

ROČNÍK 69  
ŘÍJEN  
2020

4

# Česká a slovenská FARMACIE

Czech and Slovak Pharmacy

ČASOPIS ČESKÉ FARMACEUTICKÉ SPOLEČNOSTI  
A SLOVENSKÉ FARMACEUTICKÉ SPOLEČNOSTI

JOURNAL OF THE CZECH PHARMACEUTICAL SOCIETY  
AND THE SLOVAK PHARMACEUTICAL SOCIETY

VYDÁVÁ ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ

## Z OBSAHU:

### **Franc A.**

Vakcíny z pohledu farmaceuta

### **Tenorová K, a kol.**

Kolagen v kombinaci s kyselou formou karboxymethylcelulosity v podobě netkané textilie jako moderní krycí prostředek pro terapii ran – formulace, příprava a hodnocení

### **Masaryková L, Polaščíková P.**

Aplikácia inhalačných liekov z pohľadu lekárnik

### **Dobrova AO, et al.**

Simultaneous determination of amoxicillin and potassium clavulanate in combined medicinal forms: procedure transfer from HPLC to UPLC

### **Pietkova IB, et al.**

Composition of fatty acids in *Centaurea cyanus* (L.)

## **Pokyny pro autory**

Vydáno za podpory Ministerstva zdravotnictví České republiky.

ISSN (Print) 1210-7816, ISSN (On line) 1805-4439

INDEXED IN EMBASE / Excerpta Medica, MEDLINE / Index Medicus

EBSCO publishing - MEDLINE Complete

CHEMICAL ABSTRACTS, CHEMICAL TITLES

ANALYTICAL ABSTRACTS, INIS Atomindex

INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL ABSTRACTS

Excerptováno Bibliographia medica Českoslovacca, Scopus

EBSCO – Medline Complete

Časopis je indexován v Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik  
Rady vlády pro výzkum a vývoj v ČR.





# ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE

## CZECH AND SLOVAK PHARMACY

Časopis České farmaceutické společnosti a Slovenské farmaceutické společnosti  
Journal of The Czech Pharmaceutical Society and The Slovak Pharmaceutical Society

### Česká farmaceutická společnost (Czech Pharmaceutical Society)

**Předseda (President):** prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.  
FaF UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové  
**Místopředsedové (Vice-Presidents):** PharmDr. Pavel Grodza  
PharmDr. Helena Rotterová  
**Vědecký sekretář (Secretary General):** PharmDr. Josef Malý, Ph.D.

### Slovenská farmaceutická společnost (Slovak Pharmaceutical Society)

**Prezident (President):** doc. PharmDr. Tomáš Tesař, PhD., MBA, MPH  
FaF Univerzity Komenského, Kalinčiaková 8, 832 32 Bratislava  
**Viceprezidenti (Vice-Presidents):** RNDr. Roman Smieško  
PharmDr. Slávka Porubcová  
**Vedecký sekretár (Secretary General):** doc. PharmDr. Szilvia Czigle, PhD.

### Vedoucí redaktor (Editor-in-Chief):

doc. PharmDr. Kateřina Kubová, Ph.D.  
Masarykova univerzita Brno, Farmaceutická fakulta

**Redakční rada (Board of Editors):** prof. RNDr. Dr.h.c. Jozef Čižmárik, PhD. (Bratislava)  
prof. Dr. Pharm. Sci. Dariusz Matosiuk (Poland)  
prof. RNDr. Daniel Grančai, CSc. (Bratislava)  
doc. RNDr. Jozef Kolář, CSc. (Brno, Hradec Králové)  
doc. PharmDr. Peter Kollár, Ph.D. (Brno)  
prof. Jindrich Henry Kopecek, Ph.D., D. Sc. (U.S.A.)  
prof. Mirek Macka, RNDr., PhD., FRACI, MRSC, CChem (Australia)  
PharmDr. Josef Malý, Ph.D. (Hradec Králové)  
prof. PharmDr. Miloslava Rabišková, CSc. (Hradec Králové)  
doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc. (Hradec Králové)  
doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D. (Hradec Králové)  
doc. PharmDr. Karel Šmejkal, Ph.D. (Brno)  
doc. PharmDr. et Mgr. David Vetchý, Ph.D. (Brno)  
PharmDr. Tünde Ambrus, Ph.D. (Brno)

# ročník 69

## 2020

### 4

Přehledy a odborná sdělení

*Franc A.* Vakcíny z pohledu farmaceuta ..... 151

Původní práce

*Tenorová K, Masteiková R, Kovárová N, Kostelanská K, Příkryl J, Vetchý D, Bernatonič J.* Kolagen v kombinaci s kyselou formou karboxymethylcelulosy v podobě netkané textilie jako moderní krycí prostředek pro terapii ran – formulace, příprava a hodnocení ..... 163

*Masaryková L, Polaščíková P.* Aplikácia inhalačných liekov z pohľadu lekárnik ..... 172

*Dobrova AO, Golovchenko OS, Bezruk IV, Ivanauskas L, Georgiyants V.* Simultaneous determination of amoxicillin and potassium clavulanate in combined medicinal forms: procedure transfer from HPLC to UPLC ..... 186

Krátké sdělení

*Pietkova IB, Unhurian LM, Horiacha LM, Kyslychenko VS, Zhuravel IO, Kuznietsova VY, Panasenka OI.* Composition of fatty acids in *Centaurea cyanus* (L.) ..... 194

Pokyny pro autory ..... 198

Review Articles

*Franc A.* Vaccines from the perspective of a pharmacist ..... 151

Original Articles

*Tenorová K, Masteiková R, Kovárová N, Kostelanská K, Příkryl J, Vetchý D, Bernatonič J.* Preparation and evaluation of bilayer films based on collagen and carboxymethyl cellulose for wound therapy ..... 163

*Masaryková L, Polaščíková P.* Application of inhaled drugs from the pharmacist's point of view ..... 172

*Dobrova AO, Golovchenko OS, Bezruk IV, Ivanauskas L, Georgiyants V.* Simultaneous determination of amoxicillin and potassium clavulanate in combined medicinal forms: procedure transfer from HPLC to UPLC ..... 186

Short communication

*Pietkova IB, Unhurian LM, Horiacha LM, Kyslychenko VS, Zhuravel IO, Kuznietsova VY, Panasenka OI.* Composition of fatty acids in *Centaurea cyanus* (L.) ..... 194

Instructions to the Authors ..... 199

Vydáno za podpory Ministerstva zdravotnictví České republiky.

<http://www.cls.cz>

Online verze časopisu na [www.prolekare.cz/csfa](http://www.prolekare.cz/csfa)

Registrací a vložením svého předplatitelského kódu, který najdete na přebalu časopisu, získáte přístup do online verze časopisu a jeho archivu.  
Kontakt pro dotazy [info@prolekare.cz](mailto:info@prolekare.cz) nebo +420 602 244 819. © Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2014

ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE

Vydává: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Sokolská 31, 120 26 Praha 2.

Vedoucí redaktor: doc. PharmDr. Kateřina Kubová, Ph.D.

Odpovědná redaktorka: Mgr. Helena Glezgová, e-mail: [helena.glezgova@seznam.cz](mailto:helena.glezgova@seznam.cz)

Tiskne: Tiskárna Prager – LD, s.r.o., Elišky Přemyslovny 1335, 156 00 Zbraslav

Rozšiřuje v ČR: Nakladatelství Olympia, a.s., Praha, do zahraničí (kromě SR):

Myris Trade s.r.o., V Štíhlách 1311/3, P.O.Box 2, 142 01 Praha 4, [myris@myris.cz](mailto:myris@myris.cz), 234 035 205, v SR Mediaprint-Kapa Pressegrasso, a.s., oddelenie inej formy predaja, P.O.Box 183, Stará Vajnorská 9, 830 00 Bratislava, tel.: 02/498 935 66, 02/498 935 63, 0800 188 826, fax: 02/322 222 56, e-mail: [info@ipredplatne.sk](mailto:info@ipredplatne.sk), [objednavky@ipredplatne.sk](mailto:objednavky@ipredplatne.sk), [www.ipredplatne.sk](http://www.ipredplatne.sk)

Vychází: 6krát ročně. Předplatné: na rok pro ČR je 930,00 Kč, SR 39,60 €, jednotlivé číslo 155,00 Kč, SR 6,60 €.

Informace o předplatném podává a objednávky českých předplatitelů přijímá:

CLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, tel.: 296 181 805, e-mail: [nto@cls.cz](mailto:nto@cls.cz)

Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávky přijímá: LD, s.r.o., Tiskárna Prager, tel.: 602 377 675.

Registrační značka MK ČR E 3614.

Rukopisy zasílejte na adresu: doc. PharmDr. Kateřina Kubová, Ph.D., Redakce časopisu Česká a slovenská farmacie, Masarykova univerzita, Farmaceutická fakulta, Palackého 1, 612 42 Brno, e-mail: [kubovak@pharm.muni.cz](mailto:kubovak@pharm.muni.cz)

Rukopis byl předán do výroby 5. 10. 2020.

Zaslané příspěvky se nevracejí. Otištěné příspěvky autorů nejsou honorovány, autoři obdrží bezplatně jeden výtisk časopisu.

Vydavatel získává otištěním příspěvku výlučné nakladatelské právo k jeho užití.

Vydavatel a redakční rada upozorňují, že za obsah a jazykové zpracování inzerátů a reklam odpovídá výhradně inzerent. Žádná část tohoto časopisu nesmí být kopírována za účelem dalšího rozšiřování v jakékoliv formě či jakýmkoliv způsobem, ať již mechanickým nebo elektronickým, včetně pořizování fotokopii, nahrávek, informačních databází na mechanických nosičích, bez písemného souhlasu vlastníka autorských práv a vydavatelského oprávnění.

## Vakcíny z pohledu farmaceuta

### Vaccines from the perspective of a pharmacist

Aleš Franc

Došlo 25. června 2020 / Přijato 1. července 2020

#### Souhrn

Oblast vývoje, výroby a bezpečnosti vakcín se v poslední době dostává do zorného pole veřejnosti. Cílem tohoto přehledového článku není poskytnout vyčerpávající informace o vývoji a výrobě vakcín, což by ani na omezeném prostoru nebylo možné. Jeho smyslem je v krátkosti nastínit stručný přehled principů, vývoje a výroby základních druhů vakcín a poukázat na benefity a rizika z pohledu farmaceuta. Ten se může podílet nejen na základním výzkumu, ale jeho role je především ve formulaci lékové formy, registraci vakcíny, její distribuci a osvětové a edukační činnosti směrem k laické i odborné veřejnosti.

**Klíčová slova:** vakcína • výzkum • vývoj • výroba • bezpečnost

#### Summary

The field of development, production and safety of vaccines has recently come under the public eye. The aim of this review article is not to provide comprehensive information on the development and production of vaccines, which would not be possible even in a limited space. Its purpose is to outline a brief overview of the principles, development, and production of basic types of vaccines and point out the benefits and risks from the perspective of a pharmacist. He can participate not only in basic research, but his role is mainly in the formulation of a dosage form, registration of a vaccine, its distribution, and educational activities towards the lay and professional public.

**Key words:** vaccine • research • development • production • safety

#### Úvod

Článek se z pohledu farmaceuta snaží stručně popsat problematiku vakcín s důrazem na jejich principy, vý-

robu, složení a aplikaci. Předpokládá u čtenáře základní orientaci z oblasti mikrobiologie a imunologie, jelikož používá některé termíny, které zde nejsou blíže vysvětleny. Taxonomie vakcín neodpovídá jednotlivým původcům nemoci (jsou vedle sebe řazeny vakcíny proti virům, bakteriím, prvokům a okrajově i nádorovým buňkám), ale právě uvedenému farmaceutickému aspektu. Nejprve jsou popsány vakcíny dle jejich podstaty (živé, inaktivované, subjednotkové, štěpné, toxoidy, rekombinantní, vektorové, DNA, perorální rostlinné a virům podobné částice). Poté jsou stručně probrány cesty aplikace s ohledem na lékové formy a jejich složení (injectabilia, transdermalia, nasalia a peroralia). Závěrem je krátce pojednáno o jištění jakosti z výrobního pohledu a jsou nastíněny další výzvy pro vývoj nových vakcín.

#### Co je to vakcína

Vakcína je biologický přípravek určený k navození či zvýšení specifické a aktivní imunity vůči infekčnímu agens. Bývá vyrobena z oslabených nebo usmrčených forem patogenů (bakterií a virů) nebo jejich částí, případně odvozených agens (např. toxoidů), které mají antigenní specifitu a dokážou v hostiteli vzbudit imunitní odpověď, resp. tvorbu protilátek či buňkami zprostředkovanou imunitu. Zároveň nesmí být pro organismus toxické. Vakcína stimuluje imunitní systém organismu, aby rozpoznával a ničil patogen jako cizorodý prvek a zároveň si „pamatoval“ jeho antigen, který by imunitní systém mohl v budoucnu snadněji eliminovat, aniž by došlo k rozvoji infekčního onemocnění<sup>1)</sup>. Vakcíny dnes nejsou zaměřeny jen na mikroby, ale využívá se jich s různým úspěchem i k léčbě a prevenci nádorových onemocnění, resp. k imunitní eliminaci nádorových buněk<sup>2)</sup>. Rozeznáváme vakcíny monovalentní, obsahující antigeny proti jedné nemoci, nebo polyvalentní, obsahující více antigenů proti více původcům nemocí.

#### Krátká historie a současnost

Je známo, že již ve středověku Indové požívali hadí jedy k imunizaci proti hadímu uštknutí, v čemž někteří rozpoznávají první zdokumentované používání toxoidů<sup>3)</sup>. V Číně již v roce 1695 používali tampóny namáčené v lézích pravých neštovic (variola) k imunizaci zdravých jedinců, kterým potírali nosní sliznice<sup>4)</sup>. Za počátek vakcinace je možné považovat až aplikaci rozdrce-

doc. PharmDr. ThDr. Mgr. Aleš Franc, Ph.D., ThD. (✉)

Ústav farmaceutické technologie

Farmaceutická fakulta, Masarykova univerzita

Palackého třída 1946/1, 612 42 Brno

e-mail: franca@pharm.muni. cz

ného neštovičného strupu z vemene dojnice (latinsky vacca), která prodělala kravské neštovice, k imunizaci proti variole, kterou provedl v roce 1796 anglický lékař Edward Jenner. Louis Pasteur pak poprvé formuloval teorii o mikrobech jako zdrojích infekčních nemocí a v roce 1885 připravil vakcínu z oslabeného viru vztekliny (lyssavirs). Již v roce 1830 byla na našem území největší proočkovanost proti variole a její eradikace o celé století předběhla svoji dobu. Dětská obrna (poliomyelitis) u nás vymizela v roce 1961 díky Sabinově vakcíně, zatímco ještě v roce 1988 bylo ve světě hlášeno 350 000 případů. Rovněž očkování proti TBC, které v Československu probíhalo v letech 1953–2010, až 40krát snížilo počet případů oproti zbytku světa<sup>5)</sup>, kde nyní umírá ročně více než 1 500 000 lidí<sup>6)</sup>. Zásahu zde mají zejména virologové Dmitrij Slonim, Karel Žáček a epidemiologové Vilém Škovránek, Adam Ervín a Karel Raška<sup>7)</sup>. Ve veterinární medicíně v roce 2002 došlo v České republice k eradikaci vztekliny (rabies) u lišek díky kladení návnad s perorální vakcínou, které byly později shazovány z letadla<sup>8)</sup>. Podle WHO vakcinace každoročně na celém světě obecně za-

braňuje asi 2–3 milionům úmrtí<sup>9)</sup>. Vzhledem k vakcinaci zcela vymizela variola, přičemž její poslední výskyt byl zaznamenán v roce 1979 v Somálsku. Přes tyto úspěchy existují některé patogeny, včetně HIV, původce malárie a respiračního syncytiálního viru (RSV), které jsou vůči všem pokusům o vývoj vakcíny rezistentní a představují výzvu všem vědcům na tomto poli<sup>10)</sup>. V současnosti se u nás uskutečňuje vakcinace v raném dětství například proti záškrtu (difterie), tetanu, černému kašli (pertussis), žlutence typu B (hepatitis B) nebo poliomyelitis a periodicky proti tetanu. Tím došlo k jejich dramatickému snížení či eradikaci<sup>11)</sup>. Očkovací kalendář v České republice je uveden v tabulce 1.

### Druhy vakcín

Vakcíny dokážou stimulovat ať už humorální, nebo buněčnou imunitní odpověď a jejich design se vyvíjel v souvislosti s rozvojem vědeckého poznání. Přes původně „jednoduše“ oslabené či usmrcené mikroby se stále více uplatňovaly postupy biotechnologie, molekulární

Tab. 1. Očkovací kalendář (<https://www.vakcinace.eu/ockovani-v-cr>)

Věk	Povinné očkování		Nepovinné očkování	
	nemoc	očkovací látka	nemoc	očkovací látka
od 4. dne až 6. týden	tuberkulóza (pouze u rizikových dětí s indikací)	BCG vaccine SSI		
od 9. týdne	difterie, tetanus, pertussis, polyomyelitis, hepatitida typu B, onemocnění vyvolaná <i>Haemophilus influenzae</i> typu B	hexavakcína: Hexacima Infanrix hexa (1. dávka)	pneumokoková onemocnění	Synflorix, Prevenar 13 (1. dávka)
4. měsíc	difterie, tetanus, pertussis, polyomyelitis, hepatitida typu B, onemocnění vyvolaná <i>Haemophilus influenzae</i> typu B	hexavakcína: Hexacima Infanrix hexa (2. dávka za 2 měsíce po 1. dávce)	pneumokoková onemocnění	Synflorix, Prevenar 13 (2. dávka za 2 měsíce po 1. dávce)
11. až 13. měsíc	difterie, tetanus, pertussis, polyomyelitis, hepatitida typu B, onemocnění vyvolaná <i>Haemophilus influenzae</i> typu B	hexavakcína: Hexacima Infanrix hexa (3. dávka)	pneumokoková onemocnění	Synflorix, Prevenar 13 (přeočkování)
13. až 18. měsíc	morbili, parotitis, rubeola	Priorix M-M-RVAXPRO (1. dávka)		
5. až 6. rok	morbili, parotitis, rubeola	Priorix M-M-RVAXPRO (2. dávka)		
5. až 6. rok	morbili, parotitis, rubeola	dTap vakcína: Infanrix Adacel (přeočkování)		
10. až 11. rok	morbili, parotitis, rubeola	dTap-IPV vakcína: Boostrix polio (přeočkování)		
13. až 14. rok			onemocnění lidským papilomavirem	Cervarix, Gardasil, Gardasil 9 (celkem dvě dávky)

biologie a genetiky. Vznikaly tak nové druhy bezpečnějších vakcín, jako jsou např. rekombinantní, vektorové či DNA vakcíny. Moderní a bezpečnější druhy vakcín si sice zachovaly svoji antigenní specifitu, ale jejich účinnost musela být v řadě případů zvyšována imunoadjuvanty. U každé vakcíny je proto třeba zvážit zejména dvě hlediska, kam patří reaktivita a imunogenita. Reaktivita je schopnost vakcíny vyvolat obvykle i nežádoucí odezvu organismu (horečka, bolest, obštipace, neurotoxická, febrilní křeče nebo anafylaktický šok) a imunogenita je schopnost vyvolat adekvátní imunitní odpověď<sup>12</sup>. Samotné druhy vakcín, včetně nejdůležitějších pomocných látek, lékových forem a technologií jejich přípravy, jsou krátce zmíněny v následujícím textu.

### Atenuované vakcíny

Jedná se o jednu z původních technologií přípravy z celých oslabených bakterií či virů, která je známá pod názvem LAV (live attenuated vaccines). Technologie byla rozvinuta v padesátých letech 20. století a dnes se od ní z důvodu bezpečnosti v mnoha případech upouští. Mikrobi jsou zde působením nejrůznějších exogenních faktorů oslabeni, aby se nemohli při aplikaci do lidského organismu množit. Mají však zachovanou antigenní specifitu, která je dostatečná k vyvolání imunitní odpovědi i po jedné dávce, která je srovnatelná s přirozeným onemocněním a poskytuje dostatečný čas k produkci paměťových T-lymfocytů. Historicky se LAV využívaly k produkci vakcín nejčastěji z viru spalniček (morbilliviru), polioviru, flavivirů, paramyxovirů a rotavirů<sup>13</sup>. Kultivace může probíhat na vhodných živých médiích, obsahujících nejčastěji zvířecí či lidské tkáň nebo buňky. U virů se dá využít oplodněných vajec, zvířecích embryí nebo zvířecí či lidské kultury fibroblastů. Například paramyxovirus parotitidis lze produkovat na kuřecích embryích a poliovirus na tkáňové kultuře opičích jater<sup>14</sup>. K deaktivaci mikrobů se dá využít chemické nebo fyzikální inaktivace. Z chemických činidel se nejčastěji používají formaldehyd, fenol, hydroxid sodný, saponiny apod. a z fyzikálních metod teplota či UV záření<sup>15</sup>. V současné době existuje celkem pět LAV vakcín, které doporučuje WHO. Jedná se o bakteriální vakcínu proti původci tuberkulózy *Mycobacterium tuberculosis*, založené na *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)<sup>16</sup>, což je oslabený kmen *Mycobacterium bovis* se sníženou virulencí, a virové vakcíny, kam patří perorální vakcína proti poliomyelitidě (OPV)<sup>17</sup>, rubeole<sup>18</sup>, rotaviru<sup>19</sup> a žluté zimnici (YF)<sup>20</sup>.

### Inaktivované vakcíny

Jde zřejmě o historicky nejstarší vakcíny. Jedná se o chemicky nebo fyzikálně usmrcené celé bakterie nebo viry, které již nemohou ani potenciálně způsobit infekční onemocnění. Používá se pro ně zkratka KA (killed antigen) a jsou bezpečnější a stabilnější než LAV. Imunogenita, stejně jako reaktivita KA (zejména erytém, horečka, bolestivost) jsou vysoké, a v současné době se proto rutinně nepoužívají. Nestačí je obvykle podat v jediné dávce<sup>21</sup>. Získávají se stejně jako LAV, avšak namísto oslabení se používají metody usmrcení, kam patří depozice vakcíny

působením nejčastěji roztoku kyseliny askorbové, beta-aminofenylketonu, ethyleniminu, formaldehydu, fenolu, propiolaktonu nebo jejich směsi. Z fyzikálních metod jde o působení zvýšeného tlaku, teploty, UV záření apod. Tyto metody se mohou mezi sebou kombinovat<sup>22</sup>. Nedávno se ke klinickým účelům využívaly například KA vakcíny proti HIV, hepatitidy B a C<sup>23</sup>, chřipce (influenza) apod.<sup>24</sup>. V současné době je ve veterinární medicíně zkoumána KA vakcína z nového delta-koronaviru prasat (PDCoV), který způsobuje akutní průjem, zvracení, dehydrataci a úmrtnost u novorozelých selat, což má za následek významné hospodářské ztráty. Vakcína vyvolává silnou humorální imunitu<sup>25</sup>. V humánní medicíně WHO v současné době doporučuje inaktivovanou vakcínu proti pertussis (wP)<sup>26</sup> a poliomyelitidě (IPV)<sup>27</sup>.

### Subjednotkové vakcíny

Jde o inaktivované subjednotkové vakcíny SUV (subunit vaccines), které obsahují pouze komponenty mikrobů, které jsou zodpovědné za imunogenitu. Usmrcený patogen je zde rozložen, jeho komponenty separovány a dále použity k přípravě vakcíny. SUV obsahují jen povrchové antigeny, neobsahují antigeny vnitřní, a mají proto slabší imunogenitu<sup>28</sup>. Mohou se členit podle obsahu komponent na **proteinové**, **polysacharidové** a **konjugované**. V současné době se používají jak proti bakteriím, tak proti virům. Jako protibakteriální vakcínu WHO doporučuje **proteinovou** acelulární vakcínu proti pertussis (aP), obsahující proteinový toxoid s případnou složkou dalších subcelulárních součástí<sup>29</sup>. Z protivirových vakcín sem patří vakcína proti hepatitidě B, která se skládá z povrchového proteinového antigenu viru hepatitidy B (HBsAg)<sup>30</sup>. Některé bakterie, jako jsou pneumokoky, vytvářejí polysacharidový obal, který ztěžuje imunitní odpověď hostitelského organismu. Těchto polysacharidů se využívá k tvorbě **polysacharidové** vakcíny. Jejich molekuly jsou však malé a nebývají dostatečně imunogenní, a proto se nepoužívají u dětí do 2 let. Patří sem vakcína Pneumo23, která chrání proti 23 typům pneumokoků a obvykle se přeočkovává po 5 letech<sup>31</sup>. Imunogenitu lze cíleně potencovat konjugací, resp. vazbou s proteinem, což vyvolá imunitní odpověď i u kojenců. Používají se k tomu různé proteinové nosiče, včetně difterického toxoidu (DT) a tetanického toxoidu (TT). V současné době se používají **konjugované** vakcíny pro meningokokové infekce, infekce bakterií *Haemophilus influenzae* typu b (Hib)<sup>32</sup> nebo sedmivalentní (PCV-7), desetivalentní (PCV-10) nebo třináctivalentní (PCV-13) pneumokový konjugát proti pneumokokové infekci<sup>33</sup>.

### Štěpné vakcíny

Štěpené inaktivované vakcíny SV (split vaccines) obsahují rozštěpené částice mikrobů a obvykle jak vnější, tak vnitřní antigeny, čímž se liší od SUV. Jejich reaktivita je minimální, avšak imunogenita přijatelná<sup>34</sup>. Virové kultivary jsou zde inaktivovány, štěpeny, separovány a z virů je odstraněn lipidový obal. Takto připravená vakcína proti influenze obsahuje pouze hemagglutinin (H), neuraminidázu (N), RNA a nukleoproteiny. Při

každoročním opakovaném očkování proti influenze někteří dávají přednost právě SV, které při srovnání se SUV vedou k vyššímu vzestupu titru protilátek<sup>35</sup>). I zde se ale stále hledá způsob jak zvýšit jejich imunogenitu. Jedním ze způsobů je například obalení antigenních štěpů do kationických liposomů<sup>36</sup>). Komerčních SV se využívá právě k vakcinaci proti influenze<sup>37</sup>).

### Toxoidy

Jedná se o vakcíny vyrobené z bakteriálního proteinového toxinu, inaktivovaného ve formě toxoidu (T), který je pro organismus netoxický, ale přesto má potřebnou imunogenitu. Mohou být tekuté, vysrážené, purifikované nebo adsorbované na příslušný sorbent. Při výrobě vakcín se dodnes používají endotoxiny produkované bakteriemi *Clostridium tetani* ve formě tetanotoxinu způsobujícího tetanus a *Corynebacterium diphtheriae* ve formě difterického toxinu způsobujícího diftérii<sup>38</sup>). TT a DT se vyrábějí inaktivací nativních toxinů vhodnými deaktivujícími činidly. Například TT vzniká z tetanotoxinu, který se obvykle inaktivuje denaturací formaldehydem, což ovšem natolik mění jeho strukturu, že dochází k nedostatečné imunitní odpovědi. Proto bývá adsorbován na hlinité nebo vápenaté soli, které zároveň slouží jako imunoadjuvans. Alternativně byl například botulotoxin BoNT (botulický neurotoxin), produkt *Clostridium botulinum*, vedle formaldehydu inaktivován i alkylací jodacetamidem, což snížilo jeho neurotoxickou aktivitu na nedetekovatelnou úroveň. Po imunizaci pak byly hladiny neutralizačních protilátek *in vivo* u myši 600krát vyšší než hladiny produkované formaldehydovým toxoidem<sup>39</sup>). Vakcinace TT je volně dostupná i v rozvojových zemích, přesto náklady na dopravu jsou jednou z významných překážek, které lidem brání v očkování na klinikách v subsaharské Africe<sup>40</sup>). WHO doporučuje vakcinaci proti diftérii a tetanu právě formou vakcín ve formě TT<sup>41</sup>) a DT<sup>42</sup>).

### Rekombinantní vakcíny

Rekombinantní vakcíny RV (recombinant vaccines) obsahují zpravidla virové částice, resp. fragmenty, které se při výrobě SUV separují z usmrčených patogenů. Zde jsou však produkovány metodami genetického inženýrství, a při jejich výrobě tak odpadá kultivace patogenu. Při vývoji RV je nejprve třeba zjistit strukturu imunogenního fragmentu a izolovat gen, který je zodpovědný za jeho produkci. Tento gen je následně vpraven do genomu kultivovaného mikrobu, obvykle kvasinky, *Escherichia coli* nebo tkáňové kultury savčích buněk. Biotechnologicky jsou v bioreaktorech následně produkovány dané proteiny, které jsou využity k vakcinaci. První RV proti hepatitidě typu B na základě povrchového antigenu (rHBsAg), což jest neglykosylovaný lipoprotein, byla léčebně využita již v roce 1986<sup>43</sup>). Produkce antigenu zde probíhá v buňkách kvasinek, do kterých je vpraven příslušný plasmid. Po fermentaci je kultivát štěpen a příslušný protein je izolován pomocí afinitní a hydrofobní chromatografie. Získané proteinové nanočástice jsou následně inaktivovány formaldehydem a adsorbovány

na imunoadjuvant hydroxid hlinitý<sup>44</sup>). V současné době je vyvíjena například RV k prevenci průjemových onemocnění způsobených bakteriemi rodu *Shigella flexneri*, kde jsou imunogenní epitopy z membránového kanálu a putativní lipoprotein produkovány v kultuře bakterií *Escherichia coli*<sup>45</sup>). Z komerčních vakcín se dnes využívá rekombinantní vakcína proti hepatitidě B (rHBsAg)<sup>46</sup>) nebo vakcína proti humánnímu papilomaviru (HPV) k prevenci rakoviny děložního čípku<sup>47</sup>).

### Vektorové vakcíny

Vektorové vakcíny VV (vector vaccines) používají technologie RV s tím rozdílem, že pracují s celými mikroby, které se stávají nosiči heterogenních antigenů. Principem VV je vklonování antigenu pocházejícího z patogenu do nepatogenního mikrobu za účelem vytvoření epitopu, který je schopný vyvolat imunitní odezvu. Využívají se zde například virální nosiče odvozené od DNA adenovirů, poxvirů, herpes virů, pikornavirů, cytomegaloviru a RNA retrovirů a flavivirů<sup>48</sup>). Takto upravené VV jsou na rozdíl od řady polypeptidových SUV obvykle schopné vyvolat humorální i buněčnou imunitu, není zde třeba používat imunoadjuvantů a při výrobě vakcín odpadají nákladné purifikační technologie<sup>49</sup>). Asi nejrozšířenějšími vektorovými jednotkami jsou dsDNA viru varioly a příbuzné nepatogenní vaccinia viry z rodu poxvirů, které se replikují v cytoplazmě infikované buňky<sup>50</sup>). Infekce virem vaccinia bývá mírná, obvykle bez příznaků, přičemž chrání před variolou. Vaccinia virus přijímá a transkribuje velké úseky exogenní DNA, pojme až 30 genů a vytváří dlouhodobou imunitu<sup>14, 51</sup>). V současné době se ve výzkumu využívají i bakteriální vektory, kam se řadí např. bakterie druhu *Typhimurium*, *Clostridium* nebo *Salmonella*, které vedle onkolytických virů (adenovirů a echovirů) mohou zabezpečit produkci vakcín s cytostatickou, resp. onkolytickou aktivitou na základě transportu genů zodpovědných za apoptózu nádorových buněk<sup>52</sup>). Dnes již existuje řada vektorů, které mají potenciál indukovat robustní imunitní odpověď, a některé zatím ukazují, že mohou být dobře tolerovány a posléze vést k vývoji nových vakcín.

### Genové (DNA) vakcíny

Genové vakcíny představují novou možnost imunizace a imunoterapie, která kvalitativně převyšuje KA nebo SUV. Jedná se o rekombinantní technologii, kde je za terapeutický efekt zodpovědná nativní DNA. Principem DNA vakcín je schopnost předávat geny hostitelským buňkám. Vakcína proto obsahuje jeden nebo několik genů, které se jejím prostřednictvím vnašejí do buněk hostitelského organismu (zvířete nebo potenciálně člověka), jehož metabolické procesy poté syntetizují proteiny na základě genů přítomných v plasmidu, který je schopný proniknout do buňky. Alternativně může být DNA zapouzdřena v proteinu, který usnadňuje její vstup do buněk. Bylo zjištěno, že intramuskulární injekce plasmidu DNA, kódujícího protein viru influenzy, je na myším modelu schopná vyvolat aktivaci specifických cytotoxických T-lymfocytů, které později zvíře chrání před onemocněním způsobeným



ným tímto virem. Plasmidy mohou ovšem nést i geny kódující vylučování i jiných látek, např. cytokinů, případně i jiných molekul s imunostimulačním efektem<sup>53</sup>). Mechanismus DNA vakcín skýtá naději k vývoji vakcín proti onemocněním, proti kterým zatím úspěšně či trvale očkovat nelze. Je totiž známým faktem, že některé viry, jako jsou ortomyxoviry nebo HIV, snadno mutují, resp. mění svůj zevní obal, aby nevybudily imunitní odpověď, což je právě překážkou úspěšného vývoje vakcín. Avšak vnitrobuněčné proteiny mutují velmi neochotně a stále přitom obsahují antigeny, na něž se mohou vázat cytotolytické T-buňky. Hlavním cílem DNA vakcíny je proto navodit imunitu proti těm infekcím, u nichž tradiční vakcíny a terapie nejsou úspěšné, zdokonalit stávající vakcíny nebo léčit chronická onemocnění. V současné době probíhá klinické hodnocení DNA vakcíny proti viru Zika ZIKV VRC5283, kde byl na opičím modelu sledován přenos z matky na plod. V porovnání s neimunizovanými zvířaty došlo u těch očkovaných k významnému snížení incidence velikosti a délky mateřské viremie, časné ztrátě plodu, fetální infekce a fetální patologie mozku<sup>54</sup>). Podobně probíhají testy vakcíny proti HIV<sup>55</sup>). Tyto vakcíny zatím nejsou schválené k léčbě.

### Perorální rostlinné vakcíny

Podání perorálních vakcín má být vhodnou alternativou k injekční aplikaci, jelikož tato dle WHO způsobila až 15 000 000 případů kontaminace hepatitidou B a dalšími patogeny, např. HIV<sup>56</sup>). Nadějným druhem jsou tzv. perorální rostlinné vakcíny PLV (plant-based peroral vaccines). Tento druh je v principu odvozen od RV vakcín s tím rozdílem, že hostitelským organismem je rostlinná buňka tzv. transgenní rostliny. K jejich produkci se využívá genetická agrobakteriální transformace např. pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, jejíž plasmidy nesou regulační geny. Vzhledem k schopnosti této bakterie přenášet DNA do rostlin byla uskutečněna řada cílených přenosů genetické informace do rostlinných buněk. Pomocí rekombinantní T-DNA byla vyprodukována řada proteinů včetně antigenů, jako je např. glykoprotein S koronaviru.<sup>57</sup>) V současnosti bylo vyvinuto přes 700 PLV proti např. *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Plasmodium falciparum*, rabies, rotaviru, viru hepatitidy A, B a C, morbilli viru, rinoviru, papilomaviru, cytomegaloviru atd.<sup>58</sup>). Od osmdesátých let 20. století, kdy se tyto technologie začaly zkoumat, vývoj notně pokročil a dnes se k přenosům antigenů do rostliny používají i virové vektory. Uvádí se, že využití jedlých částí takto geneticky modifikovaných rostlin jako vakcinačního materiálu je vzhledem k absenci kryptických patogenů zcela bezpečné. Při výrobě PLV, kdy lékovou formu tvoří například lyofilizovaná a enterosolventně enkapsulovaná droga, není ani potřeba nákladných fermentačních a purifikačních postupů, sterilizace lékové formy a speciálního skladování. Perorální vakcinace navíc způsobuje vzestup jak slizničních IgA, tak systémových IgG protilátek indukovaných kontaktem antigenu se střevní mukózou. Rizikem je ovšem možnost vzniku tolerance, aniž by byl aktivován imunitní systém hostitele<sup>59</sup>). V současné době jsou ze strany FDA schvále-

né dvě vakcíny. První je na bázi glukocerebrosidázy, produkované kulturami mrkvové natě. Druhou tvoří MucoRice B-subunit CTB, což je podjednotka B-choleratoxinu, produkovaná semeny rýže<sup>60</sup>).

### Virům podobné částice

VLP (virus like particles) jsou struktury o rozměrech obvykle 30–90 nm, které vznikají „samonaskládáním“ virových proteinů. Neobsahují nukleové kyseliny a často ani lipidové obaly. Jde o povrchové i vnitřní proteiny požadovaného viru, které vytvářejí tyčovou nebo ikosaedrální strukturu<sup>61</sup>). Ve všech těchto případech mají povrchy těchto VLP opakující se strukturu, která je ideální pro indukci humorální i buněčné imunity<sup>62</sup>). VLP strukturně jednoduchých virů se obvykle produkují v kulturách bakterií nebo kvasinek<sup>63</sup>). Proces zpravidla začíná fermentací rekombinantních *Saccharomyces cerevisiae*, které do média produkují potřebný protein, který se extrahuje a posléze purifikuje řadou fyzikálních a chemických metod, jako je adsorpce na silikagelu, hydrofobní interakční chromatografie, případně ultrafiltrace apod. Získaný protein bývá ošetřen formaldehydem a následně vysolen<sup>64</sup>). Příkladem je VLP odvozená od influenza viru, která obsahuje povrchové proteiny H a N smíšené s proteiny M1 a M2 z jádra viru, které se poté samy sestaví do struktury VLP. Vzhledem k tomu, že se VLP nemohou replikovat, poskytují bezpečnější alternativu k LAV<sup>65</sup>). VLP jsou schváleny FDA jako vakcíny proti hepatitidě B (HepB) a lidskému papilomaviru (HPV)<sup>66</sup>).

### Cesty aplikace

Vakcíny byly během své historie aplikovány řadou cest. Patří sem nejčastěji injekční podání – intramuskulární (např. HepB, IPV, HiB, PCV-7, DtwP, DTaP, DT, Td, TT), subkutánní (morbili, YF) nebo intradermální (např. BCG), kterými se aplikuje většina vakcín. Ačkoliv je injekční vakcinace nejvíce rozšířená, má řadu nevýhod, jako je např. potřeba vyškoleného zdravotnického personálu. Vpich je navíc bolestivý, může způsobit zranění a mohou nastat komplikace při skladování injekcí. Vedle toho se využívá i transdermálních náplastí a intranazálních přípravků těžících z velké sorpční vlastnosti nosní sliznice. I v současnosti je stále využíván perorální podání (např. OPV, rotavirus)<sup>67</sup>).

### Lékové formy a technologie vakcín

Vakcína, stejně jako kterékoliv nové léčivo, samozřejmě prochází náročnými fázemi klinického hodnocení, kdy se v I. fázi hodnotí bezpečnost a imunogenita, ve II. fázi vedlejší účinky a optimální dávkování a ve III. fázi klinická účinnost. Vedle toho samozřejmě existuje vývoj lékové formy, včetně náročné fáze detekce a bezpečné izolace antigenu, fyzikálně chemické i biologické hodnocení léčivého přípravku, jeho zavádění do výroby včetně testování stability, validace výroby a samotné registrace. Je zřejmé, že vývoj moderní a bezpečné vakcíny trvá řadu let.

### Injectabilia

Injekční vakcíny musí se samozřejmostí splňovat všechny náležitosti injekcí. To se týká i klasických kapalných injekcí a lyofilizátů, kde se injekce připravuje pro rekonstituci *in situ*. Jejich vývoj i průmyslová výroba, ačkoliv vychází z biotechnologie a genového inženýrství, se řídí běžnými standardy, jako je QbD (quality by design)<sup>68)</sup> s využitím metod MVDA (multivariate data analysis)<sup>69)</sup>. Pomineme-li nyní biotechnologické a inženýrské metody získávání antigenu, pak z hlediska klasické farmaceutické technologie injekční vakcíny obsahují kromě běžných i specifické komponenty. Jak již bylo řečeno, řada vakcín není schopná vyvolat dostatečnou imunitní odpověď, a proto se do nich přidávají tzv. **imunoadjuvanty**, které v místě vpichu zajišťují aktivaci eozinofilů a produkci IgE ve formě lokálního zánětu. Obvykle se dělí na anorganické sloučeniny (např. sloučeniny hliníku), bakteriální produkty (např. muramyl dipeptid), olejové emulze (známé je tzv. Freundovo adjuvans) a imunostimulátory (cytokiny a interleukiny)<sup>70)</sup>. Mezi historicky a stále nejvíce používané látky patří anorganické sloučeniny jako hydroxid a fosforečnan hliníkový a fosforečnan vápenatý<sup>71)</sup>. Tyto látky slouží zároveň jako sorbenty, přičemž vzniklá gelová struktura, která může pozitivně ovlivnit i délku imunitní odpovědi<sup>72)</sup>. Vzhledem k často kritizované toxicitě hliníku se hledá i řada jiných dostupných a účinných látek, jako jsou různé uhlovodíky z rostlinné, bakteriální a syntetické produkce apod.<sup>73)</sup>. Přítomnost imunoadjuvantů v různých typech vakcín uvádí tabulka 2.

K dalším látkám patří **stabilizátory**, jako jsou například glutamát sodný, chlorid nebo síran hořečnatý, které chrání před zevními vlivy. Dále jsou to **aditiva** ve formě konstituící zpravidla ve formě lyofilizovaných injekcí, jako jsou nejčastěji laktosa, sacharosa, glycin a albumin. Vedle nich se používají **protimikrobní**

**látky** jako thiomersal, k jehož vypuštění v USA a EU došlo u dětských vakcín z hlediska toxicity, nebo 2-fenoxyethanol, fenol a formaldehyd. Nežádoucím množení potenciálních patogenů lze bránit přidávkem **antibiotik**, jako je neomycin. Vakcíny pak samozřejmě mohou obsahovat běžná **pufrační činidla**. K rekonstituci lyofilizátů se používá fyziologický roztok nebo voda pro injekce<sup>74, 75)</sup>. Vedle toho se mohou vyskytovat i kultivační residua<sup>76)</sup>. Český lékopis u kontroly vakcín explicitně požaduje zkoušku na: pH, obsah adjuvans (hliníku a vápníku), volný formaldehyd, fenol a vodu, využitelný objem a bakteriální endotoxiny. Vakcíny se skladují při teplotě  $5 \pm 3$  °C, přičemž tekuté adsorbované vakcíny nesmějí zmraznout (čl. 9.5:0153).

### Transdermalia

Transdermální imunizace TCI (transcutaneous immunization) se stala atraktivní a alternativní cestou vakcinace a podnítila vývoj vakcín. Umožňují to dvě vrstvy lidské kůže: epidermis a dermis, které obsahují APC buňky (antigen presenting cells), kam patří zejména Langerhansovy buňky (LC), dermální dendritické buňky (dDC) a makrofágy, které dokážou reagovat na antigen a zahájit imunitní odpověď. K dosažení optimálního přístupu antigenu k APC, které indukují aktivaci imunitní odpovědi organismu, je třeba využít synergie vhodné cesty podání v koordinaci s potřebnými komponenty vakcíny. V současné době se proto vývoji TCI věnuje zvýšené úsilí, přičemž se využívá i synergických systémů a mechanismů ve formě např. ultrazvuku<sup>77)</sup>, iontoforézy<sup>78)</sup>, mikrojehel<sup>79)</sup> a nejčastěji liposomů<sup>80)</sup> nebo pevných nanoemulzí<sup>81)</sup>. Nadějnými se zde v poslední době jeví exkluzivně aplikované částicové systémy na bázi lipidů, jako jsou transferosomy<sup>82)</sup>, etosomy, kubosomy, niosomy nebo disperze v oleji<sup>83)</sup>. Současné výzkumy na lidech, které se zabývaly např. ochranou před počáteční

Tab. 2. Přehled některých hodnocených složení k nazální aplikaci na lidech<sup>87)</sup>

Systém	Antigen	Komentáře
LAV	pertussis	
LAV	RSV	pro děti
LAV	trivalentní influenza	
KA	influenza	
KA	trivalentní influenza	pro děti
KA	trivalentní influenza	hodnoceno na HIV pacientech
KA	trivalentní influenza	pro děti
SUV	rCTB	určeno pro horní cesty dýchací
SUV	CTB	určeno pro dolní cesty dýchací
EP	difterie a tetanus	
OMP	<i>Meningococcus</i> skupiny B (Norský typ)	získaná dobrá buněčná imunita
OMP	<i>Meningococcus</i> skupiny B	
liposomy	influenza, hepatitida B, TT	
liposomy	<i>Streptococcus mutans</i>	
VV	antigeny infekce	

infekcí *Mycobacterium tuberculosis*, prokázaly, že intradermální revakcinace adolescentů BCG zajistila 45% ochranu proti infekci<sup>84</sup>. Příkladem úspěšně registrované intradermální vakcíny proti influenze je Fluzone® Intra-dermal Quadrivalent (Sanofi Pasteur)<sup>85</sup>.

### Nasalia

Obvyklé virové a bakteriální patogeny střevních, respiračních a pohlavních nemocí vstupují skrze velkou plochu slizničních membrán respiračního ústrojí. Celý slizniční epitel horních cest dýchacích navíc představuje i účinnou fyzickou bariéru pro mnoho patogenů. Jeho lymfoidní tkáň spojená s mukózou má ovšem zvláštní význam pro rozvinutí imunitní odpovědi, což usnadňuje návrh vakcín schopných vyvolat vhodný typ ochranné imunitní odpovědi<sup>86</sup>. Proto se intranazální imunizace objevila jako velmi účinná cesta vakcinace jak pro periferní, tak systémovou, humorální i buněčnou imunitu<sup>87</sup>. Různá kvalita a míra reakce závisí na povaze antigenu a jeho interakci s mukózním indukčním místem, přičemž záleží na dávce, adjuvantech a frekvenci podání<sup>88</sup>. Na nosní sliznici je proto možné aplikovat buď samotné mikroby ve formě snad všech známých vakcín, jako jsou LAV, KA, SUV, RV, nebo například ve směsi s urychlovači penetrace (EP), případně ve formě systémů, jako jsou mikročástice obalené membránou (OMP), liposomy<sup>89</sup>, imunostimulační komplexy (ISCOM)<sup>90</sup> nebo například mikročástice na bázi PLGA<sup>91</sup>. Tabulka 3 uvádí některé klinické studie nazálních vakcín prováděných na lidech.

Z komerčních intranazálních vakcín lze uvést trivalentní živou vakcínu proti influenze typu A a B (FluMins®) a kvadrivalentní živou vakcínu proti influenze typu A a B (FluMins Quadrivalent®)<sup>92</sup>.

### Peroralia

Perorální vakcíny OV (oral vaccines) mají ve vakcinaci letitou tradici. Nejprve se používaly živé a usmrčené bakterie. Například již v roce 1902 použil Wright inaktivovanou autologní kulturu stafylokoka k vakcinaci proti stafylokokovým infekcím<sup>93</sup>. Mezi nejúspěšnější perorální vakcíny proti poliomyelitidě patří inaktivova-

ná Salkova vakcína (1952) nebo živá Sabinova vakcína (1962), které podstatně snížily, až eradikovaly výskyt polyomyelitidy<sup>94</sup>. Při perorálním podání je třeba cílit antigen zejména na střevní enterocyty, pohárkové buňky a M-buňky. K nim však vede dlouhá cesta a antigen musí překonat mnoho fyzikálně-chemických a biologických bariér. Jedná se zejména o kyselé prostředí žaludku a přítomnost proteolytických enzymů, které mohou denaturovat proteinový antigen. Dále je zde biologická bariéra střevního epitelu a hlenu a omezené časové setrvávání v tenkém střevě (cca 3–4 h), kdy dochází k většině absorpčních procesů. Rovněž je potřeba daleko většího množství antigenu ve srovnání například s injekčním podáním<sup>95</sup>.

Zcela zásadní je zde proto využití znalostí farmaceutické technologie při zpracování antigenu do OV, který je potřeba chránit před výše uvedenými hrozbami denaturace. Antigen je možné zpracovat ve více formách, jako jsou niosomy<sup>96</sup>, liposomy<sup>97</sup>, bilosomy<sup>98</sup>, ISCOM<sup>99</sup>, polymerní mikročástice (MPs) a nanočástice (NPs)<sup>100</sup>, kde se jako polymerů může využívat PLA a PLGA, případně různých fosforylovaných lipidů, chitosanu atd. Částice pak mohou být obaleny enterickými polymery. Pokud je třeba cílit částice až do kolonu, je možné využít i komerční polymerové disperze, např. Eudragit® FS<sup>101</sup>. O PLV vakcínách ve formě enkapsulovaných lyofilizovaných rostlinných materiálech bylo pojednáno u PLV vakcín.

Většina OV se podává ve formě vodných suspenzí s orálními aplikátory. Kromě suspenze bakterií, resp. enkapsulovaných či různě technologicky zpracovaných antigenů, OV běžně obsahují cukry, v případě oslabených vakcín různá kultivační média, např. DMEM<sup>102</sup>, vodu pro injekce a různé pufrální přísady<sup>103</sup>.

Komerčně se OV využívá například ve formě enterických tvrdých tobolek u vakcíny proti *Salmonella typhi* (Vivotif®). Dále suspenzí proti *Vibrio cholerae* ve formě rekombinantní SUV (Dukorale®) a LAV CVD-10-HgR (Vaxchora®). Kromě bakterií existují OV například proti rotaviru ve formě atenuovaného monovalentního kmeny lidského rotaviru RIX4414 typu G1P (Rotarix®)<sup>104</sup>.

Tab. 3. Přehled typů vakcín a přísady imuno adjuvantu<sup>48</sup>

Systém	Antigen	Adjuvant
LAV	variola, polio, morbilli, parotitis, rubeolla, kuřecí poxvirus, rotavirus, Shigela, influenza, YF	ne
LAV	TBC, typhus	ne
KA	polio, japonská encefalitis, hepatitida A, influenza, rabies	fakultativně
KA	pertussis	fakultativně
SUV proteinová	tetanus, anthrax, difterie	ano
SUV polysacharidová	pneumokok pro dospělé atd.	ne
SUV konjugovaná	pneumokok pro děti, haemophilus b, bakteriální meningitida	fakultativně
PT	pertussis	fakultativně
VLP	hepatitida B, lidský papilomavirus	ano
DNA	ve vývoji	ano
VV s DNA	ve vývoji	ne

## Jištění jakosti

Vývoj nového léčiva trvá řadu let, přičemž novým vakcínám je třeba se věnovat obzvláště pečlivě. U běžného léčiva, které se podává již při propuknutém onemocnění, se počítá s nežádoucími účinky a vždy je třeba vyhodnotit „risk-benefit ratio“. Vakcína se však podává jako prevence zdravé populaci, kde má danému onemocnění předcházet a není možné předpokládat u ní trvalé nežádoucí účinky. Je proto více než diskutabilní vyvíjet nové vakcíny například při pandemiích řádově v horizontu několika měsíců. Při jištění jakosti je třeba sledovat **bezpečnost**, kdy nová vakcína nesmí vyvolávat onemocnění nebo poškozovat organismus, což je třeba zajistit dostatečně robustním klinickým hodnocením. Dále **specifitu**, kdy vakcína musí vyvolávat tvorbu protilátek proti konkrétnímu danému antigenu (který se při infekci a následném onemocnění uplatňuje) a chránit organismus co možná nejdéle. Vakcína by měla být zároveň co nejsnáze aplikovatelná a cenově dostupná i v rozvojových zemích, které jsou často ohniskem epidemií. Počet dávek k vyvolání imunity organismu by neměl překročit pět aplikací<sup>105</sup>.

Samotné vakcíny se pak vyrábějí podle zásad správné výrobní praxe (SVP) pro výrobu léčivých přípravků biologického původu, kde se podílejí pouze proškolení pracovníci v k tomuto účelu schválených prostorách, s patřičnou dokumentací jak výchozích látek, tak systémů jednotné inokulace a systémů buněčných bank, přičemž pečlivá pozornost má být věnována validaci odstraňování nebo inaktivaci virů. Tyto požadavky vycházejí z obecných požadavků WHO a požadavků CPMP (Committee for Medicinal Products for Human Use). V České republice je tato problematika řešena zejména zákonem o léčivech, jeho prováděcími předpisy a právními předpisy EU. SÚKL k tomu vydal pokyn VYR-32 týkající se výroby léčivých přípravků biologického původu<sup>106</sup>.

Český lékopis se v podstatě chronologicky věnuje aspektům výroby ve formě: obecných ustanovení bezpečnosti, substrátům pro kultivaci, inokolům a buněčným bankám, kultivačním médiím, kultivaci a sklizni, kontrolním buňkám a vejším, purifikaci, bílkovinným nosičům, zkouškám na sterilitu meziproductů, konečné várce, stabilitě meziproductů, vzhledu a zkouškám na zvířatech (čl. 9.5:0153).

## Výzvy ve vývoji nových vakcín

Vakcíny pro více než 30 bakteriálních a virových patogenů v průběhu let zachránily stovky milionů životů. Přesto byly některé patogeny, včetně HIV, malárie a RSV, rezistentní vůči intenzivním pokusům o vývoj vakcíny. Současné vakcíny proti celosvětově důležitým chorobám, jako je TBC a influenza, jsou navíc suboptimální, což vede k potenciální pandemické těchto onemocnění<sup>107</sup>.

### Influenza

*Ortomyxovirus influenzae* vykazuje mírné, střední a hluboké mutace, které vedou k virovým variantám,

jež nevyvolají trvalou imunitu po prodělané nemoci. To má každoročně za následek miliony infekcí s odhadem 300 000 až 600 000 úmrtí<sup>108</sup>. Úspěšnost vakcinace se zde odhaduje na 10–60 % podle toho, zda byl zvolen správný typ cirkulujícího viru. Vakcíny navíc nechrání před potenciální pandemickou ptačích kmenů (např. H5N1 a H7N9), které mohou přejít na člověka<sup>109</sup>. Zároveň existuje intenzivní snaha vyvinout vakcínu zaměřenou na relativně konstantní části chřipkových antigenů N a H, jež by chránily proti širokému spektru různých virových kmenů<sup>110</sup>.

### TBC

Tuberkulóza je celosvětové infekční, nezřídka smrtelné onemocnění. Odhaduje se, že až jedna čtvrtina světové populace je infikována *Mycobacterium tuberculosis*. Každoročně přitom dochází k 10 milionům nových infekcí a systémové projevy se vyskytují u 5–10 %, z nichž přibližně 1 700 000 ročně umírá<sup>111</sup>. Hlavní důraz je zde kladen na vývoj vakcín, které by mohly zabránit progresi z latentní infekce TBC na aktivní plicní anebo diseminovanou tuberkulózu<sup>112</sup>.

### RSV

RSV podle odhadu WHO způsobuje ročně přibližně 33 milionů závažných infekcí dýchacích cest. To má za následek každoročně více než 3 miliony hospitalizací a téměř 60 000 úmrtí u dětí do 5 let. Téměř polovina těchto epizod se projevuje u dětí mladších 6 měsíců<sup>113</sup>. RSV je hlavní příčinou respiračních onemocnění a úmrtí kojenců, malých dětí a starších osob. Počáteční pokusy o vývoj vakcíny proti RSV na počátku šedesátých let 20. století s použitím inaktivované virové vakcíny nebyly úspěšné. Teprve nedávné porozumění struktuře, funkci a stabilitě povrchového glykoproteinu RSV F by mohlo vést k vývoji účinné vakcíny<sup>114</sup>.

### Malárie

Navzdory značnému pokroku v boji proti malárii zůstává jednou z nejrozšířenějších infekčních chorob na světě, přičemž 50 % světové populace je ohroženo rozvojem této choroby, jejíž úmrtí činí přes 400 000 případů ročně<sup>115</sup>. Starší zdroje uvádějí čísla přes 1 milion<sup>116</sup>. Absence účinné vakcíny a rezistence *Plasmodium malariae* k farmakoterapii jsou neustálou výzvou k vývoji bezpečné vakcíny. I přes to, že byl již ohlášen pokrok na tomto poli, není zaručeno, že půjde o trvalý úspěch<sup>117</sup>.

### HIV

Na světě žije odhadem 38 000 000 lidí nakažených HIV, přičemž 1 700 000 bylo v roce 2018 nově infikovaných a 770 000 ve stejném roce zemřelo v souvislosti s AIDS<sup>118</sup>. Problém v úspěšném vývoji vakcíny spočívá v obtížné tvorbě protilátek proti kritickým konzervovaným, stericky špatně přístupným epitopům povrchového HIV glykoproteinu. Některé poslední výzkumy navrhují vakcínu směřovat proti fúznímu proteinovému trimeru, který je zabudován do virového obalu<sup>119</sup>. Další autoři pak navrhují, že spíše než pokusy o vytvoření vakcíny na

základě strukturní analýzy antigenu mohou uspět empirické zkoušky imunogenity<sup>120)</sup>.

### Zvláštní jevy, které mohou ovlivnit účinky vakcinace

Při vakcinaci může docházet k některým jevům, které výrazně (pozitivně i negativně) ovlivňují možnost, resp. výsledek vakcinace.

Patří sem tzv. **protilátkami zprostředkovaný enhancement** (ADE – antibody-dependent enhancement), který může paradoxně zvýšit susceptibilitu k infekci. Princip se vysvětluje tím, že organismus může být infikován v průběhu času více sérotypy viru. Při prvním kontaktu s infekcí se vytvoří protilátky, které opsonizují daný virus a zprostředkují jeho fagocytózu. Při následném kontaktu příbuzného viru s těmito protilátkami (v tomto případě IgG) však protilátky virus nepoškodí, umožní mu vstup do makrofágů či jiných buněk imunitního systému, kde dojde k jeho zmnožení, a tím i k celkové progresi onemocnění. Tento jev byl pozorován u viru horečky dengue nebo virů Ebola a Zika<sup>121)</sup>.

Dalším, tentokrát pozitivním jevem, je **nespecifické zvýšení imunity** vůči patogenu vlivem předchozí vakcinace vůči odlišnému antigenu. Bylo zdokumentováno, že vakcinace proti TBC zároveň snižuje incidenci respiračních onemocnění u disponovaných jedinců. Předpokládá se, že někteří oslabení mikrobi, v tomto případě BCG, jsou schopné ovlivnit hematopoetické buňky kostní dřene tak, že dojde k robustní imunitní odpovědi po setkání již diferencovaných buněk imunitního systému s odlišným patogenem. Experimentálně byla zvýšená imunitní odpověď po předchozí vakcinaci BCG potvrzena u následné infekce, způsobené oslabeným virem YF<sup>122)</sup>.

### Závěr

Vývoj, výroba, kontrola a klinické hodnocení vakcín dnes zahrnuje mezioborový průnik mezi virology, bakteriologií, imunologií, molekulárními biologií, biotechnologií a farmaceutickými technologiemi. Žádný z těchto oborů nelze opomenout. Tento přehledový článek se z farmaceutického pohledu snaží nabídnout základní a stručný přehled klasických i moderních vakcín, jejich alespoň základní principy a naznačit vybrané způsoby výroby, včetně technologie a složení finálních lékových forem. Chtěl by být studijním doplňkovým materiálem pro studenty farmacie a terénní lékárníky a umožnit jim nahlédnout do komplexnosti dané problematiky. Zároveň se snaží nabídnout adekvátní odkazovanou literaturu k případnému samostudiu.

**Střet zájmů:** žádný.

### Seznam zkratk

ADE	– protilátkami zprostředkovaný enhancement
aP	– subjednotková (acelulární) vakcína proti pertussis
BCG	– bacillus Calmette-Guérin

CTB	– cholerycký subjednotkový toxin B
DT	– difterycký toxoid
DtwP	
(DTaP)	– difterycký a tetanický toxoid spolu se subjednotkovou vakcínou proti pertussis
EP	– urychlovač penetrace
H	– hemaglutinin
HepB	– vakcína proti hepatitidě B
HiB	– virus hepatitidy B
HIV	– virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPV	– lidský papilomavirus
ISCOM	– imunostimulační komplex
IPV	– inaktivovaná vakcína proti poliioviru
KA	– usmrcený antigen
LAV	– živá atenuovaná vakcína
MPs	– polymerní mikročástice
N	– neuramidáza
NPs	– polymerní nanočástice
OMP	– mikročástice obalené membránou
OPV	– orální vakcína proti poliomyelitidě
OV	– perorální vakcíny
PCV	– pneumokokový konjugát
PLV	– perorální rostlinná vakcína
rCTB	– rekombinantní cholerycký subjednotkový toxin B
rHBsAg	– rekombinantní antigen proti hepatitidě B
RSV	– respirační syncytiální virus
RV	– rekombinantní vakcína
SUV	– subjednotková vakcína
SV	– štěpná vakcína
T	– toxoid (anatoxin)
TBC	– tuberkulóza
TCI	– transdermální imunizace
Td	– společná vakcína proti difterii a tetanu
TT	– tetanický toxoid
VLP	– částice podobná viru
VV	– vektorová vakcína
wP	– inaktivovaná vakcína proti pertussis
YF	– žlutá zimnice

### Literatura

1. Vaccine. News Medical Life Sciences. <https://www.news-medical.net/condition/Vaccine> (15. 3. 2020).
2. Lollini P. L., Forni G. Antitumor vaccines: is it possible to prevent a tumor? *Cancer Immunol. Immun.* 2002; 51, 409–416.
3. Stanley A. P., Walter A. O., Paul A. O. Vaccines: Elsevier Health Sciences 2008.
4. Dao Z. History of Chinese martial arts: DeepLogic 1985.
5. Trebichaský I. Lži a mýty o očkování. *Živa* 2016; 3, LIII–LV.
6. Ong E., He Y., Yang Z. Epitope promiscuity and population coverage of Mycobacterium tuberculosis protein antigens in current subunit vaccines under development. *Infect. Genet. Evo.* 2020; 8, 104186.
7. Věda přináší neuvěřitelné množství překvapení. Zdravotnictví a medicína. <https://zdravi.euro.cz/rozhovory/predstavujeme/445824> (27. 8. 2012).
8. Letos se budou proti vzteklině vakcinovat lišky naposled. Tisková zpráva. SVS ČR. [https://www.svs.cz/letos\\_se\\_budou\\_proti\\_vzteklina](https://www.svs.cz/letos_se_budou_proti_vzteklina) (14. 1. 2009).

9. **Goodchild L.** Could dissolvable microneedles replace injected vaccines? *Mater. Today* 2015; 18, 419–420.
10. **Giersing B. K., Vekemans J., Nava S., Kaslow D. C., Moorthy V.** WHO Product development for Vaccines Advisory Committee. *Vaccine* 2019; 50, 7315–7327.
11. **Petrová M.** Očkování v České republice. *Tempus medicorum – Farmakoterapeutické informace. Časopis ČLK* 2015; 3–7.
12. **Cheng D. R., Perrett K. P., Choo S., Danchin M., Buttery J. P., Crawford N. W.** Pediatric anaphylactic adverse events following immunization in Victoria, Australia from 2007 to 2013. *Vaccine* 2015; 33, 1602–1607.
13. **Minor P. D.** Live attenuated vaccines: historical successes and current challenges. *Virology* 2015; 479, 379–392.
14. **Fusek M., Káš J., Ruml T.** *Bioléčiva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT 2008.
15. **Ronald W. E.** *New Vaccine Technologies*. CRC Press 2001.
16. BCG vaccine: WHO position paper. *WER* 2004; 79, 25–40.
17. Introduction of inactivated poliovirus vaccine into oral poliovirus vaccine-using countries. WHO position paper. *WER* 2003; 78, 241–252.
18. Measles vaccines: WHO position paper. *WER* 2009; 35, 349–360.
19. Rotavirus vaccines: an update. *WER* 2009; 84, 533–538.
20. Yellow fever vaccine: WHO position paper. *WER* 2003; 78, 349–360.
21. Inactivated whole-cell (killed antigen) vaccines: types of vaccines and adverse reactions. WHO. <https://vaccine-safety-training.org/inactivated-whole-cell-vaccines.html> (15. 6. 2020).
22. **Stauffer F., El-Bacha T., Da Poian A. T.** Advances in the development of inactivated virus vaccines. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 2006; 291–296.
23. **Piet M. P., Chin S., Prince A. M., Brotman B., Cundell A. M., Horowitz B.** The use of tri(N-butyl)phosphate detergent mixtures to inactivate hepatitis viruses and human immunodeficiency virus in plasma and plasma's subsequent fractionation. *Transfusion* 1990; 30, 591–598.
24. **Danihelkova H., Zavadova H.** Disruption of influenza virus A by diethyl ether-Tween and tri-N-butyl phosphate-Tween mixtures. *Acta Virol.* 1984; 28, 26–32.
25. **Gao X., Zhao D., Zhou P., Zhang L., Li M., Li W., Zhang Y., Wang Y., Liu X.** Characterization, pathogenicity and protective efficacy of a cell culture-derived porcine deltacoronavirus. *Virus research* 2020; 2, 197955.
26. Pertussis vaccine: WHO position paper. *WER* 2005; 80, 29–40.
27. Introduction of inactivated poliovirus vaccine into oral poliovirus vaccine-using countries. *WER* 2003; 78, 241–252.
28. **Palache A. M., Brands R., Scharrenburg G. V.** Immunogenicity and reactogenicity of influenza subunit vaccines produced in MDCK cells or fertilized chicken eggs. *J. Infect. Dis.* 1997; 176 (Suppl 1), S20–S23.
29. **Möller J., Kraner M. E., Burkovski A.** Proteomics of Bordetella pertussis whole-cell and acellular vaccines. *BMC Res. Notes* 2019; 12, 329.
30. Hepatitis B vaccines: WHO position paper. *WER* 2009; 84, 405–420.
31. **de Greeff S. C., Sanders E. A., de Melker H. E., van der Ende A., Vermeer P. E., Schouls L. M.** Two pneumococcal vaccines: the 7-valent conjugate vaccine (Prevenar) for children up to the age of 5 years and the 23-valent polysaccharide vaccine (Pneumo 23) for the elderly and specific groups at risk. *NTvG* 2007; 151, 1454.
32. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines: WHO position paper. *WER* 2006; 81, 445–452.
33. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization: WHO position paper. *WER* 2007; 82, 93–104.
34. **van de Witte S. V., Nauta J., Giezeman-Smits K. M., de Voogd J. M.** Trivalent inactivated subunit influenza vaccine Influvac®: 30-year experience of safety and immunogenicity. *Trials Vaccinol.* 2012; 1, 42–48.
35. **Beran J., Havlík J.** *Chřipka. Klinický obraz, prevence, léčba, 2. rozšířené vydání*. Praha: Maxdorf 2005.
36. **Even-Or O., Avniel-Polak, S., Barenholz Y., Nussbaum G.** The cationic liposome CCS/C adjuvant induces immunity to influenza independently of the adaptor protein MyD88. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2020; 1–9.
37. **Spila-Alegiani S., Salmaso S., Rota M. C., Tozzi A. E., Raschetti R.** Reactogenicity in the elderly of nine commercial influenza vaccines: results from the Italian SVEVA study. *Vaccine* 1999; 17, 1898–1904.
38. **Broder K. R., Cortese M. M., Iskander J. K., Kretsinger K., Slade B. A., Brown K. H., Mijalski C. M., Tiwari T, Weston E. J., Cohn A. C., Srivastava P. U.** Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adolescents; use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2006; 55, PR3.
39. **Jones R. G., Liu, Y., Rigsby P., Sesardic D.** An improved method for development of toxoid vaccines and antitoxins. *J Immunol. Methods* 2008; 337, 42–48.
40. **Sato R., Fintan B.** Effect of cash incentives on tetanus toxoid vaccination among rural Nigerian women: a randomized controlled trial. *Hum. Vaccin Immunother.* 2020; 16, 1181–1188.
41. Tetanus vaccine: WHO position paper. *WER* 2006; 81, 197–208.
42. Diphtheria vaccine: WHO position paper. *WER* 2006; 81, 21–32.
43. **Patzer E. J., Nakamura G. R., Hershberg R. D., Gregory T. J., Crowley C, Levinson A. D., Eichberg J. W.** Cell culture derived recombinant HBsAg is highly immunogenic and protects chimpanzees from infection with hepatitis B virus. *Bio/technology* 1986; 7, 630–636.
44. **Zhao Q., Wanga Y, Freedb D., Fub T. M., Gimenez J. A., Sitri-na R. D., Washabaugh M. W.** Maturation of recombinant hepatitis B virus surface antigen particles. *Hum. Vacc.* 2006; 4, 174–180.
45. **Kazi A, Ismail C. M., Amilda A. A., Chuah C, Leow C. H., Lim B. H., Singh K. K., Leow C. Y.** Designing and evaluation of an antibody-targeted chimeric recombinant vaccine encoding Shigella flexneri outer membrane antigens. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 7, 104176.
46. **Hernández-Bernal F., Aguilar-Betancourt A., Aljovin V., Arias G., Valenzuela C., Perez de Alejo K., Hernández K., Oquendo O., Figueredo N., Figueroa N., Musacchio A.** Comparison of four recombinant hepatitis B vaccines applied on an accelerated schedule in healthy adults. *Human Vacc.* 2011; 10, 1026–1036.
47. **Cutts F. T., Franceschi S., Goldie S., Castellsague X. D., De Sanjose S., Garnett G., Markowitz, L.** Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bull. World Health. Organ.* 2007; 85, 719–726.
48. **Josefsberg J. O., Buckland B.** Vaccine process technology. *Bio-technol. Bioeng.* 2012; 109, 1443–1460.
49. **Li Y., Cao H., Dao, N., Luo Z., Yu H., Chen Y., Chen, X.** High-throughput neuraminidase substrate specificity study of human and avian influenza A viruses. *Virology* 2011; 415, 12–19.

50. Ura T., Okuda K., Shimada M. Developments in viral vector-based vaccines. *Vaccines* 2014; 3, 624–641.
51. Sutter G., Staib C. Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2003; 3, 263–271.
52. Shanmugaraj B., Priya L. B., Mahalakshmi B., Subbiah S., Hu, R. M., Velmurugan B. K., Baskaran, R. Bacterial and viral vectors as vaccine delivery vehicles for breast cancer therapy. *Life Sci.* 2020; 117550.
53. Srivastava I. K., Liu M. A. Gene vaccines. *Ann. Intern. Med.* 2003; 138, 550–559.
54. van Rompay K. K., Keesler R. I., Ardeshir A., Watanabe J., Usachenko J., Singapuri A., Cruzen C., Bliss-Moreau E., Murphy A. M., Yee J.L., Webster H. DNA vaccination before conception protects Zika virus-exposed pregnant macaques against prolonged viremia and improves fetal outcomes. *Sci. Transl. Med.* 2019; 18, 523.
55. Felber B. K., Pavlakis G. N. HIV vaccine: better to start together? *The Lancet HIV* 2019; 11, e724–725.
56. Gaudinski M. R., Houser K. V., Morabito K. M., Hu Z., Yamshchikov G., Rothwell R. S., Berkowitz N., Mendoza F., Saunders J. G., Novik L., Hendel C. S. Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. *Lancet* 2018; 391, 552–562.
57. Salyaev R. K., Rekoslavskaya N. I. Plant-Based Peroral Vaccines. In *Multifunctional Systems for Combined Delivery. Biosensing and Diagnostics* 2017; 1, 193–210.
58. Streatfield S. J., Howard J. A. Plant-based vaccines. *Int. J. Parasitol. Parasites* 2003; 33, 479–493.
59. Chan H. T., Daniell H. Plant-made oral vaccines against human infectious diseases – are we there yet? *Plant Biotechnol. J.* 2015; 13, 1056–1070.
60. Takeyama N., Kiyono H., Yuki Y. Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials. *Ther. Adv. Vaccines* 2015; 3, 139–154.
61. Mak T. W., Saunders M. E., Jett B. D. Primer to the immune response: Academic Cell 2014.
62. Chackerian B. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 2007; 6, 381–390.
63. Fuenmayor J., Gödia F., Cervera L. Production of virus-like particles for vaccines. *New biotech.* 2017; 39, 174–180.
64. Roldao A, Silva A. C., Mellado M. C., Alves P. M., Carrondo M. J. Viruses and virus-like particles in biotechnology: fundamentals and applications. *Comprehensive biotechnology* 2017; 1, 633–656.
65. Ludwig C., Wagner R. Virus-like particles – universal molecular toolboxes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007; 18, 537–545.
66. Skwarczynski M., Toth I. Micro-and nanotechnology in vaccine development: William Andrew 2016.
67. Cook I. F. Evidence based route of administration of vaccines. *Hum. Vacc.* 2008; 4, 67–73.
68. Sheets R. L. Opinion on adventitious agents testing for vaccines: Why do we worry so much about adventitious agents in vaccines? *Vaccine* 2013; 31, 2791–2795.
69. Thomassen Y. E., van Sprang E. N., van der Pol L. A., Bakker W. A. Multivariate data analysis on historical IPV production data for better process understanding and future improvements. *Bio-technology and bioeng* 2010; 107, 96–104.
70. Aiyer-Harini P, Ashok-Kumar H. G., Kumar G. P., Shivakumar N. An overview of immunologic adjuvants. *J. Vaccines Vacci.* 2013; 4, 1000167.
71. Goto N., Kato H., Maeyama J. I., Eto K, Yoshihara S. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine* 1993; 11, 914–918.
72. HogenEsch H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine* 2002; 31, 34–39.
73. Petrovsky N., Cooper P. D. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2011; 10, 523–537.
74. Kino Y. Vaccine excipients. *Nihon. Rinsho.* 2008; 66, 1933–1937.
75. Excipients in vaccines per 0.5 mL dose. IVS. John Hopkins Bluumberg School and Public. <http://www.vaccinesafety.edu/components-Excipients.htm> (15. 6. 2002).
76. Wiedermann-Schmidt U., Maurer W. Relevance of additives and adjuvants in vaccines for allergic and toxic side effects. *Wien. Klin. Wochenschr.* 2005; 117, 510–519.
77. Prausnitz M. R., Langer R. Transdermal drug delivery. *Nature biotech.* 2008; 26, 1261.
78. Toyoda M., Hama S, Ikeda Y, Nagasaki Y, Kogure K. Anti-cancer vaccination by transdermal delivery of antigen peptide-loaded nanogels via iontophoresis. *Int. J. Pharm.* 2015; 10, 110–114.
79. Quinn H. L., Kearney M. C., Courtenay A. J., McCrudden M. T., Donnelly R. F. The role of microneedles for drug and vaccine delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2014; 11, 1769–1780.
80. Mishra D., Dubey V., Asthana A., Saraf D. K., Jain N. K. Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against Hepatitis B. *Vaccine* 2006; 24, 4847–4855.
81. Gogoll K., Stein P., Lee K. D., Arnold P., Peters T., Schild H., Radsak M., Langguth P. Solid nanoemulsion as antigen and immunopotentiator carrier for transcutaneous immunization. *Cell. Immunol.* 2016; 308, 35–43.
82. Mahor S., Rawat A., Dubey P. K., Gupta P. N., Khatri K., Goyal A. K. Cationic Transfersomes based topical genetic vaccine against hepatitis B. *Int. J. Pharm.* 2007; 340: 13–19.
83. Pielenhofer J., Sohl J., Windbergs M., Langguth P., Radsak M. P. Current progress in particle-based systems for transdermal vaccine delivery. *Front. Immunol.* 2020; 11, 266.
84. Nemes E., Geldenhuys H., Rozot V., Rutkowski K. T., Ratanjee F., Bilek N., Mabwe S., Makhetha L., Erasmus M., Toefy A., Mulenga H. Prevention of M. tuberculosis infection with H4: IC31 vaccine or BCG revaccination. *N. Engl. J. Med.* 2018; 379,138–149.
85. Bragazzi N. L, Orsi A., Ansaldi F., Gasparini R., Icardi G. Flu-zone® intra-dermal (Intanza®/Istivac® Intra-dermal): An updated overview. *Hum. Vaccin Immunother.* 2016; 12, 2616–2627.
86. Partidos C. D. Intranasal vaccines: forthcoming challenges. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2000; 8, 273–281.
87. Davis S. S. Nasal vaccines. *Adv. Drug Deliv.* 2001; 51, 21–42.
88. Heurtaut B., Frisch B., Pons F. Liposomes as delivery systems for nasal vaccination: strategies and outcomes. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010; 7, 829–844.
89. Partidos C. D. Intranasal vaccines: forthcoming challenges. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2000; 8, 273–2781.
90. Hu K. F., Lövgren-Bengtsson K., Morein B. Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 51, 149–159.

91. **Slütter B., Bal S., Keijzer C., Mallants R., Hagenaars N., Que I., Kaijzel E., van Eden W., Augustijns P., Löwik C., Bouwstra J.** Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen. *Vaccine* 2010; 38, 6282–6291.
92. Vaccines licensed for use in the United States, FDA. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/vaccines-licensed-use-united-states> (15. 6. 2020).
93. **Wright A. E.** Notes on the treatment of furunculosis, sycosis, and acne by the inoculation of a staphylococcus vaccine: and generally on the treatment of localised bacterial invasions by therapeutic inoculations of the corresponding bacterial vaccines. *Lancet* 1902; 159: 874–884.
94. **Bakker W. A., Thomassen Y. E., van't Oever A. G., Westdijk J., van Oijen M. G., Sundermann L. C., van't Veld P., Sleeman E., van Nimwegen F. W., Hamidi A., Kersten G. F.** Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV. *Vaccine* 2011; 41, 7188–7196.
95. **Ramirez J. E., Sharpe L. A., Peppas N. A.** Current state and challenges in developing oral vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017; 114, 116–131.
96. **Arora R.** Advances in niosome as a drug carrier: a review. *Asian J. Pharm.* 2016; 9, 29–39.
97. **Gould-Fogerite S., Mannino R. J.** Mucosal and systemic immunization using cochleate and liposome vaccines. *J. Liposome Res.* 1996; 2, 357–379.
98. **Jain S., Khomane K. K., Jain A., Dani P.** Nanocarriers for transmucosal vaccine delivery. *Curr. Nanosci.* 2011; 7, 160–177.
99. **Ramirez J. E., Sharpe L. A., Peppas N. A.** Current state and challenges in developing oral vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017; 15, 116–131.
100. **Narasimhan B., Goodman J. T., Vela Ramirez J. E.** Rational design of targeted next-generation carriers for drug and vaccine delivery. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2016; 18, 25–49.
101. **Zhu Q., Talton J., Zhang G., Cunningham T., Wang Z., Waters R. C., Kirk J, Eppler B., Klinman D. M., Sui Y, Gagnon S.** Large intestine-targeted, nanoparticle-releasing oral vaccine to control genitoretal viral infection. *Nature Med.* 2012; 18,1291–1296.
102. **Marco I., Feyerabend F., Willumeit-Römer R., vVan der Biest O.** Degradation testing of Mg alloys in Dulbecco's modified eagle medium: Influence of medium sterilization. *Mater. Sci. Eng. C.* 2016; 62, 68–78.
103. **Vogel F. R., Powell M. F.** A compendium of vaccine adjuvants and excipients. *Vaccine Design.* Boston, MA: Springer 1995.
104. **Rhee J. H.** Current and New Approaches for Mucosal Vaccine Delivery. In *Mucosal Vaccines.* Academic Press 2020.
105. **Mort M., Baleta A., Destefano F.** Vaccine safety basics learning manual. WHO Press, Switzerland 2013.
106. Výroba léčivých přípravků biologického původu. Doplněk 2. SÚKL 2003. <http://www.sukl.cz/leciva/doplnek-2>
107. **Mascola J. R., Fauci A. S.** Novel vaccine technologies for the 21<sup>st</sup> century. *Nat. Rev. Immunol.* 2020; 2, 87–88.
108. **Paules C. I., Sullivan S. G., Subbarao K., Fauci A. S.** Chasing seasonal influenza – the need for a universal influenza vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2018; 378, 7–9.
109. **Hewajuli D. A., Dharmayanti N. I.** Efficacy, mechanism and antiviral resistance of neuraminidase inhibitors and adamantane against avian influenza. *ICARD* 2019; 29, 61–74.
110. **Andrews, S. F., Graham, B. S., Mascola, J. R., McDermott, A. B.** Is it possible to develop a “universal” influenza virus vaccine? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2018; 10, a029413.
111. **Bloom, B. R.** New promise for vaccines against tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 2018; 379, 1672–1674.
112. **Gursel M., Gursel I.** Is global BCG vaccination coverage relevant to the progression of SARS-CoV-2 pandemic? *Med. Hypotheses* 2020; 6, 109707.
113. **Bohmwald K., Espinoza J. A., Pulgar R. A., Jara E. L., Kalergis A. M.** Functional impairment of mononuclear phagocyte system by the human respiratory syncytial virus. *Front. Immunol.* 2017; 27, 1643.
114. **Crank M. C., Ruckwardt T. J., Chen M., Morabito K. M., Phung E., Costner P. J., Holman L. A., Hickman S. P., Berkowitz N. M., Gordon I. J., Yamshchikov G. V.** A proof of concept for structure-based vaccine design targeting RSV in humans. *Science* 2019; 6452, 505–509.
115. Malaria, Key facts. WHO 14. January 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
116. New estimates of malaria deaths: concern and opportunity. *Lancet* 201; 9814, 385.
117. **Thera M. A., Plowe C. V.** Vaccines for malaria: how close are we? *Annu. Rev. Med.* 2012; 63, 345–357.
118. Global HIV & AIDS statistics - 2019 fact sheet, UNADIS. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet> (15. 6. 2009).
119. **Phillips M. A., Goldberg D. E.** Toward a chemical vaccine for malaria. *Science* 2018; 6419, 1112–1118.
120. **van Regenmortel M. H.** HIV/AIDS: Immunochemistry, Reductionism and Vaccine Design: A review of 20 years of research: Springer Nature 2019.
121. **Eroshenko N., Gill T., Keaveney M. K., Church G. M., Trevejo J. M., Rajaniemi H.** Implications of antibody-dependent enhancement of infection for SARS-CoV-2 countermeasures. *Nature Biotech.* 2020; 38, 789–791.
122. **Gursel M., Gursel M.** Is global BCG vaccination-induced trained immunity relevant to the progression of SARS-CoV-2 pandemic? *Allergy* 2020; 7, 1815–1819.



# Kolagen v kombinaci s kyselou formou karboxymethylcelulosity v podobě netkané textilie jako moderní krycí prostředek pro terapii ran – formulace, příprava a hodnocení

## Collagen in combination with the acid form of carboxymethylcellulose in the form of a nonwoven textile as a modern wound dressing – formulation, preparation and evaluation

Kateřina Tenorová • Ruta Masteiková • Jana Jarábková • David Vetchý • Jurga Bernatoniene

Došlo 31. července 2020 / Přijato 25. srpna 2020

### Souhrn

Kyselá forma karboxymethylcelulosity (HCMC) je oproti její sodné soli (NaCMC) méně známá. Je však běžně využívána jako sorbent pro chromatografické kolony a má řadu cenných vlastností pro uplatnění v péči o rány. Jako krytí ve formě hydrokoloidních vláken je již komerčně dostupná na našem trhu. Své nezastupitelné místo v léčbě ran má i kolagen, nejhojněji zastoupený protein lidského těla, plní v organismu jak stavební, tak i fyziologickou funkci. Je důležitý v procesu hojení ran a v terapii ran je využíván v různých formách. Má i velmi dobré filmotvorné vlastnosti, avšak samotné kolagenové filmy mají slabší mechanickou odolnost, což by pro případnou aplikaci na ránu nebylo vyhovující. Proto je snaha kolagen kombinovat s jinými materiály za účelem zajištění lepších mechanických a aplikačních vlastností i ve vlhkém stavu. Cílem tohoto experimentu bylo vytvořit krycí prostředek na rány, a to kombinací kolagenového filmu s HCMC ve formě netkané textilie. Vzniklé krytí mělo vyhovující organoleptické, fyzikálně-chemické (pH, nasákavost) a aplikační vlastnosti pro uplatnění v terapii ran. Textilní HCMC tvořila mechanickou oporu pro kolagen, čímž umožnila jeho úsporu

při přípravě krytí a částečně sloužila i jako absorpční vrstva.

**Klíčová slova:** krytí na rány • kolagen • kyselá forma karboxymethylcelulosity • hydrokoloidní vlákna • filmy • terapie ran

### Summary

The acid form of carboxymethylcellulose (HCMC) is less known than its sodium salt (NaCMC). However, it is commonly used as a sorbent for chromatographic columns and has a number of valuable properties for its use in wound care. As a wound dressing in the form of hydrofibers, it is already commercially available on our market. Collagen, the most abundant protein in the human body, fulfils both a building and a physiological function in the body, also has an irreplaceable place in the treatment of wounds. It is important in the process of wound healing and is used in wound therapy in various forms. It exhibits very good film-forming properties as well, but the collagen-based films themselves have weaker mechanical resistance, which limits their successful application to a wound. Therefore, the effort is to combine collagen with other materials in order to ensure better mechanical and application properties even in the wet state. The aim of this experiment was to create a wound dressing by combining a collagen film with HCMC in the form of a nonwoven textile. The resulting dressing had satisfactory organoleptic, physicochemical (pH, absorbency) and application properties for its use in wound therapy. The textile HCMC formed a mechanical support for collagen, which enabled its saving during the dressing preparation and partly served as an absorbent layer.

**Key words:** wound dressing • collagen • acid form of carboxymethylcellulose • hydrofibers • films • wound therapy

PharmDr. Kateřina Tenorová (✉) • R. Masteiková • J. Jarábková • D. Vetchý

Masarykova univerzita, Farmaceutická fakulta

Ústav farmaceutické technologie

Palackého třída 1946/1, 612 00 Brno

e-mail: K.Tenorova@seznam.cz

J. Bernatoniene

Akademie medicíny, Litevská univerzita zdravotnických věd

Farmaceutická fakulta, Katedra technologie léků a sociální farmacie

Kaunas, Litva

## Úvod

Fakt, že moderní krycí prostředky na rány jsou založeny na tzv. principu vlhkého hojení, je všeobecně známý<sup>1, 2)</sup>. Udržení vlhkého prostředí v ráně podporuje její správnou regeneraci a urychluje tím proces hojení<sup>3–5)</sup>. Požadavky na moderní krycí prostředky však nejsou jen udržení vlhkého prostředí v ráně, ale jedná se o komplexní záležitost. Ideální krytí by mělo zároveň poskytovat optimální pH i teplotu pro správné hojení rány, být schopné absorbovat nadměrné množství exsudátu, zvyšovat epidermální migraci, podporovat angiogenezi i syntézu pojivové tkáně, umožnit proudění plynů mezi ránou a okolním prostředím, poskytovat mechanickou ochranu i bariéru proti bakteriální infekci, nepřilnout na ránu a být snadno odstranitelné, být sterilní, netoxické a nealergenní, umožnit sledování rány, být přizpůsobivé a lehce tvarovatelné, snížit potřebu výměny krytí a prodloužit časový interval aplikace, být snadno dostupné ve zdravotnických zařízeních v požadovaném množství a různých velikostech, a v neposlední řadě být také nákladově efektivní<sup>3, 4, 6–9)</sup>. K výrobě moderních krycích prostředků jsou využívány jak syntetické, tak i přírodní materiály, které se v současné době dostávají do popředí ve všech odvětvích, včetně oblasti péče o rány a jsou předmětem mnoha výzkumů a studií<sup>7, 10–12)</sup>. Právě přírodní materiály a jejich deriváty vykazují příznivé vlastnosti pro hojení ran vzhledem k jejich biokompatibilitě, podobnosti s extracelulární maticí (ECM) či nižší pravděpodobností výskytu imunologických reakcí, jako je tomu v případě materiálů syntetických<sup>10, 13, 14)</sup>. Další výhodou je jejich biodegradovatelnost a ekologičnost, na což je v dnešní době upírána čím dál větší pozornost. Snahou je využívat pro tyto účely i odpadní materiály vznikající při zpracování různých známých surovin přírodního původu<sup>15, 16)</sup>. Již běžně jsou v klinické péči o rány využívány krycí prostředky na bázi alginátů<sup>17)</sup>, chitosanu<sup>18)</sup>, kolagenu<sup>19)</sup> a celulosových derivátů<sup>20)</sup>. Zkoumány jsou však i další látky s potenciálním uplatněním pro terapii ran, a to například sericin<sup>21)</sup>, hedvábný fibroin<sup>22)</sup> a mnoho dalších. Zároveň je však tendence stávající materiály modifikovat a kombinovat – ať už navzájem, nebo i se syntetickými polymery s cílem vyvinout nové prostředky na rány, které by se svými vlastnostmi blížily výše popsanému ideálnímu krytí<sup>10)</sup>.

**Celulosa** a především její deriváty nabízejí řadu cenných vlastností uplatnitelných právě pro ošetřování ran<sup>23)</sup>. Používá se jak přírodní celulosa (bavlna), regenerovaná celulosa (viskóza), tak i dva celulosové deriváty, a to oxidovaná celulosa (oxycelulosa) a karboxymethylcelulosa<sup>20)</sup>.

**Karboxymethylcelulosa (CMC)** je etherový derivát celulosy se širokou škálou uplatnění<sup>24)</sup>. Je hojně využívána jako emulgátor, stabilizátor, zahušťovadlo, protispékavá a gelotvorná látka v širokém spektru odvětví, jako jsou medicína, farmaceutický, kosmetický, textilní, potravinářský, chemický, ropný, keramický i papírenský průmysl<sup>25, 26)</sup>. V medicíně a farmacii se uplatňuje zejména jako gelotvorná látka; je používána např. do očních kapek vzhledem ke svým viskoelastickým a mukoadhezivním vlastnostem. Ve farmaceutické technologii slou-

ží jako pojivo a rozvolňovadlo (kroskarmelosa) v tabletách či jako látka zvyšující viskozitu využívaná pro stabilizaci suspenzí a emulzí<sup>27, 28)</sup>. V neposlední řadě je i významným materiálem v krycích prostředcích na rány<sup>29)</sup>, kde může být využita v různých typech krytí – ať už se jedná o hydrokoloidy, hydrokoloidní vlákna, či hydrogely<sup>20)</sup>. Usušením koloidních roztoků je možné připravit z CMC i krytí filmová, která zatím na trhu dostupná nejsou a jedná se zejména o experimentální práce na toto téma<sup>30, 31)</sup>. Karboxymethylcelulosa je využívána nejčastěji ve formě své sodné soli (NaCMC), existuje i jako sůl vápenatá (CaCMC) a jako kyselá forma (HCMC), která je však méně známá<sup>20, 32)</sup>. HCMC se běžně používá jako sorbent pro chromatografické kolony. Zajímavostí je, že má vhodné vlastnosti pro uplatnění v péči o rány a jako krytí HCel<sup>®</sup> HT je již dostupná na našem trhu. Typově se jedná o hydrokoloidní vlákna, avšak od těch klasických (NaCMC) se liší tím, že bobtnají postupně, jak dochází v ráně k výměně iontů (přechod HCMC v NaCMC). Jedná se o pH modulující krytí, eliminující působení některých bakterií. Výhodou je nedráždivost a samozřejmě zlepšení a urychlení hojení. Ačkoliv jsou klasická hydrokoloidní vlákna určena primárně pro silně až středně secernující rány, HCel<sup>®</sup> HT je vhodný i pro slabě exsudující rány v kombinaci s navlhčením fyziologickým roztokem<sup>20)</sup>.

Dalším významným biopolymerem nacházejícím uplatnění v potravinářství, medicíně, kosmetice, farmacii i tkáňovém inženýrství je **kolagen**<sup>33, 34)</sup>. Kolagen má řadu výhodných vlastností z hlediska jeho možného využití pro terapii ran – ať už se jedná o jeho nízkou cytotoxicitu, antigenicitu, dráždivost a především dobrou kompatibilitu s lidským organismem<sup>35, 36)</sup>. Jako hlavní strukturální protein pojivových tkání (kostí, vazy, šlachy, chrupavky, rohovky či cévní stěny) plní v lidském těle převážně mechanickou funkci, důležitou roli však zastává i v pokožce a tkáních, kde plní fyziologickou úlohu v procesu hojení ran a reparace tkání<sup>36, 37)</sup>. Molekula kolagenu je tvořena třemi polypeptidovými řetězci, jež jsou uspořádané do spirálovité (helikální) struktury, tzv. superšroubovice. Každý řetězec je tvořen tisíci aminokyselinami se základní sekvencí glycin-X-Y, kdy pozice X a Y obsahují ze všech aminokyselin nejčastěji prolin nebo hydroxyprolin<sup>37, 38)</sup>. V lidském těle existuje až 29 typů kolagenu; nejčastěji zastoupenými jsou kolageny typu I, III, IV, V a VII, z nichž typ I a III hraje zásadní roli v procesu hojení ran<sup>36, 38, 39)</sup>. Uměle dodaný kolagen v krycích prostředcích na rány na bázi kolagenu slouží jako obětní substrát pro enzymy (matricové metaloproteinázy, MMPs), kterých je u chronických ran nadbytek a degradují nově vznikající kolagen v zánětlivé fázi hojení rány<sup>19, 39, 40)</sup>. Ten může být do rány dodán v různých formách – ať už se jedná o gel, prášek či krytí ve formě polštářku<sup>39)</sup>. Kolagen má však i velmi dobré filmotvorné vlastnosti, jichž je využíváno především v potravinářském průmyslu<sup>41)</sup>. V terapii ran prozatím kolagenové filmy využití nenacházejí, neboť vzniklé kolagenové filmy mají slabé mechanické vlastnosti, což je z hlediska případné aplikace na ránu nevyhovující. Je však snaha

kolagen různě modifikovat např. zesíťováním, popřípadě ho kombinovat s dalšími materiály s cílem zlepšení jeho mechanických vlastností<sup>11, 41, 42</sup>).

Vzhledem k výše popsáným skutečnostem se nabízí možnost kombinace kolagenu v podobě filmu s textilní HCMC, která je sama o sobě osvědčeným krycím prostředkem s dobrými absorpčními vlastnostmi, s cílem zlepšit mechanické vlastnosti výsledného krytí a zajistit optimální aplikační vlastnosti na ránu, a to i ve vlhkém stavu, což bylo i předmětem našeho experimentu.

## Pokusná část

### Materiál

Pro přípravu kolagenového krytí na rány kombinovaného s textilní podobou kyselé formy karboxymethylcelulosity (HCMC) byly použity dva druhy kolagenu ve formě gelu, a to koňský a prasečí kolagen, oba původem ze šlach, dodané firmou Collado, s.r.o., Brno, Česká republika. Kyselou formu karboxymethylcelulosity ve formě netkané textilie se stupněm substituce (DS) 0,378 dodala firma Holzbecher Medical, s. r. o. barevna a bělidlo Zlích, Česká Skalice, Česká republika. Použitá změkčovadla – glycerol 85% a makrogol 300, stejně jako další pomocná látka – ethanol 96%, byly dodány firmou Fagron a.s., Olomouc, Česká republika. K testování připravených krycích prostředků na rány posloužil lékopisný (ČL 2017) fyziologický tlumivý roztok o pH 7,2 (FTR 7,2), k jehož přípravě byly použity běžně komerčně dostupné suroviny lékopisné kvality. Čištěná voda lékopisné kvality byla připravena pomocí přístroje Rodem 4.

## Metodika

### Stanovení koncentrace kolagenového gelu

Výchozí surovinou byl koňský a prasečí kolagen, dodané ve formě viskózního gelu neznámé koncentrace. Ke

stanovení sušiny (% obsahu) kolagenu v gelu byl použit halogenový analyzátor vlhkosti (Excellence Plus HX 204, Mettler Toledo, Švýcarsko), kde sušení probíhalo za následujících podmínek: standardní program sušení, teplota sušení 105 °C, kritérium pro vypnutí 1 mg/50 s. Kolagenový gel byl nejprve řádně zhomogenizován, poté bylo odebráno množství cca 1 g, které bylo umístěno na vytárouvanou váhu analyzátoru a bylo spuštěno měření. Výstupem byla hodnota % MC (moisture content), z níž byl odečtením od 100 zjištěn obsah kolagenové sušiny, čili % koncentrace kolagenu v gelu. Pro oba dva kolageny byla sušina stanovena celkem 6krát a ze získaných hodnot byl vypočten aritmetický průměr.

### Příprava krycích prostředků z kolagenu a HCMC

Připravované krytí na rány bylo tvořeno kolagenovým filmem v první vrstvě, na nějž byla přiložena vrstva druhá, kterou tvořila kyselá forma karboxymethylcelulosity (HCMC) ve formě netkané textilie. Krytí bylo připraveno metodou odpaření rozpouštědla a jednotlivé vzorky se lišily druhem použitého kolagenu (koňský nebo bovinní) a typem použitého změkčovadla (glycerol 85% a makrogol 300) a jeho poměrem vůči kolagenu (1 : 1; 1 : 1,5; 1 : 2). Množství použitého kolagenu bylo u všech vzorků stejné (3 mg/cm<sup>2</sup>) a vycházelo z našich předchozích zkušeností. Disperze kolagenu byla odlévána na hranaté polystyrenové Petriho misky o rozměrech 12 × 12 cm, na něž byla přiložena textilní HCMC jako svrchní vrstva. Připravované a testované vzorky včetně jejich složení jsou uvedeny v tabulce 1.

Vlastní příprava krytí probíhala tak, že byla nejprve vytvořena 1% disperze kolagenu s daným poměrem změkčovadla a předem stanoveným potřebným množstvím ethanolu 96%, která byla zhomogenizována na přístroji Cito-Unguator 2000 (Sophis a.s., Česká republika) s využitím programu „Emulze“. Ta byla následně vylita na Petriho misky a na povrch byla umístěna textilní

Tab. 1. Označení a složení jednotlivých vzorků

Označení vzorku	Druh kolagenu	Změkčovadlo	Poměr kolagen : změkčovadlo
P-G-1	prasečí	glycerol 85%	1 : 1
P-G-1,5	prasečí	glycerol 85%	1 : 1,5
P-G-2	prasečí	glycerol 85%	1 : 2
P-M-1	prasečí	makrogol 300	1 : 1
P-M-1,5	prasečí	makrogol 300	1 : 1,5
P-M-2	prasečí	makrogol 300	1 : 2
K-G-1	koňský	glycerol 85%	1 : 1
K-G-1,5	koňský	glycerol 85%	1 : 1,5
K-G-2	koňský	glycerol 85%	1 : 2
K-M-1	koňský	makrogol 300	1 : 1
K-M-1,5	koňský	makrogol 300	1 : 1,5
K-M-2	koňský	makrogol 300	1 : 2
textilní HCMC	–	–	–

HCMC tak, aby respektovala tvar misky a byla rovnoměrně rozložena na kolagenové vrstvě. Sušení poté probíhalo při teplotě místnosti. Důkladně usušené vzorky byly organolepticky hodnoceny a následně uchovávány ve vzduchotěsných obalech.

### Hodnocení připravených krytí na rány

#### Organoleptické a mikroskopické hodnocení

Organoleptické hodnocení připravených krytí bylo prováděno během celé jejich přípravy. Kontrolována byla odlévání disperze kolagenu, a to především její homogenita a možná přítomnost bublinek. Hotové a dostatečně usušené vzorky byly hodnoceny z hlediska jejich vzhledu, pevnosti, změny tvaru a schopnosti manipulace s nimi, a to jak v suchém, tak i ve vlhkém stavu. Mikroskopické hodnocení bylo provedené na optickém mikroskopu (SMZ 1500, Nikon, Japonsko), kde byly pořízeny fotografie krytí za pomoci softwaru Elements (Nikon, Japonsko).

#### Měření tloušťky

Tloušťka byla měřena s využitím digitálního tloušťkoměru Elcometer 456 (Gamin, Česká republika). Každé připravené krytí (3 ks od každého typu) bylo umístěno na nerezovou desku a sondou tloušťkoměru bylo naměřeno celkem 27 hodnot tloušťky (3 × 9) na různých místech krytí. Z naměřených hodnot byla spočítána průměrná tloušťka a směrodatná odchylka.

#### Hmotnostní stejnoměrnost

Jelikož ČL 2017 nedefinuje podmínky pro hodnocení krycích prostředků na rány včetně hodnocení jejich hmotnostní stejnoměrnosti, byla pro naše účely použita lékopisná zkouška uvedená v ČL 2017 v kapitole 2.9.5. Hmotnostní stejnoměrnost pevných jednodávkových lékových forem. Od každého typu krytí bylo vybráno 20 náhodných vzorků (vystřížené čtverečky o rozměrech 25 × 25 mm), které byly zváženy na analytických vahách. Z těchto hodnot byl následně spočítán aritmetický průměr a hranice maximální a minimální povolené odchylky, která činí pro tablety v rozmezí hmotnosti 80–250 mg 7,5 %. Dle ČL 2017 se mohou nejvýše dvě hmotnosti lišit od povolené odchylky, přičemž žádná se nesmí lišit o více než její dvojnásobek<sup>43</sup>.

#### Stanovení stupně nasákavosti (bobtnavosti) krytí

Hodnocení schopnosti krytí bobtnat, a pohlcovat tak exsudát z rány, bylo provedeno jako stanovení stupně nasákavosti  $S_n$ . K tomu byl použit umělý model rány, jehož cílem je imitovat exsudující ránu a byl využíván již v našich předchozích experimentech<sup>44</sup>. Je tvořený Petriho miskou s průměrem dna 10 cm, v níž je umístěna savá houbička po celé její ploše směřující svým hrubým povrchem nahoru, což má za cíl napodobit nerovnoměrný povrch rány. Houbička v misce je zalita 20 ml média – FTR 7,2 a zakryta víčkem, aby nedocházelo k odpařování média. Vzorek o rozměrech 2,5 × 2,5 cm byl nejprve zvážen v suchém stavu na analytických vahách a poté

umístěn na ránu (houbičku), a to kolagenem směrem do rány. Ve stanovených časových intervalech – 15 min, 1 h, 5 h, 8 h a 24 h byl pomocí pinzety oddělen od modelu rány. Následovalo jeho zvážení na analytických vahách. Ze získaných hodnot hmotností vzorku za sucha a za mokra v daném intervalu byl spočítán stupeň nasákavosti  $S_n$  (g/g), a to dle následujícího vzorce:

$$S_n = (m_m - m_s)/m_s,$$

kde  $m_m$  je hmotnost nasáklého vzorku a  $m_s$  hmotnost vzorku suchého.

#### Povrchové pH krytí po navlhčení kapkou vody

K měření povrchového pH po navlhčení kapkou vody byl použit pH metr (pH 3210, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Německo) a kontaktní skleněná elektroda (FlaTrode, Hamilton Company, USA). Na vzorek o rozměru 2,5 × 2,5 cm byla ze stříčky kápnuta kapka čerstvě převařené čištěné vody. Po nasáknutí vzorku bylo změřené povrchové pH na kolagenové straně krytí.

#### pH vodného výluhu

Pro měření pH výluhu byly použity čtverečky krytí o rozměrech 2,5 × 2,5 cm. Jednotlivé vzorky byly nejprve zváženy, umístěny do kádinek a zality čerstvě převařenou čištěnou vodou pokojové teploty, jejíž hmotnost byla v poměru 1 : 100 vůči hmotnosti daného vzorku. Měření pH vodného výluhu bylo provedeno za pomoci pH metru (pH 3210, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Německo) a ponorné elektrody (SenTix 41, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Německo), a to ve dvou časových intervalech – po 3 a po 24 hodinách.

#### Změny povrchového pH v čase

Měření povrchového pH krytí a hodnocení jeho změn v čase bylo realizované za pomoci výše zmíněného umělého modelu rány. Vzorky o rozměrech 2,5 × 2,5 cm byly umístěny na model, a to tak, že vrstva kolagenu směřovala na houbičku (do rány). Po uplynutí stanovených časových intervalů – 15 minut, 1 h, 5 h, 8 h a 24 h byl vzorek z modelu rány odstraněn, umístěn na prázdnou Petriho misku a bylo změřeno jeho povrchové pH na kolagenové straně za pomoci kontaktní elektrody.

### Výsledky a diskuze

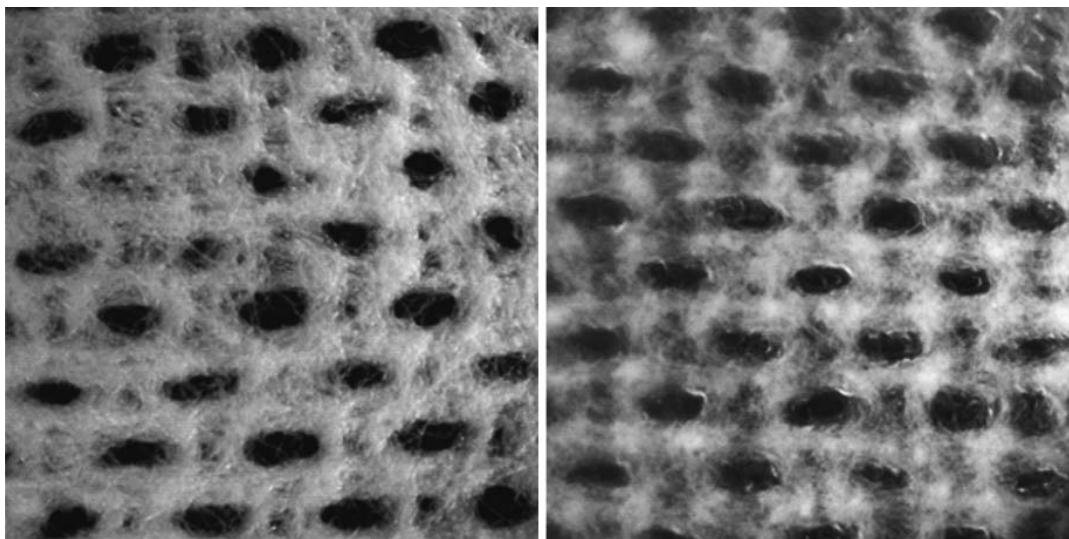
Kolagenové krytí s kyselou formou karboxymethylcelulosity ve formě netkané textilie, která tvořila opornou vrstvu pro kolagenový film, bylo připraveno metodou odpaření rozpouštědla. Ačkoliv má kolagen velmi dobré filmotvorné vlastnosti, především po navlhčení mají kolagenové filmy minimální mechanickou odolnost, což je z hlediska potencionální aplikace na ránu nevyhovující a nepříjemné. Z toho důvodu je snaha kolagen kombinovat s jinými materiály<sup>45, 46</sup>, s cílem zajistit dostatečnou pevnost, pružnost a mechanickou odolnost přípravku jako takového<sup>11, 41, 42</sup>. Z hlediska organoleptických vlast-

ností se námi zvolená kombinace kolagenu s HCMC jeví jako žádoucí pro aplikaci na rány, neboť vykazuje dobré vlastnosti a manipulaci i po navlhčení a krytí je zároveň soudržné na kolagenové vrstvě po 24 hodinách, čehož jsme chtěli docílit. Textilní HCMC vlastní kolagenový film nejen mechanicky podporuje a vede k úspoře použitého kolagenu, který sám o sobě není levným materiálem, ale zároveň funguje i jako hydrokoloidní krytí se schopností bobtnat a pojmout exsudát (obr. 1).

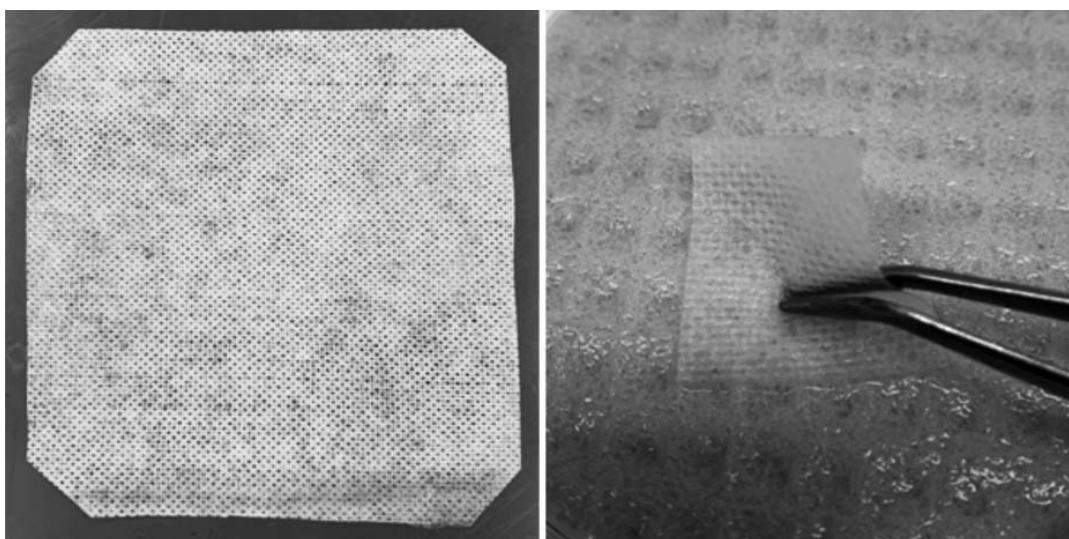
Odlévané disperze obou typů kolagenu byly viskózní, homogenní a bělavého zabarvení s tím, že druh použitého změkčovadla nijak neovlivňoval jejich vzhled a vlastnosti. Důležitou roli hrál při tvorbě disperze 96% ethanol, který sloužil k naředění disperze a k případnému odstranění nežádoucích bublinek vzniklých homogenizací. Připravená a řádně usušená krytí na rány byla z hlediska kolagenové vrstvy homogenní, hladká, lesklá, průhledná

a mezi jednotlivými druhy kolagenu nebyly patrné žádné rozdílné organoleptické vlastnosti. Vzorky s makrogolem však při pohmatu působily pevněji, vyšší poměr změkčovadla vůči kolagenu způsobil, že vzorky byly při pohmatu měkčí a poddajnější jak v případě glycerolu, tak i makrogolu. Vrstva textilní HCMC byla ve všech případech stejná, na ohmat drsná a tvořila mechanickou oporu vzniklého krytí. Ve vlhkém stavu byly všechny vzorky pevné, dobře se s nimi manipulovalo, a to i po 24 hodinách na umělém modelu rány. Z kolagenové strany působily mírně lepivým dojmem, který se zvětšoval v průběhu času. Nebyly zřejmé žádné významné rozdíly organoleptických vlastností v rámci druhu použitého kolagenu, změkčovadel či jejich poměrů. Vzhled připraveného krytí na rány přibližuje obrázek 2.

Všechny typy připraveného krytí vyhovovaly námi aplikované zkoušce hmotnostní stejnoměrnosti dle ČL



Obr. 1. Mikroskopický vzhled krytí při 10násobném přiblížení (vlevo) – struktura krytí v suchém stavu, vzhled krytí ve vlhkém stavu po 24 hodinách po umístění na umělý model rány (vpravo)



Obr. 2. Vzhled připraveného krytí na rány (vlevo) – usušený vzorek o rozměrech cca 12 × 12 cm, vzorek o rozměru 2,5 × 2,5 cm ve vlhkém stavu na umělém modelu rány po 24 hodinách (vpravo)

2017. Průměrné hmotnosti jednotlivých vzorků včetně povolené odchylky a maximální/minimálních hmotností přibližuje tabulka 2. V tabulce je také uvedena průměrná tloušťka jednotlivých vzorků. Největší naměřená tloušťka byla obecně vždy u filmů s poměrem změkčovadla 1 : 2 a s makrogolem jako změkčovadlem. Filmy z prasečího kolagenu byly silnější než filmy z kolagenu koňského, ačkoliv v průměru vážily méně. Samotná textilie logicky dosahovala nejmenší tloušťky i hmotnosti.

Hodnocení absorpčních vlastností krycích prostředků patří k jedné ze základních charakteristik jejich vlastností z hlediska aplikace na ránu. Moderní krytí mají za cíl zajistit optimální vlhkost v ráně, což vede k jejímu správnému hojení<sup>(44)</sup>. Konkrétní požadavky se liší od zamýšleného použití a především druhu rány – některé rány jsou silně exsudující, jiné rány jsou suché, a tudíž potřebují spíše hydratovat a z minimálního množství exsudátu zajistit vlhké prostředí<sup>(1)</sup>.

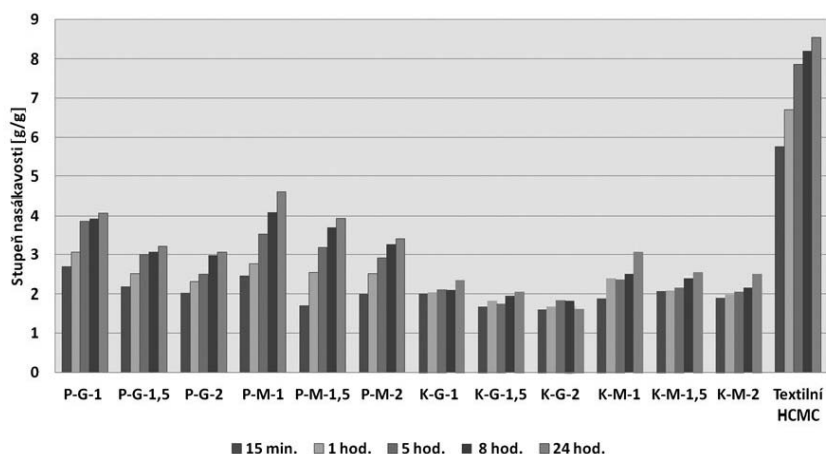
V našem případě sloužil pro porovnání schopnosti absorpce stupeň nasákavosti  $S_n$ . U hydrokoloidních vláken (samotná textilní HCMC) se vzhledem k jejich charakteristice očekává poměrně vysoká schopnost absorpce exsudátu, což potvrzuje i obrázek 3. Je patrné, že samotná textilie dosahovala až 3krát vyšší nasákavosti než v kombinaci s oběma kolageny. V případě kombinace textilie s kolagenem dosahovala nasákavost těchto vzorků průměrných hodnot s tím, že můžeme konstatovat, že oproti koňskému kolagenu má prasečí kolagen vyšší absorpční vlastnosti, které se zvyšují i v rámci času. U koňského kolagenu se sice schopnost nasáknout FTR 7,2 v čase zvyšuje, ale ne tak výrazně jako u kolagenu prasečího. Co se týče změkčovadla, filmy s makrogolem jsou nasákvější než s glycerolem a svoji roli hraje i poměr změkčovadla – čím vyšší poměr změkčovadla, tím nižší nasákavost. To je dáno hydrokopickým charakterem obou těchto látek, kvůli kterému krytí obsahuje určité procento

Tab. 2. Tloušťka a hodnocení hmotnostní stejnoměrnosti jednotlivých vzorků

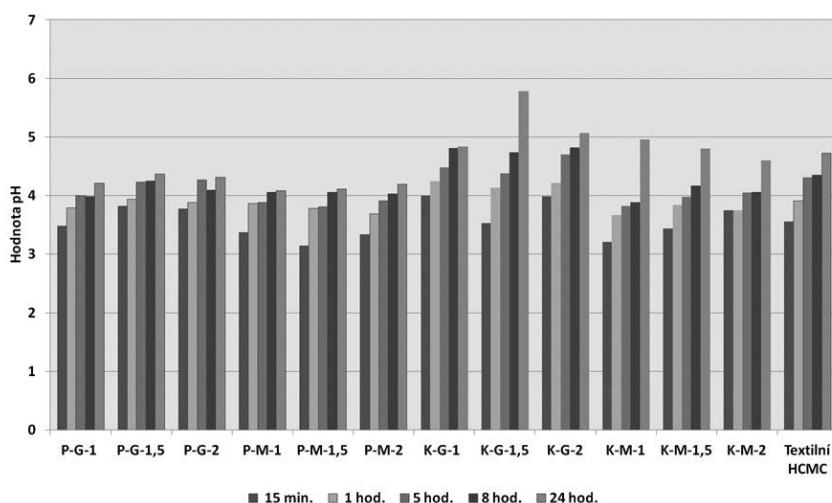
Označení vzorku	Tloušťka (μm)	Průměrná hmotnost (g)	Povolená odchylka (± 7,5 %) (g)	Nejnižší a nejvyšší hmotnost vzorků (g)	Hodnocení dle ČL 2017
P-G-1	126,45 ± 17,80	0,0583 ± 0,0027	0,0540–0,0627	0,0554–0,0642	✓
P-G-1,5	128,44 ± 19,46	0,0603 ± 0,0029	0,0557–0,0648	0,0559–0,0663	✓
P-G-2	135,13 ± 23,66	0,0690 ± 0,0039	0,0638–0,0742	0,0635–0,0752	✓
P-M-1	128,20 ± 13,29	0,0527 ± 0,0023	0,0487–0,0566	0,0487–0,0574	✓
P-M-1,5	131,30 ± 16,64	0,0633 ± 0,0026	0,0585–0,0680	0,0585–0,0687	✓
P-M-2	137,67 ± 14,78	0,0692 ± 0,0031	0,0640–0,0744	0,0651–0,0759	✓
K-G-1	111,91 ± 20,70	0,0645 ± 0,0030	0,0597–0,0694	0,0600–0,0699	✓
K-G-1,5	113,36 ± 14,01	0,0685 ± 0,0028	0,0634–0,0736	0,0626–0,0722	✓
K-G-2	117,61 ± 17,44	0,0724 ± 0,0036	0,0670–0,0778	0,0674–0,0792	✓
K-M-1	118,55 ± 16,67	0,0633 ± 0,0036	0,0585–0,0680	0,0569–0,0680	✓
K-M-1,5	120,50 ± 18,11	0,0763 ± 0,0044	0,0706–0,0820	0,0700–0,0823	✓
K-M-2	122,49 ± 16,72	0,0804 ± 0,0040	0,0743–0,0864	0,0735–0,0860	✓
textilní HCMC	104,36 ± 22,93	0,0281 ± 0,0008	0,0260–0,0302	0,0264–0,0302	✓

Tab. 3. Hodnocení pH po navlhčení kapkou vody a pH vodného výluhu

Označení vzorku	pH po navlhčení kapkou vody	pH vodného výluhu	
		po 3 h	po 24 h
P-G-1	2,46 ± 0,02	3,21 ± 0,04	3,17 ± 0,04
P-G-1,5	2,34 ± 0,04	3,24 ± 0,07	3,23 ± 0,06
P-G-2	2,09 ± 0,12	3,26 ± 0,04	3,26 ± 0,04
P-M-1	1,91 ± 0,05	3,07 ± 0,02	3,04 ± 0,02
P-M-1,5	1,87 ± 0,07	3,08 ± 0,09	3,05 ± 0,08
P-M-2	1,98 ± 0,04	3,20 ± 0,07	3,16 ± 0,07
K-G-1	2,32 ± 0,06	3,12 ± 0,01	3,12 ± 0,01
K-G-1,5	2,31 ± 0,03	3,24 ± 0,02	3,17 ± 0,08
K-G-2	2,00 ± 0,05	3,18 ± 0,04	3,16 ± 0,04
K-M-1	1,90 ± 0,04	2,95 ± 0,02	2,93 ± 0,03
K-M-1,5	2,10 ± 0,03	3,15 ± 0,04	3,13 ± 0,03
K-M-2	2,01 ± 0,04	3,07 ± 0,01	3,06 ± 0,01
textilní HCMC	2,98 ± 0,35	4,67 ± 0,11	4,55 ± 0,03



Obr. 3. Změny nasákavosti krytí a textilie v průběhu času



Obr. 4. Změny povrchového pH krytí a textilie v průběhu času ve FTR 7,2

vlhkosti, avšak tím se snižuje schopnost pojmout další kapalinu.

Stanovení hodnot pH, a především hodnocení jeho změn v čase, řadíme k významnému testování aplikačních vlastností krycích prostředků na rány. Bylo prokázáno, že chronické nehojící se rány jsou charakteristické zásaditým pH, které je spojené s vyšší aktivitou MMPs, popř. s výskytem bakteriální infekce. Naopak mírně kyselé prostředí vede k inhibici MMPs, proliferaci fibroblastů, epitelizaci, angiogenezi a potlačuje výskyt mikroorganismů<sup>4, 47</sup>. Z tohoto důvodu je důležité znát, zda je krycí prostředek na rány schopný pH modulovat a udržet jeho hodnoty v kyselé oblasti. Tabulka 3 shrnuje hodnocení povrchového pH po navlhčení kapkou vody a pH vodného výluhu všech vzorků včetně textilie. Všechny hodnoty leží v kyselé oblasti, u vzorků s makrogolem jsou nižší než u krytí s glycerolem. U stanovení pH výluhu v podstatě není zásadní rozdíl mezi hodnotami pH po 3 a 24 hodinách. O tom, zda je krytí schopné udržet pH v kyselé oblasti po jeho aplikaci v určitém časovém intervalu, vypovídá více hodnocení změn pH v čase na obrázku 4. Všechny vzorky jsou schopné i po 24 hodinách na modelu rány s FTR 7,2 udržet pH v mírně kyselé oblasti, tudíž je můžeme považovat za pH modulující krytí. V případě textilie a prasečího kolagenu

se v rámci 24hodinového intervalu pH zvyšovalo mírně, zatímco u vzorků s koňským kolagenem lze pozorovat výraznější nárůst pH v intervalu 24 hodin.

## Závěr

Z výše uvedených skutečností a provedeného experimentu vyplývá, že námi zvolená kombinace kolagenového filmu a HCMC ve formě netkané textilie se jeví jako vhodná pro zamýšlenou aplikaci na rány. Všechny připravené vzorky měly dobré organoleptické vlastnosti i ve vlhkém stavu po 24 hodinách na umělém modelu rány. Krytí bylo schopné udržet pH v kyselé oblasti a zároveň pohlcovat přiměřené množství exsudátu v ráně. Rozdíl v použitých změkčovadlech a jejich poměrech nemá zásadní vliv na testované vlastnosti krytí, avšak druh použitého kolagenu je ovlivňuje. Vzorky s koňským kolagenem mají nižší absorpční vlastnosti a menší schopnost udržet pH v rámci 24hodinového intervalu než vzorky s kolagenem prasečím.

Práce vznikla za podpory IGA VFU Brno, Česká republika pod číslem (304/2019/FaF).

**Střet zájmů:** žádný.

## Literatura

1. **Peate I., Glencross W.** Wound Care at a Glance. Oxford: Wiley-Blackwell 2015.
2. **Rajendran S.** Advanced Textiles for Wound Care (The Textile Institute Book Series), 2<sup>nd</sup> ed. Woodhead Publishing 2018.
3. **Boateng J. S., Matthews K. H., Stevens H. N. E., Eccleston G. M.** Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97(8), 2892–2923.
4. **Dhivyaa S., Padmab V. V., Santhina E.** Wound dressings – a review. *BioMedicine* 2015; 5(4), 24–28.
5. **Sweeney I. R., Mirafteb M., Collyer G.** A critical review of modern and emerging absorbent dressings used to treat exuding wounds. *Int. Wound J.* 2012; 9(6), 601–612.
6. **Bell D., Hyam D.** Choosing an appropriate dressing for chronic wounds. *Prescriber* 2007; 18(11), 65–70.
7. **Okur M. E., Karantas I. D., et al.** Recent trends on wound management: New therapeutic choices based on polymeric carriers. *Asian J. Pharm. Sci.* 2020.
8. **Yao K., Bae L., Yew W. P.** Post-operative wound management. *Aust. Fam. Physician* 2013; 42(12), 867–870.
9. **Naude L.** Exudate management: Putting the patient first. *Prof. Nurs. Today* 2008; 12(5), 29–32.
10. **Mogoşanu G. D., Grumezescu A. M.** Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int. J. Pharm.* 2014; 463(2), 127–136.
11. **Gaspar-Pintiliescu A., Stanciuc A. M., Craciunescu O.** Natural composite dressings based on collagen, gelatin and plant bioactive compounds for wound healing: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019; 138, 854–865.
12. **Paul E. J., Padmapriya B.** A pragmatic review on the property, role and significance of polymers in treating diabetic foot ulcer. *Mater. Today: Proceedings* 2020; 23, 91–99.
13. **Naseri-Nosar M., Ziora Z. M.** Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. *Carbohydr. Polym.* 2018; 189, 379–398.
14. **Calori I. R., Braga G., De Jesus P. C. C., Bi H., Tedesco A. C.** Polymer scaffolds as drug delivery systems. *Eur. Polym. J.* 2020; 129, 109621.
15. **Li X., Ma M., Ahn D. U., Huang X.** Preparation and characterization of novel eggshell membrane-chitosan blend films for potential wound-care dressing: From waste to medicinal products. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019; 123, 477–484.
16. **Jaganathan G., Manivannan K., Lakshmanan S., Sithique M. A.** Fabrication and characterization of Artocarpus heterophyllum waste derived lignin added chitosan biocomposites for wound dressing application. *Sustain. Chem. Pharm.* 2018; 10, 27–32.
17. **Varaprasad K., Jayaramudu T., Kanikireddy V., Toro C., Sadiqu E. R.** Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review. *Carbohydr. Polym.* 2020; 236, 116025.
18. **Hamed H., Moradi S., Hudson S. M., Tonelli A. E.** Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydr. Polym.* 2018; 199, 445–460.
19. **Fleck C. A., Simman R.** Modern Collagen Wound Dressings: Function and Purpose. *J. Am. Col. Certif. Wound Spec.* 2010; 2(3), 50–54.
20. **Sopuch T., Drahovzalová R., Rýdl J. et al.** Celulózové materiály v ošetřování ran. *Hojení ran* 2013; 7(2), 14–20.
21. **Bakhsheshi-Rad H. R., Ismail A. F., Aziz M., Akbari M., Hadisi Z., Omidi M., Chen X.** Development of the PVA/CS nanofibers containing silk protein sericin as a wound dressing: In vitro and in vivo assessment. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020; 149, 513–521.
22. **Farokhi M., Mottaghitalab F., Fatahi Y., Khademhosseini A., Kaplan D. L.** Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings. *Trends Biotechnol.* 2018; 36(9), 907–922.
23. **Gupta B., Agarwal R., Alam M. S.** Textile-based smart wound dressings. *Indian J. Fibre Text. Res.* 2010; 35, 174–187.
24. **Benchabane A.** Carboxymethyl Cellulose: Rheological and Pipe Flow Properties. *RAPSCI* 2018; 5(5), 95–103.
25. **Tufan M., Uraz E., Tosun C., Gercel H.** Synthesis and characterization of carboxymethyl cellulose film from pistachio shells. *Int. J. Adv. Sci. Eng. Tech.* 2016; 4(1), 153–155.
26. **Sunardi N., Febriani M., Junaidi A. B.** Preparation of carboxymethylcellulose produced from purun tikus (*Eleocharis dulcis*). *AIP Conference Proceedings* 2017; 1868, 1–8.
27. **Kulikowska A., Wasiak I., Ciach T.** Carboxymethyl cellulose oxidation to form aldehyde groups. *Biomed. Eng.* 2013; 4(2), 11–18.
28. **Araújo D. M. L., Galera P. D.** Ocular lubricants: what is the best choice? *Ciência Rural.* 2016; 46(11), 2055–2063.
29. **Stephen-Haynes J., Callaghan R., Stephens C.** Evaluating the performance of a new carboxymethylcellulose dressing in the community setting. *Br. J. Nurs.* 2017; 26(6), S36–S41.
30. **Ramli N. A., Wong T. W.** Sodium carboxymethylcellulose scaffolds and their physicochemical effects on partial thickness wound healing. *Int. J. Pharm.* 2011; 403(1–2), 73–82.
31. **Vinklářková L., Masteiková R., Vetchý D., Doležel P., Bernatonič J.** Formulation of novel layered sodium carboxymethylcellulose film wound dressings with ibuprofen for alleviating wound pain. *BioMed Res. Int.* 2015; 2015, 1–11.
32. **Lopez C. G., Rogers S. E., Colby R. H., Graham P., Cabral J. T.** Structure of sodium carboxymethylcellulose aqueous solutions: A SANS and rheology study. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* 2015; 53(7), 492–501.
33. **Liu X., Zheng Ch., Luo X., Wang X., Jiang H.** Recent advances of collagen-based biomaterials: Multi-hierarchical structure, modification and biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C.* 2019; 99, 1509–1522.
34. **Brett D.** A review of collagen and collagen-based wound dressings. *Wounds* 2008; 20(12), 347–356.
35. **Salvatore L., Gallo N., Natali M. L., et al.** Marine collagen and its derivatives: Versatile and sustainable bio-resources for healthcare. *Mater. Sci. Eng.* 2020; 113, 110963.
36. **Romero-Ortuno R., Kenny R. A., McManus R.** Collagens and elastin genetic variations and their potential role in aging-related diseases and longevity in humans. *Exp. Gerontol.* 2020; 129, 110781.
37. **Kirkness M. W. H., Lehmann K., Forde N. R.** Mechanics and structural stability of the collagen triple helix. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2019; 53, 98–105.
38. **Abou Nell E. A., Bozec L., Knowles J. C., Syed O., Mudera V., Day R., Hyun J. K.** Collagen – Emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013; 65(4), 429–456.
39. **Hochstein A. O., Bhatia A.** Collagen: its role in wound healing. *Podiatry management* 2014; 8, 103–110.
40. **Harding K. G., Rangaraj A., Leaper D.** Role of collagen in wound management. *Wounds* 2011; 7(2), 54–60.



41. **Yang H., Guo X., Chen X., Shu Z.** Preparation and characterization of collagen food packaging film. *J. Chem. Pharm. Res.* 2014; 6(6), 740–745.
42. **Chen X., Zhou L., Xu H., et al.** The structure and properties of natural sheep casing and artificial films prepared from natural collagen with various crosslinking treatments. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019; 135, 959–968.
43. **Český lékopis 2017.** Praha: Grada Publishing 2017; 4904 s.
44. **Masteiková R., Vinklárková L., Muselík J., Vetchý D., Bernatonié J., Sopuch T.** Vliv stupně substituce na nasákavost kyselých formy karboxymethylcelulosity v podobě netkané textilie. *Čes. slov. Farm.* 2013; 62(2), 89–94.
45. **Ocak B.** Development of the mechanical and barrier properties of collagen hydrolysate/carboxymethyl cellulose films by using SiO<sub>2</sub> nanoparticles. *PAJES* 2019; 25(3), 320–324.
46. **Tenorová K., Masteiková R., Kovárová N., Kostelanská K., Přikryl J., Vetchý D., Bernatonié J.** Příprava a hodnocení dvouvrstvých filmů na bázi kolagenu a karboxymethylcelulosity za účelem terapie ran. *Čes. slov. Farm.* 2019; 68, 229–236.
47. **Metcalf D. G., Haalboom M., Bowler P. G., Gamerith C., Sigl E., Heinzle A., Burnet M. W. M.** Elevated wound fluid pH correlates with increased risk of wound infection. *Wound Medicine* 2019; 26(1), 1–5.

## Aplikácia inhalačných liekov z pohľadu lekárnik

### Application of inhaled drugs from the pharmacist's point of view

Lucia Masaryková • Petra Polaščíková

Došlo 21. júna 2020 / Prijato 30. septembra 2020

#### Súhrn

**Úvod:** Základom liečby astmy a chronickej obštrukčnej choroby pľúc (CHOCHP) je inhalačná terapia, ktorá so sebou prináša viaceré výhody, a jej úspešnosť je založená na správnom prevedení inhalačnej techniky.

**Cieľ:** Primárnym cieľom výskumu bolo zistiť, aké percento pacientov postupuje pri aplikácii svojich liekov správne, aké inhalačné systémy sú preferované pri liečbe spomínaných respiračných ochorení, aké najčastejšie chyby v inhalačnej technike robia pacienti pri používaní inhalátorov a aký je postoj pacientov k možnosti edukácie zo strany verejného lekárnik.

**Metodika:** Potrebné údaje pre naplnenie cieľa boli získané z dotazníkového prieskumu, ktorého sa zúčastnilo 102 respondentov (pacientov). Anonymný dotazník pozostával z 18 otázok zameraných na inhalačné systémy, ktoré pacienti používajú a na jednotlivé kroky, ktoré je potrebné uskutočniť pri inhalácii lieku.

**Výsledky:** Do prieskumu sa zapojilo 83,33 % pacientov s prieduškovou astmou a 9,8 % pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc (CHOCHP). Najviac predpisovaným inhalátorom zo všetkých typov bol Inhaler, ktorí používalo 54,9 % respondentov. Ukázalo sa, že až u celkovo 63 % respondentov používajúcich MDI a DPI sa vyskytla nejaká chyba pri inhalácii svojich liekov. Najčastejšou chybou u oboch typov inhalačných systémov bolo nezadržanie dychu na dostatočne dlhý čas (5–10 sekúnd) po vdýchnutí z inhalátora. Vyššia chybovosť použitia bola preukázaná u inhalátorov pre práškovú formu lieku (DPI) v porovnaní s aerosólovými dávkovačmi (MDI).

**Záver:** Získané výsledky preukázali, že chyby v inhalačnej technike sú stále aktuálnym problémom pre nadpolovičnú väčšinu pacientov s respiračnými ochoreniami. Veľký potenciál pre zlepšenie tohto stavu majú pre pacientov lekárnici, ktorí svojim poradenstvom a poučením o správnej aplikácii liekov môžu pomôcť pacientom zlepšiť prevedenie inhalácie a tým zvýšiť efektívnosť liečby.

**Kľúčové slová:** adherencia • verejný lekárnik • inhalačné lieky • astma • CHOCHP

#### Summary

**Introduction:** The basis of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) treatment is inhalation therapy, which brings several benefits and its success is based on the correct inhalation technique.

**Aim:** The primary aim of the research was to find out what percentage of patients could apply their medicines properly, what inhalation systems were preferred in the treatment of these respiratory diseases, what most common mistakes in the inhalation technique patients made when using inhalers as well as what was patients' approach to the possibility of being educated by a community pharmacist.

**Methods:** Essential data to accomplish the goal were obtained by a questionnaire survey in which 102 respondents (patients) participated. The anonymous questionnaire consisted of 18 questions focusing on the inhalation systems that patients use and particular steps that need to be taken when inhaling the medicine.

**Results:** 83.33% of patients with bronchial asthma and 9.8% of patients with chronic obstructive lung disease (COPD) participated in the study. "Inhaler" was the most prescribed out of all the other kinds of inhalators, used by 54.9% of respondents. It turned out that up to 63% of the respondents using MDIs or DPIs had encountered some kind of error when inhaling their drugs. The most common mistake with both types of inhalation systems was not holding their breath for sufficient time (5 to 10 seconds) after inhaling from the inhaler. Dry-powder inhalers (DPIs) proved to be used more erroneously compared to aerosol dispensers (MDIs).

**Conclusion:** The obtained results showed that errors in the inhalation technique seem yet to be a hot issue for more than half of patients with respiratory diseases. Pharmacists have a great potential to improve the situation by giving pieces of advice and instructions regarding the proper application of medicines to help patients to enhance the performance of inhalation and thus increase the treatment efficiency.

**Key words:** adherence • community pharmacist • inhaled drugs • asthma • COPD

#### Úvod

**Asthma bronchiale.** V súčasnosti možno astmu na základe najnovších odporúčaní (GINA – Global Initiative

for Asthma; Globálna iniciatíva pre astmu) z roku 2020 definovať ako „heterogénne ochorenie, zvyčajne charakterizované chronickým zápalom dýchacích ciest. Je definované výskytom respiračných symptómov, ako sú sipot, dýchavičnosť, tieseň na hrudníku a kašeľ, ktoré sa menia z hľadiska priebehu a intenzity a sú spojené s variabilným obmedzením výdychového prietoku vzduchu. Obmedzenie prietoku vzduchu sa môže neskôr stať trvalým.“<sup>1)</sup>

Asthma bronchiale (priedušková astma) predstavuje verejný zdravotný, ale aj sociálny problém. Postihuje ľudí rôznych vekových kategórií. Nedá sa vyliečiť, ale u väčšiny pacientov môže byť účinne kontrolovaná adekvátnou liečbou. Nekontrolovaná astma vedie k závažnému obmedzeniu každodenného života<sup>2)</sup>. Ochorenie postihuje 1–18 % ľudí po celom svete, či už ide o deti alebo dospelých<sup>1)</sup>. Prevalencia astmy sa celosvetovo zvýšila o 29,4 % z 210 684,3 (95% UI 186 332,0–236 730,0) tisíc v 1990 na 272 677,5 (95% UI 242 295,9–304 699,6) tisíc v roku 2017<sup>3)</sup>. Na Slovensku týmto chronickým respiračným ochorením podľa údajov NCZI (Národné centrum zdravotníckych informácií) z roku 2018 trpí 99 756 pacientov<sup>4)</sup>. V Českej republike bolo podľa údajov Ústavu zdravotníckych informácií a štatistiky ČR v roku 2018 193 765 pacientov trpiacich týmto ochorením<sup>5)</sup>. Astmatickí pacienti zažívajú opakujúce sa záchvaty sipotov, dýchavičnosti – hlavne ťažkosti pri výdychu a niekedy aj pri kašli. Ide o zápalový stav, ktorý je sprevádzaný reverzibilným zúžením dýchacích ciest, čím možno astmu odlišiť od chronickej obštrukčnej choroby pľúc, kde obmedzenie prietoku vzduchu možno považovať za ireverzibilné, alebo nie úplne reverzibilné. Ďalším základným znakom tohto ochorenia je bronchiálna hyperaktivita, pod ktorou rozumieme nadmernú citlivosť na rôzne podnety, ako je napríklad studený vzduch, škodlivé chemikálie, cvičenie, ale aj vírusové infekcie. Tieto stimuly môžu vyvolať nežiaducu kontrakciu svaloviny bronchov (bronchokonstrikcii), čo môže mať za následok vznik astmatického záchvatu<sup>6)</sup>. Aj keď príčinu astmy nie je možné liečiť, dostatočná kontrola nad ochorením môže pacienta zbaviť ťažkostí a priaznivo ovplyvniť vývoj ochorenia z dlhodobého hľadiska. Cieľom liečby je dosiahnuť a udržať plnú kontrolu nad astmou, ktorá zahŕňa jednak kontrolu nad aktuálnymi symptómami, ale aj kontrolu nad aktivitou ochorenia, ktorá vedie k exacerbáciám a zníženiu funkcie pľúc. Podstatou liečebnej stratégie je taktiež zabrániť nežiaducim účinkom farmakoterapie<sup>7)</sup>.

**Chronická obštrukčná choroba pľúc.** Podľa Globálnej iniciatívy pre chronickú obštrukčnú chorobu pľúc (GOLD COPD – Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2020) ide teda o „bežné, preventabilné a liečiteľné ochorenie, ktoré je charakterizované pretrvávajúcimi respiračnými príznakmi a obmedzením prietoku vzduchu, ktoré je spôsobené dýchacími a/alebo alveolárnymi abnormalitami, ktoré sú zvyčajne spôsobené výraznou expozíciou škodlivých častíc alebo plynov“<sup>8)</sup>. Najnovšie údaje uvádzajú CHOCHP ako štvrtú hlavnú príčinu smrti vo svete s predpokladom, že v roku 2020 sa posunie na tretie miesto. Toto ochorenie pred-

stavuje závažný sociálny a ekonomický problém ľudskej populácie, ktorý neustále narastá. Prevalencia CHOCHP sa celosvetovo zvýšila o 49,8 % z 199 879,3 (95% UI 184 086,6–216 261,8) tisíc v 1990 až 299 398,1 (95% UI 269 025,2 – 330 073,8) tisíc v roku 2017<sup>3)</sup>. Ide však o ochorenie, ktorému sa dá predchádzať, a ktoré možno liečiť<sup>6)</sup>. Na Slovensku, ako uvádza NCZI (Národné centrum zdravotníckych informácií) za rok 2018, týmto ochorením trpí 78 345 pacientov<sup>4)</sup>. V Českej republike bolo podľa údajov Ústavu zdravotníckych informácií a štatistiky ČR v roku 2018 218 444 pacientov trpiacich týmto ochorením<sup>5)</sup>. Typickým príznakom pre pacientov s CHOCHP je pravidelná tvorba spúta, chronický kašeľ a dýchavičnosť po námahe<sup>9)</sup>. Toto chronické, pomaly progresívne ochorenie je tiež charakterizované obštrukciou v dýchacích cestách. Obmedzenie prietoku vzduchu nie je úplne reverzibilné<sup>10)</sup> a je spôsobené deštrukciou pľúcneho parenchýmu (emfyzém) a ochoreniami malých dýchacích ciest, ako je napríklad obštrukčná bronchiolitída. Za tieto štrukturálne zmeny zodpovedá chronický zápalový proces<sup>8)</sup> ako dôsledok reakcie pľúc na rôzne plyny v ovzduší alebo škodlivé častice<sup>11)</sup>.

Základné rozdiely medzi prieduškovou astmou a chronickou obštrukčnou chorobou pľúc ukazuje tabuľka 1.

Syndrom presahu astmy a chronickej obštrukčnej choroby pľúc – ACOS (athma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome) je charakterizovaný perzistujúcou bronchiálnou obštrukciou s niekoľkými znakmi obvykle spojenými s astmou a s niekoľkými znakmi obvykle spojenými s CHOCHP. Z týchto dôvodov je ACOS identifikovaný sdieľaním znakov astmy a CHOCHP. Prevalencia ACOS sa pohybuje v rozmedzí 15–20 %. Chorí majú často väčšie obtiaže, než je tomu u pacientov so samotnou astmou či samotnou CHOCHP. Rizika pre ACOS sú kombináciou rizík pre CHOCHP aj astmu. Vekovo sú pacienti mladší než u CHOCHP, majú väčší počet exacerbácií, exacerbácie sú ťažšie, a preto farmakoterapeutické intervencie vyžadujú integrovanejší prístup. Čo je úplne nevyhnutné, je plánovanie prospektívnych randomizovaných štúdií pre ACOS, pretože doteraz klinické štúdie tento prekryv úplne ignorovali a striktno oddeľovali pacientov s CHOCHP od pacientov s astmou, a naopak<sup>13)</sup>.

Pri podaní antiastmatík, liekov na liečbu prieduškovkej astmy a chronickej obštrukčnej choroby pľúc, sa uprednostňuje inhalačná aplikácia. Takýto spôsob podania je preferovaný jednak v prípade kontrolných, ale aj záchranných liečiv<sup>14)</sup>. Inhalačná terapia umožňuje umiestnenie lieku priamo do cieľového orgánu<sup>15)</sup>, teda do respiračného traktu, čím je možné dosiahnuť vysokú účinnú koncentráciu a tým rýchle farmakologické účinky<sup>16)</sup>. Inhalačnou cestou sa aplikujú dávky liekov v mikrogramoch, čím sa zníži ich systémová biologická dostupnosť a tým aj systémové vedľajšie účinky<sup>17)</sup>. Táto výhoda sa stráca pri orálnom alebo parenterálnom podaní<sup>15)</sup>. Pre úspech liečby je však dôležitá inhalačná technika. Ukázalo sa, že mnoho pacientov nesprávne používa inhalačné zariadenia, čo prispieva k výskytu exacerbácií v dôsledku nedo-

Tab. 1. Klinické a laboratórne rozdiely medzi CHOCHP a astmou<sup>12)</sup>

	Chronická obštrukčná choroba pľúc	Astma
Vznik	väčšinou po 40. roku veku	kedykoľvek v detstve
Začiatok a rozvoj	pozvoľný, postupný	často náhly začiatok
Alergia	nebýva	častá osobná i rodinná
Fajčiar alebo bývalý fajčiar	v 70 % prípadov	menej často
Suchý kašeľ	menej častý	záchvatovitý, nočný, hlavne mimo nachladnutia
Chronický produktívny kašeľ	častý	vzácný
Dušnosť	častá, progredujúca	premenlivá, často náhla
Piskoty (hlavne v noci)	vzácné	časté (tiež s dušnosťou)
Menlivosť príznakov behom 24 hodín a medzi dňami	malá	častá
Bronchiálna hyperreaktívita	u menšiny, mierna	veľmi častá, výrazná
Eozinofily v krvi a v spúte	vzácné, alebo chýba	častejšie
Neutrofilie v krvi a v spúte	častejšie	ojedinele
Obštrukčná porucha	vždy neúplne reverzibilná	väčšinou celkom reverzibilná

statočných terapeutických účinkov inhalačných liekov. Navyše nesprávne používanie inhalátorov môže spôsobiť zníženú adhérenciu pacienta k liečbe ako aj zvýšené riziko nevhodného a nadmerného dávkovania liekov lekárom<sup>16)</sup>.

### Komunikácia medzi lekárnikom a pacientom

Lekárnici zohrávajú dôležitú úlohu pri manažovaní pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc a prieduškovou astmou. Otvorená komunikácia medzi lekárnikom a pacientom je rozhodujúca, pretože štúdie ukázali, že pacienti, ktorí sú informovaní a sú súčasťou rozhodovacieho procesu, majú väčšiu pravdepodobnosť, že budú dodržiavať liečebný režim a aktívne zvládať svoju chorobu<sup>18)</sup>. Väčšina pacientov (až do 80 %) nedokáže správne používať svoj inhalátor. To prispieva k zlej kontrole symptómov a exacerbácií<sup>19)</sup>. Pre úspešné zvládanie kontroly astmy a CHOCHP je dôležité, aby boli pacienti dôkladne informovaní o svojom stave, musia poznať varovné príznaky astmatických záchvatov, poznať faktory, ktoré môžu záchvaty vyvolať, vedieť ako tieto ataky zvládnuť, dodržiavať svoj plán liečby a ovládať ako správne používať predpísanú terapiu. Výsledky rôznych štúdií ukazujú, že zvyšovanie povedomia a podpora vzdelávania môže znížiť počet hospitalizácií spojených s astmou a CHOCHP, návštevy pohotovostného oddelenia, vymeškané dni v škole a v práci a úmrtnosť<sup>20)</sup>.

Je nevyhnutné, aby verejní lekárnici informovali pacientov o správnom používaní inhalačných systémov. Medzi dôležité poradenské body určené pre pacientov patria:

- Ukázať správnu techniku používania inhalátora.
- Zdôrazniť, že aerosólové dávkovače MDI (metered

dose inhaler) si zvyčajne vyžadujú pomalý a hlboký nádych a že väčšina MDI sa pred použitím musí pretrepať.

- Upozorniť na to, že inhalátory pre práškovú formu lieku DPI (dry powder inhaler) si naopak vyžadujú rýchlu a hlbokú inhaláciu, aby sa liečivo dostalo do pľúc. DPI by sa pretrepávať nemali (výnimka je Easyhaler).
- Zosumarizovať pacientovi ako čistiť náustok inhalátora.
- Pripomenúť v dostatočnom predstihu, aby si pacient nezabudol vyzdvihnúť svoju ďalšiu dávku liekov a neostal tak bez terapie,
- Upozorniť na to, aby pacienti nepoužívali inhalačné lieky po uplynutí dátumu použiteľnosti, a teda, aby takéto lieky vyradili z používania.
- Inhalátor by sa mal uchovávať pri izbovej teplote a nie na miestach príliš chladných alebo naopak príliš horúcich.
- Vysvetliť rozdiely medzi rôznymi typmi inhalátorov.
- Objasniť pacientovi, že bronchodilatanciá relaxujú a rozširujú dýchacie cesty a mali by sa vždy použiť pred aplikáciou steroidných liečiv.
- Steroidné inhalátory redukujú opuch v dýchacích cestách a vždy po inhalácii kortikosteroidov si je potrebné vypláchnuť ústnu dutinu vodou.
- Zdôrazniť dôležitosť adhérencie k liečbe<sup>7)</sup>.

Práve adhérenca pacientov k liečbe a spôsob inhalácie sú veľmi dôležité aspekty pre dosiahnutie úplného terapeutického účinku u pacientov s astmou a CHOCHP. Desaťročná štúdia (od roku 2005 až do roku 2015) preukázala, že verejní lekárnici majú pozitívny vplyv na zlepšenie inhalačnej techniky a dodržiavanie inhalačnej terapie u pacientov. Napriek tomu ich úloha v tejto

oblasti ešte nie je dostatočne uznaná, a preto sú potrebné ďalšie štúdie. Existuje tiež potreba ďalších výskumov, ktoré by určili optimálnu frekvenciu pre opakovanú kontrolu techniky inhalácie a vzdelávania ako preventívneho opatrenia proti zhoršeniu spôsobu inhalácie u pacientov. Výsledky taktiež zdôrazňujú potrebu, aby systémy zdravotnej starostlivosti vo väčšej miere ocenili úlohu verejného lekárnik v manažmente astmy a CHOCHP v spomínaných kritických oblastiach<sup>21)</sup>.

## Materiál a metodika

Na realizáciu výskumu sme využili dotazníkovú metódu. Dotazník vlastnej konštrukcie bol anonymný, určený predovšetkým pacientom s prieduškovou astmou alebo chronickou obštrukčnou chorobou pľúc. Tento dotazníkový prieskum bol realizovaný jednak vo verejnej lekárni v Bratislave, v sanatóriu Dr. Guhra v Tatranskej Polianke, kde sa liečia pacienti s respiračnými ochoreniami, a taktiež bol dostupný na sociálnej sieti v on-line forme (link na dotazník bol umiestnený vo viacerých skupinách združujúcich pacientov s astmou a chronickou obštrukčnou chorobou pľúc). Dotazník v tlačenej forme podstúpil pilotáž na vzorke 20 respondentov. Títo respondenti neboli zarátaní do celkového počtu respondentov. Následne na základe pripomienok bola vytvorená finálna verzia, ktorá bola predložená na vyplňanie. Prieskumu sa zúčastnilo 102 respondentov rôznych vekových kategórií. Respondenti pri tlačenej verzii boli oslovení lekárnikom na základe expedovanej medikácie. Tlačenu verziu vyplnilo 42 respondentov. Zvyšok bol vyplnený v elektronickej forme. Obidve formy dotazníka vyplňali respondenti sami. Dotazník pozostával z 18 otvorených a uzavretých otázok, ktoré boli zamerané na sociodemografické údaje, informácie o ochorení, akým pacienti trpia, údaje o inhalačných liekoch a o type inhalátora, ktorý pacienti používajú, ale aj o spokojnosti pacientov s týmto inhalačným systémom.

Otázkami č. 8, 9 a 10 sme zisťovali, do akej miery boli pacienti poučení o správnej aplikácii liekov. Otázku č. 15 a otázku č. 16 tvorilo viacero podotázok zameraných priamo na jednotlivé kroky, ktoré je potrebné vykonať pri inhalácii lieku, čo nám umožnilo identifikovať konkrétne chyby v inhalačnej technike či už pri používaní inhalátorov pre práškovú formu lieku (DPI) alebo aerosólových dávkovačov (MDI). V poslednej otázke respondenti vyjadrili svoj postoj na to, či by uvítali kontrolu zvládania inhalačnej techniky v lekárni. Výsledky dotazníka boli spracované prostredníctvom MS Excel a MS Word.

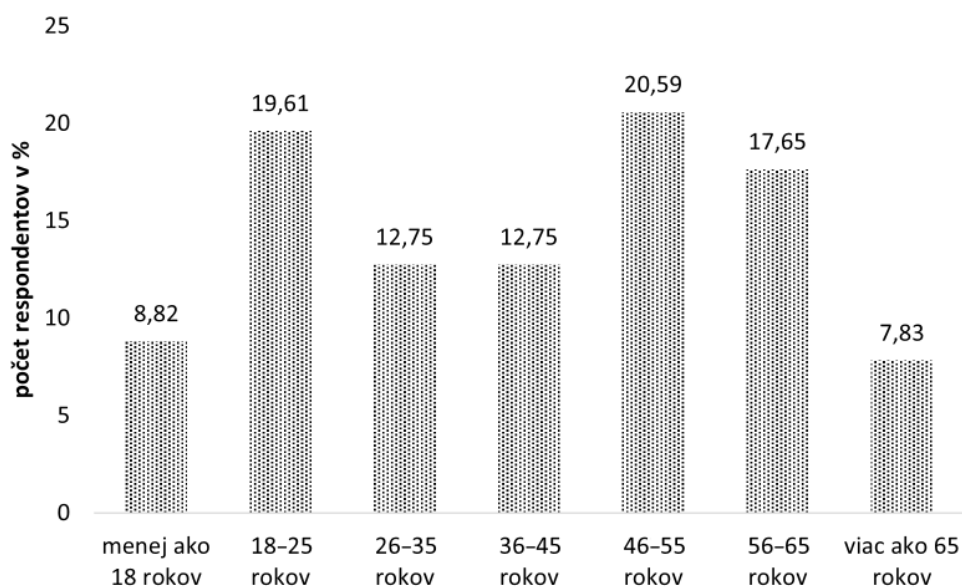
## Výsledky a diskusia

### Vyhodnotenie sociodemografických údajov respondentov

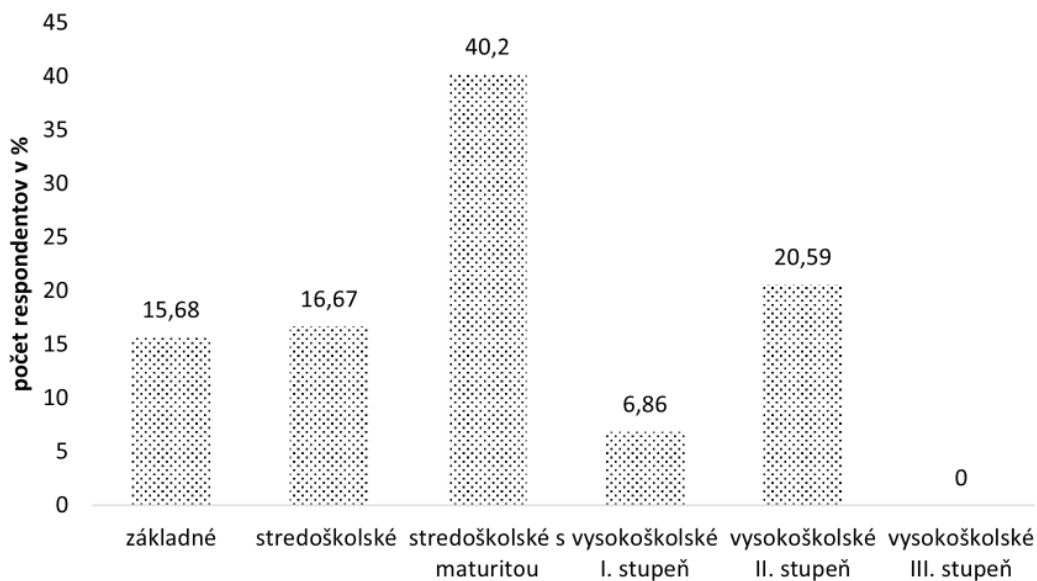
Dotazníkového prieskumu sa zúčastnilo 102 respondentov, z toho 72 (70,59 %) žien a 30 (29,41 %) mužov. Najpočetnejšiu skupinu tvorili pacienti spadajúci do vekovej kategórie 46–55 rokov, čo predstavuje 21 (20,59 %) respondentov. Druhou najviac zastúpenou skupinou boli pacienti v rozmedzí 18–25 rokov, tvoriaci 19,61 % (20 respondentov). Osemnásť (17,65 %) opýtaných patrilo do vekovej kategórie 56–65 rokov. Vekovú skupinu 26–35 a 36–45 rokov tvorilo zhodne po trinásti (12,75 %) respondentov. Najmenšie zastúpenie 7,83 % (osem respondentov) mali pacienti starší ako 65 rokov a pacienti mladší ako 18 rokov, ktorí predstavujú 8,82 % (deväť respondentov) (obr. 1).

Čo sa týka vzdelania, až 41 (40,20 %) respondentov uviedlo ako najvyššie dosiahnuté vzdelanie stredoškolské s maturitou, 21 (20,59 %) opýtaných dosiahlo vysokoškolské vzdelanie II. stupňa, 17 (16,67 %) stredoškolské bez maturity a 16 (15,68 %) základné vzdelanie. Vysokoškolské vzdelanie I. stupňa dosiahlo sedem (6,86 %) pacientov (obr. 2).

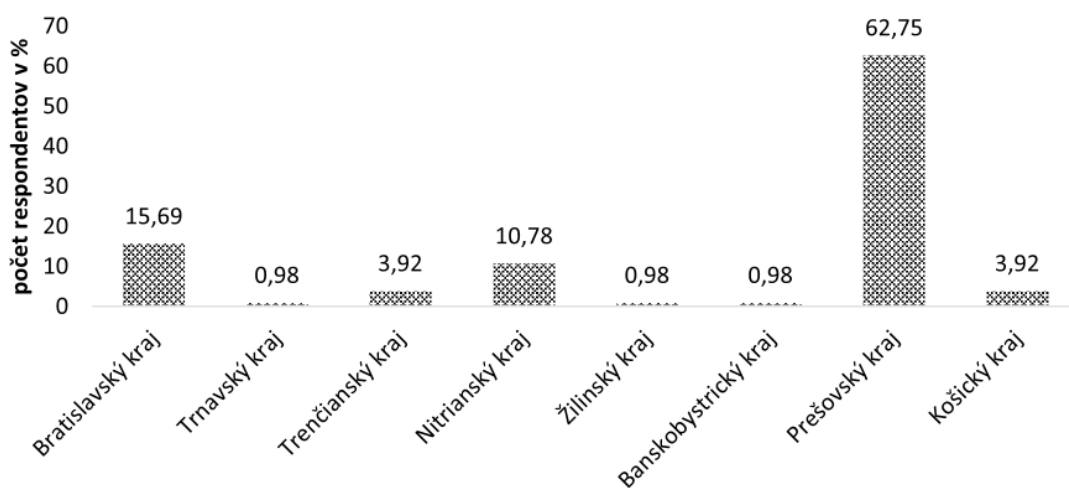
Prevažnú väčšinu, konkrétne 64 (62,75 %) respondentov dotazníkového prieskumu tvorili pacienti



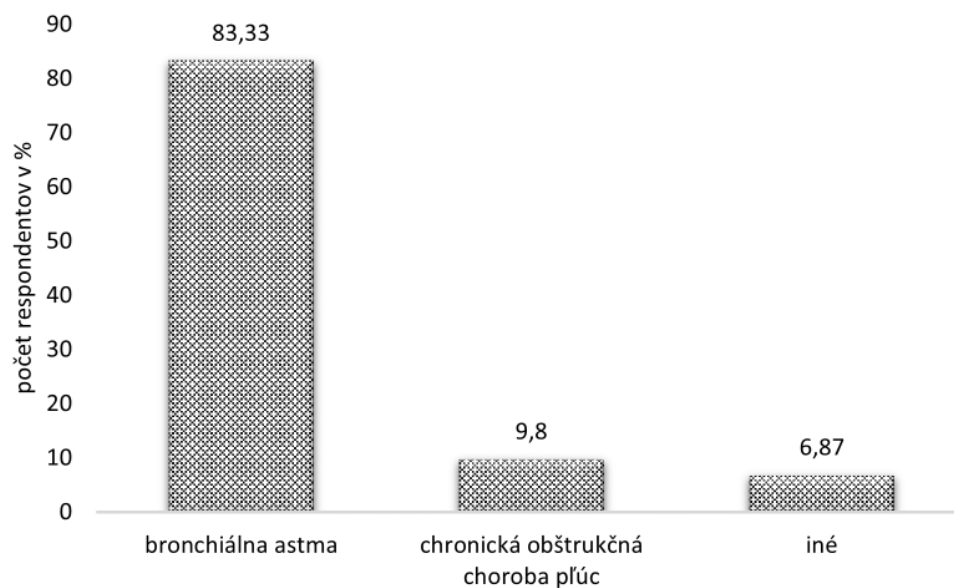
Obr. 1. Rozdelenie respondentov podľa veku



Obr. 2. Rozdelenie respondentov podľa vzdelania



Obr. 3. Rozdelenie respondentov podľa kraja



Obr. 4. Typ respiračného ochorenia, ktorým trpeli respondenti

z Prešovského kraja. Šestnásť (15,69 %) pacientov pochádzalo z Bratislavského, jedenásť (10,78 %) pacientov z Nitrianskeho, štyri (3,92 %) z Trenčianskeho a zhodne štyri (3,92 %) respondenti z Košického kraja. Najmenšiu skupinu tvorili respondenti z Trnavského, Žilinského a Banskobystrického kraja, a to len po 0,98 % (jeden respondent) (obr. 3).

#### Vyhodnotenie a porovnanie odpovedí respondentov na vybrané otázky

Predložený dotazník obsahoval 18 otázok. Vo výsledkoch uvádzame vyhodnotenie najdôležitejších otázok.

Na otázku *Akým respiračným ochorením trpíte?* väčšina respondentov – až 85 (83,33 %) uviedla, že trpí prieduškovou (bronchiálnou) astmou a desať (9,80 %) pacientov chronickou obštrukčnou chorobou pľúc. Zvyšných sedem (6,87 %) opýtaných uviedlo poslednú možnosť „Iné“, kde doplnili ochorenia ako nešpecifikovaná astma, sarkoidóza pľúc či cystická fibróza (obr. 4).

Ako ukazuje tabuľka 2 najčastejšie užívanými inhalačnými liekmi boli: Ventolin Inhaler N (16,53 %), Budelin Novolizer (13,22 %), Berodual N (9,92 %), Formovent (9,09 %), Seretide Diskus (8,26 %), Atrovent N (7,44 %) či Symbicort Turbuhaler (5,79 %). V menšej miere pacienti užívali Ecobec Easi-Breathe (4,96 %), Flutiform (4,13 %), Alvesco (3,31 %), Flixotide Inhaler N (3,31 %), Foster Nexthaler (2,48 %), Ventilastin Novolizer (1,65 %), Flixotide Diskus (1,65 %). Zhodne po 0,83 % opýtaných užívalo Formano, Serevent Diskus, Giona Easyhaler, Spiriva Handihaler, Pulmicort Turbuhaler, Bretaris Genuair, Fullhale, Seretide Inhaler, Relvar Ellipta a Budiair.

Čo sa týka dĺžky užívania inhalačných liekov, z tabuľky 3 vyplýva, že 31,37 % pacientov užívalo svoje inhalačné lieky kratšie ako 5 rokov, 28,43 % v rozmedzí 5–10 rokov a 40,20 % pacientov dlhšie ako 10 rokov.

Na otázku *Ako často užívajú pacienti svoje inhalačné lieky?* rovných 50 % (51 respondentov) uviedlo možnosť

Tab. 2. Inhalačné lieky, ktoré pacienti užívali

Liek	Počet (n)	Percento (%)
Ventolin Inhaler N	20	16,53
Budelin Novolizer	16	13,22
Berodual N	12	9,92
Formovent	11	9,09
Seretide Diskus	10	8,26
Atrovent N	9	7,44
Symbicort Turbuhaler	7	5,79
Ecobec Easi-Breathe	6	4,96
Flutiform	5	4,13
Alvesco	4	3,31
Flixotide Inhaler N	4	3,31
Foster Nexthaler	3	2,48
Flixotide Diskus	2	1,65
Ventilastin Novolizer	2	1,65
Bretaris Genuair	1	0,83
Budiair	1	0,83
Formano	1	0,83
Fullhale	1	0,83
Giona Easyhaler	1	0,83
Handihaler Spiriva	1	0,83
Pulmicort Turbuhaler	1	0,83
Relvar Ellipta	1	0,83
Seretide Inhaler	1	0,83
Serevent Diskus	1	0,83

2-krát denne. Druhou najčastejšou odpoveďou, a to u 21 (20,59 %) respondentov bolo dávkovanie 1-krát denne. Dvadsať (19,61 %) opýtaných užívalo inhalačné lieky len v prípade, ak si to jeho momentálny zdravotný stav vyžaduje. Menej frekventovaným dávkovaním bolo užívanie liekov 3-krát či 4-krát v priebehu dňa (obr. 5).

Viac ako polovica z opýtaných (55,89 %) bola poučená o správnej inhalačnej technike pri používaní inhalačných prípravkov pľúcnyim lekárom, 26 (25,49 %) respondentov zaškoliť zdravotná sestra, v piatich (4,90 %) prípadoch to bol všeobecný lekár a traja (2,94 %) pacienti boli poučení lekárnikom. Len jeden (0,98 %) respondent uviedol, že nebol vôbec poučený o tom, ako má užívať svoje inhalačné lieky. Okrem týchto variant, deväť respondentov označilo v možnosti „Iné“, že poučenie bolo vykonané alergológom/alergologičkou a v jednom prípade pacienta zaškoliť rodič (obr. 6).

Pre poučenie pacientov, čo sa týka nácviku inhalačnej techniky, môžu byť využité rôzne metódy. Najpreferovanejším spôsobom v našom prieskume bola názorná ukážka, pomocou ktorej bola poučená nadpolovičná väčšina pacientov, konkrétne 53,47 % (54 respondentov). U 36 (35,64 %) respondentov bolo využité len teoretické

vysvetlenie. Iba 11 (10,89 %) opýtaných si vyskúšalo nácvik inhalačnej techniky aj prakticky (obr. 7).

Až 76 (74,51 %) respondentov si myslelo (obr. 8), že svoj inhalátor používa správne, 23 (22,55 %) si nebolo úplne istých a tri (2,94 %) opýtani nevedeli posúdiť, či správne inhalujú.

Respondenti mali na škále od 1 (najnižšia spokojnosť) po 5 (najvyššia spokojnosť) ohodnotiť spokojnosť so svojim inhalátorom z hľadiska jednoduchosti použitia; 48 (47,06 %) respondentov vyjadrilo najvyššiu spokojnosť, 25 (24,51 %) opýtaných na škále spokojnosti zvolilo stupeň 4, 22 (21,57 %) stupeň 3 a nízku spokojnosť stupňom 2 a 1 uviedlo spolu sedem (6,86 %) respondentov (obr. 9).

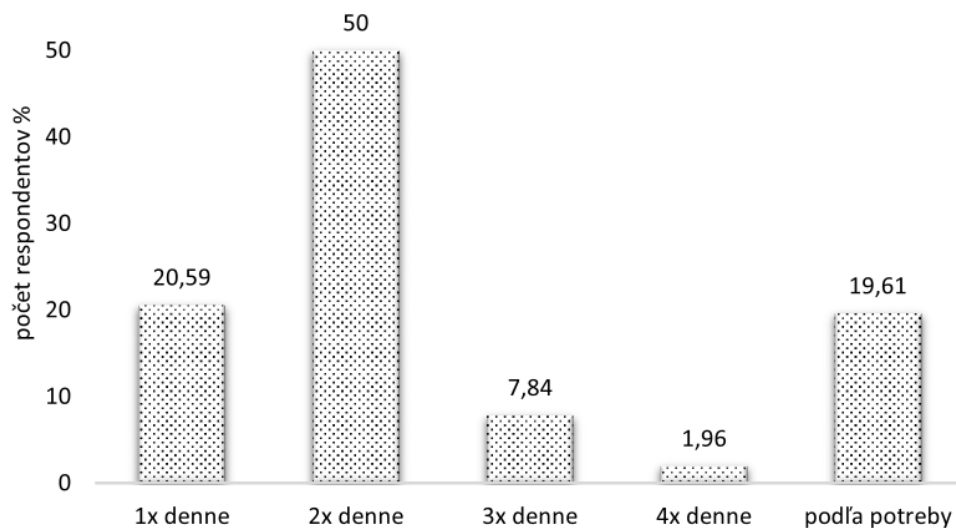
Z tabuľky 4 vyplýva, že najčastejšie používaným typom inhalátora z pomedzi všetkých inhalátorov, ale aj z pomedzi aerosólových dávkovačov (MDI), bol Inhaler, ktorý používalo 54,90 % pacientov. Čo sa týka inhalátorov pre práškovú formu liekov (DPI), medzi najviac využívané patrili Novolizer (17,65 %), Diskus (12,75 %) a Aerolizer (11,76 %).

Pri vyhodnotení všetkých dotazníkov až 64 pacientov (63 %) uviedlo nejakú chybu pri inhalácii svojich liekov.

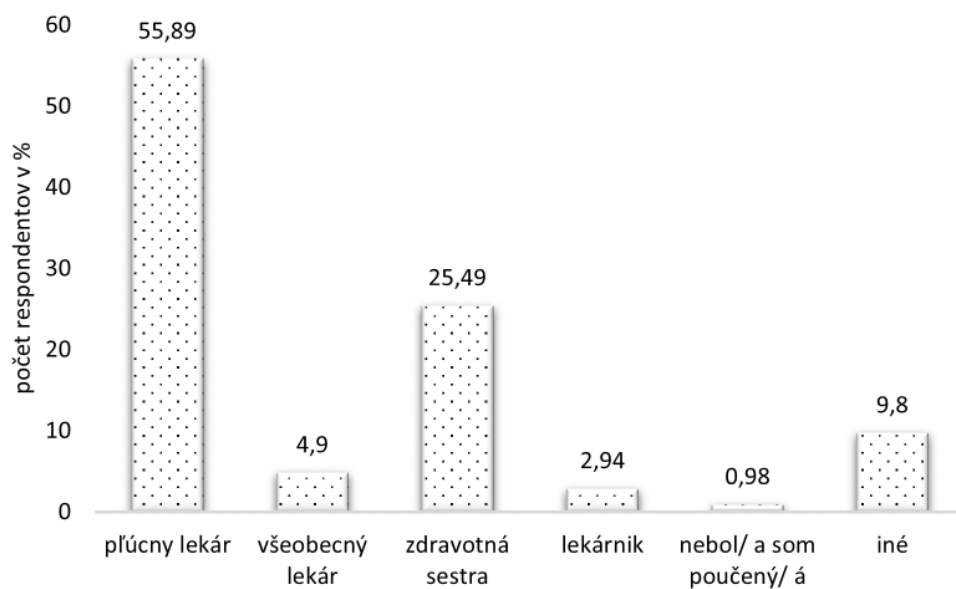
Tab. 3. Doba užívania inhalačných liekov

Doba užívania	Počet (n)	Percento (%)
1 rok	6	5,88
2 roky	12	11,77
3 roky	10	9,80
4 roky	4	3,92
5 rokov	11	10,78
6 rokov	4	3,93
7 rokov	1	0,98
8 rokov	1	0,98
9 rokov	1	0,98
10 rokov	11	10,78
11 rokov	2	1,96
12 rokov	4	3,93
13 rokov	3	2,94
14 rokov	2	1,96
15 rokov	9	8,82
18 rokov	2	1,96
20 rokov	9	8,82
22 rokov	2	1,96
25 rokov	4	3,93
30 rokov	3	2,94
32 rokov	1	0,98

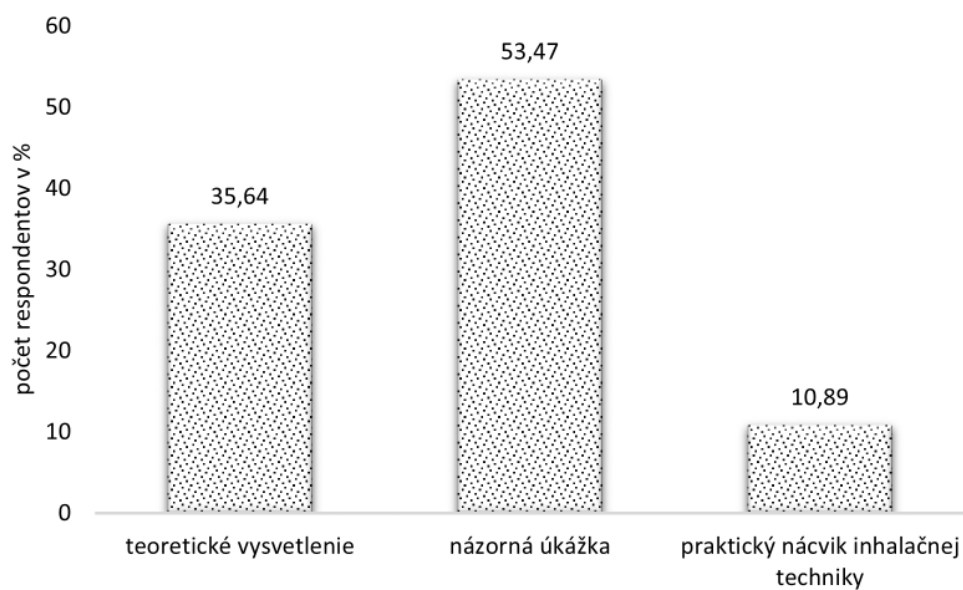




Obr. 5. Frekvencia užívania inhalačných liekov



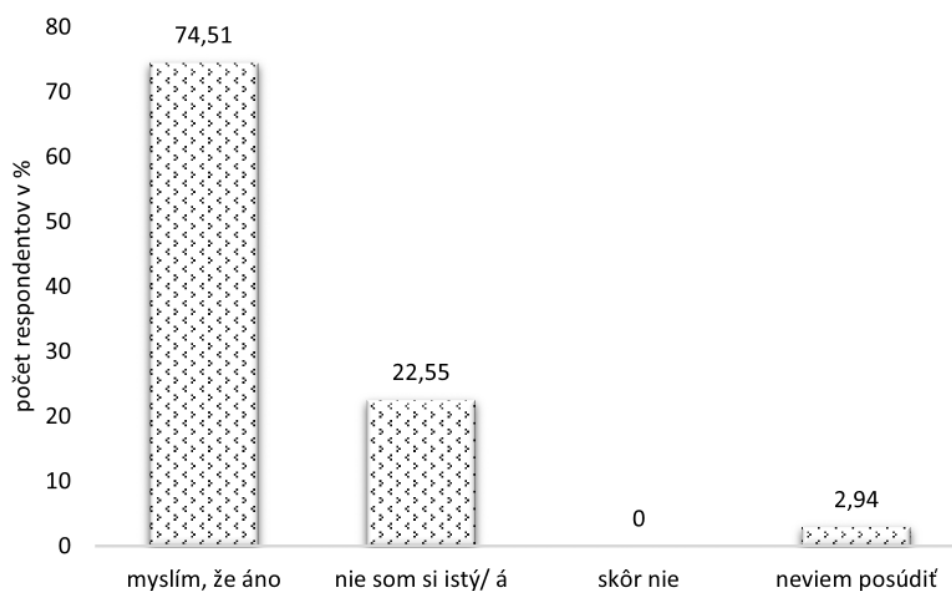
Obr. 6. Poučenie o správnej inhalačnej technike



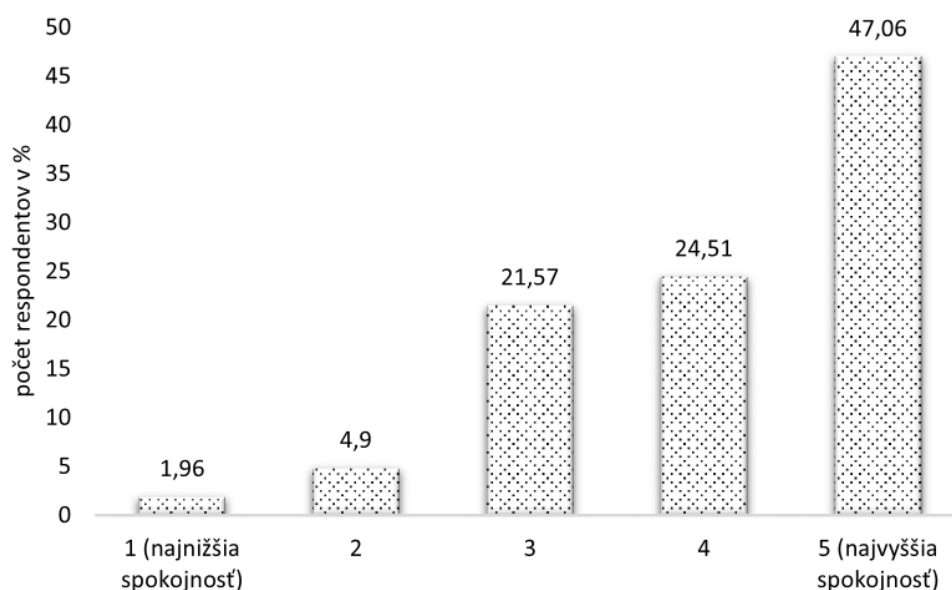
Obr. 7. Spôsob poučenia o inhalačnej technike

Všetkých 52 (100 %) opýtaných, ktorí používajú DPI, pred začiatkom inhalácie najprv vždy odstránia ochranný kryt z inhalátora. Trinásť (25 %) z nich používa jednotlivito dávkované inhalátory a 39 (75 %) respondentov viacdávkové inhalátory. V prípade pacientov užívajúcich jednotlivito dávkované inhalačné systémy (spolu trinásť respondentov), 46,15 % (šesť respondentov) pre perforovanie kapsuly stlačia tlačidlá len raz. Zostávajúcich 53,85 % (sedem respondentov) označilo možnosť „viackrát stlačiť obe tlačidlá, aby som perforoval/a kapsulu“, čo je nesprávne. Štyridsaťtri (82,69 %) pacientov používajúcich DPI pred začatím inhalácie zhlboka vydýchne mimo inhalátor, a teda prevedie správne tento krok inhalácie, zatiaľ čo zvyšných deväť (17,31 %) opýtaných robí chybu v inhalačnej technike tým, že vydýchnu buď do inhalátora alebo pred inhaláciou lieku nevydýchnu

vôbec. V ďalšom kroku inhalácie 49 (94,23 %) pacientov náustok inhalátora pevne zovrie perami, zostávajúcich 5,77 % (traja respondenti) robí chybu, pretože pri inhalácii buď majú ústa otvorené alebo do náustka zahryzávajú. Tridsaťpäť (67,31 %) respondentov pri použití DPI inhalátora sa nadýchne čo najrýchlejšie a najhlbšie. Až 32,69 % (17 respondentov) opýtaných robí pomalý a hlboký nádych, čo je v prípade DPI nežiaduce. U 18 (34,62 %) pacientov nasleduje zadržanie dychu len na menej ako 5 sekúnd, čo sa nepovažuje za dostatočné. Naopak 65,38 % (34 respondentov) z nich prevedie dostatočné zadržanie dychu v rozmedzí 5–10 sekúnd. Len 51,92 % (27 respondentov) opýtaných vydychuje po inhalácii ústami, zatiaľ čo 48,08 % (25 respondentov) nosom. Všetkých 52 (100 %) respondentov používajúcich inhalátory pre práškovú formu lieku (DPI) nezabúda



Obr. 8. Posúdenie správnosti používania inhalátora



Obr. 9. Spokojnosť s inhalátorom

Tab. 4. Typ inhalátora

Typ inhalátora	Počet (n)	Percento (%)
<b>DPI</b>		
Novolizer	18	17,65
Diskus	13	12,75
Aerolizer	12	11,76
Turbuhaler	8	7,84
Nexthaler	3	2,94
Easyhaler	1	0,98
Ellipta	1	0,98
Genuair	1	0,98
Handihaler	1	0,98
Breezhaler	0	0
<b>MDI</b>		
Inhaler	56	54,90
Easi-Breathe	6	5,88
Jet-Spacer	1	0,98
Respimat	0	0

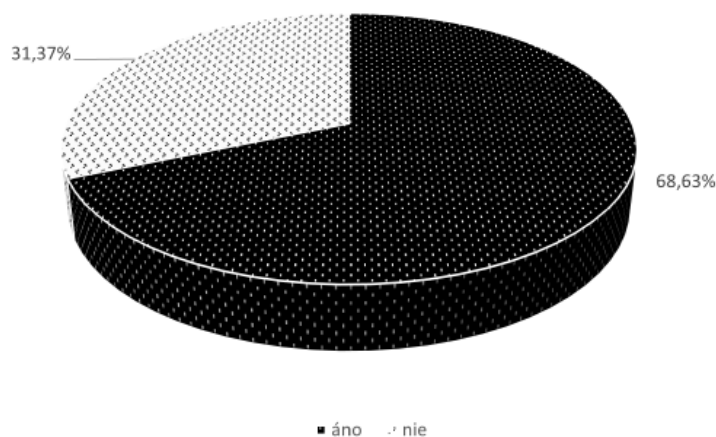
Tab. 5. Správna aplikácia inhalátorov pre práškovú formu lieku (DPI)

	Možnosti	DPI	
		n	%
Pred začiatkom inhalácie najprv vždy odstránim ochranný kryt z inhalátora:	áno	52	100
	nie	0	0
V prípade jednotlivo dávkovaných inhalátorov, vložím kapsulu do komory a následne:	1-krát súčasne stlačím obe tlačidlá, aby som perforoval/a kapsulu	6	11,53
	viackrát stlačím obe tlačidlá, aby som perforoval/a kapsulu	7	13,46
	nepoužívam jednotlivo dávkované inhalátory	39	75
Pred začatím inhalácie:	zhlboka vydýchnem mimo inhalátor	43	82,69
	zhlboka vydýchnem do inhalátora	6	11,54
	nevydýchnem pred aplikáciou lieku	3	5,77
Keď ústny nástavec inhalátora umiestnim do úst:	pevne ho zovriem perami	49	94,23
	zahryznem doň	2	3,85
	ústa mám otvorené	1	1,92
Pre uvoľnenie dávky sa nadýchnem z inhalátora:	čo najrýchlejšie a čo najhlbšie	35	67,31
	čo najpomalšie a čo najhlbšie	17	32,69
Po nádychu z inhalátora zadržím dych na:	menej ako 5 sekúnd	18	34,62
	na 5–10 sekúnd	34	65,38
Následne vyberiem náustok z úst a vydýchnem:	nosom	25	48,08
	ústami	27	51,92
Po skončení inhalácie nasadím späť ochranný kryt:	áno	52	100
	nie	0	0

nasadiť späť ochranný kryt na inhalátor po skončení inhalácie (tab. 5).

Podobne ako pri používaní inhalátorov pre práškovú formu lieku aj pri použití aerosólových dávkovačov 100 % (61) respondentov nezabúda odstrániť ochranný kryt z inhalátora pred začatím samotnej inhalácie. Pri používaní MDI bez HFA (hydrofluóralkán) je dôležité pred použitím inhalátor pretrepávať niekoľko sekúnd, čo v našom prieskume uskutočnilo 81,97 % (50 respondentov) pacientov užívajúcich tieto MDI bez HFA,

18,03 % (jedenásť respondentov) na tento krok správnej inhalácie zabúda a inhalátor nepretrepáva. Až 77,05 % (47 respondentov) opýtaných, ktorí používajú MDI, pred začiatkom inhalácie vydýchne mimo inhalátor. Zvyšných 22,95 % (14 respondentov) nepostupuje v tomto kroku inhalácie správne, pretože vydychujú do inhalátora alebo neuskutočnia výdych pred aplikáciou lieku. V ďalšom kroku označilo 56 (91,80 %) respondentov správnu možnosť, a to, že po umiestnení inhalátora do úst náustok pevne zovrú perami, zatiaľ čo 8,20 % (päť respon-



Obr. 10. Kontrola inhalačnej techniky lekárnikom

Tab. 6. Správna aplikácia aerosólových dávkovačov (MDI)

	Možnosti	MDI	
		n	%
Pred začiatkom inhalácie najprv vždy odstránim ochranný kryt z inhalátora:	áno	61	100
	nie	0	0
Inhalátor pred prvým použitím:	pretrepem niekoľko sekúnd	50	81,97
	inhalátor nepretrepávam	11	18,03
Pred začatím inhalácie:	zhlboka vydýchnem mimo inhalátor	47	77,05
	zhlboka vydýchnem do inhalátora	4	6,56
	nevydýchnem pred aplikáciou lieku	10	16,39
Keď ústny nástavec inhalátora umiestnim do úst:	pevne ho zovriem perami	56	91,80
	zahryznem doň	5	8,20
	ústa mám otvorené	0	0
Pre uvoľnenie dávky:	stlačím dno nádoby inhalátora a súčasne sa pomaly a hlboko nadýchnem	56	91,80
	najprv stlačím dno nádoby a až potom sa pomaly a hlboko nadýchnem	5	8,20
Po nádychu z inhalátora zadržím dych na:	menej ako 5 sekúnd	25	40,98
	na 5–10 sekúnd	36	59,02
Následne vyberiem náustok z úst a vydýchnem:	nosom	27	44,26
	ústami	34	55,74
Po skončení inhalácie nasadím späť ochranný kryt:	áno	61	100
	nie	0	0

dentov) opýtaných do náustka zahryzáva a nepostupuje tak správne. V prípade MDI (Inhaler, Jet-Spacer, Respimat) veľmi dôležitým krokom inhalácie je zosúladenie stlačenia a nádychu z inhalátora, čo v našom prípade uskutočnilo 56 (91,80 %) pacientov používajúcich tieto MDI. Päť respondentov (8,20 %) najprv stlačí dno nádoby inhalátora a až potom sa pomaly a hlboko nádychne. Zadržanie dychu na menej ako 5 sekúnd uskutočňuje v prípade MDI 25 (40,98 %) respondentov. Viac ako polovica, konkrétne 59,02 % (36 respondentov), po nádychu z inhalátora zadrží dych na 5–10 sekúnd, čím prevedie správny krok inhalácie. Pri použití MDI 55,74 % (34 respondentov) pacientov pri inhalácii lieku vydychuje ústami a 44,26 % (27 respondentov) nosom. Všetci pacienti používajúci aerosólové dávkovače (MDI) po skončení inhalácie nasadia späť ochranný kryt (tab. 6).

Až 70 (68,63 %) respondentov odpovedalo na poslednú otázku kladne, a teda ocenili by kontrolu zvládania inhalačnej techniky pri vyzdvihnutí svojho lieku v lekárni (obr. 10). Zvyšných 32 (31,37 %) pacientov by takúto možnosť neuvítalo.

Hlavnú úlohu pri liečbe astmy a chronickej obštrukčnej choroby pľúc (CHOCHP) zohráva inhalačná liečba. Prináša vysokú lokálnu koncentráciu liečiva priamo do respiračného traktu, dosahuje rýchle farmakologické účinky a znižuje systémové vedľajšie účinky. Každému pacientovi je potrebné vybrať vhodný liek, vhodnú dávku aj vhodný liečebný režim, ale tiež vybrať aj vhodný inhalačný systém, s ktorým je nutné pacienta a často aj jeho sociálne okolie naučiť zaobchádzať a opakovane kontrolovať správnu inhalačnú techniku. Správnu inhalačnú techniku by mal vedieť pacientovi na inhalačnom systéme s placebo predviesť lekár, ktorý inhalačný systém predpisuje, ale tiež lekárnik, ktorý inhalačný systém, respektíve inhalačný liek, vydáva. Úlohou lekárnika je v rámci dispenzačného minima poskytnúť pacientovi informácie nielen o dávkovaní, ale aj o správnej aplikácii lieku prostredníctvom inhalačného systému. Nesprávna inhalačná technika a nevhodne zvolený inhalačný systém môžu byť príčinou liečebných neúspechov. Nesprávne použitie inhalátorov môže znížiť adhérenciu pacienta, zvýšiť dávkovanie liekov a vyvolať nežiaduce účinky inhalačných liekov<sup>16</sup>.

Cieľom výskumu bolo zistiť, aké percento pacientov postupuje pri aplikácii svojich liekov správne, aké inhalačné systémy sú preferované pri liečbe spomínaných respiračných ochorení, aké najčastejšie chyby v inhalačnej technike robia pacienti pri používaní inhalátorov a aký je postoj pacientov k možnosti edukácie zo strany verejného lekárnika.

Pre získanie potrebných dát bol zvolený dotazníkový prieskum, ktorého sa zúčastnilo 102 respondentov rôzneho pohlavia, veku, vzdelania a kraja. Získané údaje preukázali, že 83,33 % zúčastnených respondentov trpí prieduškovou astmou a 9,80 % chronickou obštrukčnou chorobou pľúc. Zatiaľ, čo sa astma vyskytla u pacientov všetkých vekových kategórií, pacienti trpiaci CHOCHP tvorili vekovú skupinu od 36 rokov, čím sa preukázalo, že toto ochorenie postihuje hlavne ľudí vyššieho veku,

okolo 40. roku života<sup>11</sup>). Prieskumu sa zúčastnilo 70,59 % žien a 29,41 % mužov. Astmatickými pacientmi boli prevažne ženy, naopak CHOCHP sa vyskytovala častejšie u mužov. Tento fakt potvrdzujú aj štatistické údaje Národného centra zdravotníckych informácií z roku 2018. Prevažná väčšina našich respondentov pochádzala z Prešovského kraja. Práve táto oblasť Slovenska sa podľa údajov NCZI vyznačuje najvyšším počtom dispenzarizovaných pacientov so spomínanými chronickými respiračnými ochoreniami dolných dýchacích ciest<sup>4</sup>).

V dnešnej dobe existuje na trhu mnoho typov inhalátorov a je len na vzájomnej konzultácii lekára a pacienta, aký typ inhalačného systému lekár pre daného pacienta zvolí<sup>22</sup>). V tomto prieskume najčastejšie používaným inhalátorom zo všetkých typov a tiež z pomedzi aerosólových dávkovačov medzi pacientmi bol Inhaler. Používala ho nadpolovičná väčšina respondentov, konkrétne 54,9 %. Z inhalátorov pre práškovú formu liekov boli najviac používanými Novolizer (17,65 %), Diskus (12,75 %) a Aerolizer (11,76 %). Na základe toho, aký typ inhalátora pacienti označili, sa tiež podarilo zistiť, že 41 (40,20 %) respondentov používa len inhalátor pre práškovú formu lieku (DPI), jedenásť (10,78 %) má predpísanú kombináciu DPI a MDI a takmer polovica (49,02 %) pacientov používa len aerosólový dávkovač (MDI). Dôležitým aspektom v prípade inhalátorov je jednoduchosť ich použitia. Čím je inhalátor jednoduchší na použitie, tým sa eliminuje výskyt chýb pri inhalácii lieku a samozrejme sa zlepšuje aj compliance pacienta. V našom dotazníkovom prieskume až 47,06 % opýtaných na stupnici od 1 (najnižšia spokojnosť) po 5 (najvyššia spokojnosť) vyjadrilo najvyššiu spokojnosť s inhalátorom, ktorý v súčasnosti používajú. Ďalších 24,51 % opýtaných na škále spokojnosti zvolilo stupeň 4.

Pre dosiahnutie úplného terapeutického účinku u pacientov s astmou a CHOCHP je veľmi dôležité správne prevedenie inhalácie<sup>21</sup>). Chyby v inhalačnej technike sa vyskytujú u oboch typov inhalátorov, u MDI aj DPI, avšak identifikácia konkrétnych chýb môže viesť k zlepšeniu výsledkov, pretože, ako bolo preukázané, inhalačné chyby možno napraviť zvýšeným tréningom<sup>8</sup>). Ukázalo sa, že pacienti častejšie robia chyby pri inhalácii lieku v prípade použitia DPI inhalátora ako pri použití MDI, a to aj napriek tomu, že prieskumy poukazujú na vyššiu chybovosť pri aerosólových dávkovačoch<sup>23, 24</sup>). Najčastejšou chybou pri inhalácii u oboch typov inhalátorov je zadržanie dychu na nedostatočne dlhý čas (menej ako 5 sekúnd), čím sa nezabezpečí dobrá depozícia liečiva v pľúcach. V prípade MDI medzi časté chyby patrí aj výdych do inhalátora/nevydýchnutie pred samotnou inhaláciou (22,95 %) či nepretrepanie inhalátora na úvod inhalácie (18,03 %), týka sa to starších typov inhalátorov bez HFA roztokov. Zlá koordinácia medzi stlačením a nádychom z inhalátora, ktorá je podľa viacerých zdrojov<sup>16, 25</sup>) najproblémovejším krokom inhalácie pri MDI, sa v prieskume vyskytla len u 8,20 % respondentov. Na základe pozorovacej štúdie realizovanej v Japonsku najčastejšie sa vyskytujúcou chybou u DPI inhalátora je neprevedenie rýchleho a hlbokého nádychu,

ktorý je pre tento typ charakteristický<sup>16</sup>). V uskutočnenom prieskume v tomto kroku inhalácie zlyháva 32,69 % pacientov. Čo sa týka pacientov používajúcich jednotlivo dávkované DPI inhalátory, až 53,85 % z nich pred začatím inhalácie nepostupuje správne, pretože viackrát stláčajú tlačidlá pre perforovanie kapsuly. V štúdií v Portugalsku medzi najčastejšie chyby patrili zlá koordinácia medzi stláčaním a nádychom z inhalátora (43,8 %), neprevedenie hlbokého nádychu a výdychu pred samotnou inhaláciou (50 %) a nezadržanie dychu po inhalácii (62,5 %). Častou chybou pri pacientoch užívajúcich kortikoidy bolo aj nevypláchnutie si úst vodou po inhalácii (60,7 %) <sup>26</sup>). Podľa Kašákovvej a Kašáka pacienti robia okrem predpokladaných chýb aj tzv. raritné chyby, ako je neodstránenie ochranného krytu z náustku<sup>14</sup>), čo sa však v dotazníkovom prieskume nepotvrdilo. V našom prieskume len 51,92 % (27 respondentov) opýtaných, ktorí používajú DPI, označilo, že vydychuje po inhalácii ústami, zatiaľ čo 48,08 % (25 respondentov) nosom. Pri použití MDI 55,74 % (34 respondentov) pacientov pri inhalácii lieku vydychuje ústami a 44,26 % (27 respondentov) nosom. Informácie vo väčšine SPC inhalačných liekov neuvádzajú presne výdych nosom alebo ústami. Odporúča sa však skôr výdych ústami<sup>27</sup>).

Keďže takmer 70 % opýtaných užíva svoje inhalačné lieky dlhšie ako 5 rokov, predpokladali by sme, že budú vedieť inhalovať bez chýb. Po vyhodnotení všetkých dotazníkov z celkového počtu pacientov trpiacich respiračnými ochoreniami sa až u 63 % respondentov vyskytla nejaká chyba pri inhalácii svojich liekov. Podľa údajov Globálnej iniciatívy pre astmu je počet pacientov, ktorí nesprávne inhalujú svoje lieky, oveľa vyšší a z celosvetového hľadiska sa pohybuje až do 80 %<sup>19</sup>). Jednou z príčin môže byť to, že len okolo 10 % ľudí si pri poučení o správnej inhalácii lieku vyskúšalo praktický nácvik inhalačnej techniky a u ďalších 35,64 % bolo využité len teoretické vysvetlenie. K zlepšeniu by mohlo dopomôcť častejšie využívanie nácviku s trenažérom.

V konečnom dôsledku vplyv na dodržiavanie inhalačnej terapie a na zlepšenie inhalačnej techniky u pacientov majú podľa niekoľkoročnej štúdie verejných lekární<sup>21</sup>). Napriek tomu, že ich úloha v tejto oblasti nie je dostatočne uznaná, v tomto prieskume 68,63 % pacientov uviedlo, že by radi uvítali kontrolu zvládania ich inhalačnej techniky pri výdaji inhalačného lieku v lekární, a to napriek tomu, že viac ako 70 % z nich si myslí, že svoj inhalátor dokáže používať správne. Navyše podľa pozorovanej štúdie uskutočnenej v kardiovaskulárnom a respiračnom centre v Japonsku viac ako 90 % pacientov, ktorí dostali pokyny od lekárníkov trikrát po sebe, dosiahli maximálne inhalačné schopnosti<sup>16</sup>).

## Záver

Získané výsledky preukázali, že chyby v inhalačnej technike sú stále aktuálnym problémom pre nadpolovičnú väčšinu pacientov s respiračnými ochoreniami. Farmaceuti môžu zohrávať dôležitú úlohu v procese poučenia pacienta o správnej aplikácii inhalačných prípravkov a pri

nášať prospech pre zlepšovanie inhalačnej techniky a tým aj úspešnosti liečby pacientov s respiračnými ochoreniami.

**Stret záujmov:** žiadny.

## Literatúra

1. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention [online] 2020 [cit. 2020-09-14]. Dostupné na: [https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-full-report\\_-final\\_-\\_wms.pdf](https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-full-report_-final_-_wms.pdf)
2. Kašák V. Bronchiálna astma. Medicína pro praxi [online] 2010; 7(8 a 9), 319–321 [cit. 2020-06-19]. Dostupné na: <https://www.medicinapropraxi.cz>
3. Xie M., et al. Trends in prevalence and incidence of chronic respiratory diseases from 1990 to 2017. Respir. Res. 2020; 21 (49). [cit. 2020-08-12] Dostupné na: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-020-1291-8>
4. Národné centrum zdravotníckych informácií. Zdravotnícka ročenka SR 2018 [online] 2019 [cit. 2020-06-21]. Dostupné na: [http://www.nczisk.sk/Documents/rocnky/2018/Zdravotnicka\\_rocnka\\_Slovenskej\\_republiky\\_2018.pdf](http://www.nczisk.sk/Documents/rocnky/2018/Zdravotnicka_rocnka_Slovenskej_republiky_2018.pdf)
5. ZDRAVOTNICTVÍ ČR: Stručný přehled činností oboru pneumologie a fúzeologie za období 2007–2018. Ústav zdravotníckych informácií a statistiky ČR 2019 [cit. 2020-09-14]. Dostupné na: [www.uzis.cz](http://www.uzis.cz)
6. Rang H. P., et al. Respiratory system. Rang & Dale's Pharmacology. 7<sup>th</sup> Edition. Edinburgh: Churchill Livingstone 2012.
7. Teřl M., et al. Doporučený postup diagnostiky a léčby bronchiálního astmatu [online]. Semily: Geum 2015 [cit. 2020-06-20]. Dostupné na: <http://www.csaki.cz>
8. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Pocket Guide to COPD Diagnosis, Management and Prevention [online] 2020 [cit. 2020-09-14]. Dostupné na: <https://goldcopd.org>
9. Gray A. H., et al. Clinical Pharmacy Pocket Companion [online]. London: Pharmaceutical Press 2015 [cit. 2020-06-22], 2. vydanie. Dostupné na: <http://ebookcentral.proquest.com>
10. Drugdová M., et al. Chronická obštrukčná choroba pľúc. Národné smernice pre prevenciu a terapiu [online] 2011 [cit. 2020-06-21]. Dostupné na: <http://www.copdplatform.com>
11. Rozborilová E. Chronická obštrukčná choroba pľúc. Via practica [online] 2005; 2(2), 89–93 [cit. 2020-06-22]. Dostupné na: <http://www.solen.sk>
12. Vondra V., Vondrová I. Diferenciální diagnóza a terapie chronické obštrukční plicní nemoci a astmatu. Interní Med. 2012; 14(10), 350–356.
13. Pauk N. Fenotyp překryvu CHOPN s astmatem (ACOS). Farmakoterapie 2014; 1 [cit. 2020-08-12]. Dostupné na: [www.farmakoterapie.cz](http://www.farmakoterapie.cz)
14. Kašáková E., Kašák V. Inhalační systémy na českém trhu pro léčbu pacientů s chronickou obštrukcí průdušek. Praktické lékařství [online] 2015; 11(1), 16–18 [cit. 2020-06-18]. Dostupné na: <http://www.praktickelekarenstvi.cz>
15. Rau J. L. The Inhalation of Drugs: Advantages and Problems. Respiratory Care [online] 2005; 50(3), 367–382 [cit. 2020-06-21]. Dostupné na: <http://rc.rcjournal.com>
16. Takaku Y., et al. How many instructions are required to correct inhalation errors in patients with asthma and chronic obstructive

- pulmonary disease? *Respiratory Medicine* [online] 2017; 123, 110–115 [cit. 2020-06-23]. Dostupné na: <http://www.sciencedirect.com>
17. **Wu A.** A Pharmacist's Role in the Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *US Pharmacist* [online] 2016; 41(7), 42–46 [cit. 2020-06-22]. Dostupné na: <https://www.uspharmacist.com>
  18. **Kašák V.** Nové inhalační systémy užívané v léčbě chronických nemocí dýchacího **ústrojí** s obstrukcí **dýchacích** cest. *Remedia* [online] 2007; 17(1), 26–38 [cit. 2020-06-26]. Dostupné na: <http://www.remédia.cz>
  19. Pocket guide for asthma management and prevention (for adults and children older than 5 years). Global Initiative for Asthma [online] 2018 [cit. 2020-06-23]. Dostupné na: <https://ginasthma.org>
  20. **Terrie Y. C.** Managing asthma: The pharmacist's role. *Pharmacy Times* [online] 2014; 80(4), [cit. 2020-06-28]. Dostupné na: <http://www.pharmacytimes.com>
  21. **Hesso I., Gebara S. N., Kayyali R.** Impact of community pharmacists in COPD management: Inhalation technique and medication adherence. *Respiratory Medicine* [online] 2016; 118, 22–30 [cit. 2020-06-17]. Dostupné na: <http://www.sciencedirect.com>
  22. **Snopková M., et al.** *Lekárenská prax.* Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave 2017.
  23. **Price D. B., et al.** Inhaler errors in the CRITIKAL study: Type, frequency, and association with asthma outcomes. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* [online] 2017; 5(4), 1071–1081 [cit. 2020-5-21]. Dostupné na: <https://search.proquest.com>
  24. **Teřl M.** Léčba astmatu – chyby a omyly každodenní praxe. *Medicína pro praxi* [online] 2013; 10(3), 97–103 [cit. 2020-5-25]. Dostupné na: <https://www.solen.cz>
  25. **Vondra V.** Optimální inhalace antiastmatik a chyby při inhalování. *Praktické lékárenství* [online] 2009; 5(4), 179–181 [cit. 2020-5-26]. Dostupné na: <https://www.praktickelekarenstvi.cz>
  26. **Castel-Branco M. M., Fontes A., Figueiredo I. V.** Identification of inhaler technique errors with a routine procedure in Portuguese community pharmacy. *Pharmacy Practice* [online] 2017; 15(4), Article number 1072 [cit. 2020-5-26]. Dostupné na: <https://www.scopus.com>
  27. Correct inhalation. *Deutsche Atemwegsliga e.V.* [cit. 2020-09-14]. Dostupné na: <https://www.atemwegsliga.de/en/index.html>

# Simultaneous determination of amoxicillin and potassium clavulanate in combined medicinal forms: procedure transfer from HPLC to UPLC

## Současné stanovení amoxicilinu a klavulanátu draselného v kombinovaných lékových formách: přenos postupu z HPLC na UPLC

Anna O. Dobrova • Olga S. Golovchenko • Ivan V. Bezruk • Liudas Ivanauskas • Victoriya Georgiyants

Received May 26, 2020 / Accepted September 18, 2020

### Summary

This article presents the results of transferring a high-performance liquid chromatography (HPLC) procedure for the assay of amoxicillin and potassium clavulanate in tablets to the ultra-performed liquid chromatography (UPLC) conditions. Since the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU) does not contain the monograph for the simultaneous analysis of amoxicillin and clavulanic acid, the British Pharmacopoeia procedure was used. Parameters of the procedure were optimized to fit the UPLC and to make a better performance. Transfer of the method to the UPLC conditions allowed to shorten the run time from 15 min to 7.5 min, which makes the process less time-consuming and more cost-effective. The upgraded procedure was further validated. Validation of both methods was performed in terms of linearity, precision, accuracy, specificity and stability. HPLC method was verified to later implementation into the SPhU's monograph. Afterwards, the methods were compared in terms of their impact on the environment using the eco-scale that included hazards of the solution, the amount of produced wastes, the impact on environmental and laboratory staff, etc. Both methods appeared to be eco-friendly with a moderate advantage of UPLC method. Moreover, the statistical comparison

was performed using Passing Bablok regression method. It showed that both methods are statistically comparable.

**Key words:** amoxicillin/clavulanate formulations • UPLC • HPLC • method comparison • green chemistry

### Souhrn

Článek představuje výsledky přenosu postupu vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro stanovení amoxicilinu a klavulanátu draselného v tabletách do podmínek ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie (UPLC). Protože Státní lékopis Ukrajiny (SPhU) neobsahuje monografii pro simultánní analýzu amoxicilinu a kyseliny klavulanové, byl použitý postup podle Britského lékopisu. Parametry postupu byly optimalizovány tak, aby vyhovovaly UPLC a zlepšily výkon. Přenos metody do podmínek UPLC umožnil zkrátit dobu chodu z 15 minut na 7,5 minuty, což činí proces méně časově náročným a nákladově efektivnějším. Vylepšený postup byl dále ověřen. Validace obou metod byla provedena z hlediska linearity, přesnosti, správnosti, specificty a stability. Metoda HPLC byla ověřena pro pozdější implementaci do monografie SPhU. Poté byly metody porovnány z hlediska jejich dopadu na životní prostředí pomocí ekologické stupnice, která zahrnovala rizika řešení, množství vyprodukovaných odpadů, dopad na pracovníky životního prostředí a laboratoře atd. Obě metody se ukázaly být ekologické s mírnou výhodou pro metodu UPLC. Statistické srovnání bylo navíc provedeno regresní metodou Passing Bablok. Ukázalo se, že obě metody jsou statisticky srovnatelné.

**Klíčová slova:** formulace amoxicilin/klavulanát • UPLC • HPLC • srovnání metod • zelená chemie

Anna O. Dobrova – PhD student ✉ • O. S. Golovchenko • I. V. Bezruk • V. Georgiyants  
Department of Pharmaceutical Chemistry  
National University of Pharmacy  
61100 Valentynivska Str. 4, Kharkiv, Ukraine  
e-mail: anna.dobrova08@gmail.com

L. Ivanauskas  
Department of Analytical and Toxicological Chemistry  
Lithuanian University of Health Sciences  
A. Mickevičiaus Str. 9, LT 44307 Kaunas, Lithuania

### Introduction

Amoxicillin is a broad-spectrum semi-synthetic  $\beta$ -lactam antibiotic. Recently, it has been widely used





standard were placed into a 200 mL volumetric flask, dissolved in water, filled up to the mark, and mixed.

**Placebo solution.** Accurate weight of placebo (500 mg) was placed in a volumetric flask of a volume of 500 mL, 400 mL of water were added, shaken at a speed of 400 rpm (Shaker SM 30 B; Edmund Buhler, Germany) for 20 minutes, filled up to the volume of 500 mL, and mixed.

All solutions were filtered through a membrane filter with a pore diameter of 0.45  $\mu\text{m}$ .

#### **Chromatographic conditions for HPLC analysis**

The separation of components was performed on a RP column ACE C18 (250 mm  $\times$  4.6 mm, with particle size of 5  $\mu\text{m}$ , Pennsylvania, USA). The composition of the mobile phase was buffer solution pH 4.4 and methanol in the ratio 95 : 5, respectively. The flow rate was set at 1.0 mL/min. The wavelength was set at 220 nm. 20  $\mu\text{L}$  was injected into the chromatographic system.

#### **Chromatographic conditions for UPLC method**

The analysis was performed with an ACQUITY UPLC BEH C18 column (50 mm  $\times$  2.1 mm, with particles size 1.7  $\mu\text{m}$ , Milford, USA). The composition of the mobile phase was buffer solution with pH 4.4 and methanol in the ratio 98 : 2, respectively. The detection was performed at 220 nm with a flow rate at 0.1 mL/min. The volume of injection was 0.2  $\mu\text{L}$ .

#### **Method validation**

Both HPLC and UPLC procedures were validated according to the requirements of ICH guidelines and the State Pharmacopoeia of Ukraine in terms of linearity, precision, accuracy, specificity, and stability<sup>9, 10</sup>.

#### **Assessment of methods influence on the environment**

Parameters of the analytical methods such as the number of reagents, hazards, energy, and waste define its impact on the environment<sup>11, 12</sup>. Determination of method greenness was performed using Eco-scale, where the ideal value is 100. If some parameters of analysis differ from the principles of green chemistry, penalty points are assigned. The sum of

penalty points obtained after revision is taken into account for Eco-scale calculation using the following formula:

- Analytical Eco-scale = 100 – penalty points
- > 75 represents an excellent green method
- > 50 represents an acceptable green method
- < 50 represents an inadequate green method

Globally Harmonized System (GHS) of Classification and Labeling of Chemicals provides full information about the determination of safety class of reagent based on physical, environmental, and health hazards<sup>13</sup>. M. Tobiszewski et al. proposes determination of penalty points for each reagent by multiplying the amount of GHS hazard pictograms by a hazard degree (for instance, a warning is 1, and danger, 2)<sup>14</sup>. Also, the energy consumptions for HPLC and UPLC are  $\leq 1.5$  kWh per sample and  $< 0.1$  kWh per sample, respectively<sup>14</sup>. Besides, hazards and generation of wastes were taken into account.

#### **Method comparison between HPLC and UPLC**

Five batches (27 samples) of combined amoxicillin/potassium clavulanate tablets previously analyzed by HPLC were re-analyzed by the described UPLC method. For all analytes, the correlation between the methods was tested by a Passing-Bablok fit. It was chosen since the preliminary check of the data samples for compliance with the normal distribution showed that data samples of amoxicillin (measured by UPLC method) and potassium clavulanate (measured by HPLC) did not correspond to a normal distribution ( $p < 0.01$ ). This limits the use of ordinary least squares method for regression analysis. Therefore, the non-parametric Passing-Bablok method was taken<sup>15</sup>. Comparison procedure was performed by Microsoft Excel 2013.

## **Results and discussion**

#### **Verification of HPLC Pharmacopoeial method**

The British Pharmacopoeia proposes to use the HPLC method for the assay of medicines containing

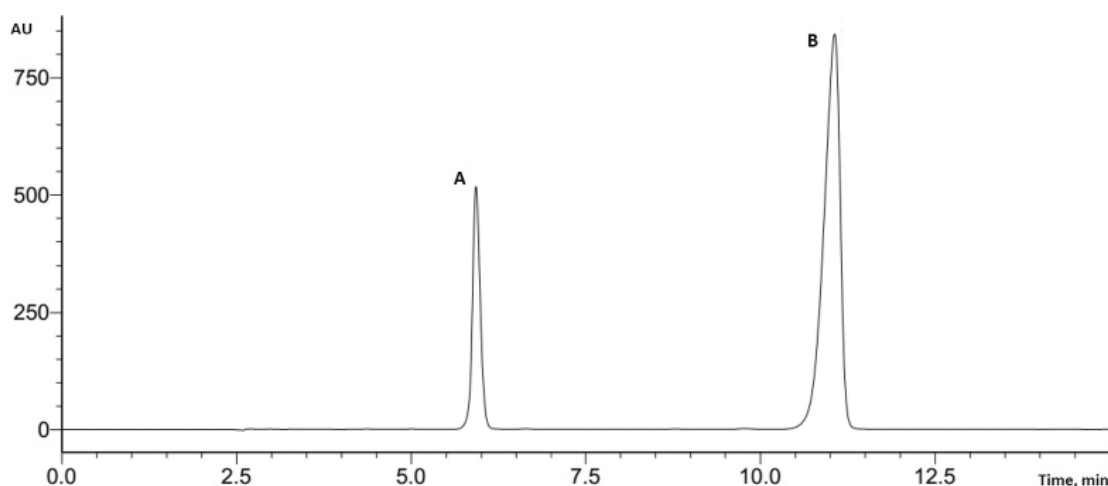


Fig. 2. Typical HPLC chromatogram (A – potassium clavulanate, B – amoxicillin)

potassium clavulanate and amoxicillin<sup>6</sup>). For separation of components, a stainless steel column (250 mm × 4.6 mm, with a particle size of 5 μm) packed with octadecylsilyl silica gel for chromatography is required. The mobile phase is a mixture of 5 volumes of methanol and 95 volumes of a 0.78% solution of sodium phosphate monobasic adjusted to pH 4.4 with phosphoric acid. The flow rate of the mobile phase should be 2 mL/min. The volume of injection is 20 μL, and the detection wavelength is set at 220 nm.

When the parameters on the HPLC system were applied, a high pressure was observed at this flow rate. Considering that, the flow rate was reduced to 1 mL/min. These changed parameters were used in further analysis of tablets containing potassium clavulanate and amoxicillin (Fig. 2).

#### **Transfer of HPLC method to UPLC**

Initially, the flow rate was reduced to 0.2 mL/min, and a smaller volume of the injection was applied (1 μL). The analysis showed no separation between

the components; therefore, the flow rate was changed to 0.1 mL/min.

After reducing the flow rate, the coefficient of separation between components was 2.02 but still, the peak of potassium clavulanate was close to the void volume.

To increase separation, different buffer pH was tried in the range of 4.0–6.0. Changed conditions had no improvements for compounds separation, thus the buffer with 4.4 pH was left.

In the next step, we changed the ratio between buffer and methanol to 97 : 3 and reduced the volume of injection to 0.5 μL. As a result, the separation between peaks became greater. Moreover, retention time for the peak of potassium clavulanate increased significantly and moved from the void volume.

And at the final step, we changed the ratio between buffer and methanol to 98 : 2 and set a volume of injection at 0.2 μL.

These conditions were used in the assay of potassium clavulanate and amoxicillin in tablets (Fig. 3).

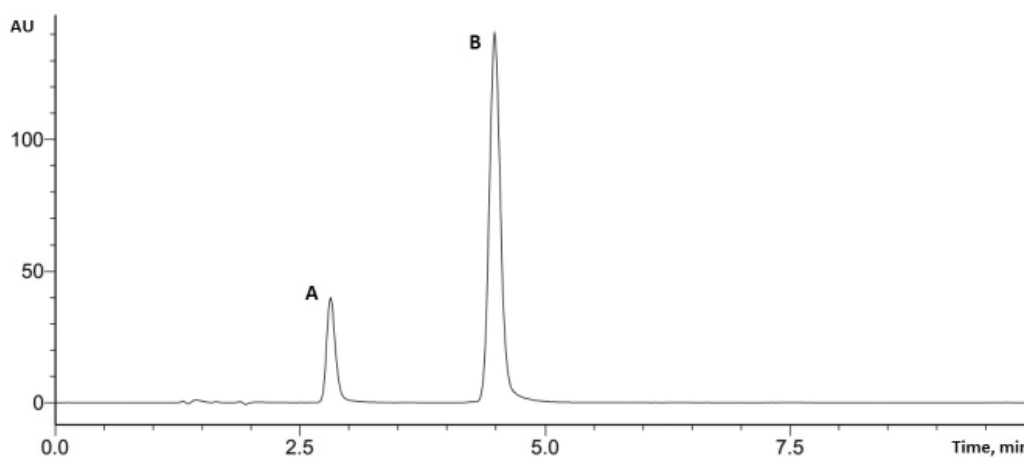


Fig. 2. Typical HPLC chromatogram (A – potassium clavulanate, B – amoxicillin)

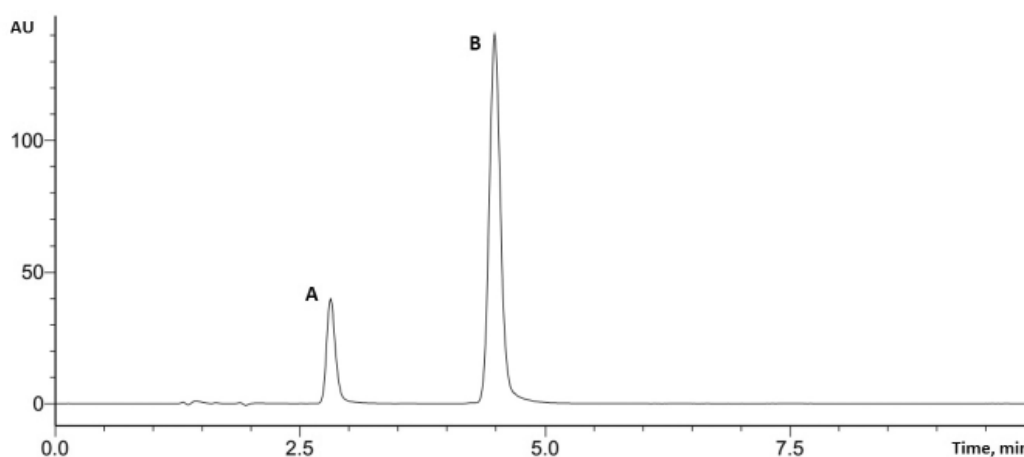


Fig. 3. Typical UPLC chromatogram (A – potassium clavulanate, B – amoxicillin)

### Suitability of chromatographic methods

The main purpose of the system suitability test is to prove the reproducibility of the chromatographic system and to examine applied procedures, equipment, reagents, etc. The British Pharmacopoeia requires to control two parameters: the coefficient of asymmetry for

potassium clavulanate and the coefficient of separation between potassium clavulanate and amoxicillin. Both methods have met all requirements, thus they can be recommended for applying in the analysis of medicines containing amoxicillin and potassium clavulanate (Table 1).

Table 1. Parameters of system suitability for both HPLC and UPLC methods

Parameter	Requirements	Found by HPLC	Found by UPLC
Coefficient of asymmetry for the peak of potassium clavulanate	At most 1.5	1.04	1.27
Coefficient of separation between the peaks of potassium clavulanate and amoxicillin	At least 3.5	15.46	7.93

Table 2. Linearity studies for HPLC and UPLC methods

Compound	Calibration curve	Correlation coefficient	Linear range, µg/mL	RSD, %	LOD, µg/mL	LOQ, µg/mL
<b>HPLC</b>						
Potassium clavulanate	$y = 1.0016x - 0.1851$	0.9999	320–480	0.31	0.8	2.4
Amoxicillin	$y = 1.007x - 0.7512$	0.9999	400–600	0.14	1	3.3
<b>UPLC</b>						
Potassium clavulanate	$y = 0.9961x + 0.3857$	0.9999	320–480	0.29	2	6.6
Amoxicillin	$y = 0.9981x + 0.1645$	0.9999	400–600	0.16	3	10

Table 3. The precision studies for potassium clavulanate and amoxicillin

Method	Component	Concentration, µg/mL	Intra-day (n = 6)			Inter-day (n = 12)		
			Found, %	RSD	Error	Found, %	RSD	Error*
HPLC	Potassium clavulanate	80	101.86	0.23	0.34	101.98	0.43	0.30
	Amoxicillin	100	98.98	0.31	0.43	99.10	0.37	0.49
UPLC	Potassium clavulanate	80	102.43	0.28	0.31	102.73	0.57	0.43
	Amoxicillin	100	99.10	0.26	0.27	98.85	0.52	0.39

\*According to the ICH Guidelines it indicates systematic error of the calculated result introduced by the analytical method from its theoretical true value.

Table 4. The accuracy data of analysis by both procedures

Reference value, %	Amount measured (%)				Relative standard deviation (%)				Recovery (%)			
	HPLC		UPLC		HPLC		UPLC		HPLC		UPLC	
	PC	AC	PC	AC	PC	AC	PC	AC	PC	AC	PC	AC
80	79.73	79.71	80.06	79.99	0.18	0.32	0.17	0.23	99.67	99.64	100.07	99.99
85	85.15	84.97	85.15	85.12	0.13	0.18	0.16	0.28	100.17	99.96	100.18	100.15
90	89.75	89.92	89.74	89.94	0.27	0.19	0.19	0.24	99.72	99.8	99.71	99.93
95	95.12	94.88	95.05	95.10	0.21	0.16	0.17	0.11	100.13	99.87	100.05	100.11
100	100.06	99.97	100.13	99.87	0.19	0.19	0.16	0.16	100.06	100.08	100.13	99.87
105	105.09	105.08	105.15	104.63	0.18	0.1	0.17	0.17	100.09	100.09	100.14	99.64
110	110.03	110.21	109.92	110.09	0.24	0.23	0.22	0.15	100.03	100.19	99.93	100.08
115	114.95	114.81	114.87	115.02	0.21	0.12	0.23	0.12	99.96	99.83	99.88	100.02
120	119.87	120.11	119.86	119.96	0.29	0.20	0.30	0.27	99.89	100.09	99.88	99.97

**Validation**

*Specificity*

Specificity studies were performed for both HPLC and UPLC methods by analyzing blank, placebo (containing all components except potassium clavulanate and amoxicillin), standard, and test solutions. According to the obtained results, no interference in the analysed components quantification from blank or placebo solutions was found. Thus, these procedures can be applied in the analysis of tablets contain potassium clavulanate and amoxicillin.

*Linearity, LOD, LOQ*

The assay procedure should be linear within the range of application, which should overlap the possible values of concentrations of the active substance. Linearity studies were performed in the range of 80–120% (step – 5%). For this purpose, 9 model solutions were prepared, the concentration of which varied uniformly within the range of application (Table 2).

The LOD and LOQ were calculated by the following formulas:

$$LOD = \frac{3.3 \cdot \sigma}{S} \wedge LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{S},$$

where  $\sigma$  is the standard deviation of the response, and  $S$  is the slope of the calibration curve<sup>9, 10</sup>.

The values of LOD and LOQ are presented in Table 2.

*Precision*

The precision study was performed within 2 days by different analysts. Test solution contained 100% of potassium clavulanate and amoxicillin. The results of the studies are shown in Table 3.

*Stability*

Stability studies have been performed for both procedures within 24 hours for a standard solution. It was found that the solutions were stable. Deviations of analyte peaks areas in the HPLC method for potassium clavulanate and amoxicillin were 0.338% and 0.362%, respectively. In the case of UPLC, potassium clavulanate and amoxicillin showed deviations of 0.391% and 0.164%, respectively.

*Accuracy*

To test accuracy within the range of analytical procedure, 9 test solutions with a known amount of potassium clavulanate (PC) and amoxicillin (AC) were prepared, following all stages of the analytical procedure. The measured solutions were in the range of 80–120% (Table 4). Both procedures have satisfactory results, thus they can be used in the analysis of medicines.

*Eco-scale calculation*

Both methods for simultaneous assay of amoxicillin and potassium clavulanate were assessed by their “greenness” using the Eco-scale to find a method with less environmental impact. The UPLC method showed a slightly higher Eco-scale value than the HPLC. The total scores for HPLC and UPLC were 82 and 85 respectively (Table 5).

*Method comparison between HPLC and UPLC*

The methods comparison was performed using the values obtained in the quantitative assessment of 27 tablets samples, measured by both HPLC and UPLC methods. The assessment was done using Passing-Bablok regression equations (estimation of  $\alpha$ ,  $\beta$ ), 95% CI for  $a$ ,  $b$  (test of hypothesis  $\beta = 1$  and  $\alpha = 0$ ), a test of linearity assumption (Table 6) and corresponding

Table 5. Assessment of the HPLC and UPLC methods

	Penalty points	
	HPLC	UPLC
<b>Reagents</b>		
Methanol 0.75 mL	6	6
Water 14.25 mL	0	0
Sodium phosphate monobasic	0	0
<b>Instrument</b>		
HPLC	1	0
Waste	8	6
Occupation hazard	3	3
<b>Sample preparation</b>		
Water 200 mL	0	0
Total penalty points	18	15
<b>Analytical Eco-scale total score</b>	<b>82</b>	<b>85</b>

regression plots with real measurement data (Fig. 4)<sup>15)</sup>. In plots, the regression lines (continuous) are in the range of amoxicillin and potassium clavulanate estimated quantitative contents from 98 to 104%. The real measurement data are presented by dots. The statistical test of the linearity assumption proved linearity between the HPLC and UPLC methods for both amoxicillin and potassium clavulanate (Table 6). The 95% CI included the value 1 for the slope and the value 0 for the intercept for both studied substances, which demonstrated that there is no statistically significant difference between the old and the new method.

## Conclusions

The HPLC procedure for the simultaneous assay of amoxicillin and potassium clavulanate was successfully transferred to the UPLC. To optimize the conditions

of the analysis, we have changed the ratio of mobile phase components, flow rate, and injection volume. Furthermore, the run time was shortened from 15 min to 7.5 min. The HPLC procedure was verified to further implementation into the SPhU monograph, and the UPLC procedure was fully validated. Both methods have met all requirements, and could be recommended for applying in the analysis of medicines containing amoxicillin and potassium clavulanate. The methods were compared in terms of environmental friendliness. In general, both methods have shown themselves to be eco-friendly, although the UPLC method showed a slightly better result. A Passing-Bablok regression method comparison showed the similarity of methods in obtained results. Both methods are reliable and could be used in laboratories during the quality control process.

**Conflict of interest:** none.

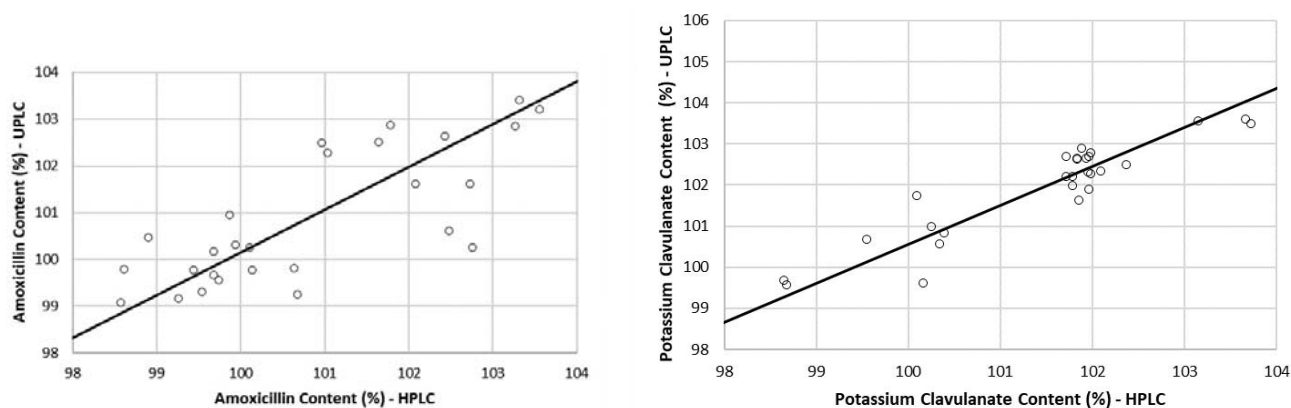


Fig. 4. Regression plots of the comparison between HPLC and UPLC for amoxicillin (a) and potassium clavulanate (a) by the Passing-Bablok method

Table 6. Testing the equality of measurements from HPLC and UPLC methods for simultaneous assay of amoxicillin and potassium clavulanate

Estimated Parameter $Y = bx+a$		Amoxicillin	Potassium Clavulanate
Slope $\beta$	B	0.91	0.95
	b-low (Low 95% CI)	0.66	0.79
	b-up (Up 95% CI)	1.25	1.26
	Test of the hypothesis $\beta = 1$	+	+
Intercept $\alpha$	A	8.73	5.73
	a-low (Low 95% CI)	-25.27	-26.30
	a-up (Up 95% CI)	34.21	21.95
	Test of the hypothesis $\alpha = 0$	+	+
Statistical test of the linearity assumption	h-stat	0.53	1.06
	p-level	0.93	0.20
	p-level > 0.05	+	+
No significant deviation from linearity			

## References

1. **Finlay J, Miller L, Poupard JA.** A review of the antimicrobial activity of clavulanate. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52(1), 18–23.
2. World Health Organization Model List of Essential Medicines, 21<sup>st</sup> List, 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325771> (28.07.2020).
3. WHO latest list of Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 5<sup>th</sup> rev. Geneva: World Health Organization; 2019. <https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-sixth/en/> (28.07.2020).
4. **Liang T.** Handbook of COVID-19 Prevention and Treatment. The First Affiliated Hospital. Zhejiang University School of Medicine. [https://gmcc.alibabadoctor.com/prevention-manual/detail?content\\_id=0](https://gmcc.alibabadoctor.com/prevention-manual/detail?content_id=0) (28.07.2020).
5. **Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon ATR, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ, European Helicobacter Study Group.** Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* 2017; 66(1), 6–30.
6. British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia 2017: Volume III. London: TSO 2017.
7. United States Pharmacopoeia and National Formulary (USP 40-NF 35). Rockville, MD: United States Pharmacopoeial Convention 2017.
8. **Raynie D, Driver JL.** Green assessment of chemical methods. In: Proceedings of the 13<sup>th</sup> Green Chemistry & Engineering Conference. USA 2009.
9. State Pharmacopoeia of Ukraine 2<sup>nd</sup> ed. 1<sup>st</sup> supplement. Kharkiv: State Enterprise “Scientific-and-expert Pharmacopoeial Centre” 2015; 1128 pp.
10. ICH harmonized tripartite guideline Q2(R1). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). In: Proceedings of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Switzerland 2005.
11. **Galuszka A, Migaszewski ZM, Konieczka P, Namieśnik J.** Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends in Anal. Chem.* 2012; 37, 61–72.
12. **Bezruk I, Kotvitska A, Korzh I, Materienko A, Gubar S, Budanova L, Ivanauskas L, Vyshnevsky I, Georgiyants V.** Combined Approach to the Choice of Chromatographic Methods for Routine Determination of Hederacoside C in Ivy Leaf Extracts, Capsules, and Syrup. *Sci. Pharm.* 2020; 88(2), 24.
13. United Nations. Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS, Rev. 4). USA 2011. <https://digitallibrary.un.org/record/704047?ln=en> (28.07.2020).
14. **Tobiszewski M, Marć M, Galuszka A, Namieśnik J.** Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry Molecules 2015; 20(6), 10928–10946.
15. **Passing H, Bablok W.** A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1983; 21(11), 709–720.

## Composition of fatty acids in *Centaurea cyanus* (L.)

### Složení mastných kyselin v *Centaurea cyanus* (L.)

Iryna B. Pietkova • Liana M. Unhurian • Liliia M. Horiacha • Viktoriia S. Kyslychenko • Iryna O. Zhuravel • Viiktorii Yu. Kuznietsova • Oleksandr I. Panasenko

Received July 20, 2020 / Accepted September 30, 2020

#### Summary

The presented study shows the composition of fatty acids (FA) in flowers and herb of wild and cultivated cornflower (*Centaurea cyanus* (L.)). The analysis was performed by gas chromatography (GC) with a method using internal normalization. Together 13 fatty acids were identified in both types of cornflower herb. Unsaturated fatty acids, particularly, linoleic, linolenic, and oleic acids, were prevailing in cultivated cornflower flowers and herb, as well as in wild cornflower flowers. Palmitic acid was the most abundant saturated FA.

**Key words:** *Centaurea cyanus* (L.) • fatty acids • GC method

#### Souhrn

Práce prezentuje výsledky studie mastných kyselin (FA) ve květech a nati volně rostoucí a pěstované chrpy (*Centaurea cyanus* (L.)). Analýza byla provedena metodou plynové chromatografie (GC) s vnitřní normalizací. V nati obou typů chrpy bylo identifikováno 13 mastných kyselin. V květech a nati pěstovaných chrp, stejně jako v květech volně rostoucích, převládaly nenasycené mastné kyseliny, zejména kyselina linolová, linolenová a olejová. Kyselina palmitová představovala nejhojněji se vyskytující nasycenou FA.

**Klíčová slova:** *Centaurea cyanus* (L.) • mastné kyseliny • metoda GC

#### Introduction

*Centaurea cyanus* (L.) is a plant of the *Asteraceae* family, originating from Europe and Middle East and now present all over the world in both wild and cultivated variants<sup>1)</sup>. In traditional medicine, the cornflower herb is known as a diuretic, antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, gastric mucosa protective, hypotensive agent<sup>1–8)</sup>. Cornflower chemical components include flavonoids, anthocyanins, carbonic acids, sugars, amino acids, macro- and microelements, and tocopherols<sup>1, 5, 7, 9, 10)</sup>. Fatty acids are not only vital macronutrients, but also promising pharmacological bioactive substances. Polyunsaturated fatty acids are known to be precursors of eicosanoids which act as lipid mediators, settling inflammations, immune and neuroprotective processes.

Fatty acids, such as saturated stearic and palmitic acids, unsaturated oleic, linoleic and linolenic acids, are potential antibacterial agents able to destabilize cell membranes of microorganisms, thus directly and indirectly suppressing their growth<sup>13, 14)</sup>. Bioactive lipid mediators to which the most unsaturated fatty acids, such as linoleic and  $\alpha$ -linolenic acids, belong settle pro-inflammatory and anti-inflammatory processes, stimulating enzymes and producing cytokines<sup>11)</sup>.

Pharmacological research has proved that fatty acids, such as unsaturated linoleic,  $\alpha$ -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids, retard tumor growth, inducing apoptotic processes in tumor cells, inhibiting angiogenesis, as well as improving efficiency of chemical drugs and alleviating their side effects<sup>12, 15–19)</sup>. Various bioactive substances in complexes with fatty acids, such as saturated palmitic acid and unsaturated linoleic, linolenic and docosahexaenoic acids, are known to possess improved lipophilic properties, becoming better compatible with lipophilic cell membranes. Such complexes are used to slow drug release; they are more bio-accessible<sup>12, 20–22)</sup>.

Data on fatty acids in cornflower herb in the literature are quite few. Fernandes L. et al. studied the fatty acid composition of cornflower flowers which contained 45.0% saturated and 55.0% unsaturated fatty acids. The most abundant were linolenic (27.7%), palmitic (25.2%), and oleic (19.8%) acids<sup>9)</sup>.

This paper is devoted to a study of fatty acids in *Centaurea cyanus* flowers and herb by GC method.

I. B. Pietkova • L. M. Unhurian

Department of Organization and Economics of Pharmacy  
Odessa National Medicinal University, Odessa, Ukraine

Liliia M. Horiacha (✉) • V. S. Kyslychenko • I. O. Zhuravel • V. Y. Kuznietsova

Department of Chemistry of Natural Compounds and Nutritionology  
National University of Pharmacy  
Valentynivska 4, 61168 Kharkiv, Ukraine  
e-mail: lilia4252@ukr.net

O. I. Panasenko

Department of Natural Sciences for Foreign Students and Toxicological Chemistry  
Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine



## Experimental part

### Materials and methods

#### Plant materials

The objects of study were wild cornflower and cultivated cornflower herb and flowers collected during blooming period in Kharkov Region, Ukraine, in 2018.

Identification of plants was carried out by the professor of the Department of Botany of National University of Pharmacy A. G. Serbin in comparison with voucher herbarium samples. The voucher herbarium samples are kept at the Department of Chemistry of Natural Compounds and Nutritionology of the National University of Pharmacy.

#### Determination of fatty acids

Methyl esters of fatty acids were studied using a Sel-michrom-1 (Ukraine) gas chromatograph with a flame ionization detector. A gas chromatography column of stainless steel, 2.5 m long and 4 mm in the inner diameter, was filled with immobile phase – inert on treating with 10% diethylene glycol succinate (DEGS).

The following working parameters were established in the chromatograph: column thermostat temperature 180 °C, vaporizer temperature 230 °C, detector temperature 220 °C, carrier gas (nitrogen) flow velocity 30 cm<sup>3</sup>/min, sample volume 2 mm<sup>3</sup> hexane solution of fatty acid methyl esters.

Reference samples were standards of saturated and unsaturated fatty acid methyl esters from Sigma.

Lipophilic fractions were obtained by exhaustive hexane extraction, they were hydrolyzed and then the developed fatty acid methyl esters determined.

Fatty acid methyl esters were obtained by the modified Peisker method which ensured complete methylation of fatty acids. Methylation was affected with a 100 : 100 : 1 mixture of chloroform with methanol and sulfuric acid. Lipophilic fraction in a volume of 30–50 µl was dosed into glass ampoules, 2.5 ml of methylating mixture were added, and then the ampoules were sealed. Then they were introduced to a thermostat at 105 °C for 3 hours. After methylation completed, the ampoules were unpacked, their contents moved to a test tube, powdered zinc sulfate added at a scalpel tip, 2 ml purified water and 2 ml hexane poured for extraction of methyl esters. After thorough stirring and settling, the hexane extract was filtered and subjected to chromatographic analysis<sup>23</sup>.

Fatty acid methyl esters were identified by peak retention time as compared to the standard mix. Composition of methyl esters was calculated by the interior normalization method.

## Results and discussion

Thirteen fatty acids were identified in tested raw materials. Of them, seven fatty acids were saturated (C12–C24), four fatty acids were monounsaturated (C14–C20), and two fatty acids were polyunsaturated (C18).

Fatty acid composition of wild and cultivated cornflower flowers and herb lipophilic fractions was determined by the GC method (Fig.1). The GC-chromatogram on the example of fatty acids in cultivated cornflower herb is shown in Figure 1.

As the result of the study, 13 fatty acid methyl esters were identified in each of wild and cultivated cornflower flowers and herb lipophilic fractions (Table 1).

The sum of saturated FAs in tested raw materials was almost identical (30.7–35.4%). The highest content of monounsaturated FAs was found in the flowers of the cultivated cornflower (19.6%), the lowest content was found in the wild cornflower herb (6.6%). The content of the sum of monounsaturated FAs in the flowers of the wild cornflower and in the herb of the cultivated cornflower varied within the limits of 13.8%. Wild cornflower flowers accumulated most polyunsaturated FAs, particularly, linoleic and linolenic acids, whereas their content in the wild cornflower herb was the lowest.

The sum of non-identified fatty acids in the wild cornflower herb was 36.7%, in the cultivated cornflower herb, 19.9%, in the wild cornflower flowers, 7.2%, and in the cultivated cornflower flowers, 9.6%.

In the cultivated cornflower herb, wild and cultivated cornflower flowers, unsaturated fatty acids prevailed. Wild cornflower flowers contained 60.0% unsaturated fatty acids, cultivated cornflower flowers contained 55.0% unsaturated fatty acids, cultivated cornflower herb contained 49.4% unsaturated fatty acids, and wild cornflower herb contained only 28.9% unsaturated fatty acids.

In wild and cultivated cornflower flowers we identified 28.6% and 16.7% linoleic acid, 22.5% and 23.3% palmitic acid, 17.6% and 18.7% linolenic acid, 10.1% and 14.3% oleic acid.

Wild cornflower herb accumulated palmitic (17.2%) acid, linolenic (12.9%) acid, linoleic (9.4%) acid and

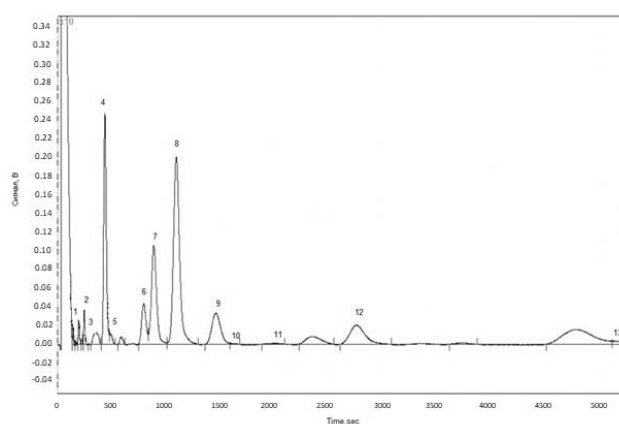


Fig 1. GC chromatogram of fatty acids in cultivated cornflower herb (1 – lauric acid, 2 – myristic acid, 3 – myristoleic acid, 4 – palmitic acid, 5 – palmitoleic acid, 6 – stearic acid, 7 – oleic acid, 8 – linoleic acid, 9 – linolenic acid, 10 – arachic acid, 11 – gondoic acid, 12 – behenic acid, 13 – lignoceric acid)

Table 1. Fatty acid composition of lipophilic fractions in wild and cultivated cornflower herb and flowers

Fatty acid methyl esters	Content of fatty acid methyl esters, % of total			
	Wild cornflower herb	Wild cornflower flowers	Cultivated cornflower herb	Cultivated cornflower flowers
Lauric (C 12:0)	0.9	0.4	0.5	0.7
Myristic (C 14:0)	1.7	1.4	1.2	1.1
Palmitic (C 16:0)	17.2	22.5	15.0	23.3
Stearic (C 18:0)	4.0	4.0	4.9	5.5
Arachic (C 20:0)	0.4	0.6	0.2	0.7
Behenic (C 22:0)	7.9	3.0	7.5	2.2
Lignoceric (C 24:0)	2.3	0.9	1.4	1.9
Total saturated FAs	34.4	32.8	30.7	35.4
Myristoleic (C 14:1)	0.3	trace quantity	trace quantity	0.2
Palmitoleic (C 16:1)	1.0	3.6	0.7	5.1
Oleic (C 18:1)	5.1	10.1	12.8	14.3
Gondoic (C 20:1)	0.2	0.1	0.3	trace quantity
Total monounsaturated FAs	6.6	13.8	13.8	19.6
Linoleic (C 18:2)	9.4	28.6	28.4	16.7
Linolenic (C 18:3)	12.9	17.6	7.2	18.7
Total polyunsaturated FAs	22.3	46.2	35.6	35.4
Total non-identified FAs	36.7	7.2	19.9	9.6
Grand total	100.00	100.00	100.00	100.00

behenic (7.9%) acid, whereas the cultivated cornflower herb contained linoleic (28.4%), palmitic (15.0%), oleic (12.8%), behenic (7.5%), linolenic (7.2%) acids.

Palmitoleic acid content in tested samples of cornflower flowers varied within the limits 3.6–5.1%, being much lower in the herb: 0.70–1.0%.

Tested cornflower herbs accumulated nearly identical amounts of saturated acids, namely, lauric, myristic, stearic, arachic, and gondoic acids.

## Conclusions

In this study we compared the fatty acid composition of wild and cultivated cornflower herbs and flowers collected in Ukraine. Unsaturated oleic (5.1–14.3%), linoleic (9.4–28.6%), linolenic (7.2–18.7%) acids as well as saturated palmitic acid (15.0–23.3%) dominated in tested raw materials.

Our obtained results show only minor difference between the fatty acid compositions of wild and cultivated cornflower raw materials, thus, cultivated cornflower herbs may serve as a substitute for wild raw materials. The herb and flowers of the cornflower are a promising raw material for further phytochemical and pharmacological research.

## Acknowledgments

The research was funded by the Ministry of Health of Ukraine from the government budget.

**Conflicts of interest:** none.

## References

1. Al-Snafi A. E. The pharmacological importance of *Centaurea cyanus* – a review. *IJPRR* 2015; 5(4), 379–384.
2. Garbacki N., Gloguen V., Damas J. Antiinflammatory and immunological effects of *Centaurea cyanus* flower-heads. *J Ethnopharmacol.* 1999; 68, 235–241.
3. Escher G. B., Santos J. S., Rosso N. D., Marques M. B., Azevedo L., do Carmo M. A. V., Dagher H., Molognoni L., Prado-Silva L. D., Sant'Ana A. S., da Silva M. C., Granato D. Chemical study, antioxidant, anti-hypertensive, and cytotoxic/cytoprotective activities of *Centaurea cyanus* L. petals aqueous extract. *Food Chem Toxicol.* 2018; 118, 439–453.
4. Klimas R., Rabiskovi M., Civinskiene G., Bernatoniene J. The diuretic effect of cornflower water extract. *Medicina (Kaunas)* 2007; 43(3), 221–225.
5. Nowicka P., Wojdylo A. Anti-hyperglycemic and anticholinergic effects of natural antioxidant contents in edible flowers. *Antioxidants* 2019; 8(308), 1–12.
6. Park J. B. Synthesis, biological activities and bioavailability of moschamine, a safflomid-type phenylpropenoic acid amide found in *Centaurea cyanus*. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 2012; 26(16), 1465–1472.
7. Pirvu L., Armatu A., Rau I., Schiopu S., Coprean D. *Centaurea cyanus* L. herba, chemical composition and therapeutic potential. *Proceeding of the International Symposium* 2008; 187–194.
8. Pirvu L., Dragomir C., Schiopu S., Mihul S. C. Vegetal extracts with gastroprotective activity. Part. I. Extracts obtained from *Centaurea cyanus* L. raw material. *Romanian Biotechnological Letters* 2012; 17(2), 7169–7176.
9. Fernandes L., Pereira J. A., Saraiva J. A., Ramalhosa E., Casal S. Phytochemical characterization of *Borago officinalis* L.

- and *Centaurea cyanus* L. during flower development. Food Res. Int. 2019; 123, 771–778.
10. **Muraveva D. A., Bubenchikova V. N.** Phenolcarboxylic acids of the flowers of *Centaurea cyanus*. Chem. Nat. Compd. 2007; 22(1), 102.
  11. **Johnson M., Bradford C.** Omega-3, Omega-6 and Omega-9 fatty acids: implications for cardiovascular and other diseases. J Glycomics Lipidomics 2014; 4(4), 1–8.
  12. **Jóźwiak M., Filipowska A., Fiorino F., Struga M.** Anticancer activities of fatty acids and their heterocyclic derivatives. Eur. J. Pharmacol. 2020; 871(172937), 1–13.
  13. **McGaw L. J., Jäger A. K., Staden van J.** Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. S. Afr. J. Bot. 2002; 68, 417–423.
  14. **Yoon B. K., Jackman J. A., Valle-González E. R., Cho N.-J.** Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. Int. J. Mol. Sci. 2018; 19(1114), 1–40.
  15. **Chamras H., Ardashian A., Heber D., Glaspy J. A.** Fatty acid modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation, apoptosis and differentiation. J. Nutr. Biochem. 2002; 13(12), 711–716.
  16. **Serini S., Piccioni E., Merendino N., Calviello G.** Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: implications for cancer. Apoptosis 2009; 14(2), 135–152.
  17. **Siddiqui R. A., Harvey K. A., Xu Z., Bammerlin E. M., Walker C., Altenburg J. D.** Docosahexaenoic acid: a natural powerful adjuvant that improves efficacy for anticancer treatment with no adverse effects. Biofactors 2011; 37(6), 399–412.
  18. **Spencer L., Mann C., Metcalfe M., Webb M., Pollard C., Spencer D., Berry D., Steward W., Dennison A.** The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential. Eur. J. Cancer 2009; 45(12), 2077–2086.
  19. **Wen B., Deutsch E., Opolon P., Auperin A., Frascogna V., Connault E., Bourhis J.** n-3 Polyunsaturated fatty acids decrease mucosal/epidermal reactions and enhance antitumour effect of ionising radiation with inhibition of tumour angiogenesis. Br. J. Canc. 2003; 89(6), 1102–1107.
  20. **Bala V., Rao S., Li P., Wang S., Prestidge C. A.** Lipophilic prodrugs of SN38: synthesis and in vitro characterization toward oral chemotherapy. Mol. Pharm. 2016; 13(1), 287–294.
  21. **Borkar N., Li B., Holm R., Hakansson A. E., Müllertz A., Yang M., Mu H.** Lipophilic prodrugs of apomorphine I: preparation, characterisation, and in vitro enzymatic hydrolysis in biorelevant media. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2015; 89, 216–223.
  22. **Tao Y., Yang F., Meng K., Chen D., Yang Y., Zhou K., Luo W., Qu W., Pan Y., Yuan Z., Xie S.** Exploitation of enrofloxacin-loaded docosanoic acid solid lipid nanoparticle suspension as oral and intramuscular sustained release formulations for pig. Drug Deliv. 2019; 26(1), 273–280.
  23. **Pohodina L., Burda N., Kyslychenko V.** Fatty acids composition study of birthwort dutchman's pipe (*Aristolochia clematitis* L.) herb and roots. Norwegian Journal of development of the International Science 2019; 31, 53–57.

# POKYNY PRO AUTORY ČASOPISU ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE

Česká a slovenská farmacie uveřejňuje po kladném posouzení recenzentů či po úpravách podle jejich připomínek: přehledy a odborná sdělení, původní práce, krátká sdělení. Dále zveřejňuje práce z dějin farmacie, zprávy o činnosti farmaceutických společností, o sjezdech, konferencích, sympoziích a jiných důležitých událostech, příspěvky z farmaceutické praxe, recenze knih a krátké informace (excerpta) ze zahraniční literatury. Uveřejňuje také limitované množství abstrakt z odborných akcí pořádaných Českou farmaceutickou společností. Počet a rozsah abstrakt je předem nutné dohodnout s redakcí časopisu.

Časopis Česká a slovenská farmacie nezpoptatňuje publikaci článků s dedikací grantového či jinak finančně podporovaného výzkumu a vývoje z veřejných zdrojů, stejně jako jazykovou korekturu anglického textu.

Všechny články v plném znění spolu s anglickými a českými souhrny jsou zveřejňovány i na internetových stránkách časopisů ČLS JEP ([www.cls.cz](http://www.cls.cz)). Příspěvky časopisu Česká a slovenská farmacie jsou volně dostupné z databáze PUBMED (po zobrazení abstraktu odkaz na FULL TEXT vpravo nahoře).

## Úprava prací

1. Nadpis výstižně a stručně vyjadřuje obsah práce. U sérií je nutné v poznámce pod čarou citovat předcházející sdělení.
2. Autoři – křestní jméno a příjmení, bez titulů (např. Jan Janák).
3. Pracoviště – nezkrácený název, sídelní město, příp. země.
4. Úvod o předmětu prací a studované problematice – zařazuje se pouze u původních prací.
5. Pokusná část – podrobný popis použitého materiálu a metod. Postupy známé z literatury se nepopisují, stačí příslušný odkaz. Rovněž se neuvádějí běžné, obecně používané metody.
6. Výsledky – stručné a výstižné shrnutí dosažených výsledků, které je rovněž možné uspořádat formou tabulek a grafů. Duplicitní informace je nepřipustná.
7. Diskuze – kritické hodnocení dosažených výsledků a jejich konfrontaci s údaji literatury.
8. Závěr je možné formulovat jako samostatnou kapitolu pouze, liší-li se podstatně od souhrnu.
9. Souhrn (u původních prací, krátkých sdělení, přehledů a prací z historie farmacie) v češtině/slovenštině a angličtině umožňuje pochopení podstaty a výsledků práce, napomáhá publicitě práce prostřednictvím internetu. Píše se ve 3. osobě, rozsah maximálně 200 slov 3 až 5 klíčových slov.
10. Literatura – pouze aktuální literární zdroje nejlépe impaktované, použité prameny se uvádějí v pořadí, v jakém jsou citovány v textu. Na literaturu se odkazuje číselným indexem nahoře se závorkou, např. Tomíček<sup>34</sup>). Citace časopisu se uvádějí s plným zněním názvu článku a se všemi autory. Vzor citace časopisu<sup>1)</sup>, knihy<sup>2,3)</sup>, přednášky<sup>4)</sup>, webu<sup>5,6)</sup>.

<sup>1)</sup> Šolínová J., Malý J. Individuální konzultace poskytované starší pacientce ve veřejné lékárně. *Prakt. Lékáren.* 2015; 11(2), 64–67.

<sup>2)</sup> Perlík F. *Základy klinické farmakologie.* 1. vydání. Praha: Galén 2008.

<sup>3)</sup> Shebeko S. K., Zupanets I. A., Popov O. S., Tarasenko O. O., Shalamay A. S. Effects of quercetin and its combi-

nations on health. In: Watson R. R., Preedy V. R., Sherma Z. (eds.) *Polyphenols: mechanisms of action in human health and disease*, 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press 2018; 373–394.

<sup>4)</sup> Barták N., Zámečník J., Adlerová K. Nové poznatky o intoxikaci kobaltem. In: *Sborník XIII. xenobiochemického symposia.* Praha: ČSBMB 1995; 18.

<sup>5)</sup> Market access in the Czech Republic. [http://www.pm-live.com/pharma\\_news/market\\_access\\_czech\\_republic\\_356414](http://www.pm-live.com/pharma_news/market_access_czech_republic_356414) (1. 2. 2019).

<sup>6)</sup> Vargas F., Romecín P., García-Guillén A. I., Wangesteen R., Vargas-Tendero P., Paredes M. D., Atucha N. M., García-Estañ J. Flavonoids in kidney health and disease. *Front. Physiol.* 2018; 9, Article 394. <https://www.frontiersin.org>

11. Autor – celé jméno s tituly, adresa, telefon, e-mailová adresa.
12. Krátká sdělení – předběžná, stručná prezentace nových významných výsledků bez diskuze. Souhrn a klíčová slova viz bod 9.
13. Střet zájmů (uvádět před seznamem literatury), např. příslušnost pracoviště nebo některého z autorů k firmě sponzorující publikovaný výzkum (netýká se grantových projektů); v případě, že není: žádný.
14. Prohlášení, že práce nebyla zadána jinému časopisu ani jinde otištěna, s výjimkou kongresových abstrakt a doporučených postupů.

## Požadavky na rukopis

**Rukopisy se zasílají pouze elektronicky.** Je třeba respektovat názvosloví organické chemie podle IUPAC. Odborná terminologie, zkratky a symboly musí odpovídat platným normám, zejména SI.

**Fotografie, chemické vzorce, grafy a výstupy z přístrojů přijímá redakce ve formátech tif, jpg a eps** (z důvodů kvality nejlépe kompresní poměr 10–12). **Barevnou reprodukci obrázků si hradí autoři sami** (2000 Kč za tiskovou stranu bez DPH).

Práce předaná redakci se považuje za definitivní, impri-mované znění schválené ke zveřejnění vedoucím příslušného pracoviště. Před zveřejněním obdrží autoři text ke korektuře. **Korektury je nutné vrátit obratem do data určeného redakcí.** Na pozdější autorské korektury nemůže být brán z časových důvodů zřetel. Při autorské korektuře není dovoleno měnit, eventuálně doplňovat text.

Z výrobních důvodů není možné zajistit autorům separátní otisky. První autor obdrží jeden výtisk časopisu zdarma (netýká se zpráv, diskuzí, recenzí knih apod.).

Časopis, jakožto nevýdělečný, neposkytuje honoráře za otištěné příspěvky s výjimkou těch, které si redakce zvlášť vyžádá.

**Rukopisy vyhovující uvedeným požadavkům zasílejte na adresu:**

*doc. PharmDr. Kateřina Kubová, PhD.*

*Redakce časopisu Česká a slovenská farmacie  
Masarykova univerzita, Farmaceutická fakulta  
Palackého 1, 612 42 Brno*

*e-mail: [kubovak@pharm.muni.cz](mailto:kubovak@pharm.muni.cz)*

# INSTRUCTIONS FOR AUTHORS FOR THE JOURNAL ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE (CZECH AND SLOVAK PHARMACY)

Česká a slovenská farmacie publishes after approval of referees or modifications according to their comments: reviews and professional communications, original papers, and short communications. It also publishes papers on the history of pharmacy, reports on the activities of pharmaceutical societies, information concerning congresses, conferences, symposia, and other important events, contributions from pharmaceutical practice, book reviews, and short pieces of information (excerpts) from foreign literature. It also publishes a limited number of abstracts from professional events organized by the Czech Pharmaceutical Society. The number and extent of abstracts is to be negotiated with the editors in advance.

**The journal Česká a slovenská farmacie does not charge fees for the publication of papers with dedications of grant-funded or otherwise financially supported research and development from public resources as well as language correction of English texts.**

The full versions of all papers including English and Czech/Slovak summaries are published on the Internet pages of the journals of the Jan Evangelista Purkyně Czech Medical Society – ČLS JEP ([www.cls.cz](http://www.cls.cz)). Papers from the journal Česká a slovenská farmacie are freely available from the PUBMED database (after the appearance of the Abstract use the reference to the FULL TEXT in upper right corner).

## Lay-out of the manuscripts

1. The title accurately and briefly expresses the content of the paper. In series a footnote must cite the previous communication.
2. Authors – first name and surname, without degrees (e.g. Jan Janák).
3. Facility – full name, location, possibly country.
4. Introduction on the subject of the paper and the issues under study – only in original papers.
5. Experimental part – a detailed description of the employed materials and methods. Procedures known in the literature are not described, pertinent reference is enough. Common, routinely used methods are not described either.
6. Results – a short and apt summary of achieved results, which can be also presented in the form of tables and figures. Duplication information is inadmissible.
7. Discussion – critical evaluation of achieved results and their confrontation with the literature data.
8. Conclusion can be formulated as a separate chapter only if it differs substantially from the Summary.
9. Summary (in original papers, short communications, review papers, and papers on the history of pharmacy) in Czech/Slovak and English enables to understand the gist and results of the paper and aids to publicize the paper on the Internet. It is written in the third person in an extent of maximally 200 words with 3 to 5 key words.
10. References – only topical literary sources with IF, the sources are listed in the order in which they are cited in the text. The literature is referred to by a number index above with a bracket, e.g. Tomiček<sup>34</sup>). Journal citations are presented with the full title of the article and the names of all authors.

Sample citations of a journal<sup>1)</sup>, a book<sup>2, 3)</sup>, a lecture<sup>4)</sup>, a web<sup>5, 6)</sup>.

<sup>1)</sup> Šolínová J., Malý J. Individuální konzultace poskytované starší pacientce ve veřejné lékárně. Prakt. Lékáren. 2015; 11(2), 64–67.

<sup>2)</sup> Perlík F. Základy klinické farmakologie, 1. vydání. Praha: Galén 2008.

<sup>3)</sup> Shebeko S. K., Zupanets I. A., Popov O. S., Tarasenko O. O., Shalamay A. S. Effects of quercetin and its combinations on health. In: Watson R. R., Preedy V. R., Sherma Z. (eds.) Polyphenols: mechanisms of action in human health and disease, 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press 2018; 373–394.

<sup>4)</sup> Barták N., Zámečník J., Adlerová K. Nové poznatky o intoxikaci kobaltem. In: Sborník XIII. xenobiochemického sympozia. Praha: ČSBMB 1995; 18.

<sup>5)</sup> Market access in the Czech Republic. [www.pmlive.com/pharma\\_news/market\\_access\\_czech\\_republic\\_356414](http://www.pmlive.com/pharma_news/market_access_czech_republic_356414) (1. 2. 2019).

<sup>6)</sup> Vargas F., Romecín P., García-Guillén A. I., Wangesteen R., Vargas-Tendero P., Paredes M. D., Atucha N. M., García-Estañ J. Flavonoids in kidney health and disease. Front. Physiol. 2018; 9, Article 394. <https://www.frontiersin.org>

11. Author – full name with degrees, address, phone, e-mail address.
12. Short communications – preliminary, short presentation of new research results without discussion. For Summary and Key words see item 9.
13. Conflict of interest (is to be presented before References): e.g. affiliation of the facility or some of the authors to the firm sponsoring the published research (not in the case of grant projects); in case there is none: none.
14. Declaration stating that the paper has not been submitted for publication to any other journal or published elsewhere excepting congress abstracts and recommended procedures.

## Requirements for the manuscript

**Only electronic submissions are acceptable.** The IUPAC organic chemistry terminology is to be used. Professional terminology, abbreviations and symbols must be in conformity with valid standards, in particular SI.

Photographs, chemical formulae, graphs and outputs from devices are accepted in the tif, jpg and eps formats (for the sake of quality best in the compression ratio 10–12). **The costs of colour reproduction of pictures are covered by the authors** (2000 CZK for a printed page without VAT).

The paper sent to the editors is considered to be the definitive version with imprimatur, approved for publication by the head of the pertinent facility. Prior to publication, the authors will receive the text for proofreading. **Proof sheets are to be returned immediately by the date determined by the editors.** Later author's corrections cannot be taken into consideration due to time limits. It is not allowed to change or supplement the proofread text.

Due to the production reasons, the authors cannot receive separate reprints. The first author will receive one copy of the journal free of charge (this does not apply to news, discussions, book reviews, etc.).

As the journal is unprofitable, it does not pay royalties for printed contributions excepting those requested by the editors.

**Manuscripts complying with the above-mentioned requirements should be sent to the following address:**

doc. PharmDr. Kateřina Kubová, Ph.D.

Redakce časopisu Česká a slovenská farmacie  
Masarykova univerzita, Farmaceutická fakulta  
Palackého 1, 612 42 Brno

e-mail: [kubovak@pharm.muni.cz](mailto:kubovak@pharm.muni.cz)

# Virtuální (online) konference



## XXII. SYMPOZIUM KLINICKÉ FARMACIE RENÉ MACHA

<https://www.faf.cuni.cz/SymposiumKF2020/>

Sekce klinické farmacie České farmaceutické společnosti ČLS JEP a Katedra sociální a klinické farmacie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové pořádají **XXII. symposium klinické farmacie René Macha**

### **Prevence a léčba ledvinových a jaterních onemocnění**

- Forma virtuální (online) konference, 20.–21. listopadu 2020
- Akce bude zařazena do kontinuálního vzdělávání ČLnK

Vážení a milí přátelé klinické farmacie,

přijměte srdečné pozvání na XXII. symposium klinické farmacie René Macha, tentokrát v netradičním formátu online konference. Termín 20.–21. listopadu 2020 a téma Prevence a léčba ledvinových a jaterních onemocnění zůstávají, přesto nás současná epidemiologická situace přiměla zvolit pro letošní rok spojení na dálku. Není nad osobní setkání a přímou diskuzi v konferenčním sále i v kuloárech mikulovského zámku, nicméně věříme, že Vám i touto online konferencí přineseme zajímavé poznatky, které navíc budete moci sledovat komfortně ze svých domovů. Budeme rádi, když se také zapojíte do živých chatů v rámci panelových diskuzí.

Věříme, že většina prezentujících bude souhlasit s dočasným umístěním jejich sdělení na zabezpečenou část konferenčního webu, odkud bude možné prezentaci po určitou dobu sledovat i po skončení konference.

Registrace na online symposium bude spuštěna v následujících dnech, kdy se budete moci přihlásit i jako aktivní vystupující se sdělením v sekci e-DRBY nebo v posterové sekci. V posterové sekci bude výzkumná aktivita účastníka prezentována vedle plakátu v PDF také formou komentovaných, předem namluvených sdělení do maximální doby 5 min.

Za účast na online symposiu bude možno získat body do kontinuálního vzdělávání ČLnK, doba účasti na akci bude monitorována a systém nedovolí přihlásit se na jednu registraci z více míst.

Těšíme se na setkání s Vámi alespoň touto online formou a věříme, že zkušenosti z tohoto nelehkého roku budeme s Vámi moci opět za rok diskutovat v prostorách zámku v Mikulově a ve Valtickém Podzemí.

Pevné zdraví Vám přeji

*Josef Malý a Martin Doseděl*



