., De Backer, G. G., Delgado, V., Ference, B. A., Graham, I. M., Halliday, A., Landmesser, U., Mihaylova, B., Pedersen, T. R., Riccardi, G., Richter, D. J., Sabatine, M. S., Taskinen, M. R., Tokgozoglu, L., Wiklund, O., ESC Scientific Document Group: 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur. Heart J.*, 2020, 41, 111 – 188.

Margóczy, R.: Preventívna kardiológia v súčasnosti [Preventive cardiology today]. *Monitor medicíny SLS*, 2023, 14 (3 – 4), 9 – 14.

Mirossay, L., Mojžiš, J.: *Základná farmakológia a farmakoterapia* [Basic Pharmacology and Pharmacotherapy]. I. vyd. Košice: Equilibria, 2021, 760 s.

Muscoli, S., Ifrim, M., Russo, M., Candido, F., Sanseviero, A., Milite, M., Di Luozzo, M., Marchei, M., Sangiorgi, G. M.: Current options and future perspectives in the treatment of dyslipidemia. *J. Clin. Med.*, 2022, 11, 4716.

Navarese, E. P., Kolodziejczak, M., Schulze, V., Gurbel, P. A., Tantry, U., Lin, Y., Brockmeyer, M., Kandzari, D. E., Kubica, J. M., D'Agostino, R. B. Sr., Kubica, J., Volpe, M., Agewall, S., Kereiakes, D. J., Kelm, M.: Effects of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 antibodies in adults with hypercholesterolemia: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.*, 2015, 163, 40 – 51.

Oleárová, A., Jurečková, K., Lehocká, Ľ., Masaryková, L.: Nové možnosti cielej liečby dyslipoproteinémií [New options for targeted treatment

of dyslipoproteinemias]. *Praktické lekárnictvo*, 2015, 5 (3 – 4), 92 – 96.

Ray, K. K., Colhoun, H. M., Szarek, M., Baccara-Dinet, M., Bhatt, D. L., Bittner, V. A., Budaj, A. J., Diaz, R., Goodman, S. G., Hanotin, C., Harrington, R. A., Jukema, J. W., Loizeau, V., Lopes, R. D., Moryusef, A., Murin, J., Pordy, R., Ristic, A. D., Roe, M. T., Tuñón, J., White, H. D., Zeiher, A. M., Schwartz, G. G., Steg, P. G.: ODYSSEY OUTCOMES Committees and Investigators.: ODYSSEY OUTCOMES Committees and Investigators. Effects of alirocumab on cardiovascular and metabolic outcomes after acute coronary syndrome in patients with or without diabetes: a prespecified analysis of the ODYSSEY OUTCOMES randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, 2019, 7, 618 – 628.

Ray, K. K., Vallejo-Vaz, A. J., Ginsberg, H. N., Davidson, M. H., Louie, M. J., Bujas-Bobanovic, M., Minini, P., Eckel, R. H., Cannon, C. P.: Lipoprotein(a) reductions from PCSK9 inhibition and major adverse cardiovascular events: pooled analysis of alirocumab phase 3 trials. *Atherosclerosis*, 2019, 288, 194 – 202.

Robinson, J. G., Farnier, M., Krempf, M., Bergeron, J., Luc, G., Aversa, M., Stroes, E. S., Langslet, G., Raal, F. J., El Shahawy, M., Koren, M. J., Lepor, N. E., Lorenzato, C., Pordy, R., Chaudhari, U., Kastelein, J. J.: ODYSSEY LONG TERM Investigators: Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.*, 2015, 372, 1489 – 1499.

Sabatine, M. S., De Ferrari, G. M., Giugliano, R. P., Huber, K., Lewis, B. S., Ferreira, J., Kuder, J. F., Murphy, S. A., Wiviott, S. D., Kurtz, C. E., Honarpour, N., Keech, A. C., Sever, P. S., Pedersen, T. R.: Clinical benefit of evolocumab by severity and extent of coronary artery disease: analysis from FOURIER. *Circulation*, 2018, 138, 756 – 766.

Sabatine, M. S., Giugliano, R. P., Wiviott, S. D., Raal, F. J., Blom, D. J., Robinson, J., Ballantyne, C. M., Somaratne, R., Legg, J., Wasserman, S. M., Scott, R., Koren, M. J., Stein, E. A. Open-Label Study of Long-Term Evaluation against LDL Cholesterol

(OSLER) Investigators.: Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.*, 2015, 372, 1500 – 1509.

Sabatine, M. S., Leiter, L. A., Wiviott, S. D., Giugliano, R. P., Deedwania, P., De Ferrari, G. M., Murphy, S. A., Kuder, J. F., Gouni-Berthold, I., Lewis, B. S., Handelsman, Y., Pineda, A. L., Honarpour, N., Keech, A. C., Sever, P. S., Pedersen, T. R.: Cardiovascular safety and efficacy of the PCSK9 inhibitor evolocumab in patients with and without diabetes and the effect of evolocumab on glycaemia and risk of new-onset diabetes: a prespecified analysis of the FOURIER randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, 2017, 5, 941 – 950.

Sandesara, P. B., Virani, S. S., Fazio, S., Shapiro M. D.: The forgotten lipids: triglycerides, remnant cholesterol, and atherosclerotic cardiovascular disease risk. *Endocr. Rev.*, 2019, 40 (2), 537 – 557.

Schwartz, G. G., Steg, P. G., Szarek, M., Bhatt, D. L., Bittner, V. A., Diaz, R., Edelberg, J. M., Goodman, S. G., Hanotin, C., Harrington, R. A., Jukema, J. W., Lecorps, G., Mahaffey, K. W., Moryusef, A., Pordy, R., Quintero, K., Roe, M. T., Sasiela, W. J., Tamby, J. F., Tricoci, P., White, H. D., Zeiher, A. M.: ODYSSEY OUTCOMES Committees and Investigators. Alirocumab and cardiovascular outcomes after acute coronary syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 2018, 379, 2097 – 2107.

Schwartz, G. G., Steg, P. G., Szarek, M., Bittner, V. A., Diaz, R., Goodman, S. G., Kim, Y. U., Jukema, J. W., Pordy, R., Roe, M. T., White, H. D., Bhatt, D. L.: ODYSSEY OUTCOMES Committees and Investigators. Peripheral artery disease and venous thromboembolic events after acute coronary syndrome: role of lipoprotein(a) and modification by alirocumab: prespecified analysis of the ODYSSEY OUTCOMES Randomized Clinical Trial. *Circulation*, 2020, 141, 1608 – 1617.

Sniderman, A., Stowasser, M.: *Rýchle fakty: Hyperlipidémia* [Fast facts: Hyperlipidemia] 1. vyd. Bratislava: Dr. Josef Raabe Slovensko, 2018, s. 144.

Squizzato, A., Suter, M. B., Nerone, M., Giugliano, R. P., Dentali, F., Maresca, A. M., Campiotti, L., Grandi, A. M., Guasti, L.: PCSK9 inhibitors for treating dyslipidemia in patients at different cardiovascular risk: a systematic review and a meta-analysis. *Intern. Emerg. Med.*, 2017, 12, 1043 – 1053.

Tsimikas, S., Fazio, S., Ferdinand, K. C., Ginsberg, H. N., Koschinsky, M. L., Marcovina, S. M., Moriarty, P. M., Rader, D. J., Remaley, A. T., Reyes-Soffer, G., Santos, R. D., Thanassoulis, G., Witztum, J. L., Danthi, S., Olive, M., Liu, L.: NHLBI Working Group recommendations to reduce lipoprotein(a)-mediated risk of cardiovascular disease and aortic stenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2018, 71, 177 – 192.

Vráblik, M., Šnejdrlová, M.: Farmakoterapie dyslipidemií [Pharmacotherapy of dyslipidemias] *Medicína pro praxi*, 2010, 7 (1), 6 – 8.



STANOVENIE STABILITY NOVÝCH KARBAMÁTOVÝCH DERIVÁTOV AKO INHIBÍTOROV CHOLÍNESTERÁZ

DETERMINATION OF STABILITY OF NEW CARBAMATE DERIVATES AS CHOLINESTERASE INHIBITORS

Ungvarská Maľučká, Lucia; Drabiková, Anna; Salayová, Aneta

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

lucia.ungvarska.malucka@uvlf.sk

ABSTRAKT

Karbamátová funkčná skupina je dôležitou súčasťou mnohých liečiv a proliečiv. Karbamáty sú súčasťou mnohých schválených liekov, ktoré pôsobia ako chemoterapeutiká, inhibítory cholínesterázy pri liečbe neurodegeneratívnych ochorení, vírusu ľudskej imunodeficiencie, antikonvulzíva a svalové relaxanciá. Koncept stability vo farmácii sa vzťahuje na liečivá, ale aj na liečivé prípravky. V oboch prípadoch sa vykonávajú testy stability, ktorých cieľom je preukázať, ako sa mení kvalita liečiva v čase v dôsledku pôsobenia rôznych faktorov (teplota, vlhkosť, svetlo, pH). Karbamáty sú z chemického hľadiska deriváty kyseliny karbámovej a možno ich štruktúrne považovať za hybridy „amidu-esteru“, ktoré sú chemicky stabilné. Vplyvom pH a teploty môže však dochádzať

k zmenám v ich chemickej štruktúre, napríklad ich hydrolýzou na amín a oxid uhličitý. Štúdia je zameraná na stanovenie stability karbamátov ako potenciálnych inhibítorov acetylcholínesterázy pomocou chromatografie na tenkej vrstve, nukleárnej magnetickej rezonancie a pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie.

Kľúčové slová: 1D a 2D NMR; HPLC; inhibítory acetylcholínesterázy; karbamáty; stabilita; TLC; UV/Vis

ABSTRACT

Carbamate functional group is an important part of many drugs and prodrugs. Carbamate group is a part of many approved drugs that act as chemotherapeutics, cholinesterase inhibitors

in the treatment of neurodegenerative diseases, human immunodeficiency virus, anticonvulsants, muscle relaxants. The concept of stability in pharmaceuticals applies both to drugs and to medicinal preparations. In both cases, stability tests are performed, the aim of which is to demonstrate how the quality of the drug changes over time as a result of various factors (temperature, humidity, light, pH). Chemically, carbamates are derivatives of carbamic acid and can be structurally considered as „amide-ester“ hybrids, which are chemically stable. Due to the influence of pH and temperature, there are changes in their structure, such as hydrolysis into amine and carbon dioxide. In this study, we focused on determining the stability of carbamates as acetylcholinesterase inhibitors using thin layer chromatography, nuclear magnetic resonance spectroscopy and using the high performance liquid chromatography.

Key words: 1D and 2D NMR; carbamates; HPLC; inhibitors of acetylcholinesterase; stability; TLC; UV/Vis

ÚVOD

Pojem stabilita sa vo farmácii vzťahuje nielen na liečivo, ale aj na liečivý prípravok. Štúdium stability je súčasťou vývoja nového lieku (s novou účinnou látkou). Účelom skúšok stability je preukázať, ako sa mení kvalita liečiva s časom vplyvom rôznych faktorov, ako sú napríklad teplota, vlhkosť a svetlo (Narayan a Manupriya, 2017; Aashigari a kol., 2019). Údaje o stabilite liečivej látky a farmaceutického výrobku sú dôležité pre žiadosť o povolenie na trh, stanovenie doby opätovného testovania lieku alebo doby použiteľnosti lieku a podmienky jeho skladovania. Účelom testovania stability je poskytnúť dôkaz o kvalite liečivej látky alebo liečivého produktu, ktorý sa časom vplyvom rôznych faktorov mení (Matthews, 1997).

Medzi analytické metódy využívané pri testoch stability patria okrem iného aj spektrofotometrické metódy (UV/Vis spektrofotometria), nukleárna mag-

netická rezonancia (NMR), ktorá slúži k identifikácii chemickej štruktúry liečiva a chromatografické metódy (TLC, HPLC) (Poole, 1995; Votrubová, 2006).

Karbamáty sú po chemickej stránke deriváty kyseliny karbámovej, ktorej amino- a karboxylová skupina je substituovaná štruktúrne rôznymi arylovými alebo alkylovými substituentmi. Karbamátová funkčná skupina pozostáva z -O-CO-NH- atómov. V molekulách liečiv sa táto funkčná skupina – farmakofórna skupina nachádza v liečivách, ktoré patria medzi reverzibilných inhibítorov acetylcholinesterázy. V klinickej praxi sa používajú prevažne k symptomatickej liečbe Alzheimerovej choroby (AD) a k liečbe ochorenia myastenia gravis (MG) (Jiráček, 2005).

MATERIÁL A METÓDY

V štúdiu boli použité nasledovné chemikálie a rozpúšťadlá, ktoré sa použili v komerčnom stave, bez ďalšieho čistenia: etanol – Mikrochem, Slovensko; TLC platničky (Silica gel 60 F₂₅₄) – Merck KGaA, Nemecko; *n*-propanol p. a. – Mikrochem, Slovensko; chloroform p. a. – Mikrochem, Slovensko; uhličitán draselný bezvodý p. a. – Mikrochem, Slovensko; hydroxid draselný p. a. – Centralchem, Slovensko; indikátorový papierik – Lach-Ner, s. r. o., Neratovice, Česká republika; metanol pre HPLC – Acros Organic, Thermo Scientifics, USA; benzylpiperidín – Sigma-Aldrich, USA; CH₃OD – Merck KGaA, Nemecko; trietylamin – Sigma-Aldrich, USA; deionizovaná voda pre HPLC – Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, Anglicko; metyl[4-(oxíran-2-ylmetoxy)fenyl]karbamát 1 – Farmaceutická fakulta, Brno, Česká republika; butyl[4-(oxíran-2-ylmetoxy)fenyl]karbamát 2 – Farmaceutická fakulta, Brno, Česká republika.

Pri príprave roztokov, stanovení fyzikálno-chemických vlastností syntetizovaných zlúčenín boli použité nasledujúce prístroje: spektrofotometer: Shimadzu, UV-1280, Serial No. A120655, Japonsko; spektrometer: 600 MHz NMR spektrometer Varian MercuryPlus, Palo Alto, Kalifornia, USA; analytické váhy: Ohaus Corp., AR3130, Čína; laboratórne váhy: KERN ABT 220-5DM, Kern & Sohn GmbH, Balin-

gen, Austrália; vákuová odparka: IKA RV 10 digital, ProfiLab24, Berlín, Nemecko; prístroj na meranie teploty topenia: Electrothermal, Kison product, Essex, Anglicko; topné hniezdo: LTHS 100, Fisher Slovakia, Slovensko; vysokoúčinný kvapalinový chromatograf: ThermoScientific, UltiMate 3000, USA.

Pri analýze NMR dát bol použitý počítačový softvér: Mnova-MestReNova, verzia 11.0.4-18998, 2017.

Na písanie chemických vzorcov bol použitý program ACD/CLabs 2021, ChemSketch Window Product Version 12.01 MDL ISISTM/DRAW 2,5.

Syntéza metyl{4-[2(RS)-hydroxy-3-(4-benzylpiperidín-1-yl)propoxy]fenyl}karbamátu (3)

Syntéza karbamátu **3** sa uskutočnila v jednom reakčnom kroku. Metyl[4-(oxiran-2-ylmetoxy)fenyl]karbamát (1,000 g; 223,23 g.mol⁻¹; 0,0045 mol) (**1**) reagoval s benzylpiperidínom (0,784 g; 175,27 g.mol⁻¹; 0,0045 mol) v 20 ml etanolu. Reakčná zmes sa refluxovala 8 hodín. Po doreagovaní sa rozpúšťadlo odparilo dosucha na rotačnej vákuovej odparke a tuhý zbytok sa prekryštalizoval z etylacetátu za tepla (Ungvarská Maľučká a Csöllei, 2021).

Syntéza butyl{4-[2(RS)-hydroxy-3-(4-benzylpiperidín-1-yl)propoxy]fenyl}karbamátu (4)

Syntéza karbamátu **4** sa uskutočnila v jednom reakčnom kroku. Butyl[4-(oxiran-2-ylmetoxy)fenyl]karbamát (1,000 g; 265,30 g.mol⁻¹; 0,0018 mol) (**2**) reagoval s benzylpiperidínom (0,660 g; 175,27 g.mol⁻¹; 0,0018 mol) v 20 ml etanolu. Reakčná zmes sa refluxovala 8 hodín. Po doreagovaní sa rozpúšťadlo odparilo dosucha na rotačnej vákuovej odparke a tuhý zbytok sa prekryštalizoval z etylacetátu za tepla (Ungvarská Maľučká a Csöllei, 2021).

Sledovanie rozkladu produktov 3 a 4 v zásaditom a kyslom prostredí

Na sledovanie rozkladu produktov **3** a **4** bolo použitých 0,010 g karbamátových derivátov rozpustených v 1 ml EtOH. Následne sa pripravili roztoky hydroxidu draselného KOH 5 %, 10 %, 25 % a 50 % (2 ml),

ktoré boli pridané do skúmavky obsahujúcej produkt **3**, respektíve **4** v etanole. Polovica takto pripravených skúmaviek bola potom vložená do kadičky s vodou a zahrievana sa na variči pri teplote 50 °C po dobu 4 hodín. Zvyšné skúmavky sa nechali 7 dní stáť pri laboratórnej teplote. Rovnako sa postupovalo aj pri príprave kyslých roztokov. Ako kyslé prostredie sa použila 96 %-tná kyselina sírová (H₂SO₄), z ktorej boli riedením pripravené roztoky: 5 %, 10 %, 25 % a 50 % (2 ml).

Spracovanie vzoriek v zásaditom a kyslom prostredí

Do roztokov vzoriek produktov **3** a **4** v zásaditom prostredí bol pridaný chloroform (5 ml). Spodná organická fáza bola odpipetovaná do novej skúmavky, ku ktorej sa na vysušenie pridalo malé množstvo bezvodého uhličitanu draselného. Organická fáza bola následne prefiltrovaná a rozpúšťadlo odparené dosucha na rotačnej vákuovej odparke. Rovnako sa postupovalo aj v prípade spracovania vzoriek **3** a **4**, ktoré boli vystavené vplyvu kyslého prostredia. Pred pridaním chloroformu sa pridával do skúmaviek bezvodý uhličitan draselný až do neutrálnej reakcie.

UV/Vis spektrofotometria

Na stanovenie A_{max} produktov **3** a **4** spektrofotometricky bol použitý 1 mg karbamátu rozpustený v 15 ml metanolu. Z roztoku sa pipetou odobralo do 1 cm kyvety 1 ml a merala sa absorbancia na UV/Vis spektrofotometri Shimadzu UV-1280 pri vlnovej dĺžke od 200 – 900 nm.

Sledovanie stability karbamátov 3 a 4 tenkovrstvou chromatografiou

Ako mobilná fáza bol použitý *n*-propanol a pár kvapiek trietylamínu. Následne sa z TLC platničky odmerala vzdialenosť škvrín od štartu a vypočítal sa retenčný faktor R_f, ktorý je podielom vzdialenosti stredu škvriny od štartu a vzdialenosti čela mobilnej fázy od štartu. Detekcia škvŕn bola uskutočnená UV žiarením pri vlnovej dĺžke 254 nm.

Sledovanie stability karbamátov **3** a **4** metódou HPLC

Na stanovenie percentuálneho zastúpenia rozkladných produktov **3** a **4** po pôsobení prostredia s H_2SO_4 , resp. KOH bola použitá metóda RP-HPLC, prístroj Dionex UltiMate 3000 (ThermoScientific) použitím kolóny Phenomenex Kinetex 2,6 μm C18 100Å, 150 x 4,6 mm. Analýza sa uskutočnila gradientovou elúciou s použitím ultrazvukom degasovanej zmesi 0,1 % kyseliny octovej v deionizovanej vode (A) a metanolu (B) pri teplote 30 °C s prietokom 0,8 ml/min, celkovým časom analýzy 15 minút, pričom zloženie mobilnej fázy sa kontinuálne menilo zo 100 % mobilnej fázy A v priebehu 10 min na 0 % A s následnou ekvilibračiou na 100 % A v priebehu 5 min. Vzorky **3** a **4** boli rozpustené v metanole na koncentráciu 0,1 mg.ml⁻¹. Detekcia píkov sa uskutočnila pomocou DAD detektora (Diode Array Detector) pri vlnovej dĺžke 225 nm. Všetky analýzy sa uskutočnili s nástrekom 5 μl vzorky. Výsledky boli následne analyzované pomocou softvéru Chromeleon 7. Hlavný pík pre zlúčeniny **3** a **4** bol priradený na základe pripraveného štandardu vzorky bez pôsobenia prostredia roztokov KOH, resp. H_2SO_4 . Percentuálne zastúpenie rozkladných produktov vo vzorkách po prídavku roztokov KOH, resp. H_2SO_4 bolo stanovené na základe plochy píkov v chromatogramoch.

Sledovanie stability produktov **3** a **4** pomocou NMR spektroskopie

Spektrálna analýza bola uskutočnená na spektrometri Varian VNMRs 600 MHz. Vzorky **3** a **4** (20 mg) boli rozpustené v 0,6 ml deuterovaného metanolu ($\text{CH}_3\text{OD}-d_1$) v kremenných NMR kyvetách. Prítomnosť rozkladných produktov bola sledovaná pomocou 1D NMR analýz (¹H, ¹³C).

VÝSLEDKY

Fyzikálno-chemické vlastnosti produktov **3** a **4**

Syntéza metyl{4-[2(RS)-hydroxy-3-(4-benzylpiperidín-1-yl)propoxy]fenyl}karbamátu (**3**)

Látka **3** bola pripravená s 68,2 % výťažnosťou

vo forme bielych ihlíc, $M_r = 398,49 \text{ g.mol}^{-1}$, t. t. = 105 °C, $R_f = 0,740$ (*n*-propanol/ Et_3N), ¹H NMR (600 MHz, 25 °C, CH_3OD) $\delta = 7,32$ (d, 2H, H-2,6; $J = 12,0 \text{ Hz}$); 7,26 (t, 2H, H-3''', 5'''; $J = 6,0 \text{ Hz}$); 7,18 (m, 1H, H-4'''); 7,16 (d, 2H, H-2''', 6'''; $J = 6,0 \text{ Hz}$); 6,87 (d, 2H, H-3,5; $J = 12,0 \text{ Hz}$); 4,12 – 4,08 (m, 1H, H-2'); 3,94 (dd, 1H, H-1_A'; $J = 4,8 \text{ Hz}, 10,8 \text{ Hz}$); 3,88 (dd, 1H, H-1_B'; $J = 6,0 \text{ Hz}, 9,6 \text{ Hz}$); 3,72 (s, 3H, CH_3 -O); 2,99 (dd, 2H, H-2_A'', 6_A''; $J = 18,0 \text{ Hz}, 30,0 \text{ Hz}$); 2,55 (dd, 1H, H-3_A'; $J = 4,2 \text{ Hz}, 13,2 \text{ Hz}$); 2,55 (d, 2H, H-7''; $J = 6,0 \text{ Hz}$); 2,49 (dd, 1H, H-3_B'; $J = 6,0 \text{ Hz}$); 2,11 – 2,02 (m, 2H, H-2_B'', 6_B''); 1,63 (d, 2H, H-3_A'', 5_A''; $J = 12,0 \text{ Hz}$); 1,60 – 1,54 (m, 1H, H-4''); 1,37 – 1,29 (m, 2H, H-3_B'', 5_B''); ¹³C NMR (600 MHz, 25 °C, CH_3OD) $\delta = 156,0$ (C=O); 155,5 (C-4); 140,9 (C-1'''); 132,5 (C-1); 129,2 (C-2''', 6'''); 128,3 (C-3''', 5'''); 126,0 (C-4'''); 120,7 (C-2, 6); 115,0 (C-3, 5); 71,5 (C-1'); 67,6 (C-2'); 61,8 (C-3'); 54,4 (C-2'', 6''); 51,6 (CH_3 -O); 43,2 (C-7''); 38,2 (C-4''); 32,1 (C-3'', 5'')

Syntéza butyl{4-[2(RS)-hydroxy-3-(4-benzylpiperidín-1-yl)propoxy]fenyl}karbamátu (**4**)

Látka **4** bola pripravená s 65,7 % výťažnosťou vo forme bielych ihlíc, $M_r = 440,57 \text{ g.mol}^{-1}$, t. t. = 114 °C, $R_f = 0,913$ (*n*-propanol/ Et_3N), ¹H NMR (600 MHz, 25 °C, CH_3OD) $\delta = 7,32$ (d, 2H, H-2,6; $J = 6,0 \text{ Hz}$); 7,26 (t, 2H, H-3''', 5'''; $J = 6,0 \text{ Hz}$); 7,16 (m, 1H, H-4'''); 7,16 (d, 2H, H-2''', 6'''; $J = 6,0 \text{ Hz}$); 6,88 (d, 2H, H-3,5; $J = 6,0 \text{ Hz}$); 4,12 – 4,08 (m, 1H, H-2'); 4,10 (t, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$; $J = 12,0 \text{ Hz}$); 3,95 (dd, 1H, H-1_A'; $J = 4,8 \text{ Hz}, 6,0 \text{ Hz}$); 3,88 (dd, 1H, H-1_B'; $J = 6,0 \text{ Hz}, 9,6 \text{ Hz}$); 2,99 (dd, 2H, H-2_A'', 6_A''; $J = 12,0 \text{ Hz}, 30,0 \text{ Hz}$); 2,56 (dd, 1H, H-3_A'; $J = 6,0 \text{ Hz}, 12,0 \text{ Hz}$); 2,55 (d, 2H, H-7''; $J = 6,0 \text{ Hz}$); 2,50 (dd, 1H, H-3_B'; $J = 6,0 \text{ Hz}, 12,0 \text{ Hz}$); 2,12 – 2,03 (m, 2H, H-2_B'', 6_B''); 1,64 (d, 2H, H-3_A'', 5_A''; $J = 12,0 \text{ Hz}$); 1,60 – 1,53 (m, 1H, H-4''); 1,38 – 1,30 (m, 2H, H-3_B'', 5_B''); 1,67 (kvi, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$; $J = 6,0 \text{ Hz}, 12,0 \text{ Hz}$); 1,46 (sex, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$; $J = 6,0 \text{ Hz}, 12,0 \text{ Hz}$); 0,99 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$; $J = 6,0 \text{ Hz}$); ¹³C NMR (600 MHz, 25 °C, CH_3OD) $\delta = 155,7$ (C=O); 155,4 (C-4); 141,0 (C-

Tab. 1: R_f faktory derivátu 3 a jeho rozkladných produktov

	R_f faktor			
	50 % H_2SO_4 (l. t.)	50 % H_2SO_4 (50 °C)	50 % KOH (l. t.)	50 % KOH (50 °C)
Samostatný derivát 3	0,740	0,740	0,740	0,740
Rozkladný produkt 1	0,696	0	0,391	0,385
Rozkladný produkt 2	0,217	—	0	—
Rozkladný produkt 3	0,174	—	—	—

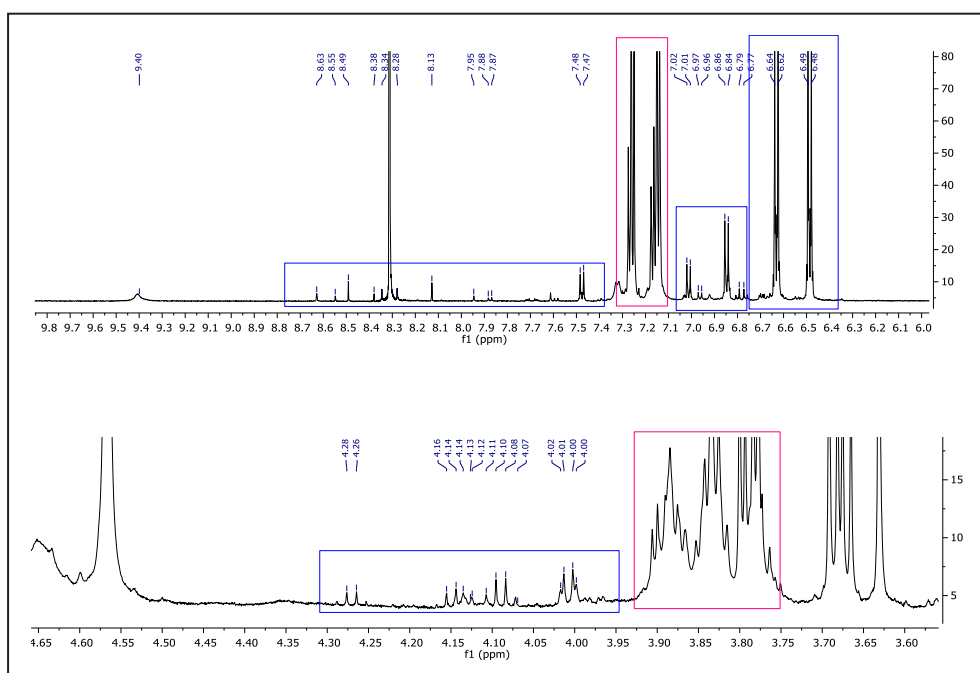
l. t. – laboratórna teplota

Tab. 2: R_f faktory derivátu 4 a jeho rozkladných produktov

	R_f faktor			
	50 % H_2SO_4 (l. t.)	50 % H_2SO_4 (50 °C)	50 % KOH (l. t.)	50 % KOH (50 °C)
Samostatný derivát 4	0,913	0,913	0,913	0,913
Rozkladný produkt 1	0,533	0,652	0,533	0
Rozkladný produkt 2	0,200	0,565	0,200	—
Rozkladný produkt 3	0	0,478	0	—

l. t. – laboratórna teplota

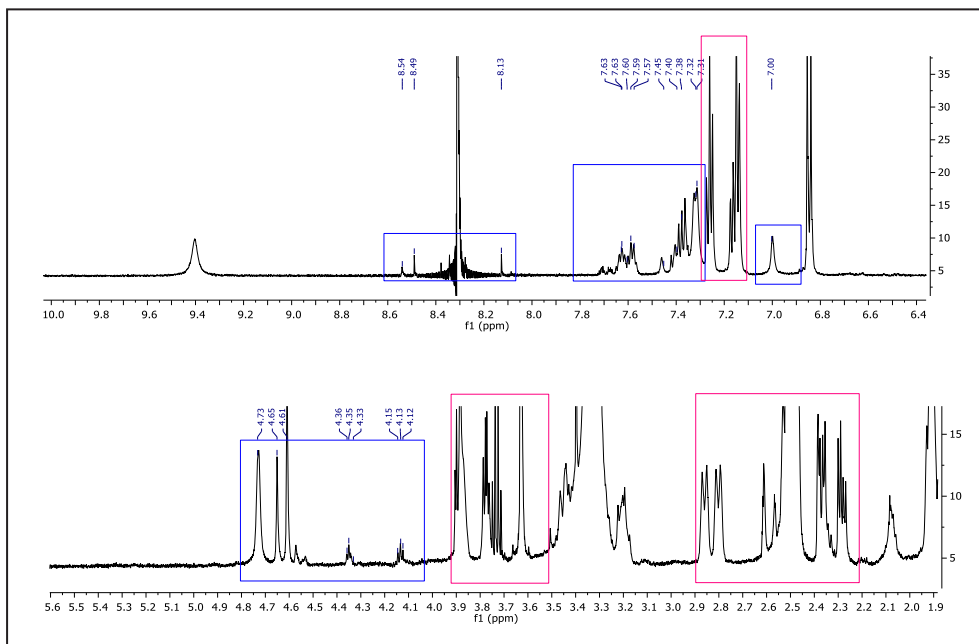
Obr. 1: 1H NMR spektrum bázeickej hydrolýzy metylového derivátu 3 v 50 % KOH



štvorec **ružová farba** – signály východiskovej látky **3**

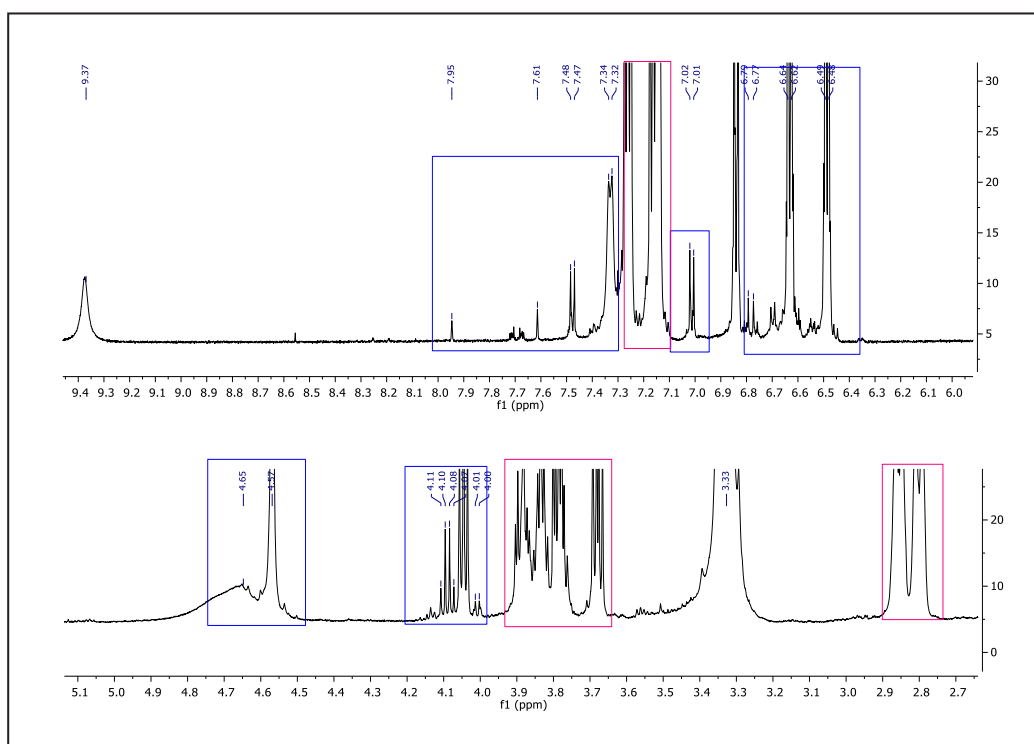
štvorec **modrá farba** – signály rozkladných produktov

Obr.: 2 ^1H NMR spektrum kyslej hydrolyzy metylového 3 derivátu v 50 % H_2SO_4



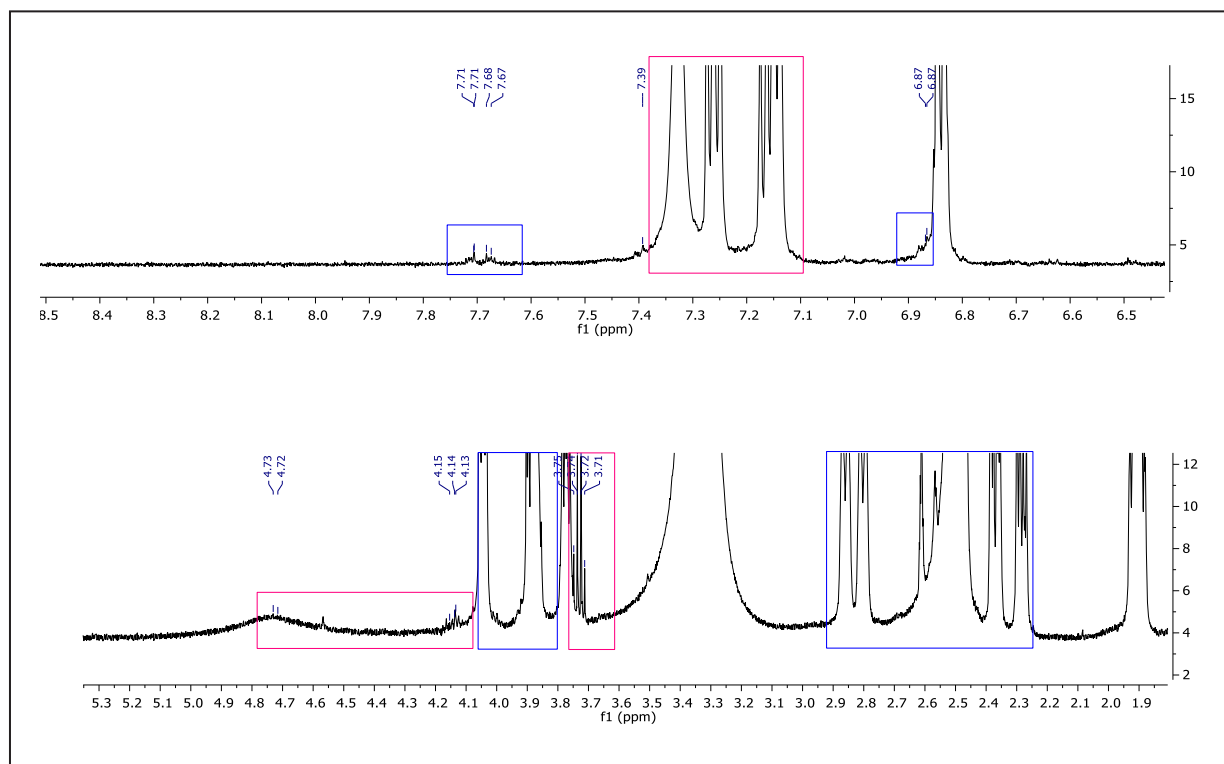
štvorec ružová farba – signály východiskovej látky 3
štvorec modrá farba – signály rozkladných produktov

Obr. 3: ^1H NMR spektrum bázeickej hydrolyzy butylového derivátu 4 v 50 % KOH



štvorec ružová farba – signály východiskovej látky 4
štvorec modrá farba – signály rozkladných produktov

Obr. 4: ^1H NMR spektrum kyslej hydrolyzy butylového derivátu **4** v 50 % H_2SO_4



štvorec ružová farba – signály východiskovej látky **4**
 štvorec modrá farba – signály rozkladných produktov

1'''); 132,6 (C-1); 129,2 (C-2''', 6'''); 128,3 (C-3''', 5'''); 126,0 (C-4'''); 120,8 (C-2, 6); 115,0 (C-3,5); 71,5 (C-1'); 67,5 (C-2'); 64,8 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$); 61,8 (C-3'); 54,4 (C-2'', 6''); 43,2 (C-7''); 38,2 (C-4''); 32,1 (C-3'', 5''); 31,4 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 19,3 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 13,2 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$).

NMR spektrá rozkladných produktov karbamátov **3** a **4**.

Sledovanie rozkladných produktov karbamátových zlúčenín **3** a **4** pomocou HPLC

V tabuľkách 3 – 6 sa nachádzajú výsledky analýz rozkladných produktov získané HPLC metódou.

Vplyv pH a teploty na stabilitu produktov **3** a **4** Tenkovsrtvová chromatografia

V tabuľkách 1 a 2 sa nachádzajú R_f hodnoty rozkladných produktov, ktoré vznikli pôsobením kyslého a zásaditého prostredia za laboratórnej a zvýšenej teploty.

NMR spektrá rozkladných produktov karbamátov **3** a **4**

Na obrázkoch 1 – 4 sú uvedené len vybrané ^1H

DISKUSIA

Finálne karbamáty **3** a **4** boli pripravené podľa reakčnej schémy 1 uvedenej nižšie. Reakciou príslušných karbamátov **3** a **4** s epoxidovým skeletom v molekule došlo reakciou s benzylpiperidínom k otvoreniu tohto trojčlánkového kruhu a vzniku aryloxyaminopropanolového farmakofóru.

Zo získaných výsledkov vyplýva, že vplyvom kyslého a zásaditého prostredia a zvýšenej teploty

Tab. 3: Percentuálne zastúpenie rozkladných produktov a metylového karbamátového derivátu 3 v kyslom prostredí

Relatívne plochy píkuv (%)											
Retenčný čas (min)	6,37	6,99	Zlúč. 3 8,23	8,46	8,80	9,04	9,18	9,36	9,67	10,86	11,2
H ₂ SO ₄ 50 %	0,23	0,66	92,35	2,97	0,44	0,48	0,15	2,22	0,33	0,17	
H ₂ SO ₄ 25 %		0,79	74,05	13,05	0,5	0,83	0,18	7,51	2,09	1,01	
H ₂ SO ₄ 10 %		0,6	97,68		0,3	0,43	0,37	0,62			
H ₂ SO ₄ 5 %		0,75	96,33		1,24	0,44	0,47	0,76			

Tab. 4: Percentuálne zastúpenie rozkladných produktov a metylového karbamátového derivátu 3 v bázičkom prostredí

Relatívne plochy píkuv (%)											
Retenčný čas (min)	6,32	6,99	Zlúč. 3 8,25	8,38	8,78	9,03	9,18	9,35	9,65	10,86	11,5
KOH 50 %	24,94			26,58	8,88						39,6
KOH 25 %	37,47		48,98		12,02						1,54
KOH 10 %	10,09		83,45		6,16						0,30
KOH 5 %	11,49		80,53		7,45			0,24			

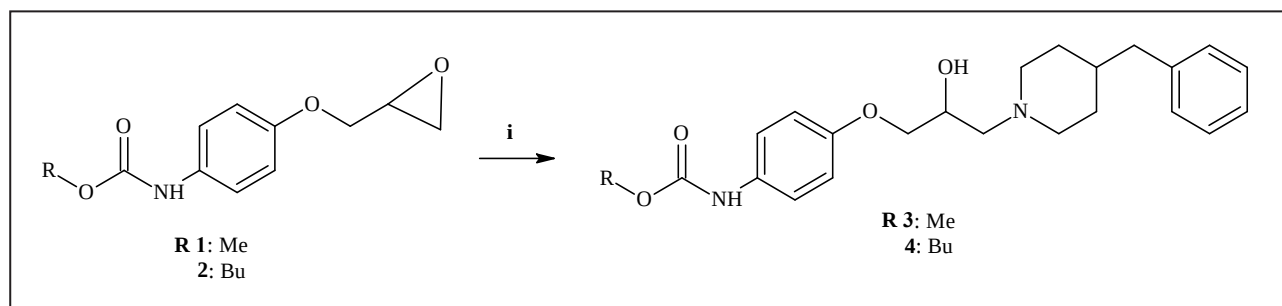
Tab. 5: Percentuálne zastúpenie rozkladných produktov butylového karbamátového derivátu 4 v kyslom prostredí

Relatívne plochy píkuv (%)												
Zlúč. 4												
Retenčný čas (min)	6,36	7,04	7,83	8,46	8,78	9,00	9,43	10,00	10,40	10,48	10,63	11,23
H ₂ SO ₄ 50 %					0,27	0,05	97,29	0,08		0,1	1,53	
H ₂ SO ₄ 25 %					0,28	0,08	97,96	0,07		0,13	1,46	0,03
H ₂ SO ₄ 10 %					0,07	0,13	97,25	0,09		0,22	1,69	
H ₂ SO ₄ 5 %					0,41	0,08	96,03	0,11		0,31	1,48	0,22

Tab. 6: Percentuálne zastúpenie rozkladných produktov butylového karbamátového derivátu 4 v bázičkom prostredí

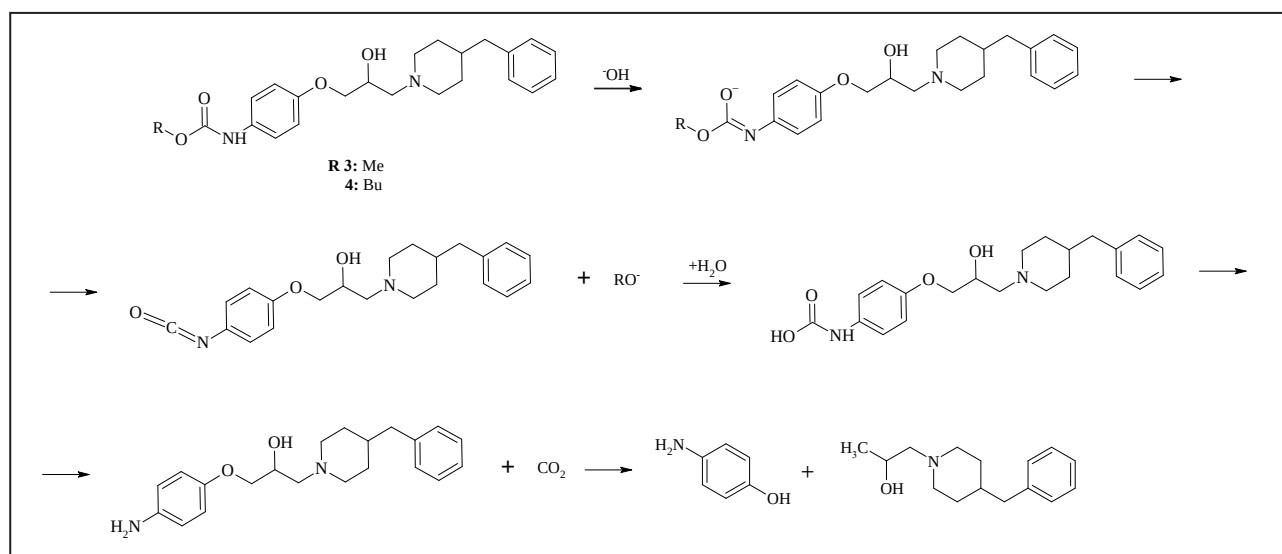
Relatívne plochy píkuv (%)												
Zlúč. 4												
Retenčný čas (min)	6,36	7,04	7,83	8,46	8,78	9,00	9,43	10,00	10,40	10,48	10,63	11,23
KOH 50 %	47,97	0,56	0,26	14,63	8,53	1,56	21,18	2,62	0,21	1,03	1,45	–
KOH 25 %	1,93	–	0,05	–	0,55	1,17	95,42	0,05	0,22	–	0,33	0,28
KOH 10 %	0,28	–	0,07	–	0,49	1,18	97,31	0,07	0,24	–	0,23	0,13
KOH 5 %	0,1	–	0,07	–	0,2	0,51	98,43	0,07	0,12	–	0,18	0,17

Schéma 1: Syntéza aryloxyaminopropanolových derivátov **3** a **4** s karbamátovou funkčnou skupinou



i: benzylpiperidín, EtOH, 8 h, reflux

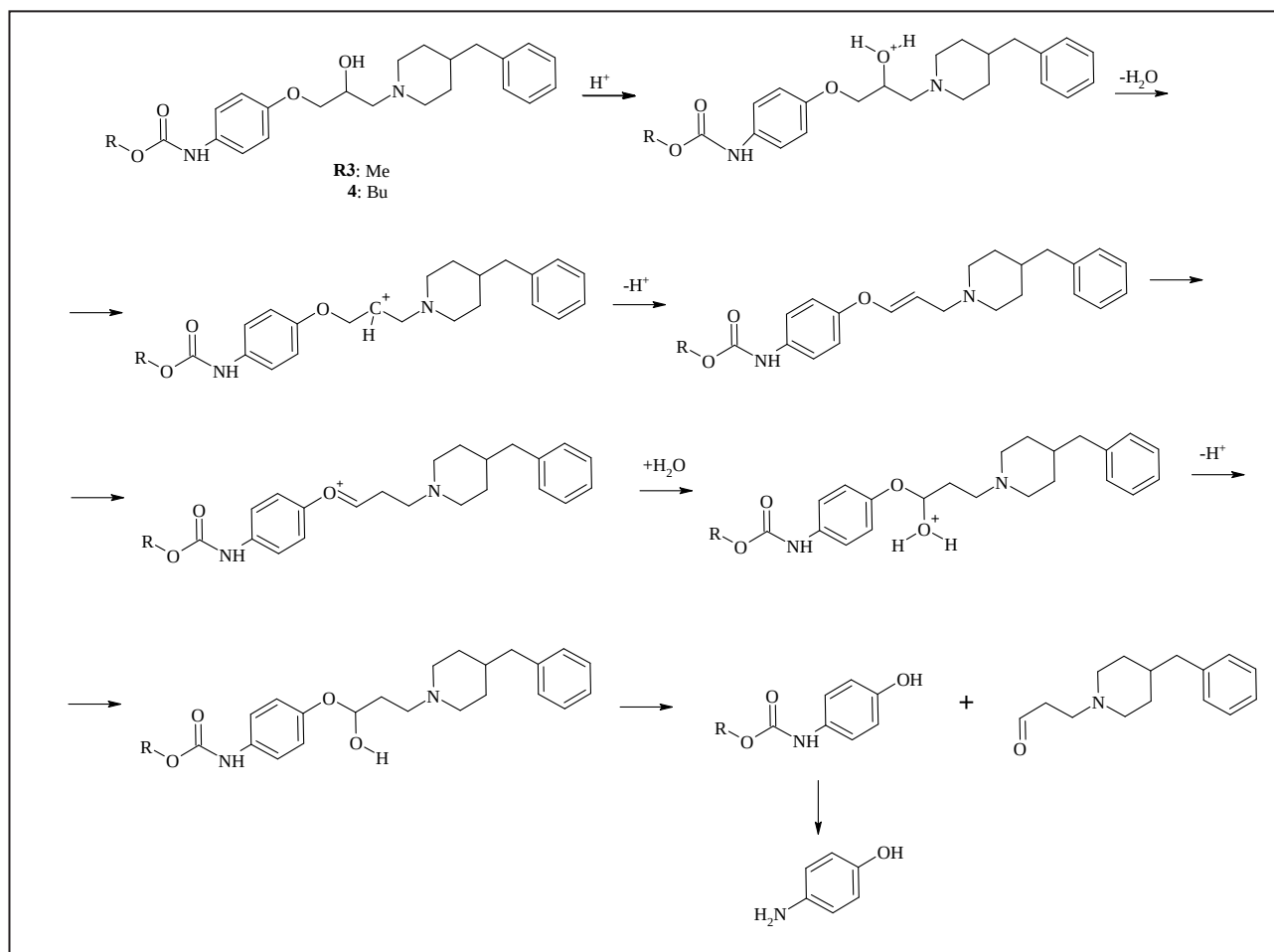
Schéma 2: Predpokladaný mechanizmus bázeckej hydrolýzy karbamátov **3** a **4**



ty dochádza k rozkladu karbamátových derivátov **3** a **4** za vzniku odlišných rozkladných produktov. To potvrdzujú výsledky získané analytickými metódami (TLC, HPLC, NMR). Tenkovrstvová chromatografia (TLC) sa využíva ako veľmi rýchly postup k odhľadniu degradačných produktov (Poole, 1995). Pomocou tejto metódy sa stanovili R_f hodnoty škvrn (rozkladné produkty), ktoré sa porovnávali s R_f hodnotou východiskovej látky (karbamátovým produktom **3** alebo **4** (viď tab. 1, 2). Niektoré látky ostali na štarte s nulovým R_f faktorom alebo dosiahli od štartu inú vzdialenosť ako východisková látka **3**, resp. **4**. Zo zistených výsledkov vyplýva, že vplyvom bázeckého alebo kyslého prostredia a takisto aj teploty dochádza k zmenám v chemickej štruktúre, teda k rozkladu karbamátových derivátov **3** a **4**.

Zmeny v chemických posunoch a multiplicité signálov, ktoré sa pozorovali v ^1H a ^{13}C NMR spektrách derivátov **3** a **4** dokazujú (viď obr. 1 – 4), že pôsobením kyslého/bázeckého pH prostredia dochádza k rozkladu karbamátovej funkčnej skupiny za vzniku rozkladných produktov, ako je napríklad aj 4-amino-fenol. V alkalickom prostredí je karbonylový kyslík karbamátovej funkčnej skupiny atakovaný hydroxylovým iónom za vzniku amínu a oxidu uhličitého (Chistenson, 1964; Silva a kol., 2015). Môžeme teda predpokladať (viď schéma 2), že bázeckou hydrolýzou karbamátovej funkčnej skupiny východiskových derivátov vznikla aromatická amino- skupina na benzénovom kruhu, čo výrazne ovplyvnilo aj zmenu chemických posunov aromatických protónov H-2,6 a H-3,5 z pôvodných 7,32 ppm (d, 2H, H-2,6) a 6,87

Schéma 3: Predpokladaný mechanizmus rozkladu derivátov 3 a 4 vplyvom kyslého prostredia

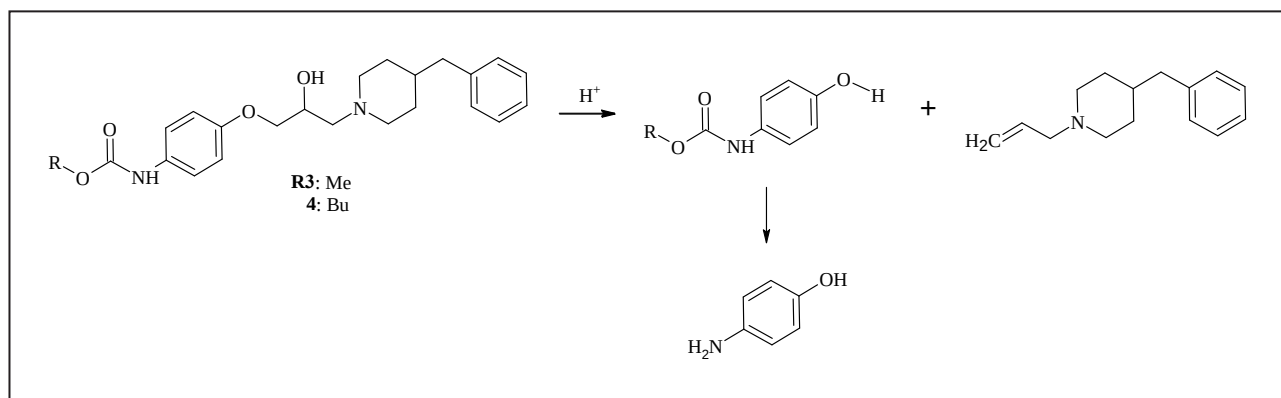


ppm (d, 2H, H-3,5) na 6,64 ppm (d, 2H, H-2,6) a 6,49 ppm (d, 2H, H-3,5). Prítomnosť minoritných dubletových signálov v tejto časti patrí ďalším rozkladným produktom, prípadne medziproduktom, ktorých chemickú štruktúru sa nám nepodarilo identifikovať. Môžeme však predpokladať, že jedným z vedľajších produktov rozkladu je aj 4-aminofenol. Potvrdzuje to prítomnosť dvoch dubletových signálov v aromatickej oblasti pri 6,49 a 6,63 ppm (vid' obr. 1). Tak tiež prítomnosť dvoch singletových signálov pri 9,40 ppm (signál $-OH$ skupiny) a 4,57 ppm (signál $-NH_2$ skupiny) (vid' schéma 2).

V 1H NMR spektre kyslej hydrolýzy metylového derivátu 3 v 50 % H_2SO_4 sa v aromatickej oblasti okrem signálov východiskovej látky nachádzali aj ďalšie signály aromatických protónov, a to v oblasti 7,36 – 7,42 ppm a 7,57 – 7,65 ppm (vid' obr. 2). Ide

o signály aromatických protónov benzénového jadra, na ktorom je naviazaná karbamátová funkčná skupina. Môžeme predpokladať, že v prítomnosti kyslého prostredia došlo k rozpadu éterovej väzby a vzniku fenolovej funkčnej skupiny (4-aminofenol), čo vysvetľuje aj nárast počtu signálov v aromatickej oblasti (vid' schéma 3, 4). To, že vplyvom kyslého prostredia môže dôjsť k rozpadu éterovej väzby za vzniku fenolovej funkčnej skupiny dokazujú aj rôzne štúdie (Jia a kol., 2011; Liang a kol., 2011; Sturgeon a kol., 2014). Aj v oblasti 4,8 – 3,7 ppm pribudli singletové a tripletové signály. V tejto oblasti ležia aj signály protónov aminopropanolového reťazca. To znamená, že nárast počtu a aj zmena ich chemických posunov nasvedčujú, že aj v tejto časti molekuly došlo vplyvom kyslého prostredia k jej štruktúrnym zmenám (vid' obr. 2).

Schéma 4: Predpokladaný mechanizmus rozkladu derivátov **3** a **4** vplyvom kyslého prostredia



Metódou HPLC boli pozorované zmeny pri rôznych retenčných časoch v percentuálnom zastúpení rozkladných produktov s vyššou aj nižšou retenciou na stacionárnej fáze vzhľadom na východiskové deriváty **3**, resp. **4** a bola preukázaná závislosť od koncentrácie použitých kyslých/bázických roztokov (viď tab. 3 – 6). V kyslom prostredí H₂SO₄ bolo zastúpenie východiskového karbamátu **3** v rozmedzí 74 – 94 % v závislosti od množstva pridanej kyseliny. V zásaditom prostredí KOH bol pozorovaný výrazný rozklad derivátu **3**, kde pri najvyššej koncentrácii 50 % KOH pík prislúchajúci pôvodnej zlúčenine **3** s retenčným časom 8,25 min nebol detegovaný a došlo k úplnému rozkladu. Rovnako aj pri deriváte **4** bol rozklad v kyslom prostredí minimálny so zastúpením 96 – 97 % východiskového derivátu **4** s retenčným časom 9,43 min. Avšak v bázičkom prostredí pri najvyšších koncentráciách (50 % KOH) sa pozorovali najväčšie rozkladné zmeny a zastúpenie východiskového karbamátu bolo len 21 %. Vo všetkých prípadoch tieto zmeny v percentuálnom zastúpení rozkladných produktov naznačujú, že dochádza k hydrolyze karbamátového derivátu a štrukturálnym zmenám, či už v kyslom alebo zásaditom prostredí a vzniku rôznych rozkladných produktov. V kyslom prostredí môže dôjsť k protonizácii na karbonylovom atóme kyslíka (Armstrong a kol., 1968); ktorý sa následne cez medziprodukty hydrolyzuje na oxid uhličitý, alkohol a amín ako konečný produkt. Takisto môže dôjsť k

N-protonizácii, kde následným pôsobením vody dochádza k vzniku rovnakých finálnych produktov (Lee a kol., 1987). Podľa Tantawy (2020) je karbamátová skupina vysoko stabilná voči pôsobeniu kyslého prostredia, čo potvrdzujú aj namerané údaje, keďže výraznejšie zmeny boli zaznamenané práve v bázičkom prostredí, a to v prípade oboch derivátov **3** a **4**.

ZÁVER

Na základe získaných výsledkov vyplýva, že vplyvom zmeny pH a teploty dochádza k zmene stability syntetizovaných karbamátových derivátov, metyl{4-[2(RS)-hydroxy-3-(4-benzylpiperidín-1-yl)propoxy]fenyl}karbamátu (**3**) a butyl{4-[2(RS)-hydroxy-3-(4-benzylpiperidín-1-yl)propoxy]fenyl}karbamátu (**4**). Využitím analytických metód, ako je nukleárna magnetická rezonancia, vysokoúčinná kvapalinová chromatografia a tenkovrstvová chromatografia, ktoré sa bežne využívajú pri stabilitných skúškach, sa potvrdilo, že pôsobením pH prostredia (kyslé/zásadité) a takisto aj zvýšenej teploty dochádza ku rozkladu karbamátových derivátov za vzniku rôznych rozkladných produktov. K najväčším pozorovaným štrukturálnym zmenám došlo na karbamátovej funkčnej skupine, no zaznamenali sa aj zmeny v oblasti aryloxyaminopropanolového fragmetu molekúl **3** a **4**. Vzhľadom k tomu, že syntetizované deriváty **3** a **4** obsahujú dve farmakofórne skupiny, karbamátovú funkčnú skupinu

nu a aryloxyaminopropanolový fragment, môžeme predpokladať, že syntetizované zlúčeniny môžu byť potenciálne inhibitory cholinesteráz, a byť tak využité v terapii Alzheimerovej choroby. Aryloxyaminopropanolový fragment je zasa zastúpený v liečivách, ktoré sa používajú ako β -blokátory.

POĎAKOVANIE

Za nameranie ^1H a ^{13}C NMR spektier patrí podľa kovanie doc. RNDr. Márii Vílkovej, PhD. z Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, laboratórium nukleárnej magnetickej rezonancie.

ZOZNAM LITERATÚRY

- Aashigari, S., Ramya Goud, G., Sneha, S., Vykuntam, U., Raju Potnuri, N.: Stability studies of pharmaceutical products. *World J. Pharm. Res.*, 2018, 8 (8), 479 – 492.
- Armstrong, V. C., Farlow, D. W., Moodie, R. B.: The hydrolysis of amides, esters, and related compounds in acid solution. Part I. Amides, carbamates, and ureas. *J. Chem. Soc. B: Physical Organic*, 1968, 1099 – 1103.
- Christenson, I.: Alkaline hydrolysis of some carbamic acid esters. *Acta Chem. Scand.*, 1964, 18 (4), 904 – 922.
- Jirák, R.: Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby [Current trends in cognitive pharmacotherapy of Alzheimer's disease]. *Neurol. pro Praxi*, 2002, 2, 101 – 105.
- Lee, I., Kim, Ch. K.: Theoretical studies on the acid hydrolysis of methyl carbamate. *J. Comput. Chem.*, 1987, 8 (6), 794 – 800.
- Liang, X., Montoya, A., Haynes, B. S.: Molecular dynamics study of acid-catalyzed hydrolysis of dimethyl ether in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B.*, 2011, 115 (25), 8199 – 206.
- Matthews, B. R.: Regulatory aspects of stability testing in Europe. *Drug dev. Ind. Pharm.*, 1999, 25 (7), 831 – 856.
- Narayan, S., Choudhary, M.: A review on stability studies of pharmaceutical products. *Int. J. Appl. Pharm. Biol. Res.*, 2017, 2, 67 – 75.
- Poole, C. F.; Poole, S. K.: *Chromatography today*. Elsevier, 5th edn., 1991, 1 – 1026.
- Silva, D., Norberto, F., Santos, S., Hervés, P.: Hydrolysis of tertiary N-(2-pyridyl) carbamates. Contradictory evidence between nucleophilic and general base catalysis. *React. Kinet. Mech. Catal.*, 2015, 115 (2), 421 – 430.
- Songyan, J., Blair, J. C., Xinwen, G., Conrad Zhang, Z., Ekerdt, J. G.: Hydrolytic cleavage of β -O-4 ether bonds of lignin model compounds in an ionic liquid with metal chlorides. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2011, 50 (2), 849 – 855.
- Sturgeon, M. R., Kim, S., Lawrence, K., Paton, R. S., Chmely, R. C., Nimlos, M., Foust, T. D., Beckham, G. T.: A mechanistic investigation of acid-catalyzed cleavage of aryl-ether linkages: implications for lignin depolymerization in acidic environments. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2014, 2 (3), 472 – 485.
- Tantawy, M. A., Weshahy, S. A., Wadie, M., Rezka, M. R.: A novel HPLC-DAD method for simultaneous determination of alfuzosin and solifenacin along with their official impurities induced via a stress stability study; investigation of their degradation kinetics. *Anal. Methods*, 2020, 12 (26), 3368 – 3375.
- Ungvarská Maľučká, L., Csöllei, J.: Synthesis of new carbamate compounds as cholinesterase inhibitors. In *Student Scientific Conference MUNI Pharm*. Masaryk University Press, 2021, 38.
- Votrubová I.: *Stabilitní studie léčiv a léčivých přípravků*. [Stability studies of drugs and medicinal preparations]. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze: Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2006, 1 – 59.



PRÍRODNÉ LÁTKY A EXTRAKTY V HOJENÍ RÁN

NATURAL COMPOUNDS AND EXTRACTS IN WOUND HEALING

Sabová, Jana¹; Čoma, Matúš^{1,2}

¹Ústav farmakológie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, trieda SNP 1
040 11 Košice

²Referát pre biomedicínsky výskum, Východoslovenský ústav srdcových a cievnych chorôb a. s., Ondavská 8, 040 11
Košice
Slovenská republika

matus.coma@upjs.sk

ABSTRAKT

Hojenie rán je dynamický a komplexný biologický proces nevyhnutný pre regeneráciu tkanív. Tento článok sa zameriava na potenciál prírodných zlúčenín a extraktov získaných z rastlín a zvierat pri podpore hojenia rán. Práca poskytuje prehľad najdôležitejších prírodných zlúčenín a extraktov so zameraním na ich protizápalové, antioxidantné a antibakteriálne vlastnosti, a na ich úlohu v syntéze kolagénu. Popisované sú rôzne bioaktívne zlúčeniny vrátane myricetínu, lupeolu, bilirubínu, kurkumínu, kvercetínu, resveratrolu, chitosanu a včelích produktov ako aj rôzne rastlinné extrakty zahŕňajúc *Aloe vera*, *Agrimonia eupatoria*, *Aesculus hippocastanum* či *Calendula officinalis*. Článok zdôrazňuje potenciál prírodných produktov v terapii rán, ktoré pre pacientov predstavujú jednoducho dostupné a nákladovo efektívne alternatívy. Skúmanie prírodných bioaktívnych zlúčenín

a mechanizmu ich účinku otvára cestu pre vznik inovatívnych terapeutických prístupov a produktov na hojenie rán.

Kľúčové slová: hojenie rán; prírodné extrakty; prírodné zlúčeniny

ABSTRACT

Wound healing is a dynamic and intricate biological process crucial for tissue regeneration. This article explores the potential of natural compounds derived from plants and animals in facilitating wound healing. The work provides an overview of essential natural substances and extracts, focusing on their anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial properties, and their role in collagen synthesis. The discussions span various bioactive compounds, including Myricetin, Lupeol, Bilirubin, Curcumin, Quercetin, Resveratrol, Chitosan,

and Bee-derived products as well as plant extracts including *Aloe vera*, *Agrimonia eupatoria*, *Aesculus hippocastanum*, and *Calendula officinalis*. The article emphasizes the immense potential of utilizing natural products in wound therapy, offering patients accessible and cost-effective alternatives. The exploration of these bioactive compounds and their biological mechanisms fosters a deeper understanding, paving the way for innovative wound care products and therapeutic approaches.

Key words: natural compounds; natural extracts; wound healing

ÚVOD

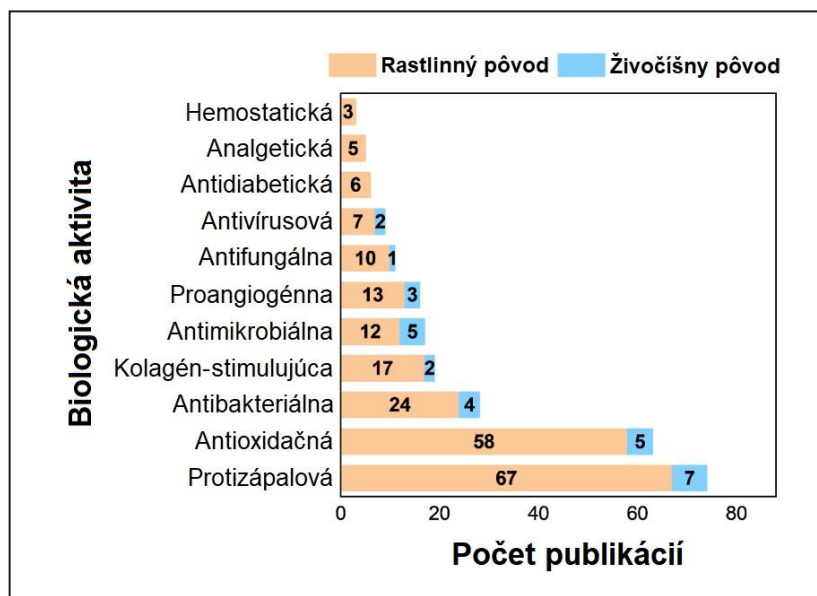
Hojenie rán je prirodzená dynamická reakcia organizmu, ktorej cieľom je náhrada poškodeného, mŕtveho alebo chýbajúceho tkaniva (Borena a kol., 2015). Proces hojenia rán zahŕňa rad nadväzujúcich koordinovaných procesov – krvácanie, koaguláciu, iniciovanie akútnej zápalovej reakcie, regeneráciu, migráciu a proliferáciu buniek spojivového tkaniva, depozíciu kolagénu, syntézu proteínov extracelulárnej matrice ako aj remodeláciu novovznikajúceho tkaniva. Každý rok sa u viac ako 100 miliónov pacientov v rozvinutých krajinách objavia jazvy v dôsledku hojenia po traumách alebo chirurgických zákrokoch (Bayat a kol., 2003). Jazvy klasifikované ako hypotrofické, atrofické (napr. jazvy po akné) a lineárne normotrofické zrelé jazvy majú zvyčajne minimálny vplyv na kvalitu života pacienta (Tsao a kol., 2002). Naopak, extrémne jazvenie, ako je hypertrofické alebo keloidné zjazvenie, je často spojené so svrbením, bolesťou a kontraktúrami, čo významne ovplyvňuje fyzickú aj psychickú pohodu pacienta (Robert a kol., 2000). Komplexné vedomosti o procesoch hojenia nám umožňujú aktívne vstupovať na rôznych úrovniach a tým ovplyvniť výsledok hojenia rán v zmysle docieľiť hojenie v čo najlepšej kvalite (estetická a funkčná stránka) a najkratšom možnom čase (Rezaie a kol., 2019; Raziyeve a kol., 2021). V priebehu histórie prešla starostlivosť o rany vý-

znamným vývojom. V minulosti sa starostlivosť a liečba rán zameriavala na použitie ľanovej tkaniny namočenej v oleji či masti, alebo použitie hliny v Mezopotámii. Rany sa čistili vodou alebo mliekom a potom sa aplikoval med alebo živica. V starovekom Grécku, v období 460 – 370 pred n. l., zaviedol Hipokrates do čistenia rán víno alebo ocot a používal vlnené obvazy. V 19. storočí sa zaviedli antiseptické techniky na kontrolu infekcií. V 20. storočí sa objavili moderné krytia rán, ktoré vytvárajú vlhké prostredie a podporujú rýchlejšie hojenie (Brocke a kol., 2020). Medzi moderné okluzívne krytia zaraďujeme:

- Filmy – tenké, priehľadné obvazy, ktoré majú zvyčajne adhezívnu stranu smerujúcu k rane. Nemajú absorpčné schopnosti, ale ranu je možné vizualizovať.
- Peny – absorpčné obvazy, ktoré môžu byť impregnované rôznymi látkami (napr. lokálne antibiotiká). Povrch rany je zvyčajne neadhezívny a ak zostane vlhký, krytie sa odstráni čisto.
- Hydrogély – gél tvorený prevažne vodou, tieto obvazy majú len slabé absorpčné vlastnosti a v skutočnosti môžu zvlhčiť suché lôžka rany. Hydrogély sa považujú za semiokluzívne, pretože umožňujú penetráciu baktérií, ak vyschnú.
- Hydrokoloidy – skladajú sa zo suchej hydrogélovej vrstvy smerujúcej k rane s absorpčnými vlastnosťami a filmovej alebo penovej vrstvy, ktorá zabraňuje prenikaniu baktérií a poskytuje štruktúrnu stabilitu. Hydrokoloidy s krycou vrstvou sú pravé okluzívne obvazy a zabraňujú výmene vzduchu a vody.

Medzi najbežnejšie zlúčeniny prírodného pôvodu používané na výrobu moderných krytí rán patria chitín, chitosan, karagénan, kolagén, pektín, elastín, kys. hyalurónová, alginát, dextrán, agaróza či fibrín. Po tisícoch tak slúžili prírodné zlúčeniny ako neoceniteľné prostriedky na liečbu rán. Tieto zlúčeniny, bohato zastúpené v rôznych rastlinách a živočíchoch, preukázali svoju účinnosť v liečebných procesoch, o čom svedčí ich dlhodobé používanie aj v tradičnej čínskej či indickej medicíne. Vzhľadom na obrovské

Obr. 1: Prehľad biologickej aktivity prírodných látok využitelných pri hojení rán



Zdroj: Trinh a kol., 2022

množstvo dostupných prírodných zlúčenín sú komplexné prehľady týchto látok nenahraditeľným zdrojom informácií pre čitateľov aj výskumníkov, ktoré uľahčujú ich systematické skúmanie.

Klasifikácia prírodných látok

Na základe literárnych údajov (Trinh a kol., 2022) boli v tomto článku prírodné zlúčeniny využiteľné na liečbu rán rozdelené do kategórií na základe ich biologickej aktivity, a to na zlúčeniny s protizápalovými účinkami, antioxidačnými účinkami, antibakteriálnymi účinkami a s kolagén-stimulačnými účinkami (viď obr. 1).

Vybrané prírodné zlúčeniny s protizápalovým účinkom

Myricetín

Myricetín vyskytujúci sa v mnohých ovocných plodoch patrí medzi flavonoidy s dobre preskúmanými účinkami pri hojení rán (Elshamy a kol., 2020). Popísané boli jeho antioxidačné, antialergické, protizápalové a imunomodulačné účinky (Semwal a kol.,

2016). Myricetín ovplyvňuje hladiny zápalových cytokínov, ako sú napríklad faktor nádorovej nekrózy (TNF- α), CD68, a interleukín-1 β (IL-1 β). Myricetín preukázal zvýšenú produkciu prozápalových cytokínov v sére (napríklad IL-1 β a TNF- α) a zníženú expresiu makrofágového CD68. Tieto zistenia naznačujú, že myricetín by mohol byť terapeuticky využitý pri hojení rán tým, že zlepšuje produkciu zápalových cytokínov a systémovú reorganizáciu. Okrem toho myricetín inhibuje produkciu prozápalových cytokínov IL-6 a IL-8 v kožných bunkách (Sklénarova a kol., 2021). Avšak myricetín je veľmi slabo rozpustný vo vode, čo ovplyvňuje jeho biologickú dostupnosť (Hong a kol., 2015). Toto obmedzenie je potrebné riešiť kombinovaním myricetínu s inými zlúčeninami alebo biomateriálmi na zlepšenie jeho rozpustnosti vo vode.

Lupeol

Lupeol je bioaktívna zlúčenina, ktorá sa nachádza hlavne v *Bowdichia virgilioides* a ovocí, ako sú mango, sójové bôby a olivy (Pereira Beserra a kol., 2020). Má antioxidačné, protizápalové a antineoplastické

účinky (Sudhahar a kol., 2006; Saleem, 2009) a zároveň znižuje produkciu zápalových cytokínov NF- κ B a IL-6, zatiaľ čo zvyšuje hladinu IL-10. Okrem toho má lupeol vplyv aj na angiogénu a proliferáciu buniek prostredníctvom zníženia expresie VEGF-A a zvýšenia expresie HIF-1 α . Tieto faktory sú markermi angiogénu a proliferácie buniek pri hojení rán (Beserra a kol., 2019). Liečba rán lupeolovým krémom ovplyvňuje hladiny prozápalových cytokínov, znižuje expresiu TNF- α , IL-1 β a IL-6 a zvyšuje expresiu IL-10. Okrem toho sa ukázalo, že liečba lupeolovým krémom zvyšuje hladiny VEGF a epidermálneho rastového faktora (EGF) a zvyšuje expresiu génu transformujúceho rastového faktora beta-1 (TGF- β 1) po 7 dňoch (Pereira Beserra a kol., 2020). Tieto faktory sa podieľajú na proliferatívnej fáze hojenia rán. Zároveň lupeol urýchľuje remodelovanie tkaniva tým, že zvyšuje syntézu kolagénových vlákien.

Bilirubín

Bilirubín je červeno-oranžová zlúčenina, ktorá je konečným produktom metabolismu hému u cicavcov a zohráva dôležitú úlohu pri ochrane buniek (Stocker a kol., 1987). Pri ošetrovaní kožných rán potkanov bilirubínom sa zistilo, že hladiny prozápalových faktorov (napríklad ICAM-1 a TNF- α) klesali a zvýšila sa expresia IL-10. U liečených potkanov sa tiež zvýšila kontrakcia rany a hladiny hydroxyprolínu a glukozamínu (Kant a kol., 2017). Bolo preukázané, že bilirubín zlepšuje hojenia rán aj u diabetických potkanov (Ram a kol., 2016). Bilirubín znižuje expresiu mRNA prozápalových cytokínov TNF- α , MMP-9 a IL-1 β , zatiaľ čo zvyšuje expresiu IL-10. Zároveň bola u potkanov liečených bilirubínom zvýšená expresia génov antioxidantov a pro-angiogénnych faktorov (VEGF, HIF-1 α , SDF-1 α , TGF- β). Zároveň bolo u liečených potkanov pozorované rýchlejšie zatváranie rán, zvýšená depozícia kolagénu a zrýchlená tvorba krvných ciev v porovnaní s kontrolnou skupinou. Tieto výsledky potvrdili úlohu bilirubínu pri regulácii prozápalových a angiogénnych faktorov v procese hojenia rán.

Vybrané prírodné zlúčeniny s antioxidačnými účinkami

Kurkumín

Kurkumín sa získava najmä z kurkumy (*Curcuma longa* L.) a preukázané boli viaceré jeho prospešné účinky vrátane protizápalových, antioxidačných a antikoagulačných (Joe a kol., 2004). Kurkumín chráni ľudské dermálne fibroblasty a epidermálne bunky pred účinkami peroxidu vodíka a superoxidových radikálov (Phan a kol., 2001) a zároveň má protektívne účinky na ľudské keratinocyty (Bonte a kol., 1997). V neposlednom rade kurkumín znižuje hladiny voľných kyslíkových radikálov a aktivitu lipidovej peroxidázy, čím sa znižuje aktivácia antioxidačných enzýmov po liečbe rán u potkanov (Mohanty a kol., 2012). Napriek jeho vynikajúcim biologickým účinkom popísaným vyššie má kurkumín obmedzenia v terapeutickom použití. Kurkumín je totiž takmer nerozpustný vo vode, čo vedie k nestabilite a jeho nízkej biologickej dostupnosti (Anand a kol., 2007).

Kvercetín

Kvercetín je známy flavonoid, ktorý sa nachádza v zelenine, ovocí a semenách, ako sú citrusy, cibuľa, čaj či korenie. Je tiež známy svojimi silnými antioxidačnými a protizápalovými vlastnosťami (Aceituno-Medina a kol., 2015). Bolo preukázané, že ošetrovanie rán kvercetínom skracovalo čas hojenia, významne znížilo úroveň oxidačného stresu, regulovalo produkciu cytokínov a rastových faktorov, podporovalo proliferáciu fibroblastov, tvorbu ciev a depozíciu kolagénu (Kant a kol., 2020). Liečba rán kvercetínom extrahovaným z rastliny *Oxytropis falcata* Bunge, tradičnej čínskej strukoviny pestovanej v Tibete, zvyšovala obsah kolagénových vlákien a významne znižovala hladiny zápalových faktorov (TNF- α , IL-1 a IL-6). Liečba kvercetínom zároveň zvýšila hladiny glutatiónu, čo naznačuje, že kvercetín má vysokú antioxidačnú kapacitu pri hojení kožných rán (Mi a kol., 2022). Možno konštatovať, že kvercetín prejavuje účinný hojivý účinok na pokožku tým, že zvyšuje migráciu a proliferáciu fibroblastov a inhibuje zápal

prostredníctvom antioxidačnej aktivity. Podobne ako väčšina flavonoidov je kvercetin málo rozpustný vo vode (Gugler a kol., 1975). Toto fyzikálne obmedzenie ovplyvňuje terapeutické použitie kvercetínu pri liečbe rán.

Resveratrol

Resveratrol sa nachádza vo viac ako 70-tich rôznych druhoch rastlín a je známy pre svoje výnimočné liečivé účinky, medzi ktoré patria antioxidačné, protinádorové, protizápalové a antibakteriálne účinky (Marques a kol., 2009; Malhotra a kol., 2015). Resveratrol chráni pred poškodením spôsobeným peroxidom vodíka, efektívne znižuje migráciu poškodených buniek a účinne potláča tvorbu intracelulárnych voľných kyslíkových radikálov a peroxidu vodíka (Zhou a kol., 2021). *In vivo* testy tiež potvrdili, že resveratrol urýchľuje hojenie rán, zlepšuje štruktúru kože a znižuje zápal. Tieto účinky môžu byť spôsobené tým, že resveratrol zvyšuje expresiu Mn-SOD, a tým redukuje oxidačné poškodenie. Resveratrol má pozitívne účinky na podporu zrýchlenia a kvality hojenia kožných rán potkanov, pričom jedným z preukázaných mechanizmov tohto zlepšenia je upregulácia nukleárných Nrf2 a Mn-SOD, čo má za následok zmiernenie oxidačného stresu (Zhou a kol., 2021).

Vybrané prírodné zlúčeniny s antibakteriálnymi účinkami

Chitosan

Chitín [poly(β -(1–4)-N-acetyl-d-glukozamín)] je jedným z najrozšírenejších polysacharidov, pričom jeho najväčším zdrojom je exoskelet morských kôrovcov, kreviet, krabov a hmyzu (Rinaudo, 2006). Chitosan je kopolymér glukozamínu a N-acetylglukozamínu spojených β -(1–4) glykozidickými väzbami a je najdôležitejším derivátom chitínu. Tajomstvom antibakteriálnych vlastností chitosanu je interakcia s negatívne nabitými molekulami v bakteriálnych membránach, ako sú anionické polysacharidy, proteíny a nukleové kyseliny (Chung a kol., 2008). Chitosan má významné výhody pri liečbe rán vďaka

svojej biokompatibilite, biodegradovateľnosti, nízkej toxicite, adsorpčným vlastnostiam a hemostatickým účinkom (Khoshfetrat a kol., 2016). Avšak chitosan je nerozpustný v neutrálnych a alkalických vodných roztokoch s hodnotami pH vyššími ako 6,5; čo vážne obmedzuje jeho použitie (Mohamed a kol., 2017). Na zvýšenie jeho biologickej dostupnosti bol chitosan v predklinických štúdiách integrovaný do niekoľkých liekových foriem s využitím nanočastíc, hydrogélů či micel (Bonferoni a kol., 2014; Verma a kol., 2017; Wang a kol., 2019; Bagher a kol., 2020).

Včelí med a propolis

Včelie produkty sú tiež prirodzenými antibakteriálnymi zdrojmi, ktoré sa bežne používajú pri liečbe rán. Včelí med sa na liečbu rán používa tisíce rokov, pričom prvé písomné zmienky pochádzajú z obdobia medzi rokmi 2600 a 2200 pred n. l. a sú uvedené v starovekom egyptskom traumatologickom manuáli (Majtan, 2011; Zubair a kol., 2015). Med je koncentrovaný vodný roztok invertných cukrov, ktorý obsahuje 40 % fruktózy, 40 % glukózy, 20 % vody, enzýmy, vitamíny a minerály, s pH 3,6 (Samarghandian a kol., 2017). Väčšina bežných druhov medu produkuje peroxid vodíka prostredníctvom endogénnej glukózo-oxidázy, ktorá je zodpovedná za jeho antibakteriálnu aktivitu. Pri rozklade peroxidu vodíka vznikajú vysoko reaktívne voľné radikály, ktoré priamo poškodzujú baktérie a tým ich eliminujú. Niektoré druhy medu ako napr. „Manuka“ či „jelly bush“ nemajú glukózo-oxidázovú aktivitu, no zachovávajú si svoje antibakteriálne vlastnosti v dôsledku nízkeho pH a vysokého obsahu cukru (Mandal a kol., 2011). Med „Manuka“ obsahuje významné množstvo metylglyoxálu, jedinečnej antibakteriálnej zložky zodpovednej za jeho špecifický antibakteriálny účinok (Atrott a kol., 2009); ktorý spočíva v indukovanej zmene štruktúry fimbrií a bičíkov, čo obmedzuje príľnavosť a motilitu baktérií (Rabie a kol., 2016). Propolis bol používaný v starovekom Egypte, Rimanmi a Peržanmi. Možno ho získavať z včelieho medu, púčikov stromov a iných rastlinných zdrojov (napr. topol', vĺba, jaseň, jelša, breza atď.). Propolis pozostáva z viac než 300

chemických zlúčenín, ako sú polyfenoly, fenolové aldehydy, aminokyseliny, steroidy atď. (Huang a kol., 2014). Najdôležitejšími zložkami propolisu s antibakteriálnymi účinkami na Gram-pozitívne baktérie sú flavonoidy, fenypropánoidy, kyselina škoricová a jej estery a glyceridy (Uzel a kol., 2005).

Vybrané prírodné zlúčeniny s kolagén-stimulačným účinkom

β-glukány

β-glukány sú glukózové polyméry a možno ich nájsť v kvasinkách, obilninách či hubách. Tieto látky sú klasifikované ako modulatory biologickej odpovede (Bohn a kol., 1995). Mnohé štúdie preukázali, že nanočastice β-glukánov ako aj rozpustné β-glukány zlepšili imunitné funkcie a majú protizápalové, protinádorové a imunomodulačné účinky (Sherwood a kol., 1987; Pretus a kol., 1991). β-glukány zlepšujú hojenie rán tým, že zvyšujú infiltráciu makrofágov, čo podporuje granuláciu tkaniva, ukladanie kolagénu a reepitelizáciu. S vynikajúcou stabilitou a odolnosťou voči proteázam nachádzajúcich sa v ranách predstavujú obvazy obohatené o β-glukány sľubný prostriedok zlepšujúci hojenie rán (Majtan a kol., 2018).

Aminokyseliny a peptidy

Okrem tradičných liečivých rastlín sú opísané aj zdroje prírodných zlúčenín pre hojenie rán obsahujúce aminokyseliny a peptidy zo zvierat (napr. včiel, mäkkýšov, slimákov, rýb atď.). Pre fibroblasty, ktoré potrebujú kyslé prostredie k vykonávaniu funkcií ako sú migrácia a organizovanie kolagénu, môže nízke pH medzi pomôcť vytvoriť a udržiavať ideálne podmienky (Mellin a kol., 1992). Aminokyseliny z druhov *Rapana venosa* a *Mytilus galloprovincialis* zlepšujú tvorbu nových vrstiev kože, čím urýchľujú hojenie kožných rán (Badiu a kol., 2010). Mechanizmus účinku týchto aminokyselín zlepšujúcich hojenie rán je pravdepodobne úzko spojený s rozdielnou reguláciou arginínového metabolizmu makrofágov, pri ktorej by mohol TGF-β1 zohrávať zásadnú regulačnú úlohu (Shearer a kol., 1997). Bioaktívny peptid ex-

trahovaný zo slimákov *Cryptozona bistrialis* stimuluje *in vitro* migráciu buniek myších fibroblastov NIH/3T3. Testy na zdravých a diabetických potkanoch tiež ukázali, že peptid *Cryptozona bistrialis* je účinný pri podpore hojenia rán (Ulagesan a kol., 2018).

Vybrané rastlinné extrakty používané v procese hojenia rán

Bylinné liečivá zohrali dôležitú úlohu pri liečení chorôb v priebehu celej histórie ľudstva. Rastlinné extrakty našli svoje využitie už v dávnych časoch v tradičnej medicíne vďaka svojim protizápalovým, antibakteriálnym, antivírusovým a antifungálnym vlastnostiam pri liečbe rôznorodých ochorení, rezných rán a popálenín (Budovsky a kol., 2015). Prírodné zlúčeniny, ako sú alkaloidy, saponíny, terpény, éterické oleje a polyfenoly z rôznych rastlinných zdrojov vykazujú pozitívne biologické účinky v kontexte hojenia rán (Ghaima, 2013). Baktérie *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* sú najčastejšie vyskytujúcimi sa patogénmi, ktoré spôsobujú infekcie kože, zatiaľ čo *Escherichia coli* je oportúnnym patogénom, ktorý sa často vyskytuje v oblasti rezných rán (Pfalzgraff a kol., 2016). Infekcie sú hlavným zdrojom komplikácií pozorovaných pri hojení rán. Riešením sú pokročilé kryty s obsahom prírodných látok, ktoré vďaka svojej antimikrobiálnej aktivite a hojivým schopnostiam môžu urýchliť proces hojenia rán (Yazarlu a kol., 2021).

Aloe vera

Aloe vera (Aloa pravá) obsahuje množstvo prírodných bioaktívnych zlúčenín ako napr. kyselinu olejovú, acemanán, fytol, pyrokatechol ale aj rôzne glykozidy, polysacharidy, saponíny, antrachinóny a vo vode rozpustné polysacharidy. Práve saponíny, acemanán a deriváty antrachinónu sa preukázali ako zlúčeniny s antimikrobiálnou aktivitou. Acemanán, polysacharid zložený z jednotiek manózy a glukózy, efektívne stimuluje makrofágy a T-lymfocyty, zvyšuje expresiu mRNA prozápalových cytokínov IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α, PGE2 a oxidu dusného. Polysacharidy ob-

siahnuté v extraktoch *aloe vera* efektívne viažu a absorbujú endogénne mitogénne inhibítory a reaktívne kyslíkové formy, čím podporujú fagocytózu. Taktiež stabilizujú vylučované cytokíny, rastové faktory a iné bioaktívne látky, čím ich funkcia pretrváva dlhšie. Aplikácia acemanánu na ranu výrazne skracuje dobu hojenia rany (Choi a kol., 2003; Oryan a kol., 2010; Eghdampour a kol., 2013; Galehdari a kol., 2016; Massoud a kol., 2023;).

Centella asiatica

Extrakt z *Centella asiatica* (Pupočník lekársky) sa používajú na zlepšenie hojenia chronických vredov, s prihliadnutím na ich veľkosť, hĺbku a rozsah. Asiaticozid izolovaný z *Centella asiatica* podporuje proces epitelizácie a tvorbu kolagénu v rane. Triterpény izolované z *Centella asiatica* zlepšujú remodeláciu kolagénu a syntézu glykozaminoglykánov. Jedným z nich je aj madekazosid (triterpénový saponín), u ktorého bola preukázaná podpora tvorby kolagénu a angiogenézy na mieste rany (Babu a kol., 2011; Arribas-López a kol., 2022).

Aesculus hippocastanum

Aesculus hippocastanum L. (Pagaštan konský) je zaradovaný do čeľade *Hippocastaneae* a je celosvetovo rozšírený. Semená *Aesculus hippocastanum* L. obsahujú rôzne zlúčeniny, vrátane bioflavonoidov (kvercetín, kaempferol a ich deriváty v podobe diglykozidov), triterpenoidných saponínov (aescín, prosapogenín), proantokyandínu A2 a kumarínov (esculín a fraxín) (Sirtori, 2001). Saponíny obsiahnuté v extraktoch *Aesculus hippocastanum* L. majú silné protizápalové vlastnosti. Zlúčeniny ako aescín taktiež zvyšujú odolnosť kapilár, a tým prispievajú k zamedzeniu úniku tekutín do okolitých tkanív, čo môže zabrániť vzniku opuchov (Wilkinson a kol., 1999). Štúdia sledujúca efekt extraktu *Aesculus hippocastanum* L. na úrovni *in vitro* odhalila indukciu tvorby extracelulárnej matrice bohatšej na fibronektín, bez indukcie expresie α -SMA dermálnych fibroblastov. *In vivo* experimenty odhalili, že extrakt podporuje hojenie rán a zlepšuje organizáciu kolagénu. Porovnanie dvoch

základných modelov hojenia rán priamo ukázalo, že použitie *Aesculus hippocastanum* L. výrazne zvýšilo schopnosť hojenia, čo indikuje potenciál extraktov z tejto rastliny zlepšiť hojenie akútnych rán (Kováč a kol., 2020).

Calendula officinalis

Calendula officinalis L. (Nechtík lekársky) z čeľade *Asteraceae*, je bežne používaná rastlina na liečbu rôznych kožných problémov, ako sú rany, popáleniny a dermatitída (Nicolaus a kol., 2017). Z farmakologického hľadiska majú extrakt preukázané protizápalové, antioxidačné, antibakteriálne, antivírusové, antifungálne a protinádorové účinky (Chandran a kol., 2008). Aj keď pozitívne účinky *Calendula officinalis* pri hojení rán sú všeobecne známe, presné mechanizmy týchto účinkov nie sú úplne preskúmané. Štúdie vykonané na bunkách ľudských a myších fibroblastov ukázali, že extrakt z *Calendula officinalis* podporujú migráciu a proliferáciu týchto buniek, ovplyvnením signálnej dráhy PI3K (Dinda a kol., 2015). Výťažky z kvetov *Calendula officinalis* sú schopné stimulovať tvorbu granulačného tkaniva tým, že ovplyvňujú expresiu faktora spojivového tkaniva (CTGF) a hladkého svalového aktínu (α -SMA) (Dinda a kol., 2016); a podporujú tvorbu nových krvných ciev *in vivo* (Parente a kol., 2012).

Chamomilla recutita

Chamomilla recutita L. (Rumanček kamilkový) patrí do čeľade *Asteraceae*. Obsahuje rôzne zlúčeniny, ako sú chamazulén, alfa-bisabolol, oxidy bisabololu, spiroétery a flavonoidy (apigenín, kvercetín, patuletín, luteolín a ich glykozidy), ktoré vykazujú terapeutické účinky. Má protizápalové účinky, antibakteriálne, antiseptické a antispazmodické účinky (Farahpour, 2019). Výskum naznačuje, že použitie masti s extraktom z *Chamomilla recutita* L. môže urýchliť reepitelizáciu a vývoj kolagénových vlákien v priebehu 10 dní (Albahri a kol., 2023). *In vitro* štúdie antibakteriálnej a antifungálnej účinnosti aktívnych nanovláknových polykaprolaktónových/polystyrénových (PCL/PS) krytov rán preukázali antibakteriál-

ne účinky voči *Staphylococcus aureus* či kvasinkám *Candida albicans* (Motealleh a kol., 2014). Ďalšia podobná štúdia tiež preukázala antibakteriálnu účinnosť nanovláknového krytu rán s obsahom 15, 20 a 30 % extraktu *Chamomilla recutita* L., pričom antibakteriálny účinok bol koncentračne závislý a prekonal účinok komerčne dostupných krytov na rany so striebornými nanočasticami (Shokrollahi a kol., 2020).

Camellia sinensis

Vodný extrakt z listov rastliny *Camellia sinensis* (Čajovník čínsky), je známy pre svoje mnohé zdravotné benefity. *Camellia sinensis* má experimentálne overené rôzne prospešné účinky, ako napríklad antioxidačné, protizápalové, antimikrobiálne, antikarcinogénne, kardioprotektívne a neuroprotektívne (Samanta, 2022). Tieto farmakologické účinky sa prevažne pripisujú katechínom. Hlavným katechínom obsiahnutým v extraktoch *Camellia sinensis* je (-)-epigalokatechín-3-galát (EGCG) (Kouhhabibi-dehkordi a kol., 2021). Podporuje rast a diferenciáciu keratinocytov (Hsu a kol., 2003) a modifikuje signalizáciu TGF- β tým, že potláča aktivitu receptorov pre TGF- β , čo vedie k zníženej expresii MMP-1 a MMP-2 a zníženej syntéze kolagénu typu 1 v ľudských dermálnych fibroblastoch. Tieto poznatky naznačujú, že EGCG môže mať potenciálne účinky na zmiernenie vzniku jaziev (Klass a kol., 2010). Vzhľadom na redukciu oxidačného stresu indukovaného ultrafialovým žiarením a zníženie poškodenia DNA v keratinocytoch predstavujú produkty s nanoformulovaným EGCG prírodné chemopreventívne prostriedky na ochranu pred účinkami UVB žiarenia (Salaheldin a kol., 2022).

Agrimonia eupatoria

Agrimonia eupatoria L. (Repík lekársky) je bylina z čeľade *Rosaceae*, často využívaná v tradičnej medicíne pre svoje prospešné účinky. Jej vodné extrakty sa využívajú na liečbu ochorení dýchacích ciest a močových ciest, tráviaceho systému a chronických rán. Obsahuje rôzne bioaktívne zlúčeniny, vrátane ta-

nínov, flavonoidov, triterpenoidov a éterických olejov (Paluch a kol., 2020). Medzi najviac zastúpené zlúčeniny patria kvercetinové glykozidy a proantokyandínové triméry, zaraďované medzi flavonoidy. Predpokladá sa, že tieto flavonoidy sú zodpovedné za rôzne biologické vlastnosti liečivých rastlín, akými sú napríklad protizápalové, antivírusové, antibakteriálne, neuroprotektívne, antiulcerogénne, spazmolytické, antitrombotické, protirakovinové, antidiabetické a antioxidačné účinky (Cao a kol., 1997; Kuczmanová a kol., 2015; Kuczmánová a kol., 2016). Je všeobecne známe, že množstvo, štruktúra a zloženie novovytvorenej matrice v rane súvisia s odolnosťou rany. Nedávna štúdia preukázala schopnosť výtlačku z *Agrimonia eupatoria* L. urýchliť uzatváranie rany a zvýšiť pevnosť rany po jej zhojení. Rovnako bola pozorovaná zvýšená depozícia ECM fibroblastami *in vitro*. Rýchlejšia epidermálna regenerácia rany bola spôsobená zvýšeným počtom fibroblastov v mieste rany. Rovnako testovaný výtlačok z *Agrimonia eupatoria* L. zvýšil bunkovú proliferáciu *in vitro*. Bola pozorovaná zvýšená expresia Ki67 a keratínu 19 (Vasilenko a kol., 2022). Extrakty z koreňov *Agrimonia eupatoria* L. dokážu účinne inhibovať rast baktérií *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* (Watkins a kol., 2012). Etanolové extrakty mali silnejší účinok proti *Escherichia coli* v porovnaní s vodnými extraktmi a miernejšie inhibičné účinky proti baktériám *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* (Ghaima, 2013; Muruzović a kol., 2016).

ZÁVER

Prírodné zlúčeniny získané z rastlín a zvierat preukázali množstvo pozitívnych účinkov v procese hojenia rán. Štúdie zdôraznili ich protizápalové, antioxidačné a antibakteriálne vlastnosti, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu pri zmiernení zápalu, znižovaní oxidačného stresu a pri prevencii infekcií v mieste rany. Napriek ich významnému potenciálu však stále pretrvávajú problémy s využitím všetkých výhod prírodných zlúčenín na hojenie rán. Problémy ako obmedzené výtlačky extrakcie, chemická nestabilita a

nízka rozpustnosť predstavujú prekážky pri ich integracii do farmaceutických prípravkov. Riešenie týchto výziev si vyžaduje spoločné úsilie vo výskume a vývoji s cieľom optimalizovať metódy extrakcie, zvýšiť biologickú dostupnosť a zabezpečiť bezpečnosť a účinnosť terapií rán na báze týchto zlúčenín (Zhang a kol., 2018). Záverom možno povedať, že skúmanie prírodných zlúčenín predstavuje sľubnú cestu pre pokrok v terapeutických intervenciách zameraných na regeneráciu tkaniva, zmiernenie komplikácií a v konečnom dôsledku zlepšenie výsledkov hojenia rán.

ZOZNAM LITERATÚRY

- Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Rodríguez, B. A., Lagaron, J. M., López-Rubio, A.: Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during *in-vitro* digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers. *Journal of Functional Foods*, 2015, 12, 332 – 341.
- Albahri, G., Badran, A., Hijazi, A., Daou, A., Baydoun, E., Nasser, M., Merah, O.: The therapeutic wound healing bioactivities of various medicinal plants. *Life*, 2023, 13 (2), 317.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., Aggarwal, B. B.: Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.*, 2007, 4 (6), 807 – 818.
- Arribas-López, E., Zand, N., Ojo, O., Snowden, M. J., Kochhar, T.: A systematic review of the effect of *Centella asiatica* on wound healing. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2022, 19 (6), 3266.
- Atrott, J., Henle, T.: Methylglyoxal in Manuka honey – correlation with antibacterial properties. *Czech Journal of Food Sciences*, 2009, 27 (10), S163 – S165.
- Babu, M. K., Prasad, O., Murthy, T.: Comparison of the dermal wound healing of *Centella asiatica* extract impregnated collagen and cross linked collagen scaffolds. *J. Chem. Pharm. Res.*, 2011, 3 (3), 353 – 362.
- Badiu, D. L., Luque, R., Dumitrescu, E., Craciun, A., Dinca, D. 2010. Amino acids from *Mytilus galloprovincialis* (L.) and *Rapana venosa* molluscs accelerate skin wounds healing via enhancement of dermal and epidermal neoformation. *Protein J.*, 2010, 29 (2), 81 – 92.
- Bagher, Z., Ehterami, A., Safdel, M. H., Khastar, H., Semiari, H., Asefnejad, A., Davachi, S. M., Mirzaii, M., Salehi, M.: Wound healing with alginate/chitosan hydrogel containing hesperidin in rat model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020, 55 (3), 101 379.
- Bayat, A., Mcgrouter, D. A., Ferguson, M. W.: Skin scarring. *BMJ*, 2003, 326 (7380), 88 – 92.
- Beserra, F. P., Vieira, A. J., Gushiken, L. F. S., De Souza, E. O., Hussni, M. F., Hussni, C. A., Nobrega, R. H., Martinez, E. R. M., Jackson, C. J., De Azevedo Maia, G. L., Rozza, A. L., Pellizzon, C. H.: Lupeol, a dietary triterpene, enhances wound healing in streptozotocin-induced hyperglycemic rats with modulatory effects on inflammation, oxidative stress, and angiogenesis. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2019, 3 (182), 627.
- Bohn, J. A., Bemiller, J. N.: (1→3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, 1995, 28 (1), 3 – 14.
- Bonferoni, M. C., Sandri, G., Dellera, E., Rossi, S., Ferrari, F., Mori, M., Caramella, C.: Ionic polymeric micelles based on chitosan and fatty acids and intended for wound healing. Comparison of linoleic and oleic acid. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2014, 87 (1), 101 – 106.
- Bonte, F., Noel-Hudson, M. S., Wepierre, J., Meybeck, A.: Protective effect of curcuminoids on epidermal skin cells under free oxygen radical stress. *Planta Med.*, 1997, 63 (3), 265 – 266.
- Borena, B. M., Martens, A., Broeckx, S. Y., Meyer, E., Chiers, K., Duchateau, L., Spaas, J. H.: Regenerative skin wound healing in mammals: state-of-the-art on growth factor and stem cell based treatments. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2015, 36 (1), 1 – 23.
- Brocke, T., Barr, J.: The history of wound healing. *Surg. Clin. North Am.*, 2020, 100 (4), 787 –

Budovsky, A., Yarmolinsky, L., Ben-Shabat, S.: Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 2015, 23 (2), 171 – 183.

Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L.: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free radical biology and medicine*, 1997, 22 (5), 749 – 760.

Dinda, M., Dasgupta, U., Singh, N., Bhattacharyya, D., Karmakar, P.: PI3K-mediated proliferation of fibroblasts by *Calendula officinalis* tincture: implication in wound healing. *Phytotherapy Research*, 2015, 29 (4), 607 – 616.

Dinda, M., Mazumdar, S., Das, S., Ganguly, D., Dasgupta, U. B., Dutta, A., Jana, K., Karmakar, P.: 2016. The water fraction of *Calendula officinalis* hydroethanol extract stimulates in vitro and in vivo proliferation of dermal fibroblasts in wound healing. *Phytotherapy Research*, 2016, 30 (10), 1696 – 1707.

Eghdampour, F., Jahdie, F., Kheyrkhah, M., Taghizadeh, M., Naghizadeh, S., Hagani, H.: The impact of *Aloe vera* and calendula on perineal healing after episiotomy in primiparous women: a randomized clinical trial. *J. Caring Sci.*, 2013, 2 (4), 279 – 286.

Elshamy, A. I., Ammar, N. M., Hassan, H. A., El-Kashak, W. A., Al-Rejaie, S. S., Abd-Elgawad, A. M., Farrag, A. H.: Topical wound healing activity of myricetin isolated from *Tecomaria capensis* v. *aurea*. *Molecules*, 2020, 25 (1), 4870.

Farahpour, M. R.: Medicinal plants in wound healing. *Wound Heal. Curr. Perspect.*, 2019, 33 – 47.

Galehdari, H., Negahdari, S., Kesmati, M., Rezaie, A., Shariati, G.: Effect of the herbal mixture composed of *Aloe Vera*, Henna, *Adiantum capillus-veneris*, and Myrrha on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 2016, 16 (386), 1 – 9.

Ghaima, K. K.: Antibacterial and wound healing activity of some *Agrimonia eupatoria* extracts. *Baghdad Sci. J.*, 2013, 10, 152 – 160.

Gugler, R., Leschik, M., Dengler, H. J.: Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1975, 9 (2 – 3), 229 – 234.

Hong, C., Xie, Y., Yao, Y., Li, G., Yuan, X., Shen, H.: A novel strategy for pharmaceutical cocrystal generation without knowledge of stoichiometric ratio: myricetin cocrystals and a ternary phase diagram. *Pharm Res.*, 2015, 32 (1), 47 – 60.

Hsu, S., Bollag, W. B., Lewis, J., Huang, Q., Singh, B., Sharawy, M., Yamamoto, T., Schuster, G.: Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003, 306 (1), 29 – 34.

Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., Hu, F. L.: Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 2014, 19 (12), 19 610 – 19 632.

Chandran, P. K., Kuttan, R.: Effect of *Calendula officinalis* flower extract on acute phase proteins, antioxidant defense mechanism and granuloma formation during thermal burns. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 2008, 43 (2), 58 – 64.

Choi, S., Chung, M.-H.: A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Seminars in integrative medicine*. Elsevier, 2003, 1 (1), 53 – 62.

Chung, Y.-C., Chen, C.-Y.: Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*, 2008, 99 (8), 2806 – 2814.

Joe, B., Vijaykumar, M., Lokesh, B. R.: Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2004, 44 (2), 97 – 111.

Kant, V., Jangir, B. L., Kumar, V., Nigam, A., Sharma, V.: Quercetin accelerated cutaneous wound healing in rats by modulation of different cytokines and growth factors. *Growth Factors*, 2020, 38 (2), 105 – 119.

Kant, V., Jangir, B. L., Nigam, A., Kumar, V., Sharma, S.: Dose regulated cutaneous wound healing potential of quercetin in male rats. *Wound Medi-*

cine, 2017, 19, 82 – 87.

Khoshfetrat, A. B., Khanmohammadi, M., Sakai, S., Taya, M.: Enzymatically-gellable galactosylated chitosan: hydrogel characteristics and hepatic cell behavior. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 92, 892 – 899.

Klass, B. R., Branford, O. A., Grobbelaar, A. O., Rolfe, K. J.: The effect of epigallocatechin-3-gallate, a constituent of green tea, on transforming growth factor- β 1-stimulated wound contraction. *Wound Repair and Regeneration*, 2010, 18 (1), 80 – 88.

Kouhihabidehkordi, G., Kheiri, S., Karimi, I., Taheri, F., Bijad, E., Bahadoram, M., Alibaie, Z., Asgharian, S., Zamani, H., Rafieian-Kopaei, M.: Effect of white tea (*Camellia sinensis*) extract on skin wound healing process in rats. *World J. Plast. Surg.*, 2021, 10 (1), 85 – 95.

Kováč, I., Melegová, N., Čoma, M., Takáč, P., Kováčová, K., Hollý, M., Ďurkáč, J., Urban, L., Gurbáľová, M., Švajdlenka, E.: *Aesculus hippocastanum* L. extract does not induce fibroblast to myofibroblast conversion but increases extracellular matrix production in vitro leading to increased wound tensile strength in rats. *Molecules*, 2020, 25 (8), 1917.

Kuczmánová, A., Balážová, A., Račanská, E., Kameníková, M., Fialová, S., Majerník, J., Nagy, M., Gál, P., Mučaji, P.: *Agrimonia eupatoria* L. and *Cynara cardunculus* L. water infusions: comparison of anti-diabetic activities. *Molecules*, 2016, 21 (5), 564.

Kuczmánová, A., Gál, P., Varinská, L., Treml, J., Kováč, I., Novotný, M., Vasilenko, T., Dal'acqua, S., Nagy, M., Mučaji, P.: *Agrimonia eupatoria* L. and *Cynara cardunculus* L. water infusions: phenolic profile and comparison of antioxidant activities. *Molecules*, 2015, 20 (11), 538 – 550.

Majtan, J.: Methylglyoxal-a potential risk factor of manuka honey in healing of diabetic ulcers. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 2011, 2011:295494.

Majtan, J., Jesenak, M.: Beta-glucans: multi-functional modulator of wound healing. *Molecules*, 2018, 23 (4), 806.

Malhotra, A., Bath, S., Elbarbry, F.: An organ system approach to explore the antioxidative, anti-inflammatory, and cytoprotective actions of resveratrol. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2015, 2015, 803 971.

Mandal, M. D., Mandal, S.: Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2011, 1 (2), 154 – 160.

Marques, F. Z., Markus, M. A., Morris, B. J.: Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41 (11), 2125 – 2128.

Massoud, D., Alrashdi, B. M., Fouda, M., El-Kott, A., Soliman, S. A., Abd-Elhafeez, H. H.: *Aloe vera* and wound healing: a brief review. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2023, 58 (2).

Mellin, T. N., Mennie, R. J., Cashen, D. E., Ronan, J. J., Capparella, J., James, M. L., Disalvo, J., Frank, J., Linemeyer, D., Gimenez-Gallego, G. et al.: Acidic fibroblast growth factor accelerates dermal wound healing. *Growth Factors*, 1992, 7 (1), 1 – 14.

Mi, Y., Zhong, L., Lu, S., Hu, P., Pan, Y., Ma, X., Yan, B., Wei, Z., Yang, G.: Quercetin promotes cutaneous wound healing in mice through Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J. Ethnopharmacol.*, 2022, 290, 115 066.

Mohamed, R. R., Elella, M. H. A., Sabaa, M. W.: Cytotoxicity and metal ions removal using antibacterial biodegradable hydrogels based on N-quaternized chitosan/poly(acrylic acid). *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 98, 302 – 313.

Mohanty, C., Das, M., Sahoo, S. K.: Sustained wound healing activity of curcumin loaded oleic acid based polymeric bandage in a rat model. *Mol. Pharm.*, 2012, 9 (10), 2801 – 2811.

Motealleh, B., Zahedi, P., Rezaeian, I., Moghimi, M., Abdolghaffari, A. H., Zarandi, M. A.: Morphology, drug release, antibacterial, cell proliferation, and histology studies of chamomile-loaded wound dressing mats based on electrospun nanofibro-

us poly (ϵ -caprolactone)/polystyrene blends. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2014, 102 (5), 977 – 987.

Muruzović, M. Ž., Mladenović, K. G., Stefanović, O. D., Vasić, S. M., Čomić, L. R.: Extracts of *Agrimonia eupatoria* L. as sources of biologically active compounds and evaluation of their antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activities. *Journal of food and drug analysis*, 2016, 24 (3), 539 – 547.

Nicolaus, C., Junghanns, S., Hartmann, A., Murillo, R., Ganzera, M., Merfort, I.: *In vitro* studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 196, 94 – 103.

Oryan, A., T Naeini, A., Nikahval, B., Gorjia, E.: Effect of aqueous extract of *Aloe vera* on experimental cutaneous wound healing in rat. *Veterinarski arhiv*, 2010, 80 (4), 509 – 522.

Paluch, Z., Biriczova, L., Pallag, G., Marques, E. C., Vargova, N., Kmoníčková, E.: The therapeutic effects of *Agrimonia eupatoria* L. *Physiological Research*, 2020, 69 (Suppl. 4), S555.

Parente, L. M. L., Lino Júnior, R. D. S., Tresvenzol, L. M. F., Vinaud, M. C., De Paula, J. R., Paulo, N. M.: Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2012, 2012, 375 671.

Pereira Beserra, F., Sergio Gushiken, L. F., Vieira, A. J., Augusto Bergamo, D., Luisa Bergamo, P., Oliveira De Souza, M., Alberto Hussni, C., Kiomi Takahira, R., Henrique Nobrega, R., Monteiro Martinez, E. R., John Jackson, C., Lemos De Azevedo Maia, G., Leite Rozza, A., Pellizzon, H. C.: From inflammation to cutaneous repair: topical application of lupeol improves skin wound healing in rats by modulating the cytokine levels, NF-kappaB, Ki-67, growth factor expression, and distribution of collagen fibers. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21(14), 4952.

Pfalzgraff, A., Heinbockel, L., Su, Q., Gutsmann, T., Brandenburg, K., Weindl, G.: Synthetic antimicrobial and LPS-neutralising peptides suppress inflammatory and immune responses in skin cells and

promote keratinocyte migration. *Scientific reports*, 2016, 6, 31 577.

Phan, T.-T., See, P., Lee, S.-T., Chan, S.-Y.: Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells *in vitro*: its implication for wound healing. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 2001, 51 (5), 927-31.

Pretus, H. A., Ensley, H. E., Mcnamee, R. B., Jones, E. L., Browder, I. W., Williams, D. L.: Isolation, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of soluble scleroglucan. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1991, 257 (1), 500 – 510.

Rabie, E., Serem, J. C., Oberholzer, H. M., Gaspar, A. R., Bester, M. J.: How methylglyoxal kills bacteria: an ultrastructural study. *Ultrastruct. Pathol.*, 2016, 40 (2), 107 – 111.

Ram, M., Singh, V., Kumawat, S., Kant, V., Tandan, S. K., Kumar, D.: Bilirubin modulated cytokines, growth factors and angiogenesis to improve cutaneous wound healing process in diabetic rats. *Int. Immunopharmacol.*, 2016, 30, 137 – 149.

Raziyeva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S., Saparov, A.: Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*, 2021, 11 (5), 700.

Rezaie, F., Momeni-Moghaddam, M., Naderi-Meshkin, H.: Regeneration and repair of skin wounds: various strategies for treatment. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 2019, 18 (3), 247 – 261.

Rinaudo, M.: Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 2006, 31 (7), 603 – 632.

Robert, R., Blakeney, P., Villarreal, C., Meyer, W. J., 3rd.: Anxiety: current practices in assessment and treatment of anxiety of burn patients. *Burns*, 2000, 26 (6), 549 – 552.

Salaheldin, T. A., Adhami, V. M., Fujioka, K., Mukhtar, H., Mousa, S. A.: Photochemoprevention of ultraviolet Beam Radiation-induced DNA damage in keratinocytes by topical delivery of nanoformulated Epigallocatechin-3-gallate. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2022, 44,

Saleem, M.: Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Lett.*, 2009, 285 (2), 109 – 115.

Samanta, S.: Potential bioactive components and health promotional benefits of tea (*Camellia sinensis*). *Journal of the American Nutrition Association*, 2022, 41 (1), 65 – 93.

Samarghandian, S., Farkhondeh, T., Samini, F. 2017. Honey and health: a review of recent clinical research. *Pharmacognosy Res.*, 9 (2), 121 – 127.

Semwal, D. K., Semwal, R. B., Combrinck, S., Viljoen, A.: Myricetin: a dietary molecule with diverse biological activities. *Nutrients*, 2016, 8 (2), 90.

Shearer, J. D., Richards, J. R., Mills, C. D., Caldwell, M. D.: Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *Am. J. Physiol.*, 1997, 272 (2 pt. 1), E181 – E190.

Sherwood, E. R., Williams, D. L., McNamee, R. B., Jones, E. L., Browder, I. W., Di Luzio, N. R.: *In vitro* tumoricidal activity of resting and glucan-activated Kupffer cells. *J. Leuko. Biol.*, 1987, 42 (1), 69 – 75.

Shokrollahi, M., Bahrami, S. H., Nazarpak, M. H., Solouk, A.: Multilayer nanofibrous patch comprising chamomile loaded carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) and polycaprolactone as a potential wound dressing. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, 147, 547 – 559.

Sirtori, C. R.: Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacological Research*, 2001, 44 (3), 183 – 193.

Sklenarova, R., Svrckova, M., Hodek, P., Ulrichova, J., Frankova, J.: 2021. Effect of the natural flavonoids myricetin and dihydromyricetin on the wound healing process *in vitro*. *J. Appl. Biomed.*, 2021, 19 (3), 149 – 158.

Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N., Ames, B. N.: Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 1987, 235 (4792), 1043 – 1046.

Sudhahar, V., Kumar, S. A., Varalakshmi, P.: 2006. Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic-

oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. *Life Sci.*, 2006, 78 (12), 1329 – 1335.

Trinh, X. T., Long, N. V., Van Anh, L. T., Nga, P. T., Giang, N. N., Chien, P. N., Nam, S. Y., Heo, C. Y.: A comprehensive review of natural compounds for wound healing: targeting bioactivity perspective. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23 (17), 9573.

Tsao, S. S., Dover, J. S., Arndt, K. A., Kammer, M. S.: Scar management: keloid, hypertrophic, atrophic, and acne scars. *Semin. Cutan. Med. Surg.*, 2002, 21 (1), 46 – 75.

Ulagesan, S., Sankaranarayanan, K., Kuppusamy, A.: Functional characterisation of bioactive peptide derived from terrestrial snail *Cryptozona bistrialis* and its wound-healing property in normal and diabetic-induced Wistar albino rats. *Int. Wound J.*, 2018, 15 (3), 350 – 362.

Uzel, A., Sorkun, K. Y., Öncü, Ö., Çoğulu, D., Gençay, Ö., Sali H, B. R.: Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, 2005, 160 (2), 189 – 195.

Vasilenko, T., Kováč, I., Slezak, M., Ďurkáč, J., Peržel'ová, V., Čoma, M., Kaňuchová, M., Urban, L., Szabo, P., Dvořánková, B.: 2022. *Agrimonia eupatoria* L. Aqueous extract improves skin wound healing: an *in vitro* study in fibroblasts and keratinocytes and *in vivo* study in rats. *In vivo*, 2022, 36 (3), 1236 – 1244.

Verma, J., Kanoujia, J., Parashar, P., Tripathi, C. B., Saraf, S. A.: Wound healing applications of sericin/chitosan-capped silver nanoparticles incorporated hydrogel. *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2017, 7 (1), 77 – 88.

Wang, X., Xu, P., Yao, Z., Fang, Q., Feng, L., Guo, R., Cheng, B.: Preparation of antimicrobial hyaluronic acid/quaternized chitosan hydrogels for the promotion of seawater-immersion wound healing. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2019, 7, 360.

Watkins, F., Pendry, B., Sanchez-Medina, A., Corcoran, O.: Antimicrobial assays of three native British plants used in Anglo-Saxon medicine for

wound healing formulations in 10th century England. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, 144 (2), 408 – 415.

Wilkinson, J., Brown, A.: Horse chestnut – *Aesculus hippocastanum*: potential applications in cosmetic skin-care products. *International journal of cosmetic science*, 1999, 21 (6), 437 – 447.

Yazarlu, O., Iranshahi, M., Kashani, H. R. K., Reshadat, S., Habtemariam, S., Iranshahi, M., Hasanpour, M.: Perspective on the application of medicinal plants and natural products in wound healing: a mechanistic review. *Pharmacological research*, 2021, 174, 105 841.

Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., Ye, W.-C.: Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese medicine*, 2018, 13 (20), 1 – 26.

Zhou, X., Ruan, Q., Ye, Z., Chu, Z., Xi, M., Li, M., Hu, W., Guo, X., Yao, P., Xie, W.: Resveratrol accelerates wound healing by attenuating oxidative stress-induced impairment of cell proliferation and migration. *Burns*, 2021, 47 (1), 133 – 139.

Zubair, R., Aziz, N.: As smooth as honey – the Historical use of honey as topical medication. *JAMA Dermatol.*, 2015, 151 (10), 1102.



UMELÁ INTELIGENCIA V MEDICÍNE A FARMÁCII

ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN MEDICINE AND PHARMACY

Čižmárik, Martin¹; Čižmáriková, Martina²

¹Katedra počítačov a informatiky, Fakulta elektrotechniky a informatiky
Technická univerzita v Košiciach, Letná 1/9, 042 00 Košice

²Ústav farmakológie, Lekárska fakulta
Univerzita P. J. Šafárika v Košiciach, Trieda SNP 1, 040 11 Košice
Slovenská republika

martina.cizmarikova@upjs.sk

ABSTRAKT

Jedna z existujúcich definícií popisuje umelú inteligenciu ako technologicky riadený systém, ktorý využíva pokročilé počítačové nástroje, softvéry a siete na simuláciu ľudskej inteligencie. Je to dnes rýchlo sa rozvíjajúci technologický fenomén, ktorého využitie sa každým dňom rapídne zvyšuje v rôznych sektoroch, pričom sa postupne stáva tiež dôležitou súčasťou modernej zdravotnej starostlivosti. V článku autori popisujú súčasné možnosti využitia umelej inteligencie v medicíne i farmácii. Okrem toho sa pozornosť autorov sústreďuje aj na prehľad najdôležitejších výhod, ale i nevýhod tejto technologickej inovácie, ktoré zostávajú výzvou pre využívanie jej plného potenciálu.

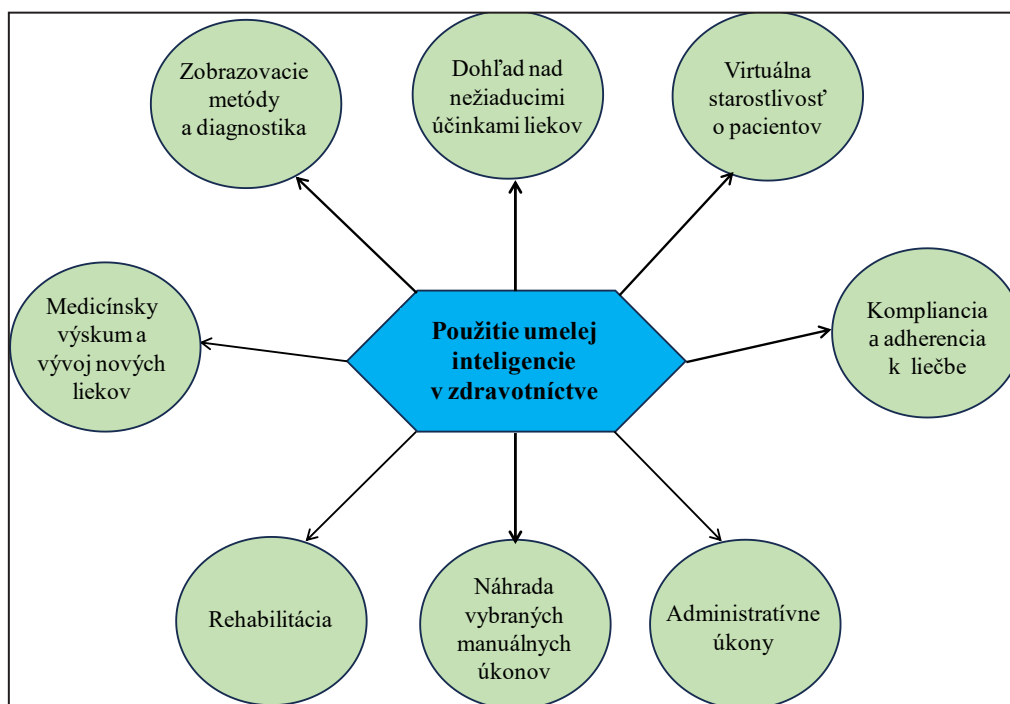
Kľúčové slová: farmácia; medicína; umelá inteligencia

ABSTRACT

Artificial intelligence may be defined as a technology-driven system that utilizes advanced computing tools, software, and networks to simulate human intelligence. It is a rapidly developing technological phenomenon, with its usage increasing daily across various sectors. Gradually, it is becoming an integral part of modern healthcare. This article briefly overviews the current possibilities for using artificial intelligence in medicine and pharmacy. Furthermore, attention is directed towards the most notable advantages and disadvantages of this technological innovation, which continue to present challenges in unlocking its full potential.

Key words: artificial intelligence; medicine; pharmacy

Obr. 1: Použitie umelej inteligencie v zdravotníctve



Zdroj: Al Kuwaiti a kol., 2023 (modifikácia a doplnenie pôvodného zdroja autormi)

ÚVOD

História modernej umelej inteligencie (UI) siaha približne do štyridsiatych až šesťdesiatych rokov 20. storočia, pričom k jej vzniku prispelo viacero významných osôb. Jednou z nich bol anglický matematik Alan Turing, ktorý počas druhej svetovej vojny vyvinul výpočtový stroj na rozlúštenie kódov šifrovacieho prístroja Enigmy, používaného nemeckou armádou. Jeho skúsenosti s pozoruhodnými schopnosťami tohto stroja riešiť úlohy dovtedy neriešiteľné aj pre skúsených matematikov ho priviedli k úvahám o potenciálnej inteligencii strojov. Neskôr, v roku 1950, sa k danej problematike vyjadril aj v svojej odbornej publikácii „Computing Machinery and Intelligence (Výpočtová technika a inteligencia)“ (Turing, 1950). V nej predstavil aj princíp testovania inteligentných strojov (tzv. Turingov test), ktorý zostáva základným meradlom pre hodnotenie inteligencie

umelých systémov: „ak človek pri interakcii s iným človekom a strojom nedokáže rozlíšiť stroj od človeka, potom sa stroj považuje za inteligentný“ (Haenlein a Kaplan, 2019). Pojem „umelá inteligencia“ ako „veda a inžinierstvo výroby inteligentných strojov“ bol oficiálne po prvýkrát vytvorený a definovaný Johnom McCarthy (Collins a kol., 2021).

Napriek značnému času, ktorý uplynul od vzniku UI, stále chýba jej všeobecne akceptovaná charakteristika. V literatúre nachádzame jej mnohé definície. UI môže byť napríklad špecifikovaná ako „imitácia ľudských intelektuálnych schopností pomocou počítačov“ alebo ako „systémy, ktoré vykazujú inteligentné správanie analyzovaním svojho prostredia a prijímaním akcií, s určitou mierou autonómie, na dosiahnutie konkrétnych cieľov (Sheikh a kol., 2023). Podľa inej definície je UI technologicky riadený systém, ktorý využíva pokročilé nástroje, softvéry a siete na simuláciu ľudskej inteligencie. Tieto prostriedky

UI sú schopné interpretovať a učiť sa zo vstupných údajov, čo im umožňuje autonómne sa rozhodovať so zámerom dosiahnuť konkrétne ciele (Paul a kol., 2021). Je dôležité poznamenať, že UI nie je navrhnutá tak, aby úplne nahradila ľudský faktor, ale aby hlavne zefektívnila a urýchlila činnosti pri potrebe čo najmenších nákladov.

UI je dnes rýchlo sa rozvíjajúci technologický fenomén, ktorého využitie sa každým dňom rapídne zvyšuje v rôznych sektoroch, nevynímajúc medicínu a farmáciu. Cieľom tohto príspevku je preto poskytnúť stručný náhľad do použitia UI v uvedených zdravotníckych odboroch, ako aj poukázať na výhody a nevýhody tejto technológie.

POUŽITIE UMELEJ INTELIGENCIE V MEDICÍNE A FARMÁCII

Medicína a farmácia sú zdravotnícke odbory, v rámci ktorých sa viaceré činnosti vzájomne prelínajú a nemožno ich vždy radikálne oddeliť. Vzhľadom na uvedené budú najdôležitejšie oblasti využitia UI v týchto dvoch sektoroch popísané spoločne (viď obr. 1) (Al Kuwaiti a kol., 2023).

Metódy umelej inteligencie

V súčasnosti môžu byť v zdravotníctve aplikované viaceré podtypy UI. Patria k nim Bayesovské siete (anglicky Bayesian Network), hybridné inteligentné systémy zahrňujúce tzv. fuzzy expertné systémy (anglicky Fuzzy Expert systems), a predovšetkým strojové učenie (ML, anglicky Machine Learning) so svojimi podtypmi, akými sú umelé neurónové siete (ANN, anglicky Artificial Neural Networks), konvolučné neurónové siete (anglicky Convolutional Neural Networks) a hlboké učenie (DL, anglicky Deep Learning) (Amisha a kol., 2019; Paul a kol., 2021).

V UI určenej pre diagnostiku chorôb sa vo všeobecnosti využívajú 2 techniky: technika založená na hodnotení vývojových grafov (hodnotenie odpovedí na sériu otázok súvisiacich s anamnézou a symptómami) alebo technika využívajúca databázové systémy (princíp DL alebo rozpoznávania vzorov, učenie pros-

tredníctvom opakujúcich sa algoritmov na rozpoznávanie toho, ako vyzerajú určité skupiny symptómov alebo určité klinické/rádiologické snímky) (Amisha a kol., 2019; Srivastava, 2023). Algoritmy UI určenej pre zdravotníctvo pritom najčastejšie využívajú 2 typy vstupných dát, a to numerické (napr. hodnota srdcovej frekvencie, krvného tlaku a pod.) alebo obrazové (napr. snímky z počítačovej tomografie alebo magnetickej rezonancie, fotografie vzoriek z biopsie tkaniva a iné).

Uplatnenie umelej inteligencie

Využitie UI v zdravotníctve našlo uplatnenie v dvoch oblastiach: virtuálnej a fyzickej (Hamet a Tremblay, 2017; Amisha a kol., 2019). Virtuálny aspekt zahŕňa široké spektrum aplikácií, ako sú systémy vytvorené pre správu elektronických zdravotných záznamov alebo neurónové siete napomáhajúce pri diagnostike a rozhodovaní o liečbe. Príkladom môže byť superpočítač Watson od International Business Machine (IBM, New York, USA), vyvinutý pomocou technológie UI s cieľom korelovať lekárske správy konkrétneho pacienta s rozsiahlou databázou známych údajov so zámerom navrhnutia najvhodnejšej liečebnej stratégie (tzv. personalizovanej liečby) a urýchlania stanovenia správnej diagnózy. Ilustráciou jeho schopností bola napríklad identifikácia rakoviny prsníka u pacienta v priebehu jednej minúty (Mishra, 2018). Ďalšou možnosťou aplikácie UI môže byť inteligentná platforma Berg. Tá zahŕňa sériu krokov, ktoré začínajú získavaním sekvenčných údajov zo vzoriek ľudského tkaniva s následným zhromažďovaním informácií o prítomných metabolitoch a proteínoch. Nakoniec sa na analýzu údajov z rozsiahlych databáz používajú pokročilé algoritmy UI, ktoré umožňujú identifikáciu základných príčin chorôb (tzv. biomarkerov). To v konečnom dôsledku prispieva k vývoju nových cielených liečiv. Popisuje sa tiež potenciál UI pri analýze reči a písma pacienta s cieľom skorej diagnostiky určitých neurologických alebo psychiatrických porúch, napr. ťažšie diagnostikovatelných raných štádií hepatálnej encefalopatie (Gazda a kol., 2021).

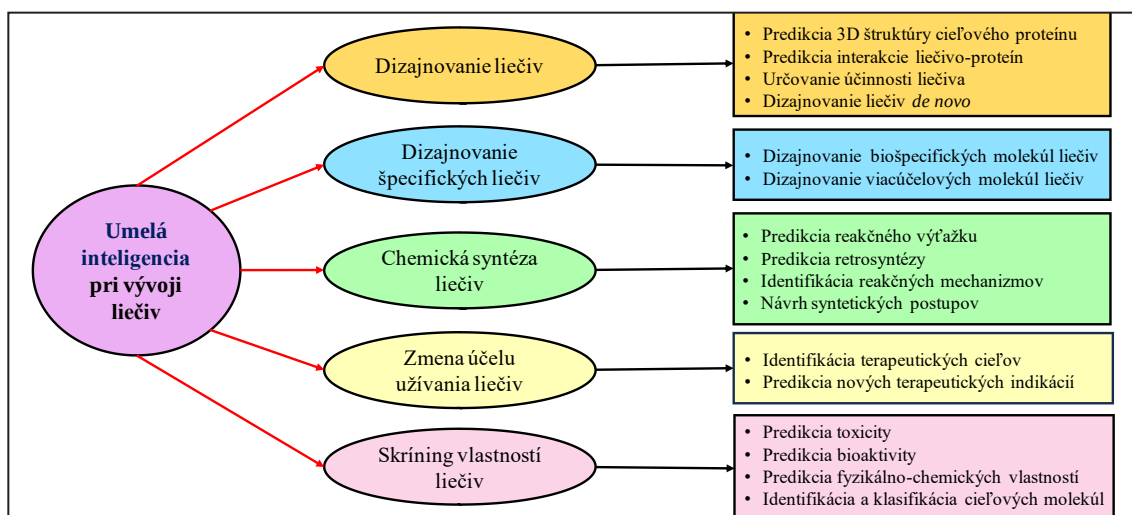
Na druhej strane sa UI v rámci fyzických aplikácií využíva pri riadení robotov asistujúcich pri chirurgických zákrokoch (napríklad operačný systém Da Vinci), inteligentných protéz či inteligentných domácich monitorovacích asistentov určených pre kontrolu zdravotného stavu jedinca (Hamet a Tremblay, 2017; Amisha a kol., 2019). Zaujímavou aplikáciou UI je vytvorenie robotov, ktoré pomáhajú pacientom zvládať bolestivé alebo komplikované lekárske výkony (napr. MEDi robot, Medicine and Engineering Designing Intelligence) prostredníctvom zadávania vhodných pokynov pacientovi v požadovanom jazyku alebo robotov, ktoré sa dokážu pohybovať po zdravotníckych zariadeniach (robot TUG), kde roznášajú lieky, jedlá, materiály na určené miesta alebo prepravujú odpadky či bielizeň, pričom rozpoznávajú prekážky alebo si sami vypočítavajú najvhodnejšiu trasu (Mishra, 2018). Na princípe UI dnes môžu fungovať aj robotické systémy určené na prípravu a výdaj perorálnych alebo intravenózných liečiv, napr. chemoterapie používanej pre onkologických pacientov.

Umelá inteligencia sa využíva aj v ďalších oblastiach medicíny (Hamet a Tremblay, 2017). Ide napríklad o on-line plánovanie dátumov kontrolných vyšetrení, digitálne registrácie pacientov v zdravotníckych zariadeniach, pripomenutie plánovaných vyšetrení alebo potrebných vakcinácií, výpočty dávkovania liekov pre špecifické skupiny jedincov (napr. deti, tehotné ženy, seniorov a pod.) alebo upozornenia pre pacientov na potenciálne nežiaduce účinky pri predpisovaní viacerých liekov. Medzi ďalšie zaujímavé medicínske nástroje UI patria: počítačová detekcia v rádiológii (tzv. CAD, anglicky Computer-aided Diagnosis; interpretácia zobrazovacích snímok), Dxplain (návrh diferenciálnych diagnóz na základe symptómov), Germwatcher (detekcia infekcií získaných v nemocnici), Babylon (virtuálna konzultácia zdravotných ťažkostí s návrhom postupov), UI na báze programu CBTpsych.com (virtuálna kognitívna behaviorálna liečba), AiCureApp (monitorovanie užívania liekov), Fitbit merače (monitorovanie fyzickej kondície, napr. tepu, spánku); IBM WatsonHealth

(diagnostika srdcových a onkologických chorôb) alebo Molly (virtuálna sestrička) (Amisha a kol., 2019).

Prudký nárast využívania UI sa zaznamenal aj pri objavovaní, vývoji a zavádzaní nových účinných liečiv do klinickej praxe. S obľubou sa UI uplatňuje už pri hľadaní nových vhodných liečebných molekúl, ale aj v ďalších procesoch (viď obr. 2) (Paul a kol., 2021). V súčasnosti existujú už aj viaceré špecifické nástroje UI, ktoré pomáhajú v raných fázach vývoja liečiva, akými sú DeepChem (ML určené na nájdenie vhodného kandidáta pre vývoj nového liečiva), DeepTox (softvér predpovedajúci toxicitu liečiva), DeepNeuralNetQSAR (systém založený na Pythone a využívajúci výpočtové nástroje na detekciu molekulárnej aktivity zlúčenín), ORGANIC (nástroj pre dizajn molekúl s požadovanými vlastnosťami), PotentialNet (neurónové siete na predpoveď väzbovej afinity ligandov), Hit Dexter (ML technika na predpovedanie možnej interferencie látok s biochemickými testami), DeltaVina (skórovací systém na hodnotenie väzbovej afinity medzi ligandom/liečivom a proteínom), Neuralgraphfingerprint (pomáha predpovedať vlastnosti nových molekúl), AlphaFold (predpovedá 3D štruktúru proteínov) alebo Chempu-ter (pomáha optimalizovať chemickú syntézu molekúl). Okrem toho UI nachádza uplatnenie aj v riadení následných fáz vývoja liečiva, ako sú vylepšovanie fyzikálno-chemických vlastností molekuly, samotný farmaceutický výrobný proces, stanovenie a overenie kvality farmaceutických postupov, dizajn a monitorovanie klinického skúšania nových liečiv až po konečný manažment distribúcie a predaja nových farmaceutických produktov. Do riadenia farmaceutického výrobného procesu môže byť napríklad zapojený automatizovaný systém riadenia (anglicky Automated Control Process System, ACPS) (Mishra, 2018). Jeho hlavným cieľom je zabezpečiť, aby sa proces vykonával bezpečne a pri nízkych nákladoch, pričom sa využíva neustále monitorovanie rôznych procesných premenných (napr. teploty). Systém ACPS obvyčajne zahŕňa niekoľko všeobecných krokov: snímanie hodnoty procesných premenných, prenos signálu do meracieho zariadenia, meranie procesnej premennej,

Obr. 2: Úloha umelej inteligencie (UI) pri vývoji liečiv



Zdroj: Paul a kol., 2021

vyhodnotenie hodnoty meranej veličiny, nastavenie hodnoty požadovanej veličiny, porovnanie požadovaných a nameraných hodnôt, prenos riadiaceho signálu do koncového riadiaceho prvku a kontrola manipulovanej hodnoty.

UI nachádza uplatnenie aj v oblasti farmakovigilancie (Chalasani a kol., 2023). Príkladom môžu byť viaceré modely UI určené na predikciu a monitorovanie nežiaducich účinkov liekov alebo využiteľné pri identifikácii liekových interakcií (viď tab. 1). K zlepšovaniu bezpečnosti farmakoterapie môžu prispievať aj systémy určené pre optimalizáciu dávkovania liečiv. Napríklad platforma UI CURATE.AI bola vyvinutá s cieľom stanoviť dávkovanie chemoterapie orientované na pacienta (tzv. personalizovaná farmakoterapia) (Tan a kol., 2021). Existujú tiež predikčné modely pre dávkovanie digoxínu (Hu a kol., 2018); warfarínu (Roche-Lima a kol., 2020) a vankomycínu (Wang a kol., 2022). Veľkou pomocou pre lekárnikov môžu byť aj robotické technológie schopné pripravovať a vydávať lieky. Takéto automatizované systémy nielen znižujú pracovnú záťaž lekárničky (príprava väčšieho množstva liekov v stanovenom časovom intervale), ale zároveň prispievajú k vyššej bezpečnosti farmakoterapie u pacienta (nižšie riziko výskytu chýb

pri príprave lieku) i k ochrane lekárničky (eliminácia kontaktu lekárničky s nebezpečnými liečivami) (Boyd a Chaffee, 2019). Prvky UI bývajú zahrnuté aj do platforiem používaných na elektronické predpisovanie liekov, pričom ich používanie môže viesť k redukcii chýb v preskripcii (Khammarnia a kol., 2017). Niektoré technológie UI navyše dokážu identifikovať z elektronických zdravotných záznamov vzniknuté chyby v dávkovaní liečiv (Nagata a kol., 2021).

Na dosiahnutie optimálnych výsledkov zvolenej farmakoterapie je tiež veľmi dôležitá kompliance pacienta (dodržiavanie časového harmonogramu a dávkovacích schém). Na jej zvyšovanie sa dnes môžu podieľať aj viaceré technológie UI, napríklad elektronické škatuľky, vrecká, fľaštičky alebo blistre na lieky so zabudovanými senzormi snímajúcimi ich otvorenie, senzory vhodné na požitie, ktoré sú priamo súčasťou lieku, video technológie na vizuálne potvrdenie užívania liekov, technológie na báze senzorov snímajúcich pohyb, elektronické zariadenia alebo aplikácie analyzujúce hlásenie o užití lieku samotným pacientom či elektronické systémy určené na komplexný monitoring farmakoterapie (Chalasani a kol., 2023).

Ďalšou možnou aplikáciou UI vo farmácii je opti-

Tab. 1: Využitie umelej inteligencie v predikcii nežiaducich účinkov farmakoterapie a liekových interakcií

Oblasť využitia	Stručný popis vyvinutého modelu UI	Citovaný zdroj
Predikcia a monitorovanie NÚ liečiv/liekov	Selekcia chemických, fyzikálnych a štrukturálnych vlastností liečiv, ktoré predisponujú k vzniku ich NÚ	Hammann a kol., 2010
	Model UI určený pre detekciu výskytu doposiaľ neznámych NÚ liečiv používaných v klinickej praxi založený na prepojení niekoľkých databáz (databáza liečivo-NÚ, databáza chemických vlastností liečiv a databáza farmakologických vlastností liečiv)	Cami a kol., 2011
	Systémy porovnávajúce molekulárne charakteristiky registrovaných liečiv a liečiv stiahnutých z trhu so zámerom využitia získaných údajov pri identifikácii nových potenciálnych liečiv	Onay a kol., 2017
	Systém MADEx (anglicky Medication, Adverse Drug Event, and Relation Extraction) určený na automatickú extrakciu dát týkajúcich sa liečiv a NÚ liečiv zo zdravotných záznamov, ako aj na analýzu ich vzájomných vzťahov	Yang a kol., 2019
	Predikčný model pre výskyt NÚ liečiv vytvorený na základe spracovania údajov z 2 databáz (databáza profilov liekmi indukovaných zmien v génovej expresii a databáza výskytu NÚ)	Mohsen a kol., 2021
	Predikcia výskytu a závažnosti NÚ liečiv u novorodencov	Yalçın a kol., 2022
Predikcia liekových interakcií	DrugBank®, Drugs.com®, Lexicomp® – príklady voľne dostupných webových databáz s možnosťou hodnotenia liekových interakcií pomocou jednoduchších modelov UI	Knox a kol., 2011; Pinkoh a kol., 2023
	Predikčný model pre výskyt liekových interakcií založený na analýze miery podobnosti 5 charakteristík skúmaných liečiv (podobnosť 2D štruktúry, podobnosť farmakoforov, podobnosť molekulárnych cieľových štruktúr, podobnosť interakčného profilu, podobnosť NÚ)	Song a kol., 2018
	Predikčný model pre liekové interakcie založený na analýzach vplyvu liečiv na rovnaké gény a signálne dráhy	Mei a Zhang, 2021
	Model využívajúci strojové učenie na predikciu schopnosti liečiv predlžovať QT interval s cieľom predchádzať nebezpečným liekovým interakciám	Van Laere a kol., 2022

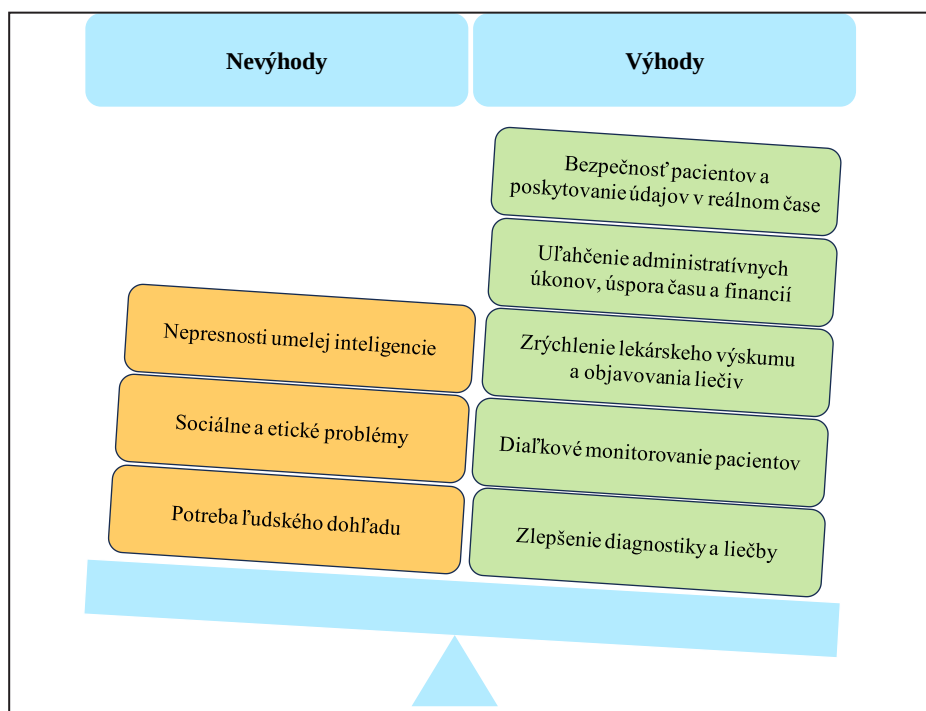
NÚ – nežiaduci účinok; UI – umelá inteligencia

malizácia zásob liekov v jednotlivých lekárňach na základe predvídania potrieb pacientov (Raza a kol., 2022).

Rovnako je potrebné spomenúť možné využitie UI v medicíne a farmácii aj v rámci vzdelávania či vedeckej činnosti. V nedávnej štúdii analyzujúcej využitie UI v niekoľkých nemedicínskych odboroch (Crompton a Burke, 2023) sa zistilo, že najčastejšie

sa umelá inteligencia využívala v rámci edukácie na automatické hodnotenie výsledkov študentov. Autori štúdie tiež pozorovali dvoj- až trojnásobný vzostup počtu vydaných publikácií v rokoch 2021 a 2022 oproti predošlým rokom, pravdepodobne vďaka využitiu UI. Iný nedávny systematický prehľad zameraný na oblasť medicíny odhalil, že populárny nástroj UI četovací robot ChatGPT (anglicky Chat Generative

Obr. 3: Výhody a nevýhody umelej inteligencie v zdravotníctve



Zdroj: Amisha a kol., 2019 (modifikácia a doplnenie pôvodného zdroja autormi)

Pretrained Transformer) významne prispel k zlepšeniu písacích schopností publikujúcich autorov, bol užitočný vo výskume a mal zároveň pozitívny vplyv na vzdelávanie i prax v oblasti zdravotnej starostlivosti (Sallam, 2023). Na druhej strane až 95 % respondentov malo pochybnosti týkajúce sa etiky, autorských a iných práv, transparentnosti, nedostatočnej originality a plagiátorstva, nepresného obsahu a nedostatočných poznatkov, nesprávnych citačných odkazov, ako aj bezpečnosti používania.

VÝHODY A NEVÝHODY UMELEJ INTELI- GENCIE

Využívanie UI v zdravotníctve ponúka množstvo rôznych výhod nielen pre pacientov, ale aj pre zdravotníckych pracovníkov, študentov zdravotníckych odborov či vedeckých pracovníkov pracujúcich v danom sektore. Na druhej strane sa s aplikáciou UI spájajú aj isté nevýhody, limity a problémy, na ktoré

sa musia v blízkej budúcnosti nájsť určité vhodné riešenia. Obrázok 3 (Amisha a kol., 2019) a nasledujúce podkapitoly sú zamerané na prehľad najdôležitejších výhod a nevýhod UI, ktoré v literatúre objasňujú viaceré odborné práce (Amisha a kol., 2019; Al Kuwaiti a kol., 2023; Srivastava, 2023).

Výhody umelej inteligencie

Výhody UI sa týkajú viacerých aspektov zdravotníctva, pričom sa zdá, že všeobecne prevažujú nad jej úskalia. Niektoré z nich sú uvádzané nižšie.

Zlepšenie diagnostiky a liečby chorôb

Zdravotníci používajú UI na včasnú analýzu a stanovenie diagnózy zdravotného stavu pacientov, pričom hlavným benefitom analýz pomocou UI je zníženie diagnostických chýb. Odporúča sa však súčasná kontrola ľudským jedincom, pretože aj UI sa môže myliť. Prínos používania UI sa zaznamenal napríklad pri včasnej identifikácii rôznych zdravotných problé-

mov, ako sú rakovina prsníka a kože, očné choroby, zápal pľúc, a to najmä prostredníctvom analýzy zobrazovacích snímok za využitia ANN (Wang a kol., 2016; Esteve a kol., 2017; Rajpurkar a kol., 2017).

Oproti tradičným prístupom využívaných v diagnostike a klinickom rozhodovaní môžu systémy UI presnejšie porozumieť súboru tréningových údajov a pomáhať lekárom nielen v diagnostike, ale aj s novými poznatkami o liečbe, procesoch starostlivosti alebo upozorňovať na rizikové faktory pacienta u komplikovaných pacientov (napr. monitorovanie životných funkcií u pacientov na jednotkách intenzívnej starostlivosti a následné upozorňovanie lekárov v kritických situáciách (Srivastava a kol., 2023). Model UI napr. preukázal rozpoznávanie sepsy u ohrozených novorodencov (Innocens BC, IBM). Celkovo UI podporuje liečbu orientovanú na pacienta (tzv. personalizovaná liečba).

Diaľkové monitorovanie pacientov

Diaľkové monitorovanie pacientov umožňuje poskytovateľom zdravotnej starostlivosti vzdialene dohliadať, hodnotiť a dokumentovať stav pacientov bez ohľadu na konvenčné prostredie zdravotnej starostlivosti. Zefektívňuje lekárske zásahy prostredníctvom využitia senzorov a komunikačných technológií, čím zjednodušuje diaľkové hodnotenie zdravotných údajov a predchádza obávam pacientov. Okrem toho podporuje informovanosť pacientov o ich vlastnom zdravotnom stave (Futurside Remote).

Nedávne výsledky výskumu ukázali, že spolupráca lekárníkov a iných zdravotníkov spolu s využívaním pokročilých systémov UI pri poskytovaní telefonických asistenčných služieb v rámci komplexného riadenia liečby pacienta dokáže efektívne znížiť náklady na zdravotnú starostlivosť, počet návštev ambulancií pohotovostnej služby, ako aj počet hospitalizácií (Kessler a kol., 2021).

Zrýchlenie lekárskeho výskumu a objavovania liečiv

UI je mimoriadne vhodná na analýzu rozsiahlych a zložitých súborov údajov, ktoré sa bežne používajú v medicínskom výskume. Okrem toho umožňuje

globálny prístup k rozsiahlym súborom údajov, čím uľahčuje zdravotníkom, vedcom i študentom získavanie informácií v reálnom čase. UI zároveň umožňuje zlučovať rôzne zdroje údajov pomocou softvérov alebo aplikácií sociálnych médií (O'Mara-Eves a kol., 2015).

Vývoj nového liečiva a následne lieku je komplikovaný, časovo a finančne náročný proces, preto aj farmaceutické spoločnosti sa čoraz viac obracajú na UI, aby zefektívnili procesy vývoja liekov. Vedci môžu využiť prediktívnu analýzu napr. na stanovenie potenciálneho liečiva, predikciu novej indikácie pre už existujúce liečivo alebo odporúčať vhodnú kombináciu liečiv a pod. (Srivastava a kol., 2023). Celkovo UI skracuje čas potrebný na vývoj liekov a následne znižuje náklady, ktoré sú spojené s vývojom liekov, zvyšuje návratnosť investícií a môže dokonca spôsobiť zníženie nákladov pre koncového používateľa – pacienta (Mishra, 2018).

Uľahčenie administratívnych úkonov, úspora času a financií

UI má potenciál zmierniť administratívnu záťaž automatickým vyplňaním štruktúrovaných dátových polí z klinických poznámok, získavaním základných informácií z lekárskeho záznamu a podporou interakcií s pacientom (Wani a kol., 2022). Aj písanie hlasového textu by sa mohlo použiť na úsporu času lekárov aj zdravotných sestier. Používanie UI tak zmierňuje ľudskú pracovnú záťaž, ale tiež urýchľuje dosahovanie cieľov v kratších časových úsekoch (Paul a kol., 2021). Automatizované nástroje UI využívajúce DL a systémy na spracovanie prirodzeného jazyka (NLP, anglicky Natural Language Processing) výrazne zvýšili efektivitu zdravotníkov tým, že im umožnili tráviť viac času s pacientom alebo viac času venovať diagnostike a liečbe komplikovanejších prípadov. To vedie k podstatnému zlepšeniu produktivity, a tým k významným úsporám nákladov pre nemocnice. Zníženie pracovnej záťaže zároveň významne redukuje stres zdravotníkov. Nástroje NLP môžeme definovať ako súbor technológií a techník navrhnutých tak, aby umožnili strojom porozumieť,

interpretovať a generovať ľudský jazyk spôsobom, ktorý je zmysluplný a kontextovo relevantný. NLP je podoblasť UI, ktorá sa zameriava na interakciu medzi počítačmi a ľudským jazykom. NLP sa často využíva pri vytváraní sofistikovanejších aplikácií, ako sú chatboty alebo virtuálni asistenti. Ako NLP neustále napreduje, hrá čoraz dôležitejšiu úlohu pri vytváraní prirodzenejšej a efektívnejšej interakcie medzi človekom a počítačom.

Bezpečnosť pacientov a poskytovanie údajov v reálnom čase

UI zohráva kľúčovú úlohu v bezpečnosti pacientov tým, že zlepšuje detekciu chýb a manažment liečby, čím zabezpečuje presnejšie rozhodovanie v zdravotníctve. Údaje v reálnom čase poskytované nástrojmi UI ponúkajú rýchle a presné informácie pre lekárov, čo vedie k rýchlejšim a efektívnejším klinickým rozhodnutiam. To prispieva k zlepšeným ochranným opatreniam, nákladovej efektívnosti a skráteniu čakacích dôb pacienta, čím sa podporujú lepšie vzťahy medzi lekárom a pacientom. Aplikácie UI navyše umožňujú pacientom prostredníctvom mobilných aplikácií sebakontrolu, prístup k informáciám o zdraví a globálne spájanie s jednotlivcami, ktorí zdieľajú podobné zdravotné problémy (Duane a kol., 2017). Na zvyšovaní bezpečnosti liečby sa celkovo môžu podieľať všetky vyššie uvádzané modely UI určené pre farmakovigilanciu.

Nevýhody umelej inteligencie

Napriek mnohým výhodám UI sa pri jej používaní stretávame aj s určitými limitmi a problémami, na ktoré poukázali viacerí autori (Amisha a kol., 2019; Srivastava, 2023).

Potreba ľudského dohľadu

Napriek preukázanej účinnosti aplikácií UI si ich využívanie stále vyžaduje značný ľudský dohľad (Srivastava, 2023). V oblastiach, ako je robotická chirurgia, je zapojenie zdravotníckych pracovníkov stále kľúčovým, pretože môže prispieť k pomoci pri diagnostike alebo prevencii zdravotných kompliká-

cií. Napriek tomu, že zdravotnícky priemysel využíva aplikácie UI už niekoľko desaťročí, táto oblasť sa stále vyvíja. Rovnako, dosiahnutie komplexného vzdelania pre zdravotníkov v tejto oblasti si bude vyžadovať roky špecializovaného školenia.

Netreba zabúdať, že aj použitie UI môže viesť k chybám, ktoré je náročné odhaliť a ktoré by mohli mať vážne následky. Napríklad aplikácia používajúca UI navrhnutá na predpovedanie komplikácií súvisiacich s pneumóniou omylom odporučila prepustenie pacientov s astmou z dôvodu nezohľadnenia relevantných informácií (Caruana a kol., 2015).

Prehliadanie sociálnych, etických a iných faktorov

Aplikácie UI poskytujú odporúčania na základe predchádzajúcich údajov, avšak bežne nezohľadňujú sociálny a ekonomický status pacienta, či jeho osobné preferencie. Začlenenie UI navyše prináša aj problémy s ochranou súkromia, keďže vplyvné spoločnosti môžu voľne kontrolovať zhromažďovanie a využívanie údajov. Veľké dátové siete sú navyše obzvlášť citlivé na kybernetické útoky (de Azambuja a kol., 2023).

Očakáva sa, že sociálnym dôsledkom zavedenia UI môže byť tiež vyšší nárast nezamestnanosti kvôli zníženiu pracovnej vyťaženia zdravotníckych pracovníkov (Amisha a kol., 2019).

S rastúcou integráciou technológií používajúcich UI v zdravotnej starostlivosti existuje naliehavá potreba účinného riadenia jej zavádzania a používania, a to v prvom kroku prostredníctvom zavedenia vnútroštátnych a medzinárodných predpisov. V súlade s uvedeným, s cieľom predchádzať alebo zmierňovať dôsledky spojené s používaním aplikácií UI, Európsky parlament a Rada európskej únie navrhli v roku 2021 „Nariadenie, ktorým sa stanovujú harmonizované pravidlá v oblasti umelej inteligencie“ (tzv. Akt o umelej inteligencii, anglicky AI Act, AIA) (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/?uri=CELEX%3A52021PC0206>). Po dlhých rokovaníach dňa 2. februára 2024 Rada ministrov EÚ jednoducho schválila predložený text AIA. V priebehu roka 2024 sa očakávajú ďalšie schvaľovacie procesy.

V súvislosti s používaním UI v medicíne sú sumárne diskutované etické problémy, ktoré sa týkajú predovšetkým bezpečnosti jej algoritmov, účinnosti zavedených aplikácií, bezpečnej ochrany získaných citlivých údajov, otázky súvisiacej s poskytovaním a vyžadovaním informovaného súhlasu, zachovania práva dobrovoľne sa rozhodnúť využívať metódy UI, ako aj otázky nákladnosti a dostupnosti jej technológií (Sunarti a kol., 2021). V lekárskej komunite tiež pretrváva etická dilema, pokiaľ ide o určenie legálnej zodpovednosti pri rozhodovaní založenom na UI (dilema, kto poniesie následky chybných úsudkov) (Al Kuwaiti a kol., 2023).

Problematická môže byť tiež sociálna izolácia jedincov (Al Kuwaiti a kol., 2023). Pri nadmernom používaní UI chýba ľudský dotyk, empatia a dochádza k poklesu emocionálnej inteligencie (Amisha a kol., 2019).

Nepresnosti umelej inteligencie

Modely UI vyvinuté pre zdravotnícke účely sú vo veľkej miere založené na analýzach miliónov diagnostikovaných prípadov. Ak sú však pre UI k dispozícii v tréningových databázach obmedzené medicínske informácie (napr. o konkrétnej chorobe, jej štatistických trendoch alebo environmentálnych rizikových faktoroch z určitých populačných skupín, systémy UI môžu mať problémy s určovaním presných diagnóz. Okrem toho chýbajúce medicínske údaje o odlišnostiach liečebnej odpovede na konkrétne liečivo v určitej demografickej skupine môžu negatívne ovplyvniť výber správnej farmakoterapie navrhutej UI pre jednotlivcov patriacich do tejto skupiny (Srivastava, 2023).

ZÁVER

Technológie UI inteligencie sa uplatňujú v širokom spektre zdravotnej starostlivosti. Boli navrhnuté tak, aby uľahčovali úlohy, ako je lekárske zobrazovanie a diagnostika, pomáhali pri akútnych a nečakaných situáciách (ako sú pandémie), umožňovali virtuálnu starostlivosť o pacientov, zvyšovali zapojenie pacien-

tov a dodržiavanie liečebných plánov, znižovali administratívnu záťaž zdravotníckych pracovníkov, stimulovali inovácie vo vývoji liekov a vakcín a mnoho ďalších úloh, ktoré by bez UI boli pomerne náročné.

Ako však integrácia UI v zdravotnej starostlivosti napreduje, čelí rôznym technickým, etickým a riadiacim výzvam. Jedna z kľúčových otázok sa týka bezpečnosti údajov a súkromia, pretože UI sa spolieha na citlivé a dôverné informácie, ktoré podliehajú právnym predpisom. Okrem toho, účinnosť umelej inteligencie pri riešení týchto výziev môže byť obmedzená kvalitou dostupných zdravotných údajov a jej neschopnosťou zahrnúť určité ľudské atribúty, ako je empatia. Hoci UI vyniká efektivitou, nemôže zatiaľ nahradiť medziľudské vzťahy, ktoré sú základom tímovej práce.

UI pravdepodobne zmení zdravotnícku prax doteraz nepoznanými spôsobmi, no mnohé z jej praktických aplikácií sú stále v plienkach a je potrebné ich lepšie preskúmať a rozvíjať. Rovnako, všetci zdravotnícki odborníci tiež musia pochopiť princípy týchto technológií, aby mohli poskytovať lepšiu zdravotnú starostlivosť čoraz väčšiemu počtu pacientov.

Sumárne je UI potrebné používať s rozvahou a brať do úvahy nielen jej benefity, ale aj negatíva, ktoré táto technológia prináša. Čím viac o tejto technológii budeme vedieť, tým viac ju dokážeme v budúcnosti zdokonaľiť a lepšie zúročiť.

ZOZNAM LITERATÚRY

Al Kuwaiti, A., Nazer, K., Al-Reedy, A., Al-Shehri, S., Al-Muhanna, A., Subbarayalu, A. V., Al-Muhanna, D., Al-Muhanna, F. A.: A Review of the role of artificial intelligence in healthcare. *Journal of Personalized Medicine*, 2023, 13 (6), 951. Doi: 10.3390/jpm13060951.

Amisha, Malik, P., Pathania, M., Rathaur, V. K.: Overview of artificial intelligence in medicine. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 2019, 8 (7), 2328 – 2331. Doi: 10.4103/jfmprc.jfmprc_440_19.

Boyd, A. M., Chaffee, B. W.: Critical evalu-

ation of pharmacy automation and robotic systems: a call to action. *Hospital Pharmacy*, 2019, 54 (1), 4 – 11. Doi: 10.1177/0018578718786942.

Cami, A., Arnold, A., Manzi, S., Reis, B.: Predicting adverse drug events using pharmacological network models. *Science Translational Medicine*, 2011, 3 (114), 114ra127. Doi: 10.1126/scitranslmed.3002774.

Caruana, R., Lou, Y., Gehrke, J., Koch, P., Sturm, M., Elhadad, N.: Intelligible models for health care: predicting pneumonia risk and hospital 30-day readmission. In *Proceedings of the 21th ACM SIG-KDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*, Sydney, Australia, August 10, 2015, 1721 – 1730. Doi: 10.1145/2783258.2788613.

Collins, C., Dennehy, D., Conboy, K., Mikalef, P.: Artificial intelligence in information systems research: A systematic literature review and research agenda. *International Journal of Information Management*, 2021, 60 (4), 102 383. Doi: 10.1016/j.ijinfomgt.2021.102383.

Crompton, H., Burke, D.: Artificial intelligence in higher education: the state of the field. *International Journal of Educational Technology in Higher Education*, 2023, 20, 22. Doi: 10.1186/s41239-023-00392-8.

de Azambuja, A. J. G., Plesker, C., Schützer, K., Anderl, R., Schleich, B., Almeida, V., R.: Artificial intelligence-based cyber security in the context of industry 4.0 – a survey. *Electronics*, 2023, 12 (8), 1920. Doi: 10.3390/electronics12081920.

Duane, S., Tandan, M., Murphy, A. W., Velting, A.: Using mobile phones to collect patient data: lessons learned from the SIMPlE study. *JMIR Research Protocols*, 2017, 6 (4), e61. Doi: 10.2196/resp-prot.6389.

Esteva, A., Kuprel, B., Novoa, R. A., Ko, J., Swetter, S. M., Blau, H. M., Thrun, S.: Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature*, 2017, 542 (7639), 115 – 118. Doi: 10.1038/nature21056.

Gazda, J., Drotar, P., Drazilova, S., Gazda, J., Gazda, M., Janicko, M., Jarcuska, P.: Artificial intelli-

gence and its application to minimal hepatic encephalopathy diagnosis. *Journal of Personalized Medicine*, 2021, 11 (11), 1090. Doi: 10.3390/jpm11111090.

Haenlein, M., Kaplan, A.: A Brief history of artificial intelligence: On the past, present, and future of artificial intelligence. *California Management Review*, 2019, 61 (4), 5 – 14. Doi: 10.1177/0008125619864925.

Hamet, P., Tremblay, J.: Artificial intelligence in medicine. *Metabolism*, 2017, 69S (3), S36 – S40. Doi: 10.1016/j.metabol.2017.01.011.

Hammann, F., Gutmann, H., Vogt, N., Helma, C., Drewe, J.: Prediction of adverse drug reactions using decision tree modeling. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2010, 88 (1), 52 – 59. Doi: 10.1038/clpt.2009.248.

Hu, Y. H., Tai, C. T., Tsai, C. F., Huang, M. W.: Improvement of adequate digoxin dosage: an application of machine learning approach. *Journal of Healthcare Engineering*, 2018, 2018, 3 948 245. Doi: 10.1155/2018/3948245.

Chalasani, S. H., Syed, J., Ramesh, M., Patil, V., Pramod Kumar, T. M.: Artificial intelligence in the field of pharmacy practice: a literature review. *Exploratory Research in Clinical and Social Pharmacy*, 2023, 12, 100 346. Doi: 10.1016/j.rcsop.2023.100346.

Kessler, S., Desai, M., McConnell, W., Jai, E. M., Mebine, P., Nguyen, J., Kiroyan, C., Ho, D., Von Schweber, E., Von Schweber, L.: Economic and utilization outcomes of medication management at a large Medicaid plan with disease management pharmacists using a novel artificial intelligence platform from 2018 to 2019: a retrospective observational study using regression methods. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy*, 2021, 27 (9), 1186 – 1196. Doi: 10.18553/jmcp.2021.21036.

Khammarnia, M., Sharifian, R., Zand, F., Barati, O., Keshtkaran, A., Sabetian, G., Shahrokh, N., Setoodezadeh, F.: The impact of computerized physician order entry on prescription orders: A quasi-experimental study in Iran. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 2017, 31, 69. Doi: 10.14196/mjiri.31.69.

- Knox, C., Law, V., Jewison, T., Liu, P., Ly, S., Frolkis, A., Pon, A., Banco, K., Mak, C., Neveu, V., Djoumbou, Y., Eisner, R., Guo, A. C., Wishart, D. S.: DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39 (1), D1035 – 1041. Doi: 10.1093/nar/gkq1126.
- Mishra, D. V.: Artificial intelligence: the beginning of a new era in pharmacy profession. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 2018, 12 (2), 72 – 76. Doi: 10.22377/ajp.v12i02.2317.
- Mei, S., Zhang, K.: A machine learning framework for predicting drug–drug interactions. *Scientific Reports*, 2021, 11 (1), 17 619. Doi: 10.1038/s41598-021-97193-8.
- Mohsen, A., Tripathi, L. P., Mizuguchi, K.: Deep learning prediction of adverse drug reactions in drug discovery using open TG–GATEs and FAERS databases. *Frontiers in Drug Discovery*, 2021, 1, 768 792. Doi: 10.3389/fddsv.2021.768792.
- Nagata, K., Tsuji, T., Suetsugu, K., Muraoka, K., Watanabe, H., Kanaya, A., Egashira, N., Ieiri, I.: Detection of overdose and underdose prescriptions – an unsupervised machine learning approach. *PLoS One*, 2021, 16 (11), e0260315. Doi: 10.1371/journal.pone.0260315.
- Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady, ktorým sa stanovujú harmonizované pravidlá v oblasti umelej inteligencie (Akt o umelej inteligencii) a menia niektoré legislatívne akty* [Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council Laying Down Harmonised Rules on Artificial Intelligence (Artificial Intelligence Act) and Amending Certain Union Legislative Acts]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/?uri=CELEX%3A52021PC0206>. [cit. 2024-01-30].
- Onay, A., Onay, M., Abul, O.: Classification of nervous system withdrawn and approved drugs with ToxPrint features via machine learning strategies. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 2017, 142, 9 – 19. Doi: 10.1016/j.cmpb.2017.02.004.
- O'Mara-Eves, A., Thomas, J., McNaught, J., Miwa, M., Ananiadou, S.: Using text mining for study identification in systematic reviews: a systematic review of current approaches. *Systematic Reviews*, 2015, 4, 5. Doi: 10.1186/2046-4053-4-5.
- Paul, D., Sanap, G., Shenoy, S., Kalyane, D., Kalia, K., Tekade, R. K.: Artificial intelligence in drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, 2021, 26 (1), 80 – 93. Doi: 10.1016/j.drudis.2020.10.010.
- Pinkoh, R., Rodsiri, R., Wainipitapong, S.: Retrospective cohort observation on psychotropic drug-drug interaction and identification utility from 3 databases: Drugs.com®, Lexicomp®, and Epocrates®. *PLoS One*, 2023, 18 (6), e0287575. Doi: 10.1371/journal.pone.0287575.
- Rajpurkar, P., Irvin, J., Zhu, K., Yang, B., Mehta, H., Duan, T., Ding, D., Bagul, A., Ball, R. L., Langlotz, C., Shpanskaya, K., Lungren, M. P., Ng, A. Y.: Radiologist-level pneumonia detection on chest x-rays with deep learning. *Computer Vision and Pattern Recognition*, 2017, 1 – 7. Doi: 10.48550/arXiv.1711.05225.
- Raza, M. A., Aziz, S., Noreen, M., Saeed, A., Anjum, I., Ahmed, M., Raza, S. M.: Artificial intelligence (AI) in pharmacy: an overview of innovations. *Innovations in Pharmacy*, 2022, 13 (2). Doi: 10.24926/iip.v13i2.4839.
- Roche-Lima, A., Roman-Santiago, A., Feliu-Maldonado, R., Rodriguez-Maldonado, J., Nieves-Rodriguez, B. G., Carrasquillo-Carrion, K., Ramos, C. M., da Luz Sant'Ana, I., Massey, S. E., Duconge, J.: Machine learning algorithm for predicting warfarin dose in Caribbean Hispanics using pharmacogenetic data. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 10, 1550. Doi: 10.3389/fphar.2019.01550.
- Sallam, M.: ChatGPT utility in health care education, research, and practice: systematic review on the promising perspectives and valid concerns. *Healthcare*, 2023, 11 (6), 887. Doi: 10.3390/healthcare11060887.
- Sheikh, H., Prins, C., Schrijvers, E.: Chapter 2 – Artificial intelligence: definition and background. In: Sheikh, H., Prins, C., Schrijvers, E. *Mission AI: The New System Technology*, Switzerland: Springer International Publishing, 2023. 15 – 41. Doi:

10.1007/978-3-031-21448-6_2.

Song, D., Chen, Y., Min, Q., Sun, Q., Ye, K., Zhou, C., Yuan, S., Sun, Z., Liao, J.: Similarity-based machine learning support vector machine predictor of drug-drug interactions with improved accuracies. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 2019, 44 (2), 268 – 275. Doi: 10.1111/jcpt.12786.

Srivastava R.: Applications of artificial intelligence in medicine. *Exploratory Research and Hypothesis in Medicine*, 2023, 1 – 9. <https://www.xiahepublishing.com/2472-0712/ERHM-2023-00048>. Accessed November 11, 2022. Doi: 10.14218/ERHM.2023.00048.

Sunarti, S., Fadzilul Rahman, F., Naufal, M., Risky, M., Febriyanto, K., Masnina, R.: Artificial intelligence in healthcare: opportunities and risk for future. *Gaceta Sanitaria*, 2021, 35 (S1), S67 – S70. Doi: 10.1016/j.gaceta.2020.12.019.

Tan, B. K. J., Teo, C. B., Tadeo, X., Peng, S., Soh, H. P. L., Du, S. X., Luo, V. W. Y., Bandla, A., Sundar, R., Ho, D., Kee, T. W., Blasiak, A.: Personalised, rational, efficacy-driven cancer drug dosing via an artificial intelligence SystEm (PRECISE): a protocol for the PRECISE CURATE.AI Pilot Clinical Trial. *Frontiers in Digital Health*, 2021, 3, 635 524. Doi: 10.3389/fdgth.2021.635524.

Turing, A. M.: Computing machinery and intelligence. *Mind*, 1950, 59 (236), 433 – 460. Doi: 10.1093/mind/LIX.236.433.

Van Laere, S., Muylle, K. M., Dupont, A. G., Cornu, P.: Machine learning techniques outperform conventional statistical methods in the prediction of high risk QTc prolongation related to a drug-drug interaction. *Journal of Medical Systems*, 2022, 46 (12),

1 – 10. Doi: 10.1007/s10916-022-01890-4.

Wang, D., Khosla, A., Gargeya, R., Irshad, H., Beck, A. H.: Deep learning for identifying metastatic breast cancer. *Quantitative Methods*, arXiv, 2016, 1 – 6. <https://arxiv.org/abs/1606.05718>. Accessed November 11, 2022. Doi: 10.48550/arXiv.1606.05718.

Wang, Z., Ong, C. L. J., Fu, Z.: AI models to assist vancomycin dosage titration. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13, 801 928. Doi: 10.3389/fphar.2022.801928.

Wani, S. U. D., Khan, N. A., Thakur, G., Gautam, S. P., Ali, M., Alam, P., Alshehri S., Ghoneim, M., M., Shakeel, F.: Utilization of artificial intelligence in disease prevention: diagnosis, treatment, and implications for the healthcare workforce. *Healthcare*, 2022, 10 (4), 608. Doi: 10.3390/healthcare10040608.

Yalçın, N., Kaşıkçı, M., Çelik, H. T., Allegaert, K., Demirkan, K., Yiğit, Ş., Yurdakök, M.: An artificial intelligence approach to support detection of neonatal adverse drug reactions based on severity and probability scores: a new risk score as web-tool. *Children*, 2022, 9 (12), 1826. Doi: 10.3390/children9121826.

Yang, X., Bian, J., Gong, Y., Hogan, W. R., Wu, Y.: MADEx: a system for detecting medications, adverse drug events, and their relations from clinical notes. *Drug Safety*, 2019, 42 (1), 123 – 133. Doi: 10.1007/s40264-018-0761-0.

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 prehľadanie, že ich článok je pôvodný, nebol publikovaný ani zaslaný na publikáciu inde.

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

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

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

Názvoslovie a terminológia. V texte je potrebné používať štandardné slovenské názvoslovie v zmysle platných odporúčaní IUPAC. Detailné inštrukcie pre

anglicky písaný text sa nachádzajú v publikáciách IUPAC *Brief Guide to the Nomenclature of Inorganic Chemistry IUPAC 2015, Pure App. Chem.* 87, 1039-1049, © IUPAC & De Gruyter 2015 and *Nomenclature of Organic Chemistry, IUPAC Recommendations and Preferred Names 2013*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 2014. Je vhodné vyhnúť sa novým triviálnym názvom. Nové zlúčeniny musia byť pomenované systémovým názvoslovím podľa IUPAC.

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

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

Latinské termíny sa píše kurzívou.

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

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

Fotografie, obrázky, grafy. Aby sa vyhlo

prípadným nepresnostiam či chybám, odporúčame zaslať fotografie, obrázky a grafy zvlášť v osobitnej prílohe (aj v prípade, že ich už autori majú v texte) a uviesť zdrojový program, v ktorom boli vypracované (napr. tabuľka – MS Word, graf – MS Excel). V texte sa uvádza odkaz na príslušnú fotografiu, obrázok a graf, napr. (viď obr. 1). Odkaz sa uvedie aj vtedy, keď autor zašle fotografie, obrázky a grafy iba v prílohe, aby bolo jasne označené miesto, kde sa má príslušná fotografia, obrázok alebo graf v texte nachádzať. Fotografie majú mať minimálne rozlíšenie na úrovni 300 dpi a musia byť jasné a ostré. Vzhľadom na technické komplikácie, ku ktorým môže dôjsť pri konvertovaní farebných obrázkov pre potreby čierno-bielej tlače sa odporúča zaslať obrázky a ilustrácie vo verzii vhodnej pre takúto tlač. V časopise môžu mať obrázky a ilustrácie šírku len 8,5 cm a nachádzať sa na strane širokej 17,5 cm, preto by veľkosť písmen v legende mala zodpovedať týmto rozmerom (Times New Roman 10). Obrázky, fotografie a grafy majú byť orámované, priebežne očíslované a má k nim byť pripojený príslušný text týkajúci sa obsahu a prípadne aj zdroja. Číslo a text nemá byť súčasťou fotografie/obrázku/grafu. Číslo a názov obrázku, fotografie a grafu sa má umiestniť nad a príslušný text týkajúci sa obsahu a prípadne aj zdroja (legenda) sa má umiestniť pod nimi. Pri mikrofotografiách text obsahuje aj údaje o mierke a technike farbenia. Hlavné objekty, zmeny a zistenia sa v mikrofotografiách označujú šípku alebo iným symbolom, ktorý je vysvetlený v legende.

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

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

Etické aspekty. Pri popise experimentov vykonávaných na zvieratách sa uvádza, či boli schválené etickou komisiou a či boli dodržané príslušné aktuálne legislatívne opatrenia, ktoré sa vzťahujú na túto oblasť ako aj číslo povolenia Štátnej veterinárnej a potravinovej správy SR. Pri klinických štúdiách sa uvádza, či boli schválené príslušnou etickou komisiou.

Štatistika. Pri opise použitých štatistických metód sa uvádzajú informácie potrebné na to, aby si informovaný čitateľ mohol na základe pôvodných výsledkov overiť ich správnosť.

ŠTRUKTÚRA PRÍSPEVKOV

Každý príspevok má byť tematicky kompletný. Odporúčaný rozsah pre odborný článok (pôvodnú štúdiu) je 12 strán, pre prehľadový článok 15 strán a pre kazuistiku 7 strán.

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

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

ABSTRAKT

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

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

ÚVOD

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

MATERIÁL A METÓDY

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

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

VÝSLEDKY

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

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

DISKUSIA

Zdôrazňujú sa nové a dôležité aspekty štúdie, ktoré vedú ku konečným záverom. Je potrebné sa vyhnúť podrobnému opakovaniu údajov už spomenutých v častiach Úvod a Výsledky. Diskusia má obsahovať zhrnutie prezentovaných zistení,

relevantné obmedzenia a význam týchto zistení pre ďalší výskum. Výsledky štúdie sú porovnávané s publikovanými výsledkami iných autorov.

ZÁVERY

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

POĎAKOVANIE

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

ZOZNAM LITERATÚRY

Všetky zdroje uvedené v zozname musia byť citované v texte.

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 *Paenibacillus larvae* and *Paenibacillus alvei*. In *Proceedings of the International Probiotic Conference: Probiotics for the 3rd Millennium*, High Tatras, Slovakia, June 4 – 7, 2008, 28 – 29.

Online časopis:

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

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

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

Online website:

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

PREHLADOVÉ ČLÁNKY

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

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

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

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

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

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

ZÁVER – Zodpovedanie otázok pre výskum, položených v úvode.

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

KAZUISTIKY

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

Odporúčaná štruktúra kazuistík je nasledovná:

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

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

ÚVOD – vysvetľuje dôvody, pre ktoré bol daný prípad opísaný

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

DISKUSIA – zdôrazňujú sa zaujímavé aspekty prípadu

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

ZOZNAM LITERATÚRY

RECENZIA

Publikujú sa aj kritické rozboru 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