

# 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. PhamDr. Martin Doležal, Ph.D.

FaF UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

**Místopředsedové (Vice-Presidents):** PhamDr. Pavel Grodza

PhamDr. Helena Rotterová

**Vědecký sekretář (Secretary General):** PhamDr. Josef Malý, Ph.D.

### Slovenská farmaceutická spoločnosť (Slovak Pharmaceutical Society)

**Prezident (President):** prof. RNDr., Dr.h.c. Jozef Čižmárik, PhD.

FaF UK, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava

**Viceprezidenti (Vice-Presidents):** prof. RNDr. Daniel Grančai, CSc.

RNDr. Roman Smieško

**Vědecký sekretář (Secretary General):** doc. RNDr. Magdaléna Fulmeková, CSc.

**Vedoucí redaktor (Editor-in-Chief):** doc. PhamDr. Kateřina Kubová, Ph.D.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta

**Redakční rada (Board of Editors):** prof. RNDr. Dr.h.c. Jozef Čižmárik, PhD. (Bratislava)

prof. Dr. Pham. Sci. Dariusz Matosiuk (Poland)

prof. RNDr. Daniel Grančai, CSc. (Bratislava)

doc. RNDr. Jozef Kolář, CSc. (Brno, Hradec Králové)

doc. PhamDr. 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)

PhamDr. Josef Malý, Ph.D. (Hradec Králové)

prof. PhamDr. Miloslava Rabišková, CSc. (Hradec Králové)

doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc. (Hradec Králové)

doc. PhamDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D. (Hradec Králové)

doc. PhamDr. Karel Šmejkal, Ph.D. (Brno)

doc. PhamDr. et Mgr. David Vetchý, Ph.D. (Brno)

# ročník 68

## 2019

### 2

## ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE

68, 2019, č. 2

## OBSAH

## Přehledy a odborná sdělení

- Sehnalová I, Říhová B, Demlová R.* Ekonomický pohled na léčbu bevacizumabem u metastatického kolorektálního karcinomu ..... 43
- Prausová N, Kollár P.* Prenylované fenoly s cytotoxickou a antiproliferativní aktivitou izolované z *Morus alba* ..... 48

## Původní práce

- Pavelková M, Vysloužil J, Kubová K, Pavloková S, Mašková E, Vetchý D.* Influence of formulation and process parameters on the properties of Cu<sup>2+</sup>/alginate particles prepared by external ionic gelation evaluated by principal component analysis ..... 69
- Macešková B, Tsadaris M-P, Machlis M.* OTC market – comparing Czech Republic and Greece ..... 78

- Zprávy ..... 86
- Pokyny pro autory ..... 87

## ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE

68, 2019, No. 2

## CONTENTS

## Review Articles

- Sehnalová I, Říhová B, Demlová R.* Bevacizumab treatment in metastatic colorectal carcinoma – an economic perspective ..... 43
- Prausová N, Kollár P.* Prenylated phenols with cytotoxic and antiproliferative activity isolated from *Morus alba* ..... 48

## Original Articles

- Pavelková M, Vysloužil J, Kubová K, Pavloková S, Mašková E, Vetchý D.* Influence of formulation and process parameters on the properties of Cu<sup>2+</sup>/alginate particles prepared by external ionic gelation evaluated by principal component analysis ..... 69
- Macešková B, Tsadaris M-P, Machlis M.* OTC market – comparing Czech Republic and Greece ..... 78

- News ..... 86
- Instructions to the Authors ..... 88

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 vložení 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, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Palackého tř. 1–3, 612 42 Brno, e-mail: [kubovak@vf.u.brno.cz](mailto:kubovak@vf.u.brno.cz)

Rukopis byl předán do výroby 21. 5. 2019.

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 jakémkoliv formě či jakýmkoliv způsobem, ať již mechanickým nebo elektronickým, včetně pořizování fotokopií, nahrávek, informačních databází na mechanických nosičích, bez písemného souhlasu vlastníka autorských práv a vydavatelského oprávnění.

# Ekonomický pohled na léčbu bevacizumabem u metastatického kolorektálního karcinomu

## Bevacizumab treatment in metastatic colorectal carcinoma – an economic perspective

Irena Sehnalová • Barbora Říhová • Regina Demlová

Došlo 21. března 2019 / Přijato 8. dubna 2019

### Souhrn

Cílená léčba znamená velký přínos v léčbě onkologických pacientů. Bevacizumab v léčbě metastatického kolorektálního karcinomu (mCRC) zlepšuje celkové přežívání pacientů (OS) a prodlužuje dobu přežití bez progresu onemocnění (PFS). Výsledky z klinické praxe potvrzují účinnost bevacizumabu v souladu s randomizovanými studiemi, avšak nákladová efektivita léčby bevacizumabem, stejně jako dalšími přípravky cílené biologické léčby, je častým tématem diskuze mezi odbornými společnostmi, regulačními autoritami a plátcí zdravotní péče. U bevacizumabu stále chybí biomarkery, které by pomohly lépe selektovat skupinu pacientů s nejlepší léčebnou odpovědí. V souhrnném článku je představen farmakoekonomický pohled na léčbu bevacizumabem u mCRC. Náklady na jeden 14denní cyklus léčby bevacizumabem v podmínkách České republiky se pohybují kolem 31 000 Kč. Publikované zahraniční farmakoekonomické analýzy nemají jednoznačné závěry. Jejich výsledky jsou zpravidla vyjadřované jako cena za získané QALY při použití hodnocené intervence ve srovnání s komparátorem a liší se v závislosti na ekonomické situaci v konkrétních zemích. Výsledky farmakoekonomických analýz je však nutné potvrdit i v reálné klinické praxi a následně přehodnotit rozhodnutí o úhradě léčivého přípravku s ohledem na konkrétní zdravotní systém dle jednotné metody typu HTA (Health Technology Assessment).

**Klíčová slova:** bevacizumab • cílená biologická léčba • QALY • metastatický kolorektální karcinom

### Summary

Targeted therapy is a significant benefit in the treatment of cancer patients. Bevacizumab improves overall

survival (OS) and progression free survival (PFS) in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC). The clinical effectiveness of bevacizumab is similar to its efficacy in randomised controlled trials. However, the costs of bevacizumab treatment as well as other agents of targeted treatment are discussed between the health care payers, the regulatory authorities and the members of professional societies. Biomarkers of bevacizumab treatment helpful in the selection of eligible groups of patients are still missing. This review focuses on current bevacizumab therapy of mCRC from the pharmacoeconomic perspective. The cost per a 14-day bevacizumab treatment cycle is approximately 31,000 CZK in the Czech Republic. External published pharmacoeconomics analyses have no clear conclusions. Their results are usually expressed as the cost per QALY gained in comparison with a comparator. They differ according to the economic situation of the particular countries. The pharmacoeconomic results have to be confirmed in the real clinical practice, and then the decision should be reassessed by using the uniform methodology, e.g. the Health Technology Assessment (HTA).

**Key words:** bevacizumab • targeted biological therapy • QALY • metastatic colorectal cancer

### Úvod

V uplynulých 20 letech došlo v medicíně ke značnému rozvoji léčivých přípravků selektivně zaměřených na různé specifické struktury, např. na receptor pro EGFR (epidermální růstový faktor), na TNF- $\alpha$  (tumor nekrotizující faktor alfa) nebo na inhibici tyrozinkinázové aktivity. Tyto léčivé látky se začaly využívat nejen v řadě onkologických diagnóz, ale i v revmatologii, gastroenterologii a dermatologii. Díky těmto léčivům se daří zbrzdřit rozvoj nemoci a zlepšit kvalitu života nemocných. V onkologii máme v současnosti řadu látek, které v klinických studiích prokázaly svoji účinnost a bezpečnost a staly se součástí doporučených postupů léčby nádorových onemocnění.

K nejčastějším onkologickým diagnózám v České republice patří zhoubné novotvary kolorekta (dg. C18-C21).

PharmDr. Irena Sehnalová (✉) • B. Říhová • R. Demlová\*

Farmakologický ústav, Lékařská fakulta MU

Kamenice 5, 625 00 Brno-Bohunice

e-mail: 403506@mail.muni.cz

\*Masarykův onkologický ústav Brno

Toto onemocnění zachycené v časných stadiích je dobře léčitelné chirurgicky, ale záchyt onemocnění v pokročilém stavu nebo ve stadiu s metastázami má špatnou prognózu. Léčebné postupy s využitím cílených léčiv zlepšily celkové přežívání pacientů s mCRC. Medián celkového přežívání pacientů (OS) se v současnosti pohybuje okolo 30 měsíců<sup>1)</sup>. V roce 2016 bylo nahlášeno celkem 7610 případů kolorektálního karcinomu, což představuje mírný absolutní pokles oproti předchozímu roku. Přesto se jedná o druhou nejčastější onkologickou diagnózou po karcinomu prostaty u mužů a po karcinomu prsu u žen<sup>2)</sup>. Každoročně asi 20 % z nově diagnostikovaných pacientů má onemocnění odhaleno v klinickém stadiu IV, tedy s přítomností vzdálených metastáz (mCRC). Predikční odhady pro rok 2018 uvádějí 1393 nově diagnostikovaných pacientů v klinickém stadiu IV<sup>3)</sup>. V mezinárodním srovnání incidence a mortality kolorektálního karcinomu dle Globocan 2012 obsadila Česká republika 6. místo<sup>2)</sup>.

### Biologická léčba u mCRC

V léčbě mCRC jsou v současnosti ze zdravotního pojištění za splnění indikačních podmínek hrazena antiangiogenní léčiva zaměřená proti VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) bevacizumab a aflibercept, inhibitory EGFR (epidermální růstový faktor) cetuximab a panitumumab, nejnověji pak multikinázový inhibitor regorafenib. Všechna tato léčiva prokázala v randomizovaných studiích svoji bezpečnost a účinnost a jejich podání vedlo k prodloužení doby do progresu onemocnění (TTP), přežití bez progresu onemocnění (PFS) nebo prodloužení celkového přežívání pacientů (OS)<sup>4–10)</sup>. Randomizované klinické studie však nemohou v dostatečné míře odpovědět na otázku, zda budou tato léčiva vykazovat stejný efekt v širší populaci pacientů indikovaných k léčbě v běžné klinické praxi. Velmi diskutovaným tématem je pak v reálné praxi také úhrada těchto léčiv z prostředků veřejného zdravotního pojištění.

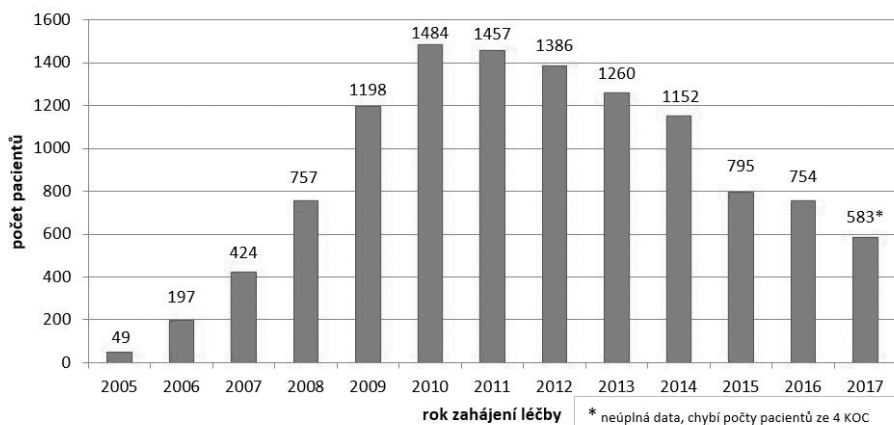
S rozvojem a aplikací principů personalizované medicíny hrají u mCRC důležitou roli prognostické a prediktivní farmakogenomické biomarkery<sup>11)</sup>. Ačkoliv

bylo objeveno několik biomarkerů, v rutinní praxi v léčbě mCRC se uplatňuje pouze vyšetření mutací RAS onkogenů (KRAS a NRAS). Divoký typ (WT) RAS onkogenů je podmínkou pro léčbu inhibitory EGFR<sup>12, 13)</sup>. Pro podání léčiv proti VEGF však nebyl zatím v klinické praxi představen žádný vhodný marker, který by predikoval pacienty s nejlepší odpovědí na tuto léčbu. Dodatečná statistická analýza klinické studie dospěla k závěru, že léčebný benefit anti-VEGF léčiva bevacizumabu je nezávislý na přítomnosti KRAS mutace<sup>14)</sup>.

### Bevacizumab v léčbě mCRC

Bevacizumab (registrovaný léčivý přípravek Avastin) je indikován pacientům s mCRC nezávisle na mutačním stavu RAS onkogenů<sup>3)</sup>. V České republice je registrován a hrazen od roku 2005. Jeho účinnost a bezpečnost byla v klinickém prostředí dále sledována v registru Corect<sup>15)</sup>. Z jeho výstupů je patrné, že klinický efekt léčby bevacizumabem u mCRC je v souladu s proběhlými randomizovanými klinickými studiemi<sup>5, 16)</sup>. Medián PFS u pacientů léčených v České republice dosahuje téměř 11 měsíců a medián OS se pohybuje okolo 26 měsíců. Ročně je u nás bevacizumabem v indikaci mCRC léčeno přibližně 1000 pacientů<sup>15)</sup>. Počet pacientů léčených v jednotlivých letech uvádí obrázek 1.

V současnosti je bevacizumab ze zdravotního pojištění hrazen k léčbě pacientů s mCRC v první a druhé linii v kombinaci s chemoterapeutickými režimy obsahujícími fluoropyrimidin. Konkrétní druh chemoterapeutického režimu je volen individuálně. Nejčastěji indikovanými režimy jsou FOLFOX (oxaliplatin, leuovorin, 5-fluorouracil) a XELOX (oxaliplatin, kapecitabin)<sup>15)</sup>. Bevacizumab je v první linii léčby podáván intravenózně v dávce 5 mg/kg každé 2 týdny nebo 7,5 mg/kg každé 3 týdny do progresu onemocnění. Při podávání ve druhé linii léčby je aplikován v dávce 10 mg/kg každé 2 týdny do progresu onemocnění (PD). Vždy po 2–3 měsících léčby je doporučeno přehodnocení účinnosti terapie<sup>3, 17)</sup>. Kromě léčby mCRC jsou dalšími indikacemi bevacizumabu v onkologii metastatický karcinom prsu, neresekabilní pokročilý metastatický



Obr. 1. Počet pacientů se zahájenou léčbou bevacizumabem

nebo rekurentní nemalobuněčný karcinom plic, pokročilý nebo metastatický karcinom ledviny, metastatický, rekurentní nebo perzistentní karcinom děložního čípku, pokročilý karcinom vaječníků, vejcovodů a primární nádor pobříšnice<sup>17</sup>.

### Farmakoekonomické hodnocení bevacizumabu u mCRC

Léčba bevacizumabem, stejně jako i jinými cílenými léčivými přináší značné finanční náklady. V podmínkách České republiky stojí jeden 14denní cyklus léčby bevacizumabem v první linii přibližně 31 000 Kč<sup>17</sup>. Retrospektivní analýza nákladů na léčbu bevacizumabem vycházející z dat reálné klinické praxe hodnocená z pohledu plátce zdravotní péče publikovaná v roce 2014 potvrdila vysoké výdaje spojené s aplikací této léčby. Průměrné náklady na léčbu mCRC při aplikaci bevacizumabu společně s některým z chemoterapeutických režimů v první linii léčby se pohybovaly kolem 1 000 000 Kč pro jednoho pacienta, přičemž samotný bevacizumab představoval 69 % veškerých přímých nákladů do PD (medián doby do PD byl 9,1 měsíce)<sup>18</sup>.

V posledních letech stoupá počet publikovaných studií hodnotících nákladovou efektivitu bevacizumabu. Výsledky jsou zpravidla vyjádřeny jako náklady za 1 QALY (quality adjusted life year), případně jako náklady na 1 LYG (life year gained) při použití hodnocené intervence ve srovnání s vhodným komparátorem. Ačkoliv koncept QALY má i své nevýhody, možnost poměřovat efektivitu léčby napříč různými diagnózami je jedním z důvodů, proč analýzy tohoto typu bývají regulačními autoritami včetně České republiky požadovány nejčastěji. Farmakoekonomické analýzy publikované v uplynulých letech se liší ve svých závěrech, zda lze léčbu bevacizumabem u mCRC považovat za nákladově efektivní. Studie hodnotící nákladovou efektivitu bevacizumabu v první a druhé linii léčby mCRC z pohledu plátce zdravotní péče ve Spojených státech amerických publikovaná v roce 2015 považuje léčbu za

neefektivní. Inkrementální náklady (ICER) pro první linii léčby byly 571 240 USD/QALY, při léčbě ve druhé linii 364 083 USD/QALY<sup>19</sup>. K podobným závěrům již dříve dospěla studie nákladové efektivity bevacizumabu v první linii léčby mCRC v Velké Británii. Náklady na léčbu bevacizumabem s režimem IFL (irinotekan, 5-fluorouracil, leukovorin) představovaly přibližně 62 857 liber za QALY, tedy asi dvojnásobek hranice ochoty platit (WTP)<sup>20</sup>. Nověji publikované analýzy zaměřené na léčbu bevacizumabem společně s chemoterapeutickými režimy XELOX nebo FOLFOX uvádějí ICER 36 000 GBP/QALY a 31 000 GBP/QALY, tedy příznivější ve prospěch léčby bevacizumabem<sup>21</sup>. V rámci rozhodovacích řízení o úhradě léčby a cenotvorbě léčiv jsou tyto analýzy důležitým argumentem, přihlíží se však i k dalším okolnostem, jako jsou závažnost onemocnění, dostupnost alternativní terapie a celkový dopad na zdravotní rozpočet (budget impact). Příklady některých analýz typu cost utility společně s WTP uvádí tabulka 1<sup>19–23</sup>.

Důležité je i zpětné hodnocení již dosažených výsledků léčby v běžné praxi. Příkladem může být retrospektivní analýza zaměřená na pacienty starší 65 let léčených bevacizumabem ve Spojených státech amerických (USA) v první linii léčby mCRC provedená v reálné klinické praxi, která vyhodnotila inkrementální náklady na 75 303 USD/LYG. Ačkoliv k vyjádření nevyužili autoři QALY, přesto v podmínkách USA by tato intervence byla pravděpodobně hodnocena jako nákladově efektivní<sup>24</sup>.

Nový pohled na hodnocení přínosů léčby bevacizumabem a inhibitory EGFR přináší projekt vypracovaný expertní skupinou České onkologické společnosti ČLS JEP pomocí parametrického systému Magnitude of Clinical Benefit Scale (ESMO-MCBS), který je založen na skórování daného léčiva ve srovnání s komparátorem (tj. stávajícími možnostmi léčby) podle zlepšení celkového přežití, přežití do progresu, kvality života a toxicity. Zde byl bevacizumab vyhodnocen jako léčivo s nižším terapeutickým benefitem pro pacienty s mCRC (skóre 1 až 2)<sup>25</sup>.

Tab. 1. Příklady některých analýz typu cost utility společně s WTP

Hodnocená intervence*	Komparátor	ICER (měna/QALY)	Země	WTP (hranice ochoty platit)**
FOLFOX + bevacizumab	FOLFOX	571 240 USD	USA	50 000-100 000 USD/QALY
FBC + bevacizumab	FBC	131 600 CAD	Kanada	100 000 CAD/QALY***
FOLFIRI + bevacizumab	FOLFIRI	62 857 GBP	Velká Británie	20 000-30 000 GBP/QALY
XELOX + bevacizumab	XELOX	36 006 GBP	Velká Británie	20 000-30 000 GBP/QALY
FOLFOX-4 + bevacizumab	FOLFOX-4	31 174 GBP	Velká Británie	20 000-30 000 GBP/QALY
MFOLFOX-6 + panitumumab	MFOLFOX-6 + bevacizumab	837 270 CZK	ČR	1 250 000 CZK/QALY***

\*chemoterapeutické režimy: FOLFOX (oxaliplatin, leukovorin, 5-fluorouracil), FBC (fluoropyrimidine-based chemotherapy), FOLFIRI (irinotekan, leukovorin, 5-fluorouracil), XELOX (oxaliplatin, kapecitabin)

\*\*WTP (willingness to pay) představuje zpravidla doporučené rozmezí, o přiznání úhrady rozhodují další parametry (závažnost onemocnění, alternativní terapie, budget impact).

\*\*\*doporučená horní hranice WTP

## Závěr

Léčba mCRC bevacizumabem je pouze jedním z příkladů zvýšení nákladů na zdravotní péči po vstupu cílených molekul na trh. Publikované farmakoekonomické analýzy mohou být podkladem pro další diskuze o benefitu aplikace léčiva. Stejně tak důležité je retrospektivní hodnocení účinnosti v běžné klinické praxi. K účelnému využívání nákladných léčiv přispívají biomarkery, které napomáhají určit, zda daná léčba bude efektivní. Klinická praxe však nemá prozatím žádný biomarker pro selekci pacientů s dobrou léčebnou odpovědí na bevacizumab – na rozdíl od terapie inhibitory EGFR, která může být indikována pouze pacientům s WT RAS. Farmakoekonomické hodnocení nových léčiv má v České republice svoji oporu v Zákoně o veřejném zdravotním pojištění č. 48/1997 Sb. a úhradové vyhlášce č. 63/2007 Sb. Státní ústav pro kontrolu léčiv při rozhodování o výši a podmínkách úhrady požaduje vypracování analýzy nákladové efektivity a dopadu na rozpočet v případech, kdy je požadováno rozšíření podmínek úhrady (vedoucí ke zvýšení počtu léčených pacientů) či zvýšení úhrady oproti základní úhradě v referenční skupině.

Ve zdravotnictví je využívána řada nákladných technologií, pro jejichž hodnocení není zatím v České republice vypracovaná jednotná metodika. Mezinárodně uznávanou metodou hodnocení zdravotnických technologií včetně léčiv je koncept Health Technology Assessment (HTA, např. HTA Core Model), který shromažďuje a hodnotí informace o medicínských, sociálních, ekonomických a etických dopadech zdravotnických technologií v daném zdravotním systému<sup>26</sup>). Principem je oddělení fáze hodnocení určité technologie, tzv. assessment, které shromažďuje data a hodnotí intervenci, a následně posouzení, tzv. appraisal, tedy rozhodnutí o hodnocené technologii v daném zdravotním systému ve smyslu jejího přijetí či zamítnutí do systému úhrad ze zdravotního pojištění. Tyto principy jsou využívány např. ve Velké Británii, kde existuje National Institute for Health and Care Excellence (NICE) poskytující odborná stanoviska pro National Health Service (NHS) k používání nákladných technologií. Podobně v Německu existuje od roku 2004 Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit und Gesundheitswesen (IQWiG). Česká republika patří k zemím s vyspělou zdravotní péčí, která je však také finančně velmi náročná. Lze předpokládat, že náklady na zdravotní péči s dalším rozvojem nových léčiv a nových technologií budou narůstat. Otázka hodnocení a rozhodování o vstupu nových technologií do systému úhrad bude nadále klíčová. Avšak zatím žádná z mezinárodně používaných metod komplexního hodnocení zdravotnických technologií nemá v České republice politickou ani legislativní oporu.

**Střet zájmů:** žádný.

## Literatura

1. van Cutsem E., Cervantes A., Adam R., et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metasta-

- tic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2016; 27(8), 1386–422. doi.org/10.1093/annonc/mdw235
2. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Novotvary 2016. Available from: <http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/novotvary> (accessed on 10. 3. 2019).
3. Vyzula R. Modrá kniha České onkologické společnosti. Brno 2018. Available from: <http://www.linkos.cz/informace-pro-praxi/modra-kniha/> (accessed on 10. 3. 2019).
4. Giantonio B. J., Catalano P. J., Meropol N. J., et al. Bevacizumab in Combination With Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin (FOLFOX4) for Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer: Results From the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25(12), 1539–1544. doi:10.1200/JCO.2006.09.6305
5. Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350(23), 2335–2342. doi:10.1056/NEJMoa032691
6. Douillard J. Y., Siena S., Cassidy J., et al. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2014; 25(7), 1346–1355. doi.org/10.1093/annonc/mdu141
7. Bokemeyer C., Bondarenko I., Hartmann J. T., et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol.* 2011; 22(7), 1535–1546. doi.org/10.1093/annonc/mdq632
8. Cutsem E. V., Taberero J., Lakomy R., et al. Addition of Afibercept to Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Improves Survival in a Phase III Randomized Trial in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated With an Oxaliplatin-Based Regimen. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30(28), 3499–3506. doi:10.1200/JCO.2012.42.8201
9. Cutsem E. V., Köhne C.-H., Láng I., et al. Cetuximab Plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: Updated Analysis of Overall Survival According to Tumor KRAS and BRAF Mutation Status. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29(15), 2011–2019. doi:10.1200/JCO.2010.33.5091
10. Grothey A., Cutsem E. V., Sobrero A., et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2012; 381(9863), 303–312. doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61900-X
11. Aghagholzadeh P., Radpour R. New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22(25), 5678–5693. doi:10.3748/wjg.v22.i25.5678
12. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Vectibix, detail léčivého přípravku, ceny a úhrady, indikační omezení. Available from: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0029248&tab=texts> (accessed on 10. 3. 2019).
13. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Erbitux, detail léčivého přípravku, ceny a úhrady, indikační omezení. Available from: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0028761&tab=prices> (accessed on 10. 3. 2019).
14. Hurwitz H. I., Yi J., Ince W., Novotny W. F., et al. The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of bevacizumab with chemotherapy in previously untreated me-

- tastatic colorectal cancer. *The Oncologist*. 2009; 14(1): 22–28. doi:10.1634/theoncologist.2008-0213
15. **Linkos. Klinický registr CORECT**. Available from: <http://www.linkos.cz/prehled-registru/klinicky-registr-corect/> (accessed on 12. 2. 2019).
  16. **Cutsem E. V., Rivera F., Berry S., et al.** Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study. *Ann Oncol*. 2009; 20(11), 1842–1847. doi.org/10.1093/annonc/mdp233
  17. **Státní ústav pro kontrolu léčiv**. Avastin, detail léčivého přípravku, ceny a úhrady, indikační omezení [Internet]. Available from: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0028396&tab=prices> (accessed on 10. 2. 2019).
  18. **Hradecká I., Ríhová B., Horová R., et al.** The cost study of first-line treatment of metastatic colorectal carcinoma with bevacizumab-containing regimen in the Czech Republic]. *Klin. Onkol*. 2014; 27(4), 255–260.
  19. **Goldstein D. A., Chen Q., Ayer T., et al.** First- and second-line bevacizumab in addition to chemotherapy for metastatic colorectal cancer: A United States-based cost-effectiveness analysis. *J. Clin. Oncol*. 2015; 33(10), 1112–1118. doi:10.1200/JCO.2014.58.4904
  20. **Tappenden P., Jones R., Paisley S., et al.** The cost-effectiveness of bevacizumab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer in England and Wales. *Eur. J. Cancer* 2007; 43(17), 2487–2494. doi.org/10.1016/j.ejca.2007.08.017
  21. **Jain S., Shankaran V.** The Economics of personalized therapy in metastatic colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2016; 12(3), 123–129. doi.org/10.1080/14737167.2016.1259070
  22. **Lawrence D., Maschio M., Leahy K. J., et al.** Economic analysis of bevacizumab, cetuximab, and panitumumab with fluoropyrimidine-based chemotherapy in the first-line treatment of KRAS wild-type metastatic colorectal cancer (mCRC). *J. Med. Econ*. 2013; 16(12), 1387–1398. doi.org/10.3111/13696998.2013.852097
  23. **Fínek J., Skoupá J., Jandová P.** Cost-effectiveness analysis of panitumumab plus mFOLFOX6 compared to bevacizumab plus mFOLFOX6 for first-line treatment of patients with wild-type RAS metastatic colorectal cancer – Czech Republic model adaptation. *Klin Onkol*. 2015; 28(4), 265–272.
  24. **Shankaran V., Mummy D., Koepl L., et al.** Survival and lifetime costs associated with first-line bevacizumab use in older patients with metastatic colorectal cancer. *The Oncologist* August 2014; 19(8), 892–899.
  25. **Büchler T., Melichar B., Vrána D., et al.** Evaluation of anti-cancer therapies with reimbursement limited to comprehensive cancer centres using the European Society for Medical Oncology Magnitude of Clinical Benefit Scale. *Klin. Onkol*. 2017; 30(5): 349–360.
  26. **EUnetHTA Joint Action 2, Work Package 8. HTA Core Model ® version 3.0 (Pdf)**; 2016. Available from: [www.htacoremodel.info/BrowseModel.aspx](http://www.htacoremodel.info/BrowseModel.aspx) (accessed 10. 2. 2019).

## Prenylované fenoly s cytotoxickou a antiproliferativní aktivitou izolované z *Morus alba*

### Prenylated phenols with cytotoxic and antiproliferative activity isolated from *Morus alba*

Nikol Prausová • Peter Kollár

Došlo 18. dubna 2019 / Přijato 7. května 2019

#### Souhrn

Tento přehledový příspěvek se zabývá cytotoxickou a antiproliferativní aktivitou 57 prenylovaných fenolů izolovaných z *Morus alba*. Prenylovaný postranní řetězec, který může být různě modifikován, zvyšuje lipofilitu látek, čímž zlepšuje jejich prostupnost biologickými membránami a vede tak ke zvýšení biologické dostupnosti. Cílem byla snaha popsat vztah mezi strukturou prenylovaných fenolů a jejich cytotoxickým účinkem a objasnit různé mechanismy, kterými cytotoxické prenylované fenoly indukují apoptosu. Závěry ukázaly, že se cytotoxicita látek zvyšuje s rostoucím počtem prenylovaných postranních řetězců a ketalových skupin. Modifikace prenylovaného postranního řetězce, jako je například hydroxylace, cytotoxicitu naopak snižuje. Cytotoxickou aktivitu ovlivňuje také přítomnost prenylových a hydroxylových skupin ve specifických polohách.

**Klíčová slova:** *Morus alba* • prenylované fenoly • antiproliferativní aktivita • cytotoxicita

#### Summary

This review deals with cytotoxic and antiproliferative activity of fifty seven prenylated phenols isolated from *Morus alba*. Prenyl side chain, which can be variously modified, increases lipophilicity of the substances, thereby improving their penetration through biological membranes and thus results in an increased bioavailability. The objective was to describe the relationship between structure of the prenylated phenols and their cytotoxic effect and to clarify various mechanisms by which cytotoxic prenylated phenols induce apoptosis. The conclusions showed that the cytotoxicity of the substances

increases with increasing number of the prenyl side chains and ketal groups. Conversely, modification of the prenyl side chain, such as hydroxylation, reduces cytotoxicity. The cytotoxic activity is also influenced by the presence of prenyl and hydroxyl groups at specific positions.

**Key words:** *Morus alba* • prenylated phenols • antiproliferative activity • cytotoxicity

#### Úvod

Nádorová onemocnění jsou po kardiovaskulárních chorobách druhou nejčastější příčinou úmrtnosti v České republice a jejich incidence celosvětově stále roste. Naopak míra úmrtnosti klesá, za což je zodpovědná zvyšující se kvalita lékařské péče, časná diagnostika nádorových onemocnění a dostupnost nových diagnostických a terapeutických prostředků.

Nevýhodu chemoterapie představuje nedostatek její selektivity a toxicita. Poměrně často také dochází ke snížení účinnosti chemoterapie vznikem rezistence, což má za následek selhání léčby. Tyto zmiňované důvody jsou tedy podnětem pro hledání nových látek, které by účinkovaly selektivně a vykazovaly tak minimální cytotoxicitu vůči nenádorovým buňkám.

V léčbě nádorových onemocnění hrají nezastupitelnou roli látky přírodního původu, jako jsou například Vinca alkaloidy, taxany či deriváty podofylotoxinu a kamptotecinu. V současné době roste zájem o prenylované fenolické sloučeniny, který je zapříčiněn silnou nehydrolyzovatelnou substitucí fenolického systému prenylovými skupinami. Prenylovaný postranní řetězec zvyšuje lipofilitu látky, zlepšuje tak její prostupnost skrze buněčné stěny a navíc přispívá k cytotoxické aktivitě. *Moraceae* je jednou z nejbohatších čeledí na prenylované flavonoidy, a proto byl ke studiu prenylovaných fenolů s cytotoxickou a antiproliferativní aktivitou vybrán právě morušovník bílý.

Cílem práce je vyhledat v dostupné literatuře prenylované fenoly s cytotoxickou a antiproliferativní aktivitou izolované z *Morus alba* a následně popsat a vyhodnotit souvislosti mezi strukturou těchto látek a jejich účinkem.

N. Prausová • doc. PharmDr. Peter Kollár, Ph.D. (✉)

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta

Ústav humánní farmakologie a toxikologie

Palackého 1/3, 612 42 Brno

e-mail: F14103@vfu.cz; KOLLARP@vfu.cz



### ***Morus alba* L.**

*Morus alba* původem pochází z Číny a také je hojně pěstována v Koreji a Japonsku. Listí moruše představuje primární stravu pro bource morušového (*Bombyx mori* L.), který podporuje hedvábnický průmysl již celá staletí<sup>1)</sup>. Antické Řecko moruším připisovalo narkotické a antitoxické účinky. Ve střední Asii plody moruší sušili a mleli na sladkou mouku. Dobře usušené jsou totiž trvanlivé a mohou nahrazovat cukr<sup>2)</sup>. Vejčité válcovité plodenství jsou vhodná zejména k výrobě marmelád, zmrzlin, octů, šťáv nebo vín<sup>3)</sup>. Z bílých plodů se rovněž připravuje mošt medové chuti<sup>2)</sup>.

Plody jsou bohaté na vitamin C a obsahují celou řadu minerálů – železo, vápník, fosfor, draslík nebo hořčík<sup>4)</sup>. Uplatňují se v léčbě slabosti, závratí, tinnitu, únavy, anemie, flatulence a inkontinence<sup>5)</sup>. Listům moruše se připisuje antioxidační, antimikrobiální, cytotoxický, antidiabetický, antihyperlipidemický, antiaterosklerotický, antiobezitní a kardioprotektivní účinek. Kořenová kůra vykazuje antimikrobiální, cytotoxické, protizánětlivé a antihyperlipidemické vlastnosti<sup>1)</sup>. Mezi další účinky kořenové kůry se řadí účinek antibakteriální, antioxidační, hypoglykemický, neuroprotektivní, antiulcerózní a analgetický<sup>6)</sup>.

Tradiční čínská medicína používá listy, plody a kůru moruše k léčbě horečky, ochraně poškození jater, zlepšení zraku, posílení kloubů nebo ke snížení krevního tlaku<sup>1)</sup>. Dále využívá i kořenové kůry k terapii kašle a astmatu<sup>7)</sup>.

#### **Obsahové látky**

Různé rostlinné části obsahují různé látky v rozličném množství, a proto se liší i svými farmakologickými účinky. V listech jsou obsaženy flavonoidy (rutin, kvercetin, isokvercetin, moracetin, astragalín), triterpeny (lupeol), steroly ( $\beta$ -sitosterol), kumariny, alkaloidy, organické kyseliny a aminokyseliny. Ve větvích moruše byly objeveny flavonoidy (mulberrin, cyklomulberrin, morusin, kempferol) a fenolické látky (resveratrol). Plody zase disponují anthokyany (cyanidin), flavonoidy (kvercetin, kempferol) a tokoferoly. V kořenech byly nalezeny též flavonoidy (morusin, morusinol), alkaloidy (kalystegin) a stilbeny (oxyresveratrol)<sup>4)</sup>.

#### **Prenylované fenoly**

Prenylované fenolické látky se objevují v čeledích *Paulowniaceae* (*Paulownia* spp.), *Leguminosae* (*Sophora* spp.), *Guttiferae* (*Garcinia* spp.), *Rutaceae* (*Neoreaputia* spp.), *Cannabaceae* (*Cannabis* a *Humulus* spp.) a *Moraceae* (*Morus*, *Maclura*, *Artocarpus* spp.). Prenylované fenoly zahrnují několik kategorií, přičemž je vždy nutná přítomnost společného fenolického hydroxyly na skeletu rozdílného biosyntetického původu substituovaného prenylovou skupinou. Jedná

se o flavonoidy, chalkony, xanthyony, stilbeny, kumariny, chinony, ftalidy, aromatické organické kyseliny a acylfloroglucinoly. Široká biologická aktivita je modifikována charakterem skeletu látky i substitucí prenylu<sup>8)</sup>.

Prenyl (3-methyl-2-buten-1-yl) nebo isoprenyl je terpenoidní postranní řetězec, jenž se často vyskytuje v jedné nebo více specifických polohách fenolického skeletu přes atom uhlíku (C-) nebo kyslíku (O-) či přes oba<sup>9)</sup>. Jinou možností připojení tvoří cyklizace se sousedním hydroxylem za vzniku 2,2-dimethyl-pyranu nebo furanu<sup>8)</sup>.

Největší zájem o tento typ sloučenin zapříčiňuje silná, nehydrolyzovatelná C-substituce fenolického systému prenylovými skupinami, které obecně zvyšují lipofilitu a udělují molekule silnou afinitu k biologickým membránám. Jinými slovy, prenylová část působí jako transportér fenolické látky skrze buněčné stěny a dokonce přispívá k biologické aktivitě vykazované celou molekulou, což se ukázalo v nedávných studiích vztahů mezi strukturou a účinkem. Kombinace prenylové skupiny s fenolickým skeletem může tedy poskytovat sérii nových zajímavých biologických aktivit, jak je již prokázáno u mnoha izolovaných bioaktivních terpenoidů a fenolů<sup>9)</sup>.

#### **Prenylované flavonoidy**

Podskupinu flavonoidů tvoří prenylované flavonoidy, které slučují flavonoidní skelet s lipofilním prenylovaným postranním řetězcem. Do roku 2005 bylo objeveno 37 rodů obsahujících prenylované flavonoidy. Dle současné literatury se nejvíce těchto látek nachází v čeledi *Moraceae*. V rostlinné říši jsou tyto látky pokládány za fytoalexiny, které hrají důležitou úlohu ve fyziologických procesech obrany proti patogenním mikroorganismům<sup>10)</sup>.

Obecně je C-prenylace více známá než O-prenylace. C-prenylace se objevuje v poloze C-6 nebo C-8 A-kruhu nebo v poloze C-3' a C-5' B-kruhu, což se obvykle nachází v *ortho* poloze hydroxylové skupiny. C-prenylace na C-kruhu nastává vzácně. Prenylovaných postranních řetězců existuje celá řada, nejčastěji se však jedná o vzorec 3,3-dimethylallyl. Flavonoidy s geranylovou nebo farnesylovou skupinou se též objevují mezi přírodními prenylovanými flavonoidy. Oxidace, cyklizace, dehydratace či redukce prenylovaného postranního řetězce vedou ke vzniku různých modifikací terpenoidního řetězce<sup>10)</sup>.

Diels-Alderový typ flavonoidů vzniká enzymatickou reakcí dehydroprenylu (dien) s  $\alpha,\beta$ -dvojnou vazbou chalkonu (dienofil)<sup>11)</sup>. Konkrétně se jedná o intermolekulární [4+2] cykloadici<sup>12)</sup>. Tyto sekundární metabolity se nalézají hlavně v čeledích *Moraceae* a *Zingiberaceae* a vykazují slibnou biologickou aktivitu využitelnou při hypertenzi, HIV, tuberkulóze, zánětu a nádorech<sup>13)</sup>. Doposud bylo z čeledi *Moraceae* izolováno okolo 80 Diels-Alderových aduktů<sup>12)</sup>.

Tab. 1. Prenylované flavony

Substituent	Látka	Buněčná linie	Hodnota účinku	Další informace	Odkaz
acyklický prenyl na A-kruhu	licoflavon C	NCI-H187 Vero	IC <sub>50</sub> = 31,73 μm IC <sub>50</sub> = 38,24 μm	PK elipticin IC <sub>50</sub> = 10,96; 2,85 μm	14, 15)
		HL-60 HeLa HepG-2 A-549 AGS	IC <sub>50</sub> = 7,0 μm IC <sub>50</sub> = 31,8 μm IC <sub>50</sub> = 10,2 μm IC <sub>50</sub> = 25,6 μm IC <sub>50</sub> = 18,3 μm	PK cisplatina IC <sub>50</sub> = 3,7; 4,9; 12,5; 12,4; 18,8 μm	16)
		H4IIE C6	IC <sub>50</sub> = 42 μmol/l IC <sub>50</sub> = 37 μmol/l	v buňkách H4IIE: indukce apoptozy aktivací kaspasy 3/7	17)
acyklický prenyl na C-kruhu	albanin A	B16	IC <sub>50</sub> = 84,7 μm		18, 19)
cyklický prenyl na A-kruhu	atalantoflavon	PC-3	IC <sub>50</sub> = 55,6 μm	PK doxorubicin IC <sub>50</sub> = 0,9 μm	20, 1)
		HeLa MCF-7 Hep3B	IC <sub>50</sub> = 1,25 μm IC <sub>50</sub> = 6,54 μm IC <sub>50</sub> = 4,33 μm	PK deguelin IC <sub>50</sub> = 6,4; 5,3; 29,3 μm	21)
		CCRF-CEM CEM/ADR 5000	IC <sub>50</sub> = 44,69 μm IC <sub>50</sub> = 33,35 μm	PK doxorubicin IC <sub>50</sub> = 0,20 a 195,12 μm	22)
cyklický prenyl na C-kruhu	cyklocommunol	SCC2095 Ca922	IC <sub>50</sub> = 4,2 μm IC <sub>50</sub> = 5 μm	omezení exprese proteinu Mcl-1 a fosforylace Akt/ mTor, zvýšení tvorby ROS, aktivace kaspasy-9 a -3	23, 15)
acyklický geranyl na A-kruhu	8-geranylapienin	HeLa MCF-7 Hep3B	IC <sub>50</sub> = 2,24 μm IC <sub>50</sub> = 3,21 μm IC <sub>50</sub> = 3,65 μm	PK deguelin IC <sub>50</sub> = 6,4; 5,3; 29,3 μm	21)
acyklický geranyl na B-kruhu	kuwanon S	HeLa MCF-7 Hep3B	IC <sub>50</sub> = 1,64 μm IC <sub>50</sub> = 7,02 μm IC <sub>50</sub> = 8,47 μm	PK deguelin IC <sub>50</sub> = 6,4; 5,3; 29,3 μm	21)
prenyl i geranyl	3'-geranyl-3-prenyl-2',4',5,7-tetrahydroxyflavon	HeLa MCF-7 Hep3B	IC <sub>50</sub> = 1,32 μm IC <sub>50</sub> = 3,92 μm IC <sub>50</sub> = 5,22 μm	PK deguelin IC <sub>50</sub> = 6,4; 5,3; 29,3 μm	21)
	sanggenon J	HeLa MCF-7 Hep3B	IC <sub>50</sub> = 2,28 μm IC <sub>50</sub> = 4,56 μm IC <sub>50</sub> = 5,30 μm	PK deguelin IC <sub>50</sub> = 6,4; 5,3; 29,3 μm	21)
	sanggenon K	HeLa MCF-7 Hep3B	IC <sub>50</sub> = 2,29 μm IC <sub>50</sub> = 3,51 μm IC <sub>50</sub> = 3,09 μm	PK deguelin IC <sub>50</sub> = 6,4; 5,3; 29,3 μm	21)

diprenyl	morusin	SK-Hep1	5–75 $\mu\text{m}$	zvýšení exprese E-kadherinu, snížení exprese vimentinu a integrinu $\alpha 2$ , $\alpha 6$ a $\beta 1$ , redukce aktivity MMP2 a MMP9, potlačení STAT3 a NF- $\kappa\text{B}$	24, 1)
		HT-29	$\text{IC}_{50} = 6,1 \mu\text{m}$	indukce apoptozy potlačením NF- $\kappa\text{B}$	25)
		MCF-7 MDA-MB-231 MDA-MB-157 MDA-MB-453 MCF10A	$\text{IC}_{50}$ 18–45 $\mu\text{m}$ $\text{IC}_{50}$ 18–45 $\mu\text{m}$ $\text{IC}_{50}$ 18–45 $\mu\text{m}$ $\text{IC}_{50}$ 18–45 $\mu\text{m}$ $\text{IC}_{50} > 118 \mu\text{m}$	snížení exprese proteinu survivin, zvýšení exprese proteinu Bax	26)
		A2780 SKOV-3 HO-8910	$\text{IC}_{50} = 31,64 \mu\text{m}$ $\text{IC}_{50} = 39,09 \mu\text{m}$ $\text{IC}_{50} = 43,18 \mu\text{m}$	influx vápníku přes napěťově řízený aniontový kanál do mitochondrií, dilatace ER a mitochondrií, produkce ROS – indukce paraptozy	27)
		H1299 H460 H292 H1975	0–50 $\mu\text{m}$ 0–50 $\mu\text{m}$ 0–50 $\mu\text{m}$ 0–50 $\mu\text{m}$	potlačení signální dráhy EGFR/STAT3	28)
		HeLa	$\text{IC}_{50} = 0,94 \mu\text{m}$	potlačení NF- $\kappa\text{B}$	29)
		DU145 M2182 PC-3 LNCaP RWPE-1	$\text{IC}_{50} = 26,27 \mu\text{m}$ $\text{IC}_{50} = 22,19 \mu\text{m}$ $\text{IC}_{50} = 19,97 \mu\text{m}$ $\text{IC}_{50} = 21,89 \mu\text{m}$ $\text{IC}_{50} = 43,48 \mu\text{m}$	potlačení exprese STAT3	30)
		AsPC-1 BxPC-3 MIA Paca-2 PANC-1	20 $\mu\text{m}$ 20 $\mu\text{m}$ 20 $\mu\text{m}$ 20 $\mu\text{m}$	potlačení exprese STAT3	31)
		U87MG T98G U373MG U251MG	5, 10 a 20 $\mu\text{m}$ 5, 10 a 20 $\mu\text{m}$ 5, 10 a 20 $\mu\text{m}$ 5, 10 a 20 $\mu\text{m}$	synergický účinek s proteinem TRAIL, aktivace kaspasy-3, -8 a -9, potlačení exprese proteinu XIAP a survivin, inhibice dráhy EGFR/PDGFR-STAT3, indukce tvorby receptoru smrti DR5	32)

Substituent	Látka	Buněčná linie	Hodnota účinku	Další informace	Odkaz
diprenyl	morusin	GBM GSCs L02	IC <sub>50</sub> = 6,87 µg/ml IC <sub>50</sub> = 3,92 µg/ml IC <sub>50</sub> = 38,06 µm	potlačení exprese proteinu CD133, nestinu, Oct4 a Sox2, zvýšení exprese adipogenních proteinů – PPARγ, adiposin D, ap2, perilipin, snížení exprese proteinu Bcl-2 a zvýšení exprese proteinu Bax a kaspasy-3	33)
		MKN45 SGC7901	1, 2 a 5 mg/l 1, 2 a 5 mg/l	down-regulace CDK a cyklinů – CDK2, CDK4, cyklin D <sub>1</sub> a cyklin E <sub>1</sub>	34)
		HL-60 HeLa HepG-2 A-549 AGS	IC <sub>50</sub> = 16,8 µm IC <sub>50</sub> = 19,0 µm IC <sub>50</sub> > 40 µm IC <sub>50</sub> = 39,0 µm IC <sub>50</sub> = 21,7 µm	PK cisplatina IC <sub>50</sub> = 3,7; 4,9; 12,5; 12,4; 18,8 µm	16)
		H22	10–40 mg/kg	zvýšení exprese proteinu p53, survivinu, cyklinu B <sub>1</sub> a snížení exprese genu NF-κB	35)
		SMMC-7721 BGC-823 SGC-7901	IC <sub>50</sub> = 20,6 µm IC <sub>50</sub> = 12,6 µm IC <sub>50</sub> = 75,8 µm	PK cisplatina IC <sub>50</sub> = 6,3; 7,3 a 14,1 µm	36)
	cudraflavon B	THP-1 LAPC-4 DU-145 PC-3 BPH-1	LD <sub>50</sub> = 24,3 µm 10 a 20 µm 10 a 20 µm 10 a 20 µm 20 a 30 µm	potlačení fosforylace Rb proteinu, inhibice exprese TNF-α, IL-1β, IL-1RA, snížení exprese genů, které jsou pod transkripční kontrolou NF-κB, PK oxaliplatinu IC <sub>50</sub> = 1,7 µm PK kamptotecin IC <sub>50</sub> = 0,2 µm	37)

diprenyl	cudraflavon B	HN4 HN12	IC <sub>50</sub> = 18,3 μm IC <sub>50</sub> = 19,5 μm	PK cisplatina IC <sub>50</sub> = 24,3 a 20,4 μm zvýšení exprese proteinu Bax, snížení exprese proteinu Bcl-2, uvolnění cytochromu C a aktivace kaspas, down-regulace Rb proteinu, zvýšená exprese proteinu p53, p21 a p27	38)
		BGC-823	IC <sub>50</sub> = 7,2 μg/ml	PK vinkristin IC <sub>50</sub> = 19 μg/ml	39)
		B16	IC <sub>50</sub> = 12,5 μm	PK vinblastin IC <sub>50</sub> = 50 μm	18)
		KB MCF-7 NCI-H187 Vero	IC <sub>50</sub> = 25,78 μm IC <sub>50</sub> = 34,65 μm IC <sub>50</sub> = 35,51 μm IC <sub>50</sub> = 29,32 μm	PK elipticin IC <sub>50</sub> = 13,48; neaktivní, 10,96 a 2,85 μm	14)
	morusinol	HL-60 HeLa HepG-2 A-549 AGS	IC <sub>50</sub> = 18,2 μm IC <sub>50</sub> > 40 μm IC <sub>50</sub> > 40 μm IC <sub>50</sub> > 40 μm IC <sub>50</sub> > 40 μm	PK cisplatina IC <sub>50</sub> = 3,7; 4,9; 12,5; 12,4; 18,8 μm	16)
	kuwanon G	A-549 Bel 7402 BGC-823 HCT-8 A2780	IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml	PK 5-fluorouracil IC <sub>50</sub> = 0,2; 0,5; 0,7; 0,5 a 0,7 μg/ml	40, 1)
	cyklomorusin	HeLa MCF-7 Hep3B	IC <sub>50</sub> = 1,66 μm IC <sub>50</sub> = 7,85 μm IC <sub>50</sub> = 7,55 μm	PK deguelin IC <sub>50</sub> = 6,4; 5,3; 29,3 μm	21)
	neocyklomorusin	HeLa	IC <sub>50</sub> < 10 μg/ml		41, 15)
		CCRF-CEM CEM/ADR 5000	IC <sub>50</sub> = 59,02 μm IC <sub>50</sub> = 69,98 μm	PK doxorubicin IC <sub>50</sub> = 0,20 a 195,12 μm	22)
	cyklomulberrin	HeLa MCF-7 Hep3B	IC <sub>50</sub> = 3,69 μm IC <sub>50</sub> = 7,19 μm IC <sub>50</sub> = 6,64 μm	PK deguelin IC <sub>50</sub> = 6,4; 5,3; 29,3 μm	21)
	kuwanon C	B16	IC <sub>50</sub> = 14,2 μm	PK vinblastin IC <sub>50</sub> = 50 μm	18, 42)
		P388	IC <sub>50</sub> = 14,0 μm		43)

Substituent	Látka	Buněčná linie	Hodnota účinku	Další informace	Odkaz
diprenyl	cudraflavon C	A375.S2	$IC_{50} = 3,42 \mu\text{m}$	produkce ROS, aktivace MAPK, zvýšení exprese proapoptotických proteinů (Puma, Bax, Bad, Bid), aktivace kaspasy-9 a 3/7	44, 15)
		B16	$IC_{50} = 9,2 \mu\text{m}$	PK vinblastin $IC_{50} = 50 \mu\text{m}$	18)
		SMMC-7721 BGC-823 SGC-7901	$IC_{50} = 11,8 \mu\text{m}$ $IC_{50} = 24,9 \mu\text{m}$ $IC_{50} = 35,5 \mu\text{m}$	PK cisplatina $IC_{50} = 6,3; 7,3$ a 14,1 $\mu\text{m}$	36)
		P388	$IC_{50} = 4,50 \mu\text{m}$		45)
		KM12 Caco-2 HT-29 HCC2998 SW48 HCT116 CCD 841 Con	$IC_{50} = 7,77 \mu\text{m}$ $IC_{50} = 9,01 \mu\text{m}$ $IC_{50} = 16,88 \mu\text{m}$ $IC_{50} = 22,18 \mu\text{m}$ $IC_{50} = 24,74 \mu\text{m}$ $IC_{50} = 34,67 \mu\text{m}$ $IC_{50} > 100 \mu\text{m}$	inhibice signalizace PI3K-AKT, aktivace vnitřní kaspázové dráhy, up-regulace genu EGR1, HUWE1 a SMG1, down-regulace genu MYB1, CCNB1 a GPX2	46)
	kuwanon A	RAW 264,7	$IC_{50} = 10,5 \mu\text{m}$	inhibice produkce NO	47)
	kuwanon T	RAW 264,7	$IC_{50} = 10,0 \mu\text{m}$	inhibice produkce NO	47)
	3',8-diprenyl-4',5,7-trihydroxyflavon	HeLa MCF-7 Hep3B	$IC_{50} = 1,66 \mu\text{m}$ $IC_{50} = 5,27 \mu\text{m}$ $IC_{50} = 4,71 \mu\text{m}$	PK deguelin $IC_{50} = 6,4; 5,3;$ 29,3 $\mu\text{m}$	21)
artonin I	HL-60 HeLa HepG-2 A-549 AGS	$IC_{50} > 40 \mu\text{m}$ $IC_{50} > 40 \mu\text{m}$ $IC_{50} > 40 \mu\text{m}$ $IC_{50} > 40 \mu\text{m}$ $IC_{50} > 40 \mu\text{m}$	PK cisplatina $IC_{50} = 3,7; 4,9; 12,5;$ 12,4; 18,8 $\mu\text{m}$	16)	
triprenyl	kuwanon H	SCLC	$K_i = 290 \text{ nm}$	antagonistický účinek na receptor pro peptid uvolňující gastrin	48, 1)

Tab. 2. Prenylované flavanony

Substituent	Látka	Buněčná linie	Hodnota účinku	Další informace	Odkaz
cyklický prenyl na B-kruhu	sanggenon F	RAW 264,7	IC <sub>50</sub> = 19,0 μm	inhibice produkce NO	47)
	kuwanon L	Molt3	200 μm	inhibice proteinu XIAP vazbou na jeho doménu BIR3	49, 50)
acyklický prenyl na A-kruhu	euchrenon a,	PC-3 NCI-H460 A-549	IC <sub>50</sub> = 17,0 μmol/l IC <sub>50</sub> = 47,4 μmol/l IC <sub>50</sub> = 35,2 μmol/l	PK doxorubicin IC <sub>50</sub> = 0,2; 0,3 a 0,5 μmol/l	51, 52)
		P388	IC <sub>50</sub> = 7,8 μg/ml	norartocarpanon IC <sub>50</sub> = 12,7 μg/ml	53)
acyklický geranyl na A-kruhu	7,2',4',6'-tetrahydroxy-6-geranylflavanon	dRLh84	IC <sub>50</sub> = 52,8 μg/ml		54)
acyklický geranyl na B-kruhu	kuwanon E	RAW 264,7	IC <sub>50</sub> = 14,9 μm	inhibice produkce NO	47)
		THP-1	LD <sub>50</sub> > 50 μm	inhibice exprese TNF-α a interleukinu-1, potlačení fosforylace Rb proteinu, PK oxaliplatinu LD <sub>50</sub> = 1,7 μm	37)
		CEM RPMI8226 U266	IC <sub>50</sub> = 15,4 μm IC <sub>50</sub> = 16,4 μm IC <sub>50</sub> = 42,2 μm		55)
	kuwanon U	THP-1	LD <sub>50</sub> = 45,7 μm	PK oxaliplatinu LD <sub>50</sub> = 1,7 μm	37)
		CEM RPMI8226 U266 THP-1	IC <sub>50</sub> = 18,5 μm IC <sub>50</sub> = 26,8 μm IC <sub>50</sub> = 56,3 μm IC <sub>50</sub> = 28,0 μm		55)
cyklický geranyl na A-kruhu	sanggenon G	MDA-MB-213 SW60 ACHN	IC <sub>50</sub> = 24,0 μmol/l IC <sub>50</sub> = 10,96 μmol/l IC <sub>50</sub> = 13,44 μmol/l	inhibice heparinasy (IC <sub>50</sub> = 3,7 μmol/l)	56)
		Molt3	vazebná afinita 34,26 μm	inhibice proteinu XIAP vazbou na jeho doménu BIR3, aktivace kaspasy-9, -8 a -3	49)
	sanggenol L	HL-60 HeLa HepG-2 A-549 AGS	IC <sub>50</sub> = 17,7 μm IC <sub>50</sub> = 16,4 μm IC <sub>50</sub> = 16,7 μm IC <sub>50</sub> = 14,8 μm IC <sub>50</sub> = 15,7 μm	PK cisplatinu IC <sub>50</sub> = 3,7; 4,9; 12,5; 12,4; 18,8 μm	16)
		A2780 SKOV-3 OVCAR-3	IC <sub>50</sub> = 16,7 μm IC <sub>50</sub> = 16,2 μm IC <sub>50</sub> = 30,4 μm	potlačení exprese cyklinu D <sub>1</sub> , aktivace kaspasy-9 a -3, inhibice NF-κB	57)

Substituent	Látka	Buněčná linie	Hodnota účinku	Další informace	Odkaz
diprenyl	sanggenon C	PC-3	IC <sub>50</sub> = 18,76 μmol/l	aktivace kaspasy-9 a -3	58)
		Lovo HT-29 SW480	5–80 μm 5–80 μm 5–80 μm	zvýšení tvorby ROS, zvýšení hladiny intracelulárního Ca <sup>2+</sup> a ATP, inhibice produkce NO, snížení exprese proteinu Bcl-2	59)
		RAW 264,7	IC <sub>50</sub> = 2,82 μm IC <sub>50</sub> = 3,38 μm	inhibice produkce NO, inhibice NF-κB	60)
		H22 P388 K562	IC <sub>50</sub> = ~15 μm IC <sub>50</sub> = ~15 μm IC <sub>50</sub> = ~15 μm	inhibice proteazomu, zástava buněčného cyklu ve fázi G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	61)
		HSC-2 HSG HGF	CC <sub>50</sub> = 18 μm CC <sub>50</sub> = 23 μm CC <sub>50</sub> = 45 μm	PK 2'-hydroxychalkon CC <sub>50</sub> = 58; 49 a 110 μm	62)
		Hep3B	IC <sub>50</sub> = 1,26 μm IC <sub>50</sub> = 3,20 μm IC <sub>50</sub> = 1,26 μm	inhibice HIF-1α, inhibice VEGF, potlačení životaschopnosti	63)
	sanggenon B	HSC-2 HSG HGF	CC <sub>50</sub> = 39 μm CC <sub>50</sub> = 47 μm CC <sub>50</sub> = 98 μm	PK 2'-hydroxychalkon CC <sub>50</sub> = 58; 49 a 110 μm	62, 64)
	sanggenon O	HSC-2 HSG HGF	CC <sub>50</sub> = 73 μm CC <sub>50</sub> = 100 μm CC <sub>50</sub> = 140 μm	PK 2'-hydroxychalkon CC <sub>50</sub> = 58; 49 a 110 μm	62)
		RAW 264,7	IC <sub>50</sub> = 1,15 μm IC <sub>50</sub> = 1,29 μm	inhibice produkce NO, inhibice NF-κB	60)
		Hep3B	IC <sub>50</sub> = 1,03 μm IC <sub>50</sub> = 2,08 μm IC <sub>50</sub> = 8,75 μm	inhibice HIF-1α, inhibice VEGF, potlačení životaschopnosti	63)
	sanggenon A	HSC-2 HSG HGF	CC <sub>50</sub> = 53 μm CC <sub>50</sub> = 46 μm CC <sub>50</sub> = 110 μm	PK 2'-hydroxychalkon CC <sub>50</sub> = 58; 49 a 110 μm	62, 65)
	sanggenon D	HSC-2 HSG HGF	CC <sub>50</sub> = 44 μm CC <sub>50</sub> = 64 μm CC <sub>50</sub> = 140 μm	PK 2'-hydroxychalkon CC <sub>50</sub> = 58; 49 a 110 μm	62, 66)
	sanggenol Q	H460 A-549 H1299	10–60 μg/ml 10–60 μg/ml 10–60 μg/ml	aktivace kaspasy-9 a -3 inhibice proteinu Bcl-2 a XIAP	67, 16)



Tab. 3. Prenylované chalkony

Substituent	Látka	Buněčná linie	Hodnota účinku	Další informace	Odkaz	
acyklický prenyl na A-kruhu	morachalkon A	P388	IC <sub>50</sub> = 17,8 μm		43, 42)	
	morachalkon B	HCT-8 BGC-823	IC <sub>50</sub> = 6,4 μg/ml IC <sub>50</sub> = 5,7 μg/ml		68)	
	morachalkon C	HCT-8 BGC-823	IC <sub>50</sub> = 9,4 μg/ml IC <sub>50</sub> = 8,3 μg/ml		68)	
	isobavachalkon	PC-3	PC-3	IC <sub>50</sub> = 26,19 μm	vazba na thioredoxin reductasu 1, zvýšení hladiny ROS	69, 42)
		Tca8113	Tca8113	20 a 40 μm	snížení exprese MMP-2 a -9, defosforylace kinasy Akt a ERK, down-regulace proteinu Bcl-2, up-regulace Bax	70)
		MGC803	MGC803	IC <sub>50</sub> = 49,68 μm	inhibice drah Akt a ERK, down-regulace Bcl-2, up-regulace Bax, aktivace kaspasy-3	71)
		CCRF-CEM CEM/ADR 5000	CCRF-CEM CEM/ADR 5000	IC <sub>50</sub> = 2,90 μm IC <sub>50</sub> = 3,73 μm	PK doxorubicin IC <sub>50</sub> = 0,20 a 195,12 μm	72)
		HeLa	HeLa	25 a 50 μm	kombinace s proteinem TRAIL, zvýšená exprese receptoru DR5	73)
		H929	H929	10–40 μm	souběžná aplikace chlorochinu vede k aktivaci proteinkinasy C, kaspasy-9 a -3	74)
		OVCAR-8 PC-3 MCF-7 A-549 L-02 HUVEC	OVCAR-8 PC-3 MCF-7 A-549 L-02 HUVEC	IC <sub>50</sub> = 7,92 μm IC <sub>50</sub> = 15,06 μm IC <sub>50</sub> = 28,29 μm IC <sub>50</sub> = 32,20 μm IC <sub>50</sub> = 31,61 μm IC <sub>50</sub> = 31,30 μm	inhibice Akt	75)
IMR-32 NB-39	IMR-32 NB-39	IC <sub>50</sub> = 5,61 μm IC <sub>50</sub> = 6,22 μm	up-regulace proteinu Bax, aktivace kaspasy-9 a -3	76)		

Substituent	Látka	Buněčná linie	Hodnota účinku	Další informace	Odkaz
diprenyl	kuwanon J 2,4,10''- -trimethylether	HeLa	IC <sub>50</sub> = 4,65 μm	inhibice NF-κB, PK celastrol IC <sub>50</sub> = 4,1 μm	77)
	kuwanon R	HeLa	IC <sub>50</sub> = 7,38 μm	inhibice NF-κB, PK celastrol IC <sub>50</sub> = 4,1 μm	77)
		Hep3B	IC <sub>50</sub> = 3,17 μm IC <sub>50</sub> = 3,51 μm IC <sub>50</sub> = 6,42 μm	inhibice HIF-1α, inhibice VEGF, potlačení životaschopnosti	63)
	kuwanon J	Hep3B	IC <sub>50</sub> = 4,10 μm IC <sub>50</sub> = 3,14 μm IC <sub>50</sub> = 8,55 μm	inhibice HIF-1α, inhibice VEGF, potlačení životaschopnosti	63, 1)
	kuwanon Q	Hep3B	IC <sub>50</sub> = 3,80 μm IC <sub>50</sub> = 4,24 μm IC <sub>50</sub> = 5,94 μm	inhibice HIF-1α, inhibice VEGF, potlačení životaschopnosti	63, 11)
	kuwanon V	Hep3B	IC <sub>50</sub> = 8,32 μm IC <sub>50</sub> = 7,84 μm IC <sub>50</sub> = 9,54 μm	inhibice HIF-1α, inhibice VEGF, potlačení životaschopnosti	63, 11)

Tab. 4. Diels-Alderovy adukty chalkonu a dehydroprenyl-2-arylbenzofuranu

Substituent	Látka	Buněčná linie	Hodnota účinku	Další informace	Odkaz
prenyl	mulberrofuran G	HL-60 HeLa HepG-2 A-549 AGS	IC <sub>50</sub> = 3,4 μm IC <sub>50</sub> = 9,6 μm IC <sub>50</sub> = 14,4 μm IC <sub>50</sub> = 15,3 μm IC <sub>50</sub> = 3,5 μm	PK cisplatina IC <sub>50</sub> = 3,7; 4,9; 12,5; 12,4; 18,8 μm	16)
		HL-60 CRL1579	IC <sub>50</sub> = 1,7 μm IC <sub>50</sub> = 9,8 μm	PK cisplatina IC <sub>50</sub> = 1,9 μm IC <sub>50</sub> = 21,1 μm aktivace kaspasy -3, -8,-9,-2, zvýšení poměru Bax/Bcl-2	78)
		A-549 BGC-823 HCT-8 A2780 Bel 7402	IC <sub>50</sub> = 5,2 μg/ml IC <sub>50</sub> = 5,7 μg/ml IC <sub>50</sub> = 8,9 μg/ml IC <sub>50</sub> = 5,0 μg/ml IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml	PK 5-fluorouracil IC <sub>50</sub> = 0,2; 0,7; 0,5; 0,7 a 0,5 μg/ml	40)
		Hep3B	IC <sub>50</sub> = 2,60 μm IC <sub>50</sub> = 28,6 μm	inhibice HIF-1α inhibice VEGF	63)
	mulberrofuran C	HL-60 HeLa HepG-2 A-549 AGS	IC <sub>50</sub> > 40 μm IC <sub>50</sub> > 40 μm IC <sub>50</sub> > 40 μm IC <sub>50</sub> > 40 μm IC <sub>50</sub> > 40 μm	PK cisplatina IC <sub>50</sub> = 3,7; 4,9; 12,5; 12,4; 18,8 μm	16)

prenyl	mulberrofuran J	HL-60 HeLa HepG-2 A-549 AGS	IC <sub>50</sub> > 40 μm IC <sub>50</sub> > 40 μm IC <sub>50</sub> > 40 μm IC <sub>50</sub> > 40 μm IC <sub>50</sub> > 40 μm	PK cisplatina IC <sub>50</sub> = 3,7; 4,9; 12,5; 12,4; 18,8 μm	16)
	mongolicin C	HL-60 HeLa HepG-2 A-549 AGS	IC <sub>50</sub> = 17,1 μm IC <sub>50</sub> = 17,1 μm IC <sub>50</sub> = 17,4 μm IC <sub>50</sub> = 16,8 μm IC <sub>50</sub> = 17,5 μm	PK cisplatina IC <sub>50</sub> = 3,7; 4,9; 12,5; 12,4; 18,8 μm	16)
		A-549 Bel 7402 BGC-823 HCT-8 A2780	IC <sub>50</sub> = 6,6 μg/ml IC <sub>50</sub> = 7,2 μg/ml IC <sub>50</sub> = 6,1 μg/ml IC <sub>50</sub> = 6,7 μg/ml IC <sub>50</sub> = 6,0 μg/ml	PK fluorouracil IC <sub>50</sub> = 0,2; 0,5; 0,7; 0,5 a 0,7 μg/ml	40)
	australisin C	A-549 Bel 7402 BGC-823 HCT-8 A2780	IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml IC <sub>50</sub> = 8,5 μg/ml	PK fluorouracil IC <sub>50</sub> = 0,2; 0,5; 0,7; 0,5 a 0,7 μg/ml	40, 65)
	mulberrofuran Q	HL-60 CRL1579	IC <sub>50</sub> = 37,6 μm IC <sub>50</sub> = 83,9 μm	PK cisplatina IC <sub>50</sub> = 1,9 μm IC <sub>50</sub> = 21,1 μm aktivace kaspasy -3,-8,-9,-2 a zvýšení poměru Bax/Bcl-2	78)
A-549 Bel 7402 BGC-823 HCT-8 A2780		IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml IC <sub>50</sub> > 10 μg/ml	PK fluorouracil IC <sub>50</sub> = 0,2; 0,5; 0,7; 0,5 a 0,7 μg/ml	40)	
diprenyl	mulberrofuran F	A-549 Bel 7402 BGC-823 HCT-8 A2780	IC <sub>50</sub> = 4,9 μg/ml IC <sub>50</sub> = 4,8 μg/ml IC <sub>50</sub> = 5,7 μg/ml IC <sub>50</sub> = 4,7 μg/ml IC <sub>50</sub> = 4,6 μg/ml	PK fluorouracil IC <sub>50</sub> = 0,2; 0,5; 0,7; 0,5 a 0,7 μg/ml	40, 42)
	mulberrofuran E	A-549 Bel 7402 BGC-823 HCT-8 A2780	IC <sub>50</sub> = 5,8 μg/ml IC <sub>50</sub> = 6,6 μg/ml IC <sub>50</sub> = 5,9 μg/ml IC <sub>50</sub> = 6,7 μg/ml IC <sub>50</sub> = 5,7 μg/ml	PK fluorouracil IC <sub>50</sub> = 0,2; 0,5; 0,7; 0,5 a 0,7 μg/ml	40, 79)
	chalkomoracin	A-549 Bel 7402 BGC-823 HCT-8 A2780	IC <sub>50</sub> = 5,5 μg/ml IC <sub>50</sub> = 5,6 μg/ml IC <sub>50</sub> = 5,6 μg/ml IC <sub>50</sub> = 7,0 μg/ml IC <sub>50</sub> = 5,7 μg/ml	PK fluorouracil IC <sub>50</sub> = 0,2; 0,5; 0,7; 0,5 a 0,7 μg/ml	40, 42)
		PC-3 MDA-MB-231	IC <sub>50</sub> = 6,0 μm IC <sub>50</sub> = 6,0 μm	indukce paraptosy potlačením exprese proteínu AIP1/Alix, zvýšená tvorba ROS, zvýšená exprese PINK1	80)
	yunanensin A	A-549 Bel 7402 BGC-823 HCT-8 A2780	IC <sub>50</sub> = 0,922 μg/ml IC <sub>50</sub> = 5,387 μg/ml IC <sub>50</sub> = 0,863 μg/ml IC <sub>50</sub> = 5,378 μg/ml IC <sub>50</sub> = 2,384 μg/ml		81, 82)

## Prenylované stilbeny

Tab. 5. Diels-Alderovy adukty chalkonu a dehydroprenylstilbeny

Substituent	Látka	Hodnota účinku	Další informace	Odkaz
prenyl	kuwanon Y	IC <sub>50</sub> = 15 μmol/l	inhibice proteinkinasy C	<sup>83)</sup>

## Diskuze

V práci jsou popsány a hodnoceny cytotoxické a anti-proliferativní účinky prenylovaných fenolů izolovaných z moruše bílé. Z celkového souboru 113 prenylovaných fenolů tvořily největší část hodnocených látek prenylované flavony, dále v sestupném pořadí prenylované flavanony, Diels-Alderovy adukty chalkonu a dehydroprenyl-2-arylbenzofuranu, prenylované chalkony a nakonec prenylované stilbeny. Cytotoxickou aktivitu vykazalo 57 látek, přičemž kořenová kůra moruše bílé představuje hlavní zdroj prenylovaných fenolů a také je poměrně velké množství těchto látek zastoupeno v listech stromu *Morus alba*.

*Moraceae* je jednou z nejbohatších čeledí na prenylované flavonoidy<sup>10)</sup>. Prenylovaný postranní řetězec, který může být různě modifikován, zvyšuje lipofilitu látek, čímž zlepšuje jejich prostupnost biologickými membránami a vede tak ke zvýšení biologické dostupnosti<sup>9)</sup>.

Prenylovaný postranní řetězec v mnohých případech zlepšuje i biologickou aktivitu, což bylo prokázáno studií na buněčné linii melanomu B16, kde cytotoxická aktivita rostla se vzrůstajícím počtem prenylových skupin<sup>18)</sup>. Nejvyšší cytotoxický účinek vykazovaly látky obsahující ve své struktuře dva prenylované postranní řetězce, ke kterým patřily cudraflavon C, cudraflavon B a kuwanon C. Podíváme-li se detailněji na struktury těchto tří látek, můžeme konstatovat, že cytotoxickou aktivitu ovlivňují i hydroxylové skupiny ve specifických polohách. Cudraflavon C s nejnižší hodnotou inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub> = 9,2 μm) má acyklické prenylové skupiny navázány v polohách C-3 a C-6. Cudraflavon B také obsahuje prenylové skupiny v polohách C-3 a C-6, avšak v poloze C-6 došlo k cyklizaci prenylu se sousední hydroxylovou skupinou, což je pravděpodobně důvodem nižší cytotoxické aktivity cudraflavonu B (IC<sub>50</sub> = 12,5 μm) v porovnání s cytotoxickou aktivitou cudraflavonu C. Kuwanon C vykázal z těchto tří látek nejvyšší hodnotu inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub> = 14,2 μm), což bude s největší pravděpodobností způsobeno substitucí acyklickými prenylovými skupinami v polohách C-3 a C-8.

V této studii byl také testován albanin A, který obsahuje jeden acyklický prenylovaný řetězec v poloze C-3. Hodnota inhibiční koncentrace albaninu A (IC<sub>50</sub> = 84,7 μm) se již velmi výrazně lišila od hodnot inhibičních koncentrací diprenylovaných flavonů. Tato studie také naznačuje, že látka obsahující acyklickou prenylovou skupinu v poloze C-6 vykazuje mnohem silnější cytotoxicitu než látka s acyklickou prenylovou skupinou v poloze C-3.

Lze tedy říci, že v případě diprenylovaných flavonů byla neefektivnější substituce acyklických prenylových skupin v polohách C-3 a C-6, dále efektivita klesala cyklizací jednoho z prenylu se sousedním hydroxylem a nejméně efektivní se zdála být substituce acyklických prenylových skupin v polohách C-3 a C-8<sup>18)</sup>.

Další studie, která podporuje tvrzení, že prenylovaný postranní řetězec zvyšuje cytotoxický účinek, porovnává cytotoxickou aktivitu 8-prenylapigeninu a apigeninu u nádorové buněčné linie myšičího hepatomu H4IIE a myšičí gliomu C6, kde hodnota inhibiční koncentrace apigeninu nebyla na rozdíl od 8-prenylapigeninu vůbec stanovena<sup>17)</sup>. Ke stejnému závěru došel Ferlinahayati et al., kdy C-8 prenylovaný euchrenon a, vykázal na buňkách myšičí lymfocytické leukemie P388 vyšší cytotoxicitu než norartocarpanon, který přítomnost prenylovaného postranního řetězce postrádá<sup>53)</sup>.

Vliv geranylovaného postranního řetězce na cytotoxickou aktivitu uvádí ve své studii i Šmejkal et al. Ukázalo se, že flavanony s geranylovou skupinou v poloze C-6 vykazovaly vyšší cytotoxicitu než flavanony obsahující geranyl v poloze C-3', mezi které patří například kuwanon E nebo kuwanon U. Kromě toho hydroxylace geranylovaného postranního řetězce cytotoxicitu snižuje, stejně jako přítomnost hydroxylové skupiny v poloze C-3<sup>84)</sup>.

Nejširší paletu cytotoxických aktivit vykázal jednoznačně morusin, jehož struktura obsahuje prenylovou skupinu v poloze C-8, která podlela cyklizaci s hydroxylovou skupinou v poloze C-7, a další acyklickou prenylovou skupinu v poloze C-3. U morusinu byly rovněž provedeny tři studie *in vivo*, v nichž tato látka dokázala snížit plicní kolonizaci buněk hepatocelulárního karcinomu SK-Hep1 u imunodeficientního kmenu myšičí druhu Nude mice a potlačit růst epiteliálního ovariálního karcinomu a glioblastomu<sup>24, 27, 33)</sup>. Studie *in vivo* byla provedena i u sanggenonu C ze skupiny prenylovaných flavanonů, kde na myšičím xenograftovém modelu potlačil růst karcinomu tlustého střeva a zvýšil apoptosu buněk tohoto nádoru<sup>59)</sup>. Chalkomoracin je jediným zástupcem Diels-Alderových aduktů chalkonu a dehydroprenyl-2-arylbenzofuranu, který byl prozatím testován *in vivo*. Na myšičím xenograftovém modelu prokázal inhibiční účinek na růst karcinomu prsu buněčné linie MDA-MB-231<sup>80)</sup>.

O selektivitě lze v případě prenylovaných flavonů hovořit u cudraflavonu B a cudraflavonu C. Cudraflavon B účinně zastavoval buněčný cyklus lidské monocytární buněčné linie THP-1 ve fázi G<sub>1</sub>, avšak distribuce nenádorové buněčné linie BPH-1 izolované z benigní hyperplazie prostaty zůstala ve všech fázích buněčného cyklu nezměněna, a to i po vystavení vysokým koncentracím.

tracím cudraflavonu B<sup>37</sup>). Silný cytotoxický účinek vykázal cudraflavon B u dvou nádorových buněčných linií skvamózního orálního karcinomu HN4 a HN12, avšak vůči nenádorovým lidským orálním keratinocytům cytotoxicitu ve stejné koncentraci neprojevil<sup>38</sup>). Cudraflavon C by mohl představovat vhodnou molekulu pro studium léčby maligního melanomu A375.S2, protože indukuje apoptosu jeho buněk a zároveň není cytotoxický vůči lidským fibroblastům a keratinocytům<sup>44</sup>). Soo et al. zaznamenal selektivní inhibiční účinek cudraflavonu C na proliferaci buněk kolorektálního karcinomu KM12, Caco-2, HT-29, HCC2998, SW48 a HCT116, nicméně proliferaci epitelálních kolorektálních buněk CCD CoN 841 cudraflavon C neinhiboval<sup>46</sup>).

Určitá selektivní aktivita byla zjištěna u pěti prenylovaných flavanonů sanggenonu A, B, C, D a O, které prokázaly vyšší cytotoxicitu vůči lidským orálním nádorovým buněčným liniím (HSC-2 a HSG) než vůči nenádorovým lidským gingiválním fibroblastům (HGF)<sup>62</sup>.

Isobavachalkon projevil selektivní účinek hned ve dvou studiích. Nejprve byl potvrzen jeho antiproliferativní účinek u čtyř nádorových buněčných linií OVCAR-8, PC-3, MCF-7 a A-549 (ovariální karcinom, karcinom prostaty, karcinom prsu a karcinom plic) a u dvou nenádorových buněčných linií L-02, HUVEC (jaterní buňky a lidské endoteliální buňky pupečnickové vény). Nicméně silnější antiproliferativní aktivita byla prokázána u nádorových buněčných linií OVCAR-8 a PC-3 ( $IC_{50} = 7,92$  a  $15,06 \mu\text{m}$ ), a to z toho důvodu, že tyto dvě nádorové buněčné linie vykazují nadměrnou aktivaci endogenní proteinkinasy B (Akt), kterou isobavachalkon účinně inhibuje<sup>75</sup>). Velmi silný cytotoxický účinek isobavachalkonu byl pozorován u dvou nádorových buněčných linií lidského neuroblastomu IMR-32 a NB-39 ( $IC_{50} = 5,61$  a  $6,22 \mu\text{m}$ ), avšak vůči nenádorovým cerebelárním granulárním buňkám cytotoxicky nepůsobil ( $IC_{50} > 100 \mu\text{m}$ )<sup>76</sup>).

Ze studie zkoumající cytotoxicitu desíti prenylovaných flavonů vůči třem nádorovým buněčným liniím HeLa, MCF-7 a Hep3B lze vyhodnotit jako nejefektivnější 3'-geranyl-3-prenyl-2',4',5,7-tetrahydroxyflavon, 8-geranylapienin a sanggenon K. Všechny tyto tři látky obsahují geranylovaný postranní řetězec, přičemž 3'-geranyl-3-prenyl-2',4',5,7-tetrahydroxyflavon a sanggenon K mají ve své struktuře navázanou i prenylovou skupinu v poloze C-3. Znovu se zde potvrzuje teorie, že substituce geranylovou skupinou v poloze C-8 (8-geranylapienin) vykazuje vyšší cytotoxicitu vůči nádorovým buněčným liniím MCF-7 a Hep3B, než substituce geranylem v poloze C-3' (kuwanon S). Rozdíl mezi 3'-geranyl-3-prenyl-2',4',5,7-tetrahydroxyflavonem a sanggenonem K je v modifikaci geranylové skupiny v poloze C-3'. V případě 3'-geranyl-3-prenyl-2',4',5,7-tetrahydroxyflavonu je tento geranyl acyklický, avšak sanggenon K má ve své struktuře geranyl cyklický. I zde může být cyklický geranyl příčinou nižší cytotoxické aktivity vůči nádorové buněčné linii HeLa, nicméně vůči nádorovým buněčným liniím MCF-7 a Hep3B vykázal lepší cytotoxicitu právě sanggenon K obsahující geranyl cyklický. Sanggenon K i sanggenon J obsahují geranylovou skupinu v poloze C-3', přesto vyšší cytotoxicitu vykazuje sanggenon K, u které-

ho dochází k cyklizaci geranylu s hydroxylovou skupinou v poloze C-2' na rozdíl od sanggenonu J, který podléhá cyklizaci s hydroxylem v poloze C-4'. U morusinu, cyklomorusunu a cyklomulberrinu lze konstatovat, že nižší cytotoxická aktivita morusinu a cyklomorusunu vůči MCF-7 a Hep3B může být způsobena cyklizací prenylové skupiny v poloze C-8 se sousedním hydroxylem v poloze C-7, kdežto u cyklomulberrinu k této cyklizaci nedochází<sup>21</sup>).

Qin et al. se zabýval cytotoxickou aktivitou Diels-Alderových aduktů chalkonu a dehydroprenyl-2-arylbzenzofuranu, prenylovaných flavanonů a prenylovaných flavonů u nádorových buněčných linií HL-60 (lidská myeloidní leukemie), HeLa (lidský cervikální adenokarcinom), HepG-2 (lidský hepatocelulární karcinom), A-549 (lidský nemalobuněčný karcinom plic) a AGS (lidský adenokarcinom žaludku). Z Diels-Alderových aduktů chalkonu a dehydroprenyl-2-arylbzenzofuranu byla určena cytotoxická aktivita pouze u mulberrofuranu G a mongolicinu C. Mulberrofuran G však vykázal vyšší cytotoxický účinek vůči všem pěti nádorovým buněčným liniím, což může být způsobeno přítomností ketalových skupin, kterých mulberrofuran G obsahuje více než mongolicin C. Geranylovaný flavanon sanggenol L vykázal ze všech testovaných látek nejnižší hodnotu inhibiční koncentrace u buněčné linie nemalobuněčného karcinomu plic. Z chemických struktur 3'-geranyl-3-prenyl-2',4',5,7-tetrahydroxyflavonu, morusinu a morusinolu vyplývá již výše uváděný fakt, že cyklizací prenylovaného postranního řetězce klesá cytotoxická aktivita. Morusin a morusinol jsou diprenylované flavony lišící se modifikací prenylu v poloze C-3. Morusin má ve své struktuře navázaný acyklický prenyl v poloze C-3, ale morusinol obsahuje v poloze C-3 prenyl cyklický, a právě proto morusin vykazuje vyšší cytotoxickou aktivitu. Naopak 3'-geranyl-3-prenyl-2',4',5,7-tetrahydroxyflavon vykazuje vyšší cytotoxicitu než morusin, protože je jeho prenylovaný i geranylovaný řetězec acyklický. Pozoruhodné je, že licoflavon C prokázal nejvyšší cytotoxicitu ze všech testovaných prenylovaných flavonů u nádorových buněčných linií HL-60 ( $IC_{50} = 7,0 \pm 1,3 \mu\text{m}$ ) a HepG-2 ( $IC_{50} = 10,2 \pm 0,9 \mu\text{m}$ ), a to i přesto, že ve své struktuře obsahuje pouze jeden acyklický prenylovaný postranní řetězec v poloze C-8<sup>16</sup>).

Licoflavon C a cudraflavon B byly testovány vůči nádorovým buněčným liniím KB (lidský orální karcinom), MCF-7 (karcinom prsu) a NCI-H187 (karcinom plic) a vůči nenádorové buněčné linii Vero (ledvinné fibroblasty získané z afrického kočkodana zeleného). Diprenylovaný cudraflavon B vykázal cytotoxicitu u všech testovaných buněčných linií, zatímco licoflavon C obsahující jednu prenylovou skupinu vykázal cytotoxicitu pouze u buněk karcinomu plic a Vero. To na první pohled působí, že dva prenylované postranní řetězce cudraflavonu B zlepšují jeho cytotoxickou aktivitu. Když však porovnáme jejich jednotlivé hodnoty inhibičních koncentrací, zjistíme, že u licoflavonu C byla naměřena nižší hodnota inhibiční koncentrace vůči buňkám karcinomu plic než u cudraflavonu B a zároveň licoflavon C prokázal žádoucí nižší cytotoxicitu vůči nenádorovým buňkám Vero<sup>14</sup>).

Existují však i další studie, ve kterých neplatí tvrzení, že cyklizace prenylové skupiny se sousední hydroxylovou skupinou snižuje cytotoxickou aktivitu, například při testování morusinu a kuwanonu C na buňkách myši lymfocytické leukemie P388. Přestože morusin ve své struktuře obsahuje jeden acyklický a jeden cyklický prenylovaný řetězec, vykázal vyšší cytotoxickou aktivitu než kuwanon C, který má ve své struktuře navázány dva acyklické prenyly ve stejných polohách jako morusin. Dále byl testům cytotoxicity podroben i prenylovaný chalkon morachalkon A, který ze všech tří testovaných látek vykázal nejnižší cytotoxicitu<sup>43</sup>.

Studie testující cytotoxickou aktivitu devíti Diels-Alderových aduktů chalkonu a dehydroprenyl-2-arylbenzofuranu vůči nádorovým buněčným liniím A-549 (lidský nemalobuněčný karcinom plic), Bel 7402 (lidský hepatocelulární karcinom), BGC-823 (karcinom žaludku), HCT-8 (lidský kolorektální karcinom) a A2780 (lidský ovariální karcinom) došla k závěru, že nejvyšší cytotoxicity dosáhl yunanensin A, v jehož struktuře jsou přítomné ketalové skupiny, a dva prenylované postranní řetězce, z nichž jeden podléhá cyklizaci se sousedním hydroxylem a druhý se podílí na 4+2 cykloadici, ze které však nevzniká cyklohexen, nýbrž benzen. O něco menší cytotoxicitu vykázal mulberrofuran F, který ve své struktuře také obsahuje ketalové skupiny i dva prenylované postranní řetězce, z nichž je jeden acyklický a druhý se účastní 4+2 cykloadice. Jak již bylo řečeno, cyklizace prenylovaného postranního řetězce by měla cytotoxicitu snižovat, což však v tomto případě neplatí. Ve struktuře yunanensinu A může cytotoxicitu ovlivňovat benzenový kruh místo cyklohexenového. Dále téměř stejnou cytotoxickou aktivitu vykázaly chalkomoracin a mulberrofuran E. Tyto dvě látky jsou strukturálně velmi podobné, obě obsahují dva prenylované postranní řetězce, avšak chalkomoracin disponuje jednou hydroxylovou skupinou navíc, což bude pravděpodobně důvodem jeho vyšší cytotoxicity. Velmi podobnou míru cytotoxicity s těmito dvěma látkami prokázal mulberrofuran G, jehož strukturu tvoří ketalové skupiny. Na rozdíl od předchozích dvou látek nevykázal cytotoxicitu u všech nádorových buněčných linií. U mongolicinu C byla zjištěna nižší cytotoxicita než u mulberrofuranu G, protože mulberrofuran G obsahuje více ketalových skupin. Australisin C prokázal nejslabší cytotoxický efekt u nádorové buněčné linie A2780, zatímco mulberrofuran J a Q spolu s prenylovaným flavonem kuwanonem G byly inaktivní. Vzhledem k výsledkům této studie lze konstatovat, že vzrůstající počet prenylovaných postranních řetězců, ketalových skupin a hydroxylových skupin zvyšuje cytotoxický účinek<sup>40, 81</sup>.

Kikuchi et al. testoval albanol A a mulberrofuran Q u nádorové buněčné linie myeloidní leukemie HL-60 a melanomu CRL1579. Zde albanol A vykázal dokonce vyšší cytotoxickou aktivitu než kontrolní cisplatina. Mulberrofuran Q vykázal naopak jen velmi slabou cytotoxickou aktivitu. Výsledek této studie tedy dokládá fakt, že intenzita cytotoxické aktivity může korelovat s množstvím ketalových skupin<sup>78</sup>.

V některých případech může o cytotoxicitě rozhodovat i konečná konfigurace látek. Například sanggenon C a sanggenon O jsou vzájemnými diastereoizomery, kterým se ve své studii věnoval Dat et al. Zkoumal potlačení životaschopnosti buněk Hep3B a inhibici akumulace HIF-1 $\alpha$  (hypoxií indukovaný transkripční faktor) a sekrece vaskulárního endoteliálního růstového faktoru v buňkách této linie. Sanggenon O sice efektivněji inhiboval akumulaci HIF-1 $\alpha$  a sekreci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, avšak sanggenon C vykázal silnější cytotoxicitu u buněk Hep3B. Z prenylovaných chalkonů byly těmto testům podrobeny kuwanon J, Q, R a V, přičemž kuwanony J, Q a R vykázaly podobné hodnoty inhibičních koncentrací. Hodnoty inhibičních koncentrací kuwanonu V byly ve všech případech nejvyšší, z čehož vyplývá jeho nejslabší cytotoxický efekt, který může být dán nižším počtem hydroxylových skupin v jeho struktuře<sup>63</sup>.

K zajímavému závěru došla studie hodnotící kuwanon L a sanggenon B, C, D a G jako inhibitory proteinu XIAP. Sanggenony B, C a D neprokázaly žádnou aktivitu, na rozdíl od sanggenonu G a kuwanonu L. Kuwanon L však v porovnání se sanggenonem G projevil jen velmi malou inhibiční aktivitu, protože sanggenon G vzhledem k vyšší lipofilitě postranního prenylovaného řetězce daleko lépe překonává biologické membrány, čímž efektivně vstupuje do buněk. Aby látka mohla působit jako ligand domény proteinu XIAP, vyžaduje určitou flexibilitu fenylové skupiny (B-kruh) flavonoidního skeletu, což v případě sanggenonu B, C, a D není dodrženo, protože hydroxylová skupina navázaná na B-kruhu flavonoidního skeletu podlehla cyklizaci s C-kruhem<sup>49</sup>.

## Závěr

Cílem práce bylo vyhledat v dostupné literatuře prenylované fenoly s cytotoxickou a antiproliferativní aktivitou izolované z *Morus alba* a následně popsat a vyhodnotit souvislosti mezi strukturou těchto látek a jejich účinkem.

Z celkového souboru 113 prenylovaných fenolů byla cytotoxická aktivita zjištěna u 57 látek, které byly nejčastěji izolovány z kořenové kůry moruše bílé. Většina látek s cytotoxickou aktivitou byla odvozena od prenylovaných flavonoidů. Substituce fenolického skeletu prenylovanými postranními řetězci zvyšuje lipofilitu látky a uděluje jí silnou afinitu k biologickým membránám, díky čemuž je látka schopna interagovat s cílovými proteiny v buňce. Prenylované fenoly indukovaly v buňkách apoptosu ovlivňováním exprese proteinů z rodiny Bcl-2 nebo aktivováním klíčových apoptotických enzymů – kaspas.

Výsledky studií potvrdily, že se vzrůstajícím počtem prenylovaných postranních řetězců roste cytotoxická aktivita, na kterou měly dále vliv i hydroxylové skupiny ve specifických polohách. Ketalové skupiny v kombinaci s prenylovanými postranními řetězci rovněž zvyšovaly cytotoxickou aktivitu. Také se ukázalo, že látky s prenylovou skupinou navázanou na A-kruhu vykazovaly vyš-

ší cytotoxicitu než látky obsahující prenylovou skupinu na B-kruhu nebo C-kruhu. Modifikace prenylovaného postranního řetězce, jako je například hydroxylace, cytotoxicitu naopak snižovala. Jakým způsobem ovlivňuje cyklizace prenylovaného postranního řetězce se sousedním hydroxylem cytotoxickou aktivitu, zůstává nejasné. V některých případech cyklizací prenylové skupiny se sousedním hydroxylem cytotoxicita rostla, v jiných naopak klesala. Geranylované fenoly vykazaly ve studiích vyšší cytotoxicitu než prenylované fenoly, protože geranylová skupina je více lipofilní a umožňuje tak efektivnější vstup do buněk.

Osm prenylovaných fenolů prokázalo selektivní cytotoxický účinek vůči nádorovým buňkám, přičemž vůči nenádorovým buňkám nebyly cytotoxické vůbec, nebo byly méně cytotoxické než k buňkám nádorovým.

### Seznam použitých zkratk

Akt	serin-threoninová kinasa
ATP	adenosintrifosfát
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma
CDK	cyklin-dependentní kinasa
DR5	receptor smrti 5
EGFR	epidermální růstový faktor
ER	endoplazmatické retikulum
ERK	extracelulárně regulovaná kinasa
HIF-1	hypoxií indukovaný transkripční faktor
IC50	střední inhibiční koncentrace
LD50	střední smrtelná dávka
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MMP	matrixové metaloproteinasy
NF-κB	jaderný faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
PINK1	PTEN-indukované kinasy 1
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PK	pozitivní kontrola
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
Rb protein	retinoblastomový protein
ROS	reaktivní formy kyslíku
STAT-3	signální transduktor a aktivátor transkripce 3
TNF	tumor nekrotizující faktor
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
XIAP	X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

### Seznam zkratk buněčných linií

AGS	buněčná linie lidského adenokarcinomu žaludku
ACHN	buněčná linie lidského renálního adenokarcinomu
AsPC-1	buněčná linie lidského adenokarcinomu pankreatu
A-549	buněčná linie lidského nemalobuněčného karcinomu plic

A2780	buněčná linie lidského ovariálního karcinomu
A375.S2	buněčná linie lidského maligního melanomu
BGC-823	buněčná linie lidského karcinomu žaludku
BPH-1	buněčná linie benigní hyperplazie prostaty
BxPc-3	buněčná linie lidského adenokarcinomu pankreatu
B16	buněčná linie myšního melanomu
Bel 7402	buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu
Caco-2	buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu
Ca922	buněčná linie lidského orálního skvamózního karcinomu
CEM	buněčná linie lidské T-lymfoblastické leukemie
CEM/ADR 5000	buněčná linie lidské akutní T-lymfoblastické leukemie
CCRF-CEM	buněčná linie lidské T-lymfoblastické leukemie
CRL1579	buněčná linie lidského melanomu
C6	buněčná linie myšního gliomu
DU-145	buněčná linie lidského karcinomu prostaty
dRLh84	buněčná linie hepatocelulárního karcinomu potkana
HCC2998	buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu
HCT-8	buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu
HCT116	buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu
HeLa	buněčná linie lidského cervikálního adenokarcinomu
HepG-2	buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu
Hep3B	buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu
HGF	buněčná linie lidských gingiválních fibroblastů
HL-60	buněčná linie lidské myeloidní leukemie
HN4	buněčná linie lidského orálního skvamózního karcinomu
HN12	buněčná linie lidského metastatického orálního skvamózního karcinomu
HO-8910	buněčná linie lidského ovariálního karcinomu
HSC-2	buněčná linie lidského orálního skvamózního karcinomu
HSG	buněčná linie lidského karcinomu slinné žlázy
HT-29	buněčná linie lidského kolorektálního karcinomu
HUVEC	buněčná linie lidských jaterních buněk
H1299	buněčná linie lidského nemalobuněčného karcinomu plic

H1975	buněčná linie lidského nemalobuněčného karcinomu plic obsahující dvojitou mutaci L858R/T790M	P388	buněčná linie myši lymfocytické leukemie
H22	buněčná linie myšního hepatocelulárního karcinomu	RPMI8226	buněčná linie lidského mnohočetného myelomu
H292	buněčná linie lidského nemalobuněčného karcinomu plic	RAW 264,7	buněčná linie myši leukemie
H4IIE	buněčná linie hepatocelulárního karcinomu potkana	SCC2095	buněčná linie lidského orálního skvamózního karcinomu
H460	buněčná linie lidského nemalobuněčného karcinomu plic	SCLC	buněčná linie lidského malobuněčného karcinomu plic
H929	buněčná linie lidského mnohočetného myelomu	SGC-7901	buněčná linie lidského karcinomu žaludku
IMR-32	buněčná linie lidského neuroblastomu	SKOV-3	buněčná linie lidského ovariálního karcinomu
KB	buněčná linie lidského orálního karcinomu	SK-Hep1	buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu
KM12	buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu	SMMC-7721	buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu
K562	buněčná linie lidské erythro-megakaryoblastické leukemie	SW48	buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu
LAPC-4	buněčná linie lidského pokročilého karcinomu prostaty	SW480	buněčná linie lidského kolorektálního karcinomu
LNCaP	buněčná linie lidského androgen-senzitivního adenokarcinomu prostaty	Tca8113	buněčná linie lidského skvamózního karcinomu jazyku
LoVo	buněčná linie lidského kolorektálního karcinomu	THP-1	buněčná linie lidské monocytické leukemie
L-02	buněčná linie lidských endoteliálních buněk pupečnickové vény	U266	buněčná linie lidského mnohočetného myelomu
MCF-7	buněčná linie lidského prsního karcinomu	Vero	buněčná linie ledvinných fibroblastů získaných z afrického kočkodana zeleného
MCF10A	buněčná linie lidského prsního epitelu		
MDA-MB-157	buněčná linie lidského prsního karcinomu		
MDA-MB-231	buněčná linie lidského prsního karcinomu		
MDA-MB-453	buněčná linie lidského prsního karcinomu		
MGC803	buněčná linie lidského karcinomu žaludku		
MIA Paca 2	buněčná linie lidského adenokarcinomu pankreatu		
MKN45	buněčná linie lidského adenokarcinomu žaludku		
M2182	buněčná linie lidského karcinomu prostaty		
Molt3	buněčná linie lidské akutní T-lymfoblastické leukemie		
NB-39	buněčná linie lidského neuroblastomu		
NCI-H187	buněčná linie lidského malobuněčného karcinomu plic		
NCI-H460	buněčná linie lidského karcinomu plic		
OVCAR-3	buněčná linie lidského ovariálního adenokarcinomu		
OVCAR-8	buněčná linie lidského ovariálního adenokarcinomu		
PANC-1	buněčná linie lidského adenokarcinomu pankreatu		
PC-3	buněčná linie lidského adenokarcinomu prostaty		

**Střet zájmů:** žádný.

#### Literatura

1. **Chan E., Lye P., Wong S.** Review: Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. CJNM 2016; 14(1), 17–30. <https://www.sciencedirect.com.katalog.vfu.cz:444/science/article/pii/S187553641630005X>
2. **Kresánek J.** Atlas léčivých rostlin a lesných plodov. 3. vyd. Bratislava: Osveta 1988; 400 s.
3. **Natić M., Dabić D., Papetti A., Fotirić Akšić M., Ognjanov V., Ljubojević M., Tešić Ž.** Analysis and characterisation of phytochemicals in mulberry (*Morus alba* L.) fruits grown in Vojvodina, North Serbia. Food Chem. 2015; 171, 128–136. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614013260>
4. **Lim T.** Edible Medicinal and Non Medicinal Plants: Volume 3, Fruits. Dordrecht Heidelberg London New York: Springer 2012; 399–429. <https://epdf.tips/volume-3-fruits.html>
5. **Krishna H., Singh D., Singh R., Kumar L., Sharma B., Saroj P.** Morphological and antioxidant characteristics of mulberry (*Morus* spp.) genotypes. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 2018. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1658077X18302169>
6. **Yimam M., Jiao P., Hong M., Brownell L., Hyun-Jin Kim, Lee Y., Jia Q.** Repeated dose 28-day oral toxicity study of a botanical composition composed of *Morus alba* and *Acacia catechu* in rats. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2018; 94, 115–123. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230018300400>



7. **Kumar V., Chauhan S. Mulberry:** Life enhancer. *J. Med. Plants Res.* 2008; 2(10), 271–278. [https://academicjournals.org/article/article1380526584\\_Kumar%20and%20Chauhan.pdf](https://academicjournals.org/article/article1380526584_Kumar%20and%20Chauhan.pdf)
8. **Šmejkal K.** Medicínské využití prenylovaných fenolů. <https://docplayer.cz/71015046-Medicinske-vyuziti-prenylovanych-fenolu-karel-smejkal.html> (2013)
9. **Talhi O.** Organic Synthesis of C-Prenylated Phenolic Compounds. *Curr. Org. Chem.* 2013; 17(10), 1067–1102. [https://www.researchgate.net/publication/236854139\\_Organic\\_Synthesis\\_of\\_C-Prenylated\\_Phenolic\\_Compounds](https://www.researchgate.net/publication/236854139_Organic_Synthesis_of_C-Prenylated_Phenolic_Compounds)
10. **Yang X., Jiang Y., Yang J., He J., Sun J., Chen F., Zhang M., Yang B.** Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities. *Trends Food Sci. Technol.* 2015; 44(1), 93–104. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415000710>
11. **Nomura T., Hano Y., Fukai T.** Chemistry and biosynthesis of isoprenylated flavonoids from Japanese mulberry tree. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* 2009; 85(9), 391–408. <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/pjab/85.391?from=CrossRef>
12. **Xia C., Tang G., Guo Y., Xu Y., Huang Z., Yin S.** Mulberry Diels-Alder-type adducts from *Morus alba* as multi-targeted agents for Alzheimer's disease. *Phytochemistry.* 2019; 157, 82–91. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942218306988>
13. **Nasir S., Tee J., Rahman N., Chee Ch.** Flavonoids – from biosynthesis to human health. InTech. 2017; 167–188. <http://www.intechopen.com/books/flavonoids-from-biosynthesis-to-human-health/biosynthesis-and-biomimetic-synthesis-of-flavonoid-diels-alder-natural-products>
14. **Boonyaketgoso S., Rukachaisirikul V., Phongpaichit S., Trisuwana K.** Cytotoxic arylbenzofuran and stilbene derivatives from the twigs of *Artocarpus heterophyllus*. *Tetrahedron Lett.* 2017; 58(16), 1585–1589. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403917303167>
15. **Guo Y., Tang G., Lou L., Li W., Zhang B., Liu B., Yin S.** Prenylated flavonoids as potent phosphodiesterase-4 inhibitors from *Morus alba*: Isolation, modification, and structure-activity relationship study. *Eur. J. Med. Chem.* 2018; 144, 758–766. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523417310887>
16. **Qin J., Fan M., He J., Wu X., Peng L., Su J., Cheng X., Li Y., Kong L., Li R., Zhao Q.** New cytotoxic and anti-inflammatory compounds isolated from *Morus alba* L. *Nat. Prod. Res.* 2015; 29(18), 1711–1718. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2014.999333>
17. **Wätjen W., Weber N., Lou Y., Wang Z., Chovolou Y., Kampkötter A., Kahl R., Proksch P.** Prenylation enhances cytotoxicity of apigenin and liquiritigenin in rat H4IIE hepatoma and C6 glioma cells. *Food Chem. Toxicol.* 2007; 45(1), 119–124. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691506002213>
18. **Arung E., Yoshikawa K., Shimizu K., Kondo R.** Isoprenoid-substituted flavonoids from wood of *Artocarpus heterophyllus* on B16 melanoma cells: Cytotoxicity and structural criteria. *Fitoterapia.* 2010; 81(2), 120–123. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X09001749>
19. **Zhang Y., Luo J., Wan C., Zhou Z., Kong L.** Four New Flavonoids with  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activities from *Morus alba* var. *tatarica*. *Chem. Biodivers.* 2015; 12(11), 1768–1776. <https://onlinelibrary-wiley-com.katalog.vfu.cz:444/doi/epdf/10.1002/cbdv.201500005>
20. **Fomani M., Ngeufa Happi E., Nougou Bisoué A., Ndom J., Kamdem Waffo A., Sewald N., Wansi J.** Oxidative burst inhibition, cytotoxicity and antibacterial acridinoline alkaloids from *Citrus reticulata* (Blanco). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016; 26(2), 306–309. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X15303413>
21. **Dat N., Binh P., Quynh L., Van Minh C., Huang H., Lee J.** Cytotoxic prenylated flavonoids from *Morus alba*. *Fitoterapia.* 2010; 81(8), 1224–1227. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X10002078>
22. **Kuete V., Sandjo L., Djeussi D., Zeino M., Kwamou G., Ngadjui B., Efferth T.** Cytotoxic flavonoids and isoflavonoids from *Erythrina sigmoidea* towards multi-factorial drug resistant cancer cells. *Invest. New Drugs* 2014; 32(6), 1053–1062. <http://link.springer.com/10.1007/s10637-014-0137-y>
23. **Weng J., Bai L., Ko H., Tsai Y.** Cyclocommunol induces apoptosis in human oral squamous cell carcinoma partially through a Mcl-1-dependent mechanism. *Phytomedicine.* 2018; 39, 25–32. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711317301770>
24. **Lin W., Lai D., Lee Y., Chen N., Tseng T.** Antitumor progression potential of morusin suppressing STAT3 and NF $\kappa$ B in human hepatoma SK-Hep1 cells. *Toxicol. Lett.* 2015; 232(2), 490–498. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427414015069>
25. **Lee J., Won S., Chao C., Wu F., Liu H., Ling P., Lin C., Su C.** Morusin induces apoptosis and suppresses NF- $\kappa$ B activity in human colorectal cancer HT-29 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 372(1), 236–242. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X08009285>
26. **Kang S., Kim E., Kim S., Lee J., Ahn K., Yun M., Lee S.** Morusin induces apoptosis by regulating expression of Bax and Survivin in human breast cancer cells. *Oncol. Lett.* 2017; 13(6), 4558–4562. <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.6006>
27. **Xue J., Li R., Zhao X., Ma C., Lv X., Liu L., Liu P.** Morusin induces paraptosis-like cell death through mitochondrial calcium overload and dysfunction in epithelial ovarian cancer. *Chem.-Biol. Interact.* 2018; 283, 59–74. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279717311924>
28. **Park H., Min T., Chi G., Choi Y., Park S.** Induction of apoptosis by morusin in human non-small cell lung cancer cells by suppression of EGFR/STAT3 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018; 505(1), 194–200. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X18320102>
29. **Wang L., Guo H., Yang L., Dong L., Lin C., Zhang J., Lin P., Wang X.** Morusin inhibits human cervical cancer stem cell growth and migration through attenuation of NF- $\kappa$ B activity and apoptosis induction. *Mol. Cell. Biochem.* 2013; 379(1–2), 7–18. <http://link.springer.com/10.1007/s11010-013-1621-y>
30. **Lim S., Park S., Kang S., Park D., Kim S., Um J., Jang H., Lee J., Jeong C., Jang J., Ahn K., Lee S.** Morusin induces cell death through inactivating STAT3 signaling in prostate cancer cells. *Am. J. Cancer Res.* 2015; 5(1), 289–300. <http://www.ajcr.us/files/ajcr0003469.pdf>
31. **Kim C., Kim J., Oh E., Nam D., Lee S., Lee J., Kim S., Shim B., Ahn K.** Blockage of STAT3 Signaling Pathway by Morusin Induces Apoptosis and Inhibits Invasion in Human Pancreatic Tumor Cells. *Pancreas.* 2016; 45(3), 409–419. <http://Insights.ovid.com/crossref?an=00006676-201603000-00015>

32. **Park D., Ha I., Park S., Choi M., Lim S., Kim S., Lee J., Ahn K., Yun M., Lee S.** Morusin Induces TRAIL Sensitization by Regulating EGFR and DR5 in Human Glioblastoma Cells. *J. Nat. Prod.* 2016; 79(2), 317–323. <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.5b00919>
33. **Guo H., Liu C., Yang L., Dong L., Wang L., Wang Q., Li H., Zhang J., Lin P., Wang X.** Morusin inhibits glioblastoma stem cell growth in vitro and in vivo through stemness attenuation, adipocyte transdifferentiation, and apoptosis induction. *Mol. Carcinog.* 2016; 55(1), 77–89. <http://doi.wiley.com/10.1002/mc.22260>
34. **Wang F., Zhang D., Mao J., Ke X., Zhang R., Yin C., Gao N., Cui H.** Morusin inhibits cell proliferation and tumor growth by down-regulating c-Myc in human gastric cancer. *Oncotarget.* 2017; 8(34), 57187–57200. [https://www.researchgate.net/publication/318437337\\_Morusin\\_inhibits\\_cell\\_proliferation\\_and\\_tumor\\_growth\\_by\\_downregulating\\_c-Myc\\_in\\_human\\_gastric\\_cancer](https://www.researchgate.net/publication/318437337_Morusin_inhibits_cell_proliferation_and_tumor_growth_by_downregulating_c-Myc_in_human_gastric_cancer)
35. **Wan L., Ma B., Zhang Y.** Preparation of morusin from *Ramulus mori* and its effects on mice with transplanted H 22 hepatocarcinoma. *BioFactors* 2014; 40(6), 636–645. <http://doi.wiley.com/10.1002/biof.1191>
36. **Ma J., Qiao X., Pan S., Shen H., Zhu G., Hou A.** New isoprenylated flavonoids and cytotoxic constituents from *Artocarpus tonkinensis*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2010; 12(7), 586–592. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10286020.2010.485932>
37. **Kollár P., Bárta T., Hošek J., Souček K., Závalová V., Artinian S., Talhouk R., Šmejkal K., Suchý P., Hampl A.** Prenylated Flavonoids from *Morus alba* L. Cause Inhibition of G1/S Transition in THP-1 Human Leukemia Cells and Prevent the Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response. *Evid. Based Complementary Alternat. Med.* 2013; 2013, 1–13. <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/350519/>
38. **Lee H., Auh Q., Lee Y., Kang S., Chang S., Lee D., Kim Y., Kim E.** Growth inhibition and apoptosis-inducing effects of cudraflavone B in human oral cancer cells via MAPK, NF- $\kappa$ B, and SIRT1 Signaling Pathway. *Planta Medica.* 2013; 79(14), 1298–1306. <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0033-1350619>
39. **Zou Y., Hou A., Zhu G., Chen Y., Sun H., Zhao Q.** Cytotoxic isoprenylated xanthenes from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg. Med. Chem.* 2004; 12(8), 1947–1953. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089604000641>
40. **Zhang Q., Tang Y., Chen R., Yu D.** Three new cytotoxic Diels-Alder-type adducts from *Morus australis*. *Chemistry* 2007; 4(7), 1533–1540. <https://onlinelibrary-wiley-com.katalog.vfu.cz:444/doi/epdf/10.1002/cbdv.200790133>
41. **Oke-Altuntas F., Kapche G., Nantchouang Ouete J., Demirtas I., Koc M., Ngadjui B.** Bioactivity evaluation of cudraxanthone I, neocyclomorusin and (9 $\beta$ h)-3 $\beta$ -acetoxyanosta-7,24-diene isolated from *Milicia excelsa* Welw. C. C. Berg (Moraceae). *Med. Chem. Res.* 2016; 25(10), 2250–2257. <http://link.springer.com/10.1007/s00044-016-1670-3>
42. **Gryn-Rynko A., Bazylak G., Olszewska-Slonina D.** New potential phytotherapeutics obtained from white mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Biomed. Pharmacother.* 2016; 84, 628–636. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S075333221631188>
43. **Ferlinahayati F., Syah Y., Juliawaty L., Achmad S., Hakim E., Takayama H., Said I., Latip J.** Phenolic constituents from the wood of *Morus australis* with cytotoxic activity. *Z. Naturforsch. C.* 2008; 63(1–2), 35–39. <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/znc.2008.63.issue-1-2/znc-2008-1-207/znc-2008-1-207.pdf>
44. **Lee C., Yen F., Ko H., Li S., Chiang Y., Lee M., Tsai M., Hsu L.** Cudraflavone C induces apoptosis of A375.S2 melanoma cells through mitochondrial ROS production and MAPK activation. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(7), 1508–1520. <https://content-ebscohost-com.katalog.vfu.cz:444/ContentServer.asp?T=P&P=AN&K=124367473&S=R&D=a9h&EbscoContent=dGJyMNLr40Sep7A4xNvgOLCmr1GeprF-Sr6a4S7SWxWXS&ContentCustomer=dGJyMPGut0ivr-LZPuePfgeyx43zx>
45. **Syah Y., Juliawaty L., Achmad S., Hakim E., Ghisalberti E.** Cytotoxic prenylated flavones from *Artocarpus champeden*. *J. Nat. Med.* 2006; 60(4), 308–312. <http://link.springer.com/10.1007/s11418-006-0012-z>
46. **Soo H., Chung F., Lim K., Yap V., Bradshaw T., Hii L., Tan S., See S., Tan Y., Leong C., Mai C., Castresana J.** Cudraflavone C Induces tumor-specific apoptosis in colorectal cancer cells through inhibition of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-AKT pathway. *PLoS One* 2017; 12(1), 1–20. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0170551>
47. **Yang Z., Matsuzaki K., Takamatsu S., Kitanaka S.** Inhibitory effects of constituents from *morus alba* var. *multicaulis* on differentiation of 3T3-L1 cells and nitric oxide production in RAW264.7 cells. *Molecules* 2011; 16(7), 6010–6022. <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/7/6010>
48. **Mihara S., Hara M., Nakamura M., Sakurawi K., Tokura K., Fujimoto M., Fukai T., Nomura T.** Non-peptide bombesin receptor antagonists, kuwanon G and H, isolated from mulberry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 213(2), 594–599. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X85721730>
49. **Seiter M., Salcher S., Rupp M., Hagenbuchner J., Kiechl-Kohlendorfer U., Mortier J., Wolber G., Rollinger J., Obexer P., Ausserlechner M.** Discovery of Sanggenon G as a natural cell-permeable small-molecular weight inhibitor of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *FEBS Open Bio.* 2014; 4(1), 659–671. <http://doi.wiley.com/10.1016/j.fob.2014.07.001>
50. **Wang Z., Li X., Chen M., Liu F., Han C., Kong L., Luo J.** A strategy for screening of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Morus alba* root bark based on the ligand fishing combined with high-performance liquid chromatography mass spectrometer and molecular docking. *Talanta.* 2018; 180, 337–345. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914017312730>
51. **Wang X., Di X., Shen T., Wang S., Wang X.** New phenolic compounds from the leaves of *Artocarpus heterophyllus*. *Chin. Chem. Lett.* 2017; 28(1), 37–40. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1001841716301838>
52. **Jung J., Park J., Lee Y., Seo K., Oh E., Lee D., Lim D., Han D., Baek N.** Three new isoprenylated flavonoids from the root bark of *Morus alba*. *Molecules* 2016; 21(9), 1–10. <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/9/1112>
53. **Ferlinahayati F., Syah Y., Juliawaty L., Hakim E.** Flavanones from the wood of *Morus nigra* with cytotoxic activity. *Indones. J. Chem.* 2013; 13, 205–208. [https://www.researchgate.net/publication/286348915\\_Flavanones\\_from\\_the\\_wood\\_of\\_Morus\\_nigra\\_with\\_cytotoxic\\_activity](https://www.researchgate.net/publication/286348915_Flavanones_from_the_wood_of_Morus_nigra_with_cytotoxic_activity)
54. **Kofujita H., Yaguchi M., Doi N., Suzuki K.** A novel cytotoxic prenylated flavonoid from the root of *Morus alba*. *J. Insect Bio-*

- technol. Sericology 2004; 73(3), 113–116. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jibs/73/3/73\\_3\\_113/\\_pdf/-char/en](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jibs/73/3/73_3_113/_pdf/-char/en)
55. Šmejkal K. Cytotoxic potential of C-prenylated flavonoids. *Phytochem. Rev.* 2014; 13(1), 245–275. <http://link.springer.com/10.1007/s11101-013-9308-2>
  56. Cui L., Lee H., Oh W., Ahn J. Inhibition of sanggenon G isolated from *Morus alba* on the metastasis of cancer cell. *Chm.* 2011; 3(1), 23–26. [http://www.tiprpress.com/chmen/ch/reader/create\\_pdf.aspx?file\\_no=CHM20100722001&year\\_id=2011&quarter\\_id=1&fal](http://www.tiprpress.com/chmen/ch/reader/create_pdf.aspx?file_no=CHM20100722001&year_id=2011&quarter_id=1&fal)
  57. Nam M., Jung D., Seo K., Kim B., Kim J., Kim J., Kim B., Baek N., Kim S. Apoptotic effect of sanggenol L via caspase activation and inhibition of NF- $\kappa$ B signaling in ovarian cancer cells. *Phytother. Res.* 2016; 30(1), 90–96. <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.5505>
  58. Zhou P., Dong X., Tang P. Sanggenon C induces apoptosis of prostate cancer PC3 cells by activating caspase 3 and caspase 9 pathways. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2017; 37(9), 1206–1210. <http://www.j-smu.com/Upload/html/2017091206.html>
  59. Chen L., Liu Z., Zhang L., Yao J., Wang C. Sanggenon C induces apoptosis of colon cancer cells via inhibition of NO production, iNOS expression and ROS activation of the mitochondrial pathway. *Oncol. Rep.* 2017; 38(4), 2123–2131. <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2017.5912>
  60. Dat N., Xuan Binh P., Phuong Quynh L., Huóng H., Van Minh C. Sanggenon C and O inhibit NO production, iNOS expression and NF- $\kappa$ B activation in LPS-induced RAW264.7 cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2012; 34(1), 84–88. <https://eds-a-ebSCOhost-com.katalog.vfu.cz:444/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=5&sid=caf51610-430c-4581-952f-c80d8366c0d6%40sdc-v-sessmgr04>
  61. Huang H., Liu N., Zhao K., Zhu C., Lu X., Li S., Lian W., Zhou P., Dong X., Zhao C., Guo H., Zhang C., Yang C., Wen G., Lu L., Li X., Guan L., Liu C., Wang X., Dou Q., Liu J. Sanggenon C decreases tumor cell viability associated with proteasome inhibition. *Front. Biosci.* 2011; 3(4), 1315–1325. [https://www.researchgate.net/publication/51174312\\_Sanggenon\\_C\\_decreases\\_tumor\\_cell\\_viability\\_associated\\_with\\_proteasome\\_inhibition](https://www.researchgate.net/publication/51174312_Sanggenon_C_decreases_tumor_cell_viability_associated_with_proteasome_inhibition)
  62. Shi Y., Fukai T., Sakagami H., Chang W., Yang P., Wang F., Nomura T. Cytotoxic Flavonoids with Isoprenoid Groups from *Morus mongolica*. *J. Nat. Prod.* 2001; 64(2), 181–188. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np000317c>
  63. Dat N., Jin X., Lee K., Hong Y., Kim Y., Lee J. Hypoxia-inducible factor-1 inhibitory benzofurans and chalcone-derived Diels-alder adducts from *Morus* species. *J. Nat. Prod.* 2009; 72(1), 39–43. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np800491u>
  64. Wu Y., Kim Y., Kwon T., Tan C., Son K., Kim T. Anti-inflammatory effects of mulberry (*Morus alba* L.) root bark and its active compounds. *Nat. Prod. Res.* 2019; 1–4. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2018.1527832>
  65. Jing W., Yan R., Wang Y. A practical strategy for chemical profiling of herbal medicines using ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry: a case study of Mori Cortex. *Anal. Methods.* 2015; 7(2), 443–457. <https://pubs.rsc.org/en/content/getauthorversionpdf/C4AY02196G>
  66. Liu Y., Li S., Hou J., Liu Y., Wang D., Jiang Y., Ge G., Liang X., Yang L. Identification and characterization of naturally occurring inhibitors against human carboxylesterase 2 in White Mulberry Root-bark. *Fitoterapia* 2016; 115, 57–63. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X16304981>
  67. Kim S., Son E., Yoon S. Pharmaceutical composition including sanggenol Q for preventing or treating lung cancer. 2017. Republic of Korea. KR101771364B1. Uděleno 19. 7. 2016. Zapsáno 24. 8. 2017. <https://patents.google.com/patent/KR101771364B1/en>
  68. Yang Y., Zhang T., Xiao L., Yang L., Chen R. Two new chalcones from leaves of *Morus alba* L. *Fitoterapia.* 2010; 81(6), 614–616. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X1000064X>
  69. Li K., Zheng Q., Chen X., Wang Y., Wang D., Wang J. Isobavachalcone Induces ROS-Mediated Apoptosis via Targeting Thioredoxin Reductase 1 in Human Prostate Cancer PC-3 Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018; 2018, 1–13. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/1915828/>
  70. Shi Y., Wu W., Huo A., Zhou W., Jin X. Isobavachalcone inhibits the proliferation and invasion of tongue squamous cell carcinoma cells. *Oncol. Lett.* 2017; 14(3), 2852–2858. <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.6517>
  71. Jin X., Shi Y. Isobavachalcone induces the apoptosis of gastric cancer cells via inhibition of the Akt and Erk pathways. *Exp. Ther. Med.* 2016; 11(2), 403–408. <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2015.2904>
  72. Kuete V., Mbaveng A., Zeino M., Fozing C., Ngameni B., Kapche G., Ngadjui B., Efferth T. Cytotoxicity of three naturally occurring flavonoid derived compounds (artocarpesin, cycloartocarpesin and isobavachalcone) towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. *Phytomedicine* 2015; 22(12), 1096–1102. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711315002330>
  73. Szliszka E., Jaworska D., Ksek M., Czuba Z., Król W. Targeting death receptor TRAIL-R2 by chalcones for TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13(12), 15343–15359. <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/11/15343>
  74. Zhao S., Ma C., Liu C., Wei W., Sun Y., Yan H., Wu Y. Autophagy inhibition enhances isobavachalcone-induced cell death in multiple myeloma cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 30(4), 939–944. <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2012.1066>
  75. Jing H., Zhou X., Dong X., Cao J., Zhu H., Lou J., Hu Y., He Q., Yang B. Abrogation of Akt signaling by Isobavachalcone contributes to its anti-proliferative effects towards human cancer cells. *Cancer Lett.* 2010; 294(2), 167–177. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383510000704>
  76. Nishimura R., Tabata K., Arakawa M., Ito Y., Kimura Y., Akihisa T., Nagai H., Sakuma A., Kohno H., Suzuki T. Isobavachalcone, a chalcone constituent of *Angelica keiskei*, induces apoptosis in neuroblastoma. *Biological.* 2007; 30(10), 1878–1883. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/30/10/30\\_10\\_1878/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/30/10/30_10_1878/_pdf)
  77. Phung T., Tran T., Dan T., Chau V., Hoang T., Nguyen T. Chalcone-derived Diels–Alder adducts as NF- $\kappa$ B inhibitors from *Morus alba*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2012; 14(6), 596–600. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10286020.2012.670221>
  78. Kikuchi T., Nihei M., Nagai H., Fukushi H., Tabata K., Suzuki t., Akihisa T. Albanol A from the Root Bark of *Morus alba* L. Induces Apoptotic Cell Death in HL60 Human Leukemia Cell Line. *Chemical* 2010; 58(4), 568–571. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/58/4/58\\_4\\_568/\\_pdf/-char/en](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/58/4/58_4_568/_pdf/-char/en)
  79. Lee Y., Seo K., Hong E., Kim D., Kim Y., Baek N. Diels-alder type adducts from the fruits of *Morus alba* L. *Appl. Biol. Chem.* 2016;

- 59(2), 91–94. [https://www.researchgate.net/publication/304583358\\_Diels-Alder\\_type\\_adducts\\_from\\_the\\_fruits\\_of\\_Morus\\_alba\\_L](https://www.researchgate.net/publication/304583358_Diels-Alder_type_adducts_from_the_fruits_of_Morus_alba_L)
80. **Han H., Chou C., Li R., Liu J., Zhang L., Zhu W., Hu J., Yang B., Tian J.** Chalconoracins are potent anticancer agents acting through triggering oxidative stress via a mitophagy- and paraptosis-dependent mechanism. *Sci. Rep.* 2018; 8(1), 1–14. <https://www.nature.com/articles/s41598-018-27724-3.pdf>
81. **Cui X., Wang L., Yan R., Tan Y., Chen R., Yu D.** A new Diels-Alder type adduct and two new flavones from the stem bark of *Morus yunnanensis* Koidz. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2008; 10(4), 315–318. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10286020701833537>
82. **Ha M., Seong S., Nguyen T., Cho W., Ah K., Ma J., Woo M., Choi J., Min B.** Chalcone derivatives from the root bark of *Morus alba* L. act as inhibitors of PTP1B and  $\alpha$ -glucosidase. *Phytochemistry* 2018; 155, 114–125. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942218304254>
83. **Hu C., Chen Z., Yao R., Xu G.** Inhibition of protein kinase C by stilbene derivatives from *Morus alba* L. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 1996; 8(2), 13–16. [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-TRCW199602002.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-TRCW199602002.htm)
84. **Šmejkal K., Svačinová J., Šlapetová T., Schneiderová K., Dall'Acqua S., Innocenti G., Závalová V., Kollár P., Chudík S., Marek R., Julínek O., Urbanová M., Kartal M., Csöllei M., Doležal K.** Cytotoxic activities of several geranyl-substituted flavanones. *J. Nat. Prod.* 2010; 73(4), 568–572. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np900681y>

## ORIGINAL ARTICLE

# Influence of formulation and process parameters on the properties of Cu<sup>2+</sup>/alginate particles prepared by external ionic gelation evaluated by principal component analysis

## Vliv formulačních a procesních parametrů na vlastnosti Cu<sup>2+</sup>/alginátových částic připravených vnější iontovou gelací hodnocený analýzou hlavních komponent

Miroslava Pavelková • Jakub Vysloužil • Kateřina Kubová • Sylvie Pavloková • Eliška Mašková • David Vetchý

Received March 18, 2019 / Accepted March 29, 2019

### Summary

Currently, the method of external ionic gelation for the preparation of alginate particles is successfully used not only in the field of pharmacy and medicine, but also especially in the field of biotechnology. Therefore, the preparation of alginate particles and their subsequent evaluation using principal component analysis was the key task of our experiment. To optimize this method, we focused on the evaluation of the effect of formulation (the polymer concentration, the hardening solution concentration) and process parameters (the outer diameter of the injection needle) on the properties of the resulting beads (yield, sphericity factor, equivalent diameter and swelling capacity at pH 6). Using multivariate data analysis, the major influence on the resulting properties of the prepared particles was confirmed only in sodium alginate concentration. Obtained results verified the reliable and safe potential of the external ionic gelation for preparation alginate-based particulate dosage forms.

**Klíčová slova:** hydrogelové částice • vnější iontová gelace • natrium-alginát • měďnaté ionty • hodnocení částicové lékové formy • analýza hlavních komponent

### Souhrn

V současné době je metoda vnější iontové gelace v přípravě alginátových částic s úspěchem používána nejen na poli farmacie a medicíny, ale zejména v oblasti

biotechnologie. Proto byla příprava alginátových částic a jejich následné hodnocení pomocí analýzy hlavních komponent stěžejním cílem našeho experimentu. Kvůli optimalizaci této metody jsme se zaměřili na hodnocení vlivu různých formulačních (koncentrace polymeru, koncentrace tvrdícího roztoku) a procesních parametrů (velikost vnějšího průměru injekční jehly) na vlastnosti vzniklých částic (výtěžek, sféricita, ekvivalentní průměr a bobtnavost při pH 6). Metodou analýzy hlavních komponent byl zásadní vliv na výsledné vlastnosti alginátových částic potvrzen pouze u koncentrace natrium-alginátu. Tyto výsledky potvrdily spolehlivý a bezpečný potenciál vnější iontové gelace v přípravě částicové lékové formy na bázi alginátu.

**Key words:** hydrogel particles • external ionic gelation • sodium alginate • copper ions • evaluation of the particulate dosage form • principal component analysis

### Introduction

External ionic gelation method is a widely employed technique for the formation of hydrogel beads. It belongs among promising tools in the development of novel biocompatible sustained and targeted controlled drug delivery systems, mainly due to its indisputable advantages, such as nontoxic process without using organic solvents, convenient and controllable procedure<sup>1</sup>). This technique is based on the cross-linking tendency of polyelectrolytes in the presence of polyvalent ions to form hydrogels<sup>2–4</sup>), when physical (electrostatic) forces between the polyelectrolyte and the present polyvalent ions are formed<sup>5</sup>).

During external ionic gelation, the polymer solution is extruded as drops into a hardening bath containing polyvalent ions, which immediately diffuse inward into the interstitial spaces between the alginate polymer chains to initiate cross-linking at the periphery of the polymer drop. A semisolid membrane encasing the drop is formed<sup>6</sup>). Subsequent leaving of the drops in the hardening solution for a certain time period allows further dif-

M. Pavelková • PharmDr. Jakub Vysloužil, Ph.D. (✉) • K. Kubová • S. Pavloková • E. Mašková\* • D. Vetchý

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Palackého 1, 612 42 Brno, Czech Republic

e-mail: jakub.vyslouzil@gmail.com

\*Department of Pharmacology and Immunotherapy, Veterinary Research Institute

fusion of ions across the membrane via a concentration gradient. After saturation of available binding sites, resulting beads are formed as three dimensional, water-insoluble gel network<sup>7, 8</sup>, with a higher concentration of ions at the periphery compared to the centre of the gel<sup>9</sup>.

The type and molecular weight of the polymer, surface tension and viscosity of the polymer solution, the type and concentration of the hardening solution (as formulation parameters) as well as temperature, hardening time, stirring intensity, the diameter of the drip device (as process parameters), all affect the resulting particle structure and their properties<sup>10, 11</sup>.

Alginates as naturally occurring anionic polyelectrolytes belong among the most commonly used polymers in the formation of hydrogel beads by external ionic gelation, especially due to their biocompatibility, biodegradability, low toxicity, vast availability, relatively low cost, and mild gelation<sup>12, 13</sup>. Commercially available alginates are typically extracted from brown seaweed (Phaeophyceae), including species *Laminaria*, *Ascophyllum* and *Macrocystis*. Bacterial alginates can be produced from *Azotobacter* and *Pseudomonas* species but these extraction methods are not economically viable for commercial applications<sup>14, 15</sup>.

Chemically, alginates are a family of linear unbranched polysaccharides which contain varying amounts of 1,4'-linked  $\beta$ -D-mannuronic acid (M) and  $\alpha$ -L-guluronic acid (G) residues. The residues may vary widely in composition and sequence and are arranged in a pattern of blocks along the chain as homogenous (poly-G, poly-M) or heterogeneous (MG) block-like patterns<sup>16, 17</sup>. The M/G ratio is a critical factor affecting the physical properties of the alginate and its resulting hydrogels<sup>14</sup>. The affinity of different block structures of the alginate to polyvalent ions increases in the order of  $Mg^{2+} \ll Mn^{2+} < Zn^{2+} < Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+} < Cu^{2+} < Pb^{2+}$  ions<sup>18–21</sup>. In general, it can be said that divalent cations preferentially bind toward the G-block rather than the M-block<sup>7, 22</sup>. However, in a more detailed study by Mørch et al. it has been found that  $Sr^{2+}$  ions are preferentially bound to the G-units,  $Ba^{2+}$  ions are bound to G- and M-blocks and  $Ca^{2+}$  are bound to G- and MG-blocks<sup>19</sup>.

The binding properties of the  $Cu^{2+}$  ions used in our study have been extensively investigated by researchers Lu et al. They have determined that no preference between M/G units exists in the formation of  $Cu^{2+}$  complexes with the alginate<sup>23</sup>. Moreover, the copper-alginate affinity is so strong that the outermost part of the beads is strongly complexed and the created outercoat partially prevents further diffusion of the  $Cu^{2+}$  ions toward the beads centre. Copper beads so develop a dense outer layer and they seem to lack  $Cu^{2+}$  ions in the centre<sup>24, 25</sup>.

The gel-forming property of sodium alginate, as well as its apparent biocompatibility<sup>14, 26</sup>, leads to an increased use in the medical, pharmaceutical and biotechnology industries. The alginate is employed for applications such as wound dressings<sup>27</sup>, gel matrix to encapsulate and to control the release of drugs including protein-based substances or as matrices for tissue engineering<sup>12, 14, 26, 28, 29</sup>.

The method of external ion gelation, especially when using polyvalent ions with antimicrobial and/or antiviral activity, provides a unique possibility to prepare a medical form with a biological activity without the need of drug encapsulation<sup>30</sup>. For instance, antimicrobial effects of copper have been known and used by humans since ancient times<sup>31</sup>. Therefore, its entrapment in the alginate network can provide a simple and effective way of treatment of vaginal or eye infections<sup>30</sup>.

The main objective of the presented study was to observe and evaluate the effect of several process and formulation parameters on the technological properties of  $Cu^{2+}$ /alginate particles prepared by the ion external gelation method. An influence of needle diameter, polymer concentration and hardening solution concentration on the main important characteristics of prepared particles such as the yield, sphericity, equivalent diameter, swelling capacity were measured and investigated by principal component analysis.

## Experimental part

### Materials

Sodium alginate – SA (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) served as the polymer for the particle preparation, copper (II) chloride (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) was used as the gelation agent. Sodium hydroxide and potassium dihydrogen phosphate (both Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové, Czech Republic) were used for the formation of pH 6.0 phosphate buffer. All materials were of Ph. Eur. quality.

### Microparticle preparation

Beads were prepared by the external ionic gelation method. For each sample 100 g of sodium alginate solution (3% or 4%) was filled in a syringe with an appropriate needle (diameter 0.5, 0.7 or 0.9 mm) and they were added dropwise, using a linear dispenser pump NE-1000 (New Era Pump System, Farmingdale, NY, USA), to a hardening solution of copper (II) chloride (0.5M or 1M concentration) in Petri dishes, which were placed on a rotating pad to prevent deformation of the beads by constantly dripping to the same place. Here the crosslinking and hardening process took place. The injection needle tip distance from the surface of the curing solution was approximately 10 cm. Hardening time was 60 minutes. Thereafter, formed beads were washed with purified water, collected by filtration and then dried in a cabinet drier (HORO-048B, Dr. Hofmann GmbH, Ostfildern, Germany) for 12 hours at 25 °C. Samples were named accordingly to the parameter values used for their preparation (see Table 1).

### Microparticle characteristics

#### Yield

Effectiveness of the process was evaluated by yield. Dried samples were weighed on an analytical scales

KERN 440-47N (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Germany). The yield was expressed as the weight of dry beads in grams obtained by dropping of 100 g of polymer solution (g/100 g).

#### Optical microscopy

To determine the morphology of the prepared beads, a stereoscopic microscope Nikon SMZ 1500 (Nikon, Tokyo, Japan) with a photo camera TV Lens 0.55xDS (Nikon, Tokyo, Japan) was employed. Beads were observed by a 0.75 objective. For each sample 200 random particles were measured using the threshold method in software NIS-Elements 4.00.06 (Nikon, Tokyo, Japan). The evaluated morphological properties included the sphericity factor (SF)<sup>32</sup>:

$$SF = \frac{4\pi A}{p^2} \quad [1]$$

where  $A$  is a particle area in mm<sup>2</sup> and  $p$  is perimeter in mm. Another determined property was the equivalent diameter (ED), which gives the diameter of a circle which has the same area as the observed object<sup>32</sup>:

$$ED = \sqrt{\frac{4 \cdot A}{\pi}} [mm] \quad [2]$$

ED and SF were calculated from the measured values and expressed as the arithmetic mean and standard deviation.

#### Swelling capacity

Swelling capacity ( $S_{sw}$ ) belongs among physical factors which may influence mucoadhesivity and drug release from dosage forms<sup>34</sup>. Every sample was

tested for swelling capacity in pH 6.0 phosphate buffer. 100 mg of particles were placed into small pre-weighed metal baskets and then immersed into the buffer. In pre-determined intervals (30 minutes, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours), baskets were picked up, properly dried from the outside and weighed on analytical scales. Each sample was measured in triplicate. Swelling capacity was calculated from the following equation<sup>35</sup>:

$$S_{sw} = \frac{Wt - W_0}{W_0} * 100[\%] \quad [3]$$

where  $Wt$  is the weight of beads in grams at the respective time interval,  $W_0$  is the weight of beads in grams before the first immersion<sup>35</sup>.

#### Data analysis

The primary goal of the data analysis was a study of the dependencies between formulation/process parameters and Cu<sup>2+</sup>/alginate particles properties. In order to determine statistical significance of these effects, the data were evaluated by means of analysis of variance (ANOVA) and for a better dependency visualization, the data were subsequently subjected to the principal component analysis (PCA). The p-values obtained by ANOVA are given in the parentheses for the discussed characteristics in the section Results and discussion, but only in the cases where statistical significance was confirmed ( $p < 0.05$ ). The resulting PCA model was built based on the variables: yield, sphericity, equivalent diameter and swelling capacity at 6 h. The swelling capacities at all-time points were highly correlated, so redundant variables were excluded from the calculations. Data analysis was performed by means of the R software, version 3.4.4.<sup>36</sup>.

Table 1. Designation of bead samples and variables used during their preparation

Sample	Needle diameter (mm)	SA concentration (%)	Copper (II) chloride concentration (%)
5-A3-Cu0.5	0.5	3	0.5
5-A3-Cu1.0	0.5	3	1.0
5-A4-Cu0.5	0.5	4	0.5
5-A4-Cu1.0	0.5	4	1.0
7-A3-Cu0.5	0.7	3	0.5
7-A3-Cu1.0	0.7	3	1.0
7-A4-Cu0.5	0.7	4	0.5
7-A4-Cu1.0	0.7	4	1.0
9-A3-Cu0.5	0.9	3	0.5
9-A3-Cu1.0	0.9	3	1.0
9-A4-Cu0.5	0.9	4	0.5
9-A4-Cu1.0	0.9	4	1.0

## Results and discussion

### *Influence of needle diameter*

#### *Effect on yield*

Influence of the needle diameter on the sample yields is displayed in Table 2. The sample yields prepared using 0.5 mm, 0.7 mm and 0.9 mm injection needles were in the range from 3.443 to 4.814 g/100 g, 3.184 to 4.386 g/100 g and 3.398 to 4.609 g/100 g, respectively. No dependence between the yield and the outside diameter of the used needle was found.

#### *Effect on sphericity*

Many studies have confirmed an impact of the needle size on the beads sphericity, specifically, that smaller and more spherical particles are formed using a smaller diameter syringe<sup>11, 37, 38</sup>). However, the aforementioned dependence has not been verified by our investigation, but the appropriate sphericity of all samples with minimal differences has been shown. The highest sphericity ( $0.966 \pm 0.02$ ) was shown in sample 5-A4-Cu0.5. The order of the rest of the samples was as follows: 7-A4-Cu1.0, 5-A4-Cu1.0, 9-A4-Cu0.5 and 7-A4-Cu0.5 with the sphericity values of  $0.960 \pm 0.02$ ,  $0.958 \pm 0.03$ ,  $0.955 \pm 0.04$  and  $0.953 \pm 0.04$ , respectively (see Table 2).

#### *Effect on equivalent diameter*

The beads prepared using a 0.5 mm diameter needle showed the smallest equivalent diameter, namely samples 5-A3-Cu0.5 and 5-A3-Cu1.0 ( $974 \pm 44 \mu\text{m}$ ,  $995 \pm 48 \mu\text{m}$ ). Conversely, the largest particles were prepared using a 0.9 mm needle, namely samples 9-A4-Cu0.5, 9-A4-Cu1.0 ( $1227 \pm 32 \mu\text{m}$ ,  $1205 \pm 61 \mu\text{m}$ ). These results showed a slight increase in particle size, depending on the needle diameter ( $p < 0.001$ ). However, A3-Cu0.5

sample was an exception. This sample prepared with the use of a 0.9 mm needle ( $1013 \pm 43 \mu\text{m}$ ) provided smaller beads than with the use of 0.7 mm needle ( $1055 \pm 29 \mu\text{m}$ ) (Table 2) which could be caused by some random influences, such as human factor failure. The theories<sup>11, 37, 39, 40</sup>) about the dependence of the size syringe tip diameter on the drop size formation and subsequently on the size of the resulting beads have not been thus fully confirmed.

#### *Effect on swelling capacity*

The beads dripped through a 0.5 mm injection syringe had the swelling capacity in the range of 76–130% after 30 minutes and 107–159% after 1 hour. The swelling of the samples obtained with a 0.7 mm injection needle was in the range of 38–151% (after 30 minutes) and 59 to 165% (after 1 hour). Swelling capacity of the samples prepared by using a 0.9 mm outer diameter injection needle ranged from 89 to 125% after 30 minutes, and 104 to 138% after 1 hour. Within next 5 hours, the swelling capacity increased, but significantly less, only about 20–30% (see Figs. 1, 2). No correlation between the outer diameter of the injection needle and the swelling of individual samples has been found.

### *Influence of sodium alginate concentration*

#### *Effect on yield*

The yields of beads prepared using 3% and 4% SA solutions were in the range from 3.184–3.820 g/100 g and 4.290–4.814 g/100 g. When comparing the corresponding samples in Table 2 (samples prepared using the same hardening solution concentration and the same size of needle diameter), it is obvious that the yields of individual samples statistically significantly depended on the SA concentration ( $p < 0.001$ ). Specifically, the higher

Table 2. Yield, sphericity factor and equivalent diameter results

Sample	Yield (g/100 g)	Sphericity (%)	Equivalent diameter ( $\mu\text{m}$ )
5-A3-Cu0.5	3.443	$0.930 \pm 0.06$	$974 \pm 44$
5-A3-Cu1.0	3.820	$0.917 \pm 0.06$	$995 \pm 48$
5-A4-Cu0.5	4.290	$0.966 \pm 0.02$	$1099 \pm 41$
5-A4-Cu1.0	4.814	$0.958 \pm 0.03$	$1139 \pm 51$
7-A3-Cu0.5	3.184	$0.934 \pm 0.05$	$1055 \pm 29$
7-A3-Cu1.0	3.212	$0.927 \pm 0.04$	$1058 \pm 49$
7-A4-Cu0.5	4.380	$0.953 \pm 0.04$	$1192 \pm 30$
7-A4-Cu1.0	4.386	$0.960 \pm 0.02$	$1175 \pm 38$
9-A3-Cu0.5	3.398	$0.918 \pm 0.06$	$1013 \pm 43$
9-A3-Cu1.0	3.722	$0.936 \pm 0.06$	$1075 \pm 40$
9-A4-Cu0.5	4.536	$0.955 \pm 0.04$	$1227 \pm 32$
9-A4-Cu1.0	4.609	$0.939 \pm 0.04$	$1205 \pm 61$



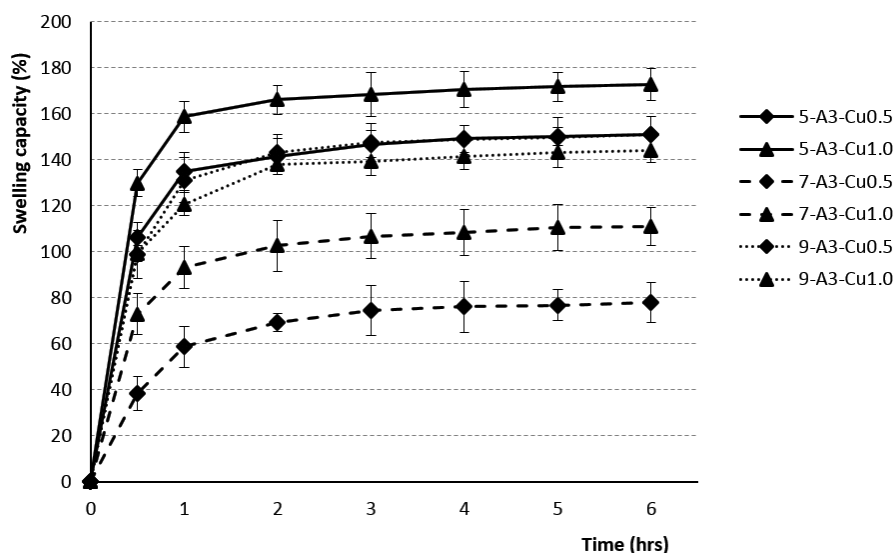


Fig. 1. The swelling profiles of 3%  $\text{Cu}^{2+}$ /alginate particles in phosphate buffer  $\text{pH} = 6.0$

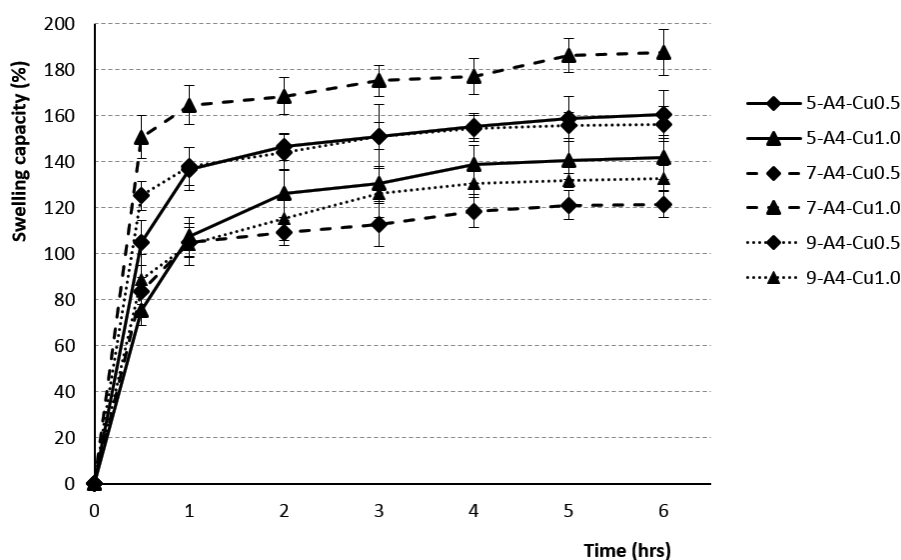


Fig. 2. The swelling profiles of 4%  $\text{Cu}^{2+}$ /alginate particles in phosphate buffer  $\text{pH} = 6.0$

yields were achieved using more concentrated solution of alginates, which is consistent with the experimental study of Aswathy et al.<sup>41)</sup>. The explanation could be seen in a higher number of binding sites for crosslinking by polyvalent ions in the higher-concentrated SA solution resulting in an increase in the process yield.

#### Effect on sphericity

The SA concentration exhibited a major influence on the sphericity of all samples ( $p < 0.001$ ). All 4% samples showed higher sphericity values than the 3% samples (see Table 2). Our investigation has confirmed the theories of many researchers<sup>42, 43)</sup> about an increase in bead sphericity in dependence on rising polymer solution concentrations. At a low SA concentration, the particles are formed of a loose networks structure which may collapse during drying. On the other hand, a higher SA concentration cre-

ates a denser matrix structure which prevents collapse of the beads<sup>42, 44)</sup> and the resulting beads are more spherical. In addition, when the alginate liquid drop hits and enters the hardening bath, there are competing forces between the viscous surface tension forces and impact-drag forces to maintain the drop shape. However, the viscosity of the low-concentration SA solutions is not sufficient to cope with impact, resulting in bead deformation<sup>45)</sup>.

#### Effect on equivalent diameter

Equivalent diameter of beads was in the range of  $974 \pm 44 \mu\text{m}$  (5-A3-Cu0.5) to  $1075 \pm 40 \mu\text{m}$  (9-A3-Cu1.0) for 3% SA samples and between  $1099 \pm 41 \mu\text{m}$  (5-A4-Cu0.5) and  $1227 \pm 32 \mu\text{m}$  (9-A4-Cu0.5) for 4% samples (see Table 2). Overall, in samples prepared with the same needle outer diameter, our results showed that all samples prepared from the 4% SA solution were larger

in size compared to the 3% solution ( $p < 0.001$ ). This could be attributed to an increase in relative viscosity at higher concentration of SA and formation of large droplets during dripping of polymer solution to the hardening bath<sup>42, 43, 46–48</sup>.

#### *Effect on swelling capacity*

The rate of swelling capacity was not dependent on the polymer concentration used. The swelling capacity was found to be the highest during the first hour, with the minimum value for the sample 7-A3-Cu0.5 (60%) and the maximum one for the sample 7-A4-Cu1.0 (168%). Consequently, during the next five hours, the swelling capacity changed less significantly, the batch 7-A3-Cu0.5 swelled up to 79% and the batch 7-A4-Cu1.0 up to 192% (see Figs. 1, 2). Our research did not confirm the findings reported by the majority of investigators about the dependence of the swelling extent on the SA concentration, which demonstrated that the beads prepared using the 4% SA polymeric solution exhibited a slower swelling rate than the more porous beads prepared with low-concentration 3% SA solution<sup>43, 47, 49, 50</sup>. Our results, indicating statistical insignificance, were probably due to the unequal drying of the extracted baskets from the phosphate buffer during the test performance.

#### **Influence of hardening solution concentration**

##### *Effect on yield*

In samples prepared from the 3% SA solution and 0.5M hardening solutions, the yields took values from 3.184 to 3.433 g/100 g and in samples cross-linked with 1M hardening solution the values ranged from 3.212 to 3.820 g/100 g. Likewise, in the 4% samples cross-linked by 1M solution, the yield was slightly higher (see Table 2). Based on our experiment, it can be said that the yield of the samples increased with increasing concentrations of the hardening solution, but with no statistical insignificance. An explanation could be the following one: using a larger amount of  $\text{Cu}^{2+}$  ions provides a possibility of creating more electrostatic bonds within the crosslinking of the alginate polymer chains. Ultimately, there is a smaller loss of alginate within external ionic gelation process.

##### *Effect on sphericity*

In our experiment, the beads sphericity dependence on the concentration of the hardening solution has not been demonstrated. The sphericity factor randomly grew and fell with increasing concentration of the hardening solution (see Table 2). Our results do not correspond with many other studies, which has confirmed the tendency to creation of the more spherical particles with their uniform size depending on the rising concentration of hardening solution<sup>42</sup>.

##### *Effect on equivalent diameter*

Based on previous researches<sup>46, 51</sup>, we expected that an increase in cross-linking ion concentration would signi-

ficantly affect the mean diameter of the beads. However, our results were as follows: for the beads prepared from the 3% SA solution (using diameter needles of 0.5, 0.7 and 0.9 mm) and for the beads from 4% SA (using only a 0.5 mm needle), the equivalent diameter was smaller when the 0.5M hardening solution was used. Conversely, the beads prepared from 4% SA (using a 0.7 and 0.9 mm needle), the equivalent diameter was lower when we used the 1M hardening solution (see Table 2). An impact of hardening solution concentration on the beads equivalent diameter was confirmed ( $p < 0.001$ ).

##### *Effect on swelling capacity*

The dependence of the swelling rate on the concentration of the hardening solution has not been demonstrated. The results within the corresponding samples were discrepant. Samples from 3% SA prepared using 0.5 mm and 0.7 mm diameter needles showed a higher swelling capacity when the beads were cross-linked by 1M solution  $\text{CuCl}_2$ . 3% SA samples prepared with a 0.9 mm needle showed higher swelling when the 0.5M hardening solution was used for crosslinking. The samples from 4% SA exhibited similar behavior (see Figs. 1, 2). Despite the research which showed that the swelling capacity decreased with an increase in divalent ions concentration, dependence of swelling capacity on the crosslinking ion concentration has not confirmed in our study<sup>47</sup>.

#### **Multivariate data analysis**

For a better representation of the relationships between the variables (formulation/process parameters) themselves and between the variables and objects ( $\text{Cu}^{2+}$ /alginate particles properties), the PCA method was employed. Graphical representation is provided by the PCA loadings plot (Fig. 3), which displays the correlation structure of variables, and the PCA scores plot (Fig. 4), which displays the layout of objects. In the loadings plot, original variables are depicted as arrows in the ordination space of the first two principal components (PCs), their lengths are directly proportional to the explained variability and the amount of correlation can be interpreted based on the angle between any two arrows. In the scores plot, the samples with similar characteristics are closely spaced, while different samples are far apart from each other.

In the resulting model, the first two PCs explained 90.2% of variability, which is a sufficient amount to provide a reliable data interpretation (52). The relatively high positive correlation of equivalent diameter, sphericity and yields is obvious in the PCA loadings plot. These variables also correlated with the PC1. Swelling capacity at the time point 6 h was more associated with the PC2. In the PCA scores plot, the samples distribution along the PC1 is evident, clustering into two groups is based on SA concentration, which is also highlighted in the graph. When comparing the PCA graphical outputs (Figs. 3 and 4), it can be summarized that samples with a higher SA concentration exhibited a higher equivalent diameter, as well as higher sphericity and yield. Within both groups (A3 and A4), the samples differed mainly on the basis of

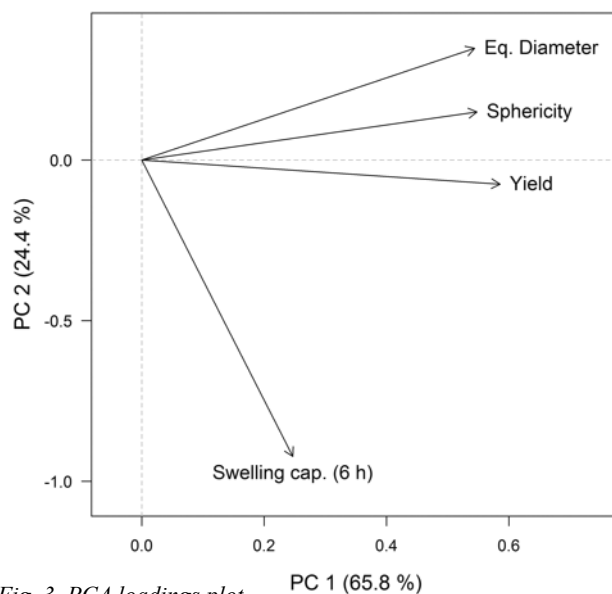


Fig. 3. PCA loadings plot

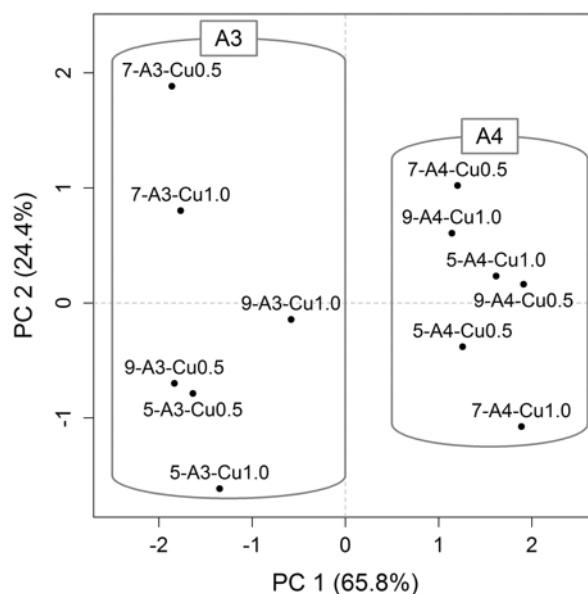


Fig. 4. PCA scores plot

swelling capacity, but without apparent statistical relationships with other variables. So the effects of varying needle diameter in conjunction with hardening solution concentration on the resulting particles properties cannot be unambiguously discussed.

## Conclusion

The external ionic gelation resulted in the formation of all  $\text{Cu}^{2+}$ /alginate particle samples with satisfactory properties. Their morphological parameters (ED, SF) as well as the enormous ability to swell in the environment of pH 6 were convenient, without a significant influence of most of our tested parameters. Based on multivariate data analysis results, it can be concluded that SA concentration was the only factor which fundamentally influenced the resulting properties of the prepared  $\text{Cu}^{2+}$ /alginate par-

ticle. Therefore, our results have confirmed external ionic gelation as a safe, reliable and robust method for  $\text{Cu}^{2+}$ /alginate beads. Despite a relatively wide variability of the input parameters, it resulted in the creation of beads with well-defined characteristics with a potential use for a development of a convenient particulate dosage form suitable either for drug encapsulation or for its own use due to the antimicrobial effect of copper.

## Acknowledgement

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports project "FIT" (Pharmacology, Immunotherapy, nanoToxicology) CZ.02.1.01/0.0/0.0/15 003/0000495 and by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, institutional support MZE-R00518.

**Conflicts of interest:** none.

## Reference

1. Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N., Aminabhavi T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Release* 2004; 100, 5–28.
2. Patil J. S., Kamalapur M. V., Marapur S. C., Kadam D. V. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. *Dig. J. Nanomater. Bios.* 2010; 5, 241–248.
3. Patil P., Chavanke D., Wagh M. A. A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2012; 4, 27–32.
4. Cerciello A., Auremma G., Del Gaudio P., Sansone F., Aquino R. P., Russo P. A novel core-shell chronotherapeutic system for the oral administration of ketoprofen. *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 2016; 32, 126–131.
5. Ahmadi F., Oveisi Z., Samani S. M., Amoozgar Z. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Res. Pharm. Sci.* 2015; 10, 1–16.
6. Zhang H., Tumarkin E., Peerani R., Nie Z., Sullan R. M. A., Walker G. C., Kumacheva E. Microfluidic production of biopolymer microcapsules with controlled morphology. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128, 12205–12210.
7. Smidsrød O., Skjåk-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* 1990; 8, 71–78.
8. Alonso B. C., Rayment P., Ciampi E., Ablett S., Marciani L., Spiller R. C., Norton I. T., Gowland P. A. NMR relaxometry and rheology of ionic and acid alginate gels. *Carbohydr. Polym.* 2010; 82, 663–669.
9. Skjåk-Braek G., Grasdalen H., Smidsrød O. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. *Carbohydr. Polym.* 1989; 10, 31–54.
10. Vysloužil J., Dvořáčková K., Kejdušová M. Příprava léčivých mikročastic metodou odpařování rozpouštědla. *Chem. Listy* 2013; 107, 16–23.
11. Lee B.-B., Ravindra P., Chan E.-S. Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion dripping. *Chem. Eng. Technol.* 2013; 36, 1627–1642.
12. Gombotz W. R., Wee S. F. Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 1998; 31, 267–285.
13. Marković D., Zarubica A., Stojković N., Vasić M., Cakić M., Nikolić G. Alginates and similar exopolysaccharides in biomedical application and pharmacy: Controlled delivery of drugs. *Advanced technologies* 2016; 5, 39–52.
14. Lee K. Y., Mooney D. J. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 2012; 37, 106–126.
15. Urtuvia V., Maturana N., Acevedo F., Peña C., Díaz-Barrera A. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World J. Microb. Biot.* 2017; 33, 198.
16. Haug A., Larsen B., Smidsrød O. Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chem. Scand.* 1967; 21, 691–704.
17. Haug A., Larsen B. Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates. *Acta Chem. Scand.* 1962; 16, 1908–1918.
18. Agulhon P., Markova V., Robitzer M., Quignard F., Mineva T. Structure of alginate gels: Interaction of diuronate units with divalent cations from density functional calculations. *Biomacromolecules* 2012; 13, 1899–1907.
19. Mørch Y. A., Donati I., Strand B. L., Skjåk-Braek G. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , and  $\text{Sr}^{2+}$  on alginate microbeads. *Biomacromolecules* 2006; 7, 1471–1480.
20. Haug A., Smidsrød O. Selectivity of some anionic polymers for divalent metal ions. *Acta Chem. Scand.* 1970; 24, 843–854.
21. Idota Y., Kogure Y., Kato T., Yano K., Arakawa H., Miyajima C., Kasahara F., Ogihara T. Relationship between physical parameters of various metal ions and binding affinity for alginate. *Biol. Pharm. Bull.* 2016; 39, 1893–1896.
22. Braccini L., Pérez. Molecular basis of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules* 2001; 2, 1089–1096.
23. Lu L., Liu X., Qian L., Tong Z. Sol-gel transition in aqueous alginate solutions induced by cupric cations observed with viscoelasticity. *Polym. J.* 2003; 35, 804–809.
24. Velings N. M., Mestdagh M. M. Physico-chemical properties of alginate gel beads. *Polym. Gels Netw.* 1995; 3, 311–330.
25. Rodrigues J. R., Lagoa R. Copper ions binding in Cu-alginate gelation. *J. Carbohydr. Chem.* 2006; 25, 219–232.
26. Jain D., Bar-Shalom D. Alginate drug delivery systems: application in context of pharmaceutical and biomedical research. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2014; 40, online 1–9.
27. Thomas S. Alginate dressings in surgery and wound management – part 1. *J. Wound Care.* 2000; 9, 56–60.
28. Draget K. I., Taylor C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloid* 2011; 25, 251–256.
29. Augst, A. D., Kong H. J., Mooney D. J. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol. Biosci.* 2006; 6, 623–633.
30. Pavelková M., Kubová K., Vysloužil J., Kejdušová M., Vetchý D., Celer V., Molinková D., Lobová D., Pechová A., Vysloužil J., Kulich P. Biological effects of drug-free alginate beads cross-linked by copper ions prepared using external ionotropic gelation. *AAPS PharmSciTech.* 2017; 18, 1343–1354.
31. Grass G., Rensing C., Solioz M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl. Environ. Microb.* 2011; 77, 1541–1547.
32. Rabišková M., Häring A., Minczingerová K., Havlásek M., Musilová P. Microcrystalline cellulose in oral dosage forms. *Chem. Listy* 2007; 101, 70–77.
33. Smýkalová I., Horáček J., Hýbl M., Bjelková M., Pavelek M., Kruliková T., Hampel D. Seed type identification by image analysis – correlation of nutrients with size, shape and colour characteristics of seeds. *Chem. Listy* 2011; 105, 138–145.
34. Dodou D., Breedveld P., Wieringa P. A. Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005; 60, 1–16.
35. Kubánková R., Vysloužil J., Kejdušová M., Vetchý D., Dvořáčková K. Impact of formulation and process parameters on the properties of chitosan-based microspheres prepared by external ionic gelation. *Ces. slov. Farm.* 2014; 63, 127–135.
36. The R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 1993–2003. <https://www.R-project.org/>
37. Chan E.-S., Lee B.-B., Ravindra P., Poncelet D. Prediction models for shape and size of calcium-alginate macrobeads produced through extrusion – dripping method. *J. Colloid Interf. Sci.* 2009; 338, 63–72.
38. Rousseau I., Le Cerf D., Picton L., Argillier J. F., Muller G. Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SPS)

- from calcium alginate gel beads. *Eur. Polym. J.* 2004; 40, 2709–2715.
39. **Kašpar O., Jakubec M., Štěpánek F.** Characterization of spray dried chitosan-TPP microparticles formed by two- and three fluid nozzles. *Powder Technol.* 2013; 204, 31–40.
40. **Popa E. G., Gomes M. E., Reis R. L.** Cell delivery systems using alginate- carrageenan hydrogel beads and fibers for regenerative medicine applications. *Biomacromolecules* 2011; 12, 3952–3961.
41. **Aswathy K. S., Abraham A. M., Jomy L., Mehaladevi R., Rosemol K. J.** Formulation and evaluation of Etodolac alginate beads prepared by ionotropic gelation for sustained release. *Int. J. Sci. Innov. Res.* 2014; 3, 527–531.
42. **Manjanna K. M., Shivakumar B., Pramod kumar T. M.** Diclofenac sodium microbeads for oral sustained drug delivery. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2009; 1, 317–327.
43. **Joshi S., Patel P., Lin S., Madan P. L.** Development of cross-linked alginate spheres by ionotropic gelation technique for controlled release of naproxen orally. *Asian J. Biomed. Pharm. Sci.* 2012; 7, 134–142.
44. **Rajesh K. S., Khanrah A., Biswanath S.** Release of ketoprofen from alginate microparticles containing film forming polymers. *J. Sci. Ind. Res.* 2003; 62, 985–989.
45. **Chan E.-S.** Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydr. Polym.* 2011; 84, 1267–1275.
46. **Østberg T., Vesterhus L., Graffner C.** Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration: II. Effect of process and formulation factors on matrix properties. *Int. J. of Pharmaceut.* 1993; 97, 183–193.
47. **Sathali A. A. H., Varun J.** Formulation, development and *in vitro* evaluation of candesartan cilexetil mucoadhesive microbeads. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 2012; 4, 109–118.
48. **Khazaeli P., Pardakhty A., Hassanzadeh F.** Formulation of ibuprofen beads by ionotropic gelation. *Iran. J. Pharm. Res.* 2008; 7, 163–170.
49. **Blandino A., Macías M., Cantero D.** Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and  $\text{CaCl}_2$  concentration on gelation kinetics. *J. Biosci. Bioeng.* 1999; 88, 686–689.
50. **Bajpai S. K., Sharma S.** Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  ions. *React. Funct. Polym.* 2004; 59, 129–140.
51. **Striamornsak P., Nunthanid J.** Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: II. Effect of formulation and processing variables on drug release. *J. Microencapsul.* 1999; 16, 303–313.
52. **Reimann C., Filzmoser P., Garret R. G., Dutter R.** Statistical data analysis explained: applied environmental statistics with R. Ltd. Chichester, John Wiley & Sons; 2008.

## ORIGINAL ARTICLE

**OTC market – comparing Czech Republic and Greece****Trh s volně prodejnými léčivými – porovnání Česká republika a Řecko**

Božena Macešková • Marios-Panagiotis Tsadaris • Michail Machlis

Received March 11, 2019 / Accepted April 24, 2019

**Summary**

Medicines for self-medication (over-the-counter, OTC) are available through pharmacies, in some countries they are also available in supermarkets and other outlets. The use of OTC in European Union countries shows some differences at national level, in pharmacies and in patients' preference. This study aimed to completing the lists of marketed OTC in Czech Republic and Greece. Next topics are: finding out the real range of OTC products offered by pharmacies, finding and evaluating number of packages sold in pharmacies in 20 particular common OTC in 2016, and identification of factors influencing the sales. Web pages of national drug authorities (Czech Republic, Greece) were searched to complete lists of marketed OTC in each country. Data on range of OTC drugs and sales of them were extracted from computer systems (Czech Republic) and other types of documents (Greece) kept in pharmacies. The percentage of the real range of OTC products in pharmacies was calculated as the ratio to the number of OTC in national lists. Numbers of sold packages were compared among pharmacies. Classification system ATC (anatomical/therapeutical/chemical) was employed to present findings in all parts of the research. The Czech list contained 1,160 of marketed OTC in 10 ATC (1<sup>st</sup> level), with the maximum in ATC R (243 drugs). The Greek list contained 1,254 OTC in 13 ATC (1<sup>st</sup> level), with the maximum in ATC D (272 drugs). In lists of both countries, there were detected 86 drugs identical in 9 ATC (1<sup>st</sup> level). At least one OTC in each of 10 listed ATC was found in Czech pharmacies as a part of range of products, the range of OTC in Greek pharmacies comprised 11 ATC. The highest sales (year 2016) were found in ATC R (drug ACC long tbl eff) in CR and in ATC A (drug: Imodium cps) in Greece. The differences in the range of OTC drugs and in their sales were found between Czech Republic and Greece, and between types of

pharmacies inside each country. Factors influencing them were detected: ownership of the pharmacy, locality (number of inhabitants).

**Key words:** OTC drugs • pharmacy • Czech Republic • Greece

**Souhrn**

Léčiva pro samoléčení (OTC přípravky) jsou dostupné v lékárnách, v některých zemích jsou k dispozici rovněž v supermarketech a na dalších místech. Problematika OTC přípravků v zemích Evropské unie vykazuje některé odlišnosti na národní úrovni, v lékárnách i v preferencích pacientů. Tato studie má za cíl sestavit seznamy obchodovaných OTC přípravků v České republice a v Řecku. Dalšími tématy jsou: zjištění skutečného spektra OTC léčiv nabízených v lékárnách, vyhodnocení počtu prodaných balení vybraných 20 běžných OTC léčiv za rok 2016 a identifikace faktorů ovlivňujících prodej OTC přípravků. Webové stránky národních lékových agentur (Česká republika, Řecko) byly použity pro sestavení seznamů obchodovaných OTC přípravků v obou zemích. Údaje o spektru OTC v lékárnách a jejich prodeji byly získány z lékárenského software (v ČR) a z jiných typů dokumentů uchovávaných v lékárně (v Řecku). Byl vypočítán podíl nalezeného spektra OTC v jednotlivých lékárnách vzhledem počtu OTC v národních seznamech. Byly porovnány počty prodaných balení. Ve všech částech práce byla pro prezentaci výsledků použita ATC (anatomicko/terapeuticko/chemická) klasifikace léčiv. Český seznam obsahoval 1160 obchodovaných OTC přípravků náležejících do 10 ATC skupin (první úroveň), s maximem v ATC R (243 přípravků). Řecký seznam obsahoval 1254 obchodovaných OTC přípravků náležejících do 13 ATC skupin, s maximem v ATC D (272 přípravků). Bylo identifikováno 86 totožných přípravků v seznamech obou zemí, náležejících do 9 ATC skupin (první úroveň). V nabídce OTC v českých lékárnách se vyskytoval alespoň jeden přípravek z každé z deseti identifikovaných ATC skupin, v nabídce řeckých lékáren byly zahrnuty OTC přípravky z 11 ATC skupin. Nejvyšší prodeje (v roce 2016) byly zjištěny v ČR v ATC skupině R (přípravek ACC long tbl eff) a v Řecku v ATC A (přípravek Imodium cps). Byly nalezeny rozdíly v nabídce OTC přípravků v lékárnách a v jejich pro-

dejích, a to jak mezi Českou republikou a Řeckem, tak mezi jednotlivými typy lékáren uvnitř každé země. Jako faktory těchto rozdílů byly identifikovány: vlastnictví lékárny, lokalita (počet obyvatel).

**Klíčová slova:** OTC léčiva • lékárna • Česká republika • Řecko

## Introduction

Medicines for self-medication are often called „nonprescription“ or „over-the-counter“ (OTC) and are available through pharmacies. In some countries OTC products are also available in supermarkets and other outlets. Responsible self-medication has been identified as an important element in long-term health policy by the institutions of the European Community<sup>1</sup>. Research shows that 81 percent of adults use OTC medicines as a first response to minor ailments<sup>2</sup>.

Harmonization between countries' regulatory agencies is a positive development<sup>3</sup>. Even if a specific directive<sup>4</sup> has been approved, the situation of self-medication products in European Union (EU) countries is still far from being harmonized<sup>5</sup>. The final EU Medicines Agencies Network Strategy 2020 emphasises that this strategy has a key role in improving patients access to well-established medicines including the nonprescription ones. Multi Annual Work Plan (MAWP) incorporates the same objective: enhancement and improvement of existing tools such as the mutual recognition/decentralized procedures (MRC/DCP) and achievement of agreements on common criteria for the authorisation of OTC products. It recommends to explore ways how to facilitate the greater number of product switches which should result in improving the availability of nonprescription medicines through simplified regulatory requirements<sup>6</sup>. It is often expected that through deregulation in the community pharmacy sector the prices of OTC medicines will go down. In reality these expectations could not be fully met. Deregulation has led to the opening of new pharmacies and of OTC dispensaries, since OTC sale outside pharmacies is usually permitted<sup>7</sup>.

## Situation in Czech Republic

Though one of the smallest markets, the Czech Republic has a strict control of a drug on its launch and a rigorous system of drug registration<sup>8</sup>. Any proprietary medicinal product is subject to marketing authorisation prior to its placement on the market in the Czech Republic. The marketing authorisation procedure is the responsibility of State Institute for Drug Control and it includes an assessment of a dossier, in which the future marketing authorisation holder evidences the safety, efficacy, and quality of the product<sup>9</sup>. Patients can have access to a small amount of OTC drugs subcategory „selected drugs“ in many points except pharmacies<sup>10</sup>. Spending on retail pharmaceuticals as a share of GDP (2013): total 1.3%, private 0.5%<sup>11</sup>. The

expenditure per capita (2015): 404 USD<sup>12</sup>, OTC 83 USD (2013)<sup>11</sup>. OTC share in total pharmaceutical market not listed in<sup>10</sup>, estimation: nearly 5%.

## Situation in Greece

Accessing the market requires manufacturers to obtain necessary approvals from The National Organization for Medicines (EOF), an entity of Ministry of Health and Social Solidarity. Right from informing the EOF, manufacturers might have to cope with other complex Regulatory procedures for registrations and licensing<sup>13</sup>. Price liberalization and market opening (since 2016) allows for the ability of Greek consumers to buy more OTC products while creating increased competition from new outlets will press prices down. Negotiations are currently taking place regarding the sale of OTC via channels (i.e. supermarkets) other than just pharmacies<sup>14</sup>. The main aim of the reform is to provide to patients all necessary knowledge, advice and convenience in order to be healthier, by choosing the ideal drug for their condition. A base alignment and agreement between the state, the industry and the pharmacy with the patient in the core will create a huge evolution with increasing satisfaction for consumers<sup>15</sup>. OTC that can be bought outside the pharmacies as well create the subcategory „drugs for general distribution“<sup>16, 18</sup>.

Spending on retail pharmaceuticals as a share of GDP (2013): total 2.8%, private 0.9%<sup>11</sup>, per capita (2015): 572 USD<sup>12</sup>, OTC share in total pharmaceutical market 5%<sup>10</sup>.

Advertising of OTC medicines is allowed in many countries in EU, including both CR<sup>19</sup> and Greece<sup>17</sup>.

The aim of this study was to complete the list of all marketed OTC in Czech Republic and Greece, to compare them, to ascertain the real range of OTC drugs offered by selected pharmacies (3 in each country) and to analyse the sales of twenty chosen OTC in these pharmacies in one-year period (2016).

## Experimental part

### Methodology

OTC marketed in CR and Greece were the subject of this research. This group presents the sub-group of authorized OTC, and the drug was included in the list of marketed OTC if it was really marketed by wholesalers and pharmacies. Analysis of national lists of OTC in CR<sup>20</sup> and Greece<sup>21, 22</sup> was the first step of the research. Drugs marketed in 2016 were sorted using the ATC (anatomical/therapeutic/chemical) system (5<sup>th</sup> level) and the identical drugs (the same name, dosage form, strength and size of package) were identified comparing both lists. Six pharmacies (3 in each country) were chosen to take part in data gathering. Different types of ownership and different localities were the parameters for the selection (Table 1). Finding out the range of marketed OTC drugs in pharmacies followed. The range of OTC is the aggre-

gate of particular drugs that used to be in the stock of the pharmacy, it means they have been at least once ordered by the pharmacy, regardless of their real presence in the stock of the pharmacy in the moment of researching. To complete the range of products, the documentation of stocking drugs in chosen pharmacies was analysed in the end of 2016. There are substantial differences between CR and Greece in the methods of stock inventory – the Czech ones are more complex due to use of sophisticated computer systems. Authors performed the search under the supervision of the head of the pharmacy. Documents in Greek pharmacies showed the large variety and lack of uniformity, using different kinds of software to keep records of various structure and content. The cooperation of the pharmacist with the researcher was necessary to find corresponding data. The ratio between the real range of OTC found in pharmacies and the total number of marketed OTC included in national lists was calculated in ATC groups (1<sup>st</sup> level) in both countries and expressed in percentage. Finally, analysing the sales of 20 particular common OTC in chosen pharmacies was performed (January 1, 2016 – December 31, 2016). The sample of OTC was based on 18 OTC identified as identical in both countries, the next two were of different size of package comparing CR and Greece (Table 4). Basic condition for the choice was the presence of the drug in the range of OTC products in pharmacies. The next condition was to include maximal number of ATC groups – eight ATC

groups (1<sup>st</sup> level) from the nine ones found in the group of identical OTC can be found in the sample. Completing this part of research was finished in spring 2017.

Pharmacy I. (CR) was owned by corporation, it was the only one run by this legal body, pharmacy III. (CR) was a member of the chain operating several hundreds pharmacies. The number of inhabitants in the city where the chain pharmacy was established is not mentioned because all pharmacies of the chain have the same business strategy and the range of OTC products is quite the same in all of them, not dependent on the population. All community pharmacies were owned exclusively by pharmacist in Greece in the time of research. The influence of pharmacies' characteristics on the range of OTC drugs and on the number of sold packages is mentioned in discussion.

**Results**

ATC with no OTC in both countries are not included in Figure 1.

The list of OTC chosen for sales evaluation was completed by the column „number of OTC in national list ATC (5<sup>th</sup> level)“ in order to be able to assess the influence of other OTC drugs with the same active substance on the patients' choice and on the sale of the particular drug included in analysis. The data in columns (CR, Greece) present the number of marketed OTC in the same ATC (5<sup>th</sup> level) (Table 4).

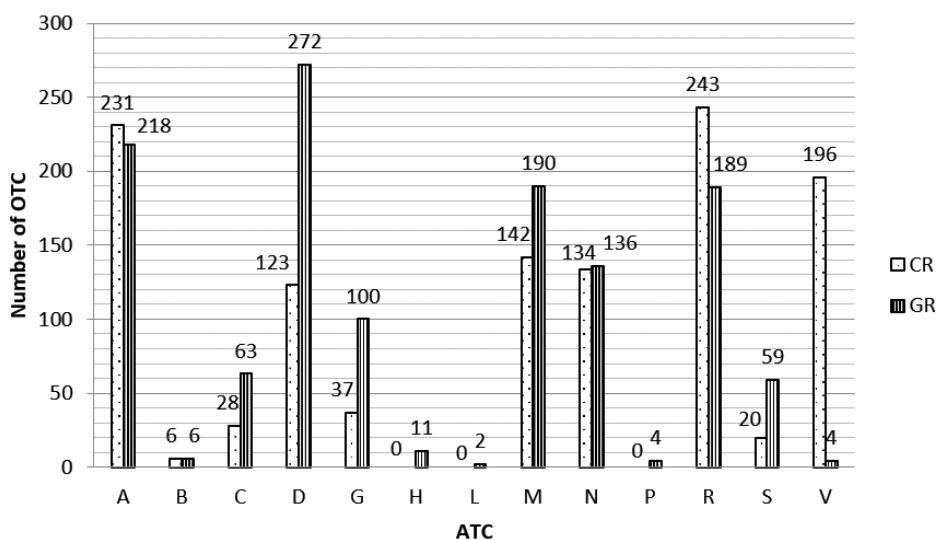


Fig. 1. Number of marketed OTC medicines in ATC: comparing CR and Greece

Table 1. Description of pharmacies that took part in the research

	CR			Greece		
	Pharmacy I	Pharmacy II	Pharmacy III	Pharmacy I	Pharmacy II	Pharmacy III
<b>Locality</b>	Big city	Town	City	Big city	Town	Village
<b>Inhabitants</b>	500,000	2,000	–	3,500,000	20,000	1,000
<b>Owner/type</b>	corporation	pharmacist	chain	pharmacist	pharmacist	pharmacist



Table 2. Identical OTC-ATC classification

Country	Number of marketed OTC in national list	Number of identical OTC	Number of identical OTC in particular ATC (1 <sup>st</sup> level)												
			A	B	C	D	G	H	L	M	N	P	R	S	V
CR	1,160	86	18	1	1	16	2	0	0	6	14	0	26	2	0
Greece	1,254														

Table 3. Comparing the range of OTC products in pharmacies with the number of marketed OTC in CR and Greece

ATC	CR			Greece		
	range of products as a share of the list of marketed OTC			range of products as a share of the list of marketed OTC		
	Pharmacy I	Pharmacy II	Pharmacy III	Pharmacy I	Pharmacy II	Pharmacy III
A	27.27%	57.14%	44.58%	32.11%	16.97%	19.72%
B	50.00%	83.33%	100.00%	16.67%	16.67%	16.67%
C	42.85%	82.14%	71.43%	41.27%	12.70%	17.46%
D	31.71%	60.98%	46.34%	47.43%	28.68%	33.09%
G	43.24%	56.76%	54.05%	5.00%	8.00%	5.00%
H	*	*	*	0.00%	0.00%	0.00%
L	*	*	*	50.00%	50.00%	50.00%
M	25.35%	50.70%	47.89%	44.74%	25.26%	33.68%
N	23.88%	50.00%	54.48%	46.32%	33.09%	32.35%
P	*	*	*	50.00%	50.00%	50.00%
R	35.80%	56.38%	59.26%	55.02%	36.51%	43.39%
S	45.00%	75.00%	35.00%	27.12%	22.03%	25.42%
V	8.16%	39.80%	15.82%	0.00%	0.00%	0.00%
Total	26.98%	53.88%	45.60%	40.03%	24.72%	28.55%

(\*) no marketed OTC in the ATC group in the national list, 0.00% means that there was at least one marketed OTC in the national list in the particular ATC group, but none was found in the range of products in the particular pharmacy. „Total“ means the percentage of the complete range of products in the pharmacy expressed as a share of the national list of marketed OTC.

Table 4. List of OTC chosen for analysis of sales in the pharmacies (CR, Greece)

Code		Name of Drug	Dosage Form	Strenght	Size of Package	Name of Substance	ATC 5 <sup>th</sup> level	Number of OTC in national list (ATC 5 <sup>th</sup> level)	
CR	Greece							CR	Greece
45989	7549	TALCID	tbl mnd	500 mg/tbl	20 tbl	Hydrotalcit	A02AD04	1	1
151579	103599	DULCOLAX	tbl ent	5 mg/tbl	40 tbl	Bisacodyl	A06AB02	3	2
146257	110129	IMODIUM	cps dur	2 mg/cps	8 cps	Loperamid	A07DA03	10	3
162858	204	ASPIRIN PROTECT 100	tbl ent	100 mg/tbl	28(**20) tbl	Acetylsalic. acid	B01AC06	5	1
15892	6344	LAMISIL	crm	10 mg/1 g	15 g	Terbinafin	D01AE15	4	20

Table 4. List of OTC chosen for analysis of sales in the pharmacies (CR, Greece) - continuing

Code		Name of Drug	Dosage Form	Strenght	Size of Package	Name of Substance	ATC 5 <sup>th</sup> level	Number of OTC in national list (ATC 5 <sup>th</sup> level)	
CR	Greece							CR	Greece
15391	5862	FENISTIL ROLL-ON	drm eml	1 mg/1 g	1 × 8 ml	Dimetinden	D04AA13	3	2
103065	2820	ZOVIRAX	crm	5 g/100 g	2 g	Aciclovir	D06BB03	5	4
62320	285	BETADINE	ung	100 mg/1 g	20(**30)g	Povidone iodine	D08AG02	18	14
149198	107818	ELLAONE	tbl nob	30 mg/tbl	1 tbl	Ulipristal acetate	G03AD02	1	1
62543	19071	NUROFEN	tbl obd	200 mg/tbl	24 tbl	Ibuprofen	M01AE01	49	20
100097	6330	VOLTAREN EMULGEL	gel	10 mg/1 g	100 g	Diclofenac	M02AA15	30	44
46213	8448	ASPIRIN-C	tbl eff	400 mg/ 240 mg/tbl	10 tbl	Acetylsal. acid, comb.	N02BA51	5	15
13802	17619	PANADOL EXTRA	tbl flm	500 mg/ 65 mg/tbl	30 tbl	Paracetamol, comb.	N02BE51	58	11
188194	112872	NICORETTE SPRAY 1 mg/DOSE	orm spr sol	1 mg/dose	1 × 13.2 ml	Nicotin	N07BA01	22	30
189464	8411	OTRIVIN MENTHOL 1 mg/ml	nas spr sol	1 mg/1 ml	1 × 10 ml	Xylometazolin	R01AA07	27	11
119924	3983	LIVOSTIN	nas spr sus	5 mg/10 ml	1 × 10 ml	Levocabastin	R01AC02	1	1
64907	109150	STREPFEN	pas	8.75 mg/pas	16 pas	Flurbiprofen	R02AX01	4	3
57395	114588	ACC LONG	tbl eff	600 mg/tbl	10 tbl	Acetylcystein	R05CB01	17	12
23739 (*)	101332	PROSPAN	sir	7 mg/1 ml	100 ml	Hedera leaf	R05CA12	9	2
49629	2405	TEARS NATURALE II	oph gtt sol	1 mg/1 ml + 3 mg/1 ml	15 ml	Hypromelose + Dextran	S01XA20	10	17

(\*) code cancelled at May 1, 2017, replaced by 202353

(\*\*) size of package in Greece (difference from CR)

## Discussion

There were 1,160 marketed OTC in CR and 1,254 ones in Greece in 2016 (Table 2). There were 86 of them identical in both lists, it means having the same name, dosage form, strength and size of package. They were classified in 9 ATC (1<sup>st</sup> level). No identic OTC was found in ATC H, L, P and V. The only one drug (Ellaone tbl 30 mg 1 tbl) has been authorized by European Medicines Agency, the rest of them by national medicines agencies.

As for the variety of marketed OTC drugs in national lists: it was more extensive in Greece, comprising 13 ATC 1<sup>st</sup> level (Fig. 1), but OTC listed in ATC H and V were not found as a part of range of products in any of researched pharmacies (Table 3). The list of marketed OTC in Czech Republic was ranked in 10 ATC 1<sup>st</sup> level (Fig. 1) and at least one drug of each of these 10 ATC groups was really the part of range of products in pharmacies (Table 3).

The range of OTC in pharmacies (Table 3) seemed to be independent of the size of the settlement whe-

Table 5. Sales of chosen OTC in pharmacies in 2016 (CR, Greece)

Name of drug (*)	CR				Greece			
	Number of packages			Total	Number of packages			Total
	Pharmacy				Pharmacy			
I	II	III	I	II	III	I	II	III
TALCID	1	0	37	38	3	7	5	15
DULCOLAX	0	1	35	36	146	170	100	416
IMODIUM	22	22	103	147	300	425	125	850
ASPIRIN PROTECT 100	7	6	5	18	75	83	50	208
LAMISIL	6	2	24	32	38	49	23	110
FENISTIL ROLL-ON	0	0	8	8	57	50	49	156
ZOVIRAX	9	6	19	34	74	68	52	194
BETADINE	64	33	162	259	10	39	21	70
ELLAONE	0	0	14	14	6	11	8	25
NUROFEN	0	0	11	11	6	25	5	36
VOLTAREN EMULGEL	12	5	48	65	197	320	147	664
ASPIRIN-C	0	0	23	23	29	120	21	170
PANADOL EXTRA	30	17	269	316	363	250	170	783
NICORETTE SPRAY 1 mg/DOSE	1	0	61	62	8	15	11	34
OTRIVIN MENTHOL 1 mg/ml	215	15	174	404	10	8	1	19
LIVOSTIN	0	7	33	40	29	32	18	79
STREPFEN	3	14	62	79	76	82	52	210
ACC LONG	14	49	556	619	5	11	2	18
PROSPAN	13	4	15	32	29	40	18	87
TEARS NATURALE II	1	17	21	39	53	72	39	164
Total	398	198	1,680	2,276	1,514	1,877	917	4,358

(\*) dosage form, strength and size of package: see Table 4

re the pharmacy was located in Greece. This was not confirmed in CR. The pharmacy in the small town offered the biggest range of products in 70.00% of ATC (1<sup>st</sup> level) comparing to pharmacies in other localities. There were found 53.88% of all marketed OTC in the range of products in this small pharmacy. The pharmacy in the big city (CR) had the smallest range of products in 90.00% of ATC (1<sup>st</sup> level), in total: 26.98% of the marketed ones. It could be deduced that the pharmacy in the small town (the only one in this town) made efforts to meet the maximum of patients' needs in order to prevent the patients to buy their OTC in other pharmacies. The next reason could be the difference in the ownership of the pharmacies: because of the big competition the pharmacist as the owner had to supply the patients' demands as much as possible to be attractive for clients and to stack up to the competition. The results in pharmacies in big cities

were opposite: the range of products offered to patients was 26.98% in CR (minimum of the researched Czech pharmacies) versus 40.03% in Greece (maximum of the researched Greek pharmacies). Similar range of products in pharmacies in smaller settlements (24.72% town, 28.55% village) was found in Greece. Chain (CR) seemed to offer the wide range of OTC products (45.60%) comparing to the independent pharmacy in the big city (26.98%).

Sales of 20 common OTC (Table 4) in chosen pharmacies (Table 5) showed big differences. They were nearly twice as high (191.48%) in Greece as in CR in 2016. Despite of the similar OTC share in total pharmaceutical market (approx. 5% in 2015<sup>10)</sup>) the changes that started in 2016 (non-restrictive environment, new businesses or new products<sup>14)</sup>) in Greece seemed to bring out new patterns in pharmacists' and patients' habitual practice. The extent of OTC sales

Table 6. Top ATC groups sold in chosen pharmacies

CR		Greece	
ATC 1 <sup>st</sup> level	Number of packages	ATC 1 <sup>st</sup> level	Number of packages
R	1,174	A	1,281
N	330	N	817
A	181	M	700
D	140	D	530
M	76	R	413

Table 7. Top OTC drugs sold in chosen pharmacies

CR			Greece		
ATC 5 <sup>th</sup> level	Name of drug (*)	Number of packages	ATC 5 <sup>th</sup> level	Name of drug (*)	Number of packages
R05CB01	ACC long	619	A07DA03	Imodium	850
R01AA07	Otrivin Menthol	404	N02BE51	Panadol Extra	783
N02BE51	Panadol Extra	316	M02AA15	Voltaren Emulgel	664
D08AG02	Betadine	259	A06AB02	Dulcolax	416
A07DA03	Imodium	147	R02AX01	Streptfen	210

(\*) dosage form, strength and size of package: see Table 4

did not rely on the extent of range of OTC in pharmacies (Table 3, 5): there were biggest sales (1,877 packages) in the pharmacy with the least range of products in Greece (locality: town). On the contrary, the sales seemed to be dependent on the ownership of the pharmacy in CR: the chain-pharmacy had the highest sales (1,680 packages) even if it did not have the broadest range of products. The pharmacies located in small town (CR) and village (Greece) showed lower sales regardless of not having the least range of OTC drugs. When detecting the highest sales in ATC groups (Table 5, 6) in Greece, the most frequently sold group was ATC A (Alimentary tract – 1,281 packages) and the most frequently sold OTC was IMODIUM cps dur 2 mg/cps 8 cps (A07DA03, 850 packages) (Table 7). The number of OTC marketed in ATC A (218 OTC) was the second highest in Greece (Fig. 1 – ATC D with 272 OTC was the first one) and the range of products in the pharmacies oscillated between 32.11% and 16.97% (Table 3). In Czech pharmacies, the most frequently sold ATC group was R (Respiratory tract – 1,174 packages) (Table 5, 6) and the most frequently sold OTC was ACC long tbl eff 600 mg/tbl 10 tbl (R05CB01, 619 packages) (Table 7). The number of OTC marketed in ATC R was the highest one in CR (Fig. 1 – 243 OTC) and the range of products in the pharmacies oscillated between 59.26% and 35.80% (Table 3).

This research brings the simplified and non-representative look into the OTC market in Czech Republic and Greece. There are some factors impeding the generalization of results: the small number of pharmacies taking part in the research, impossibility of drawing a comparison between data on sales in pharmacies and international<sup>11, 12)</sup> and national statistics on OTC drug consumption (in Czech Republic at wholesalers' level)<sup>23)</sup>. Last but not least, the Czech OTC market has been stabilized since the changes in the health care system in nineties, while the Greek one is expected to undergo big changes in the near future due to starting liberalization and market opening. On the other hand, some factors not taken in consideration in this research might modify what was found up: the climatic differences between the two countries could determine what are the most common patients' symptoms treated by self-medication and what are the most frequently sold OTC drugs.

**Conflicts of interest:** none.

#### Literature

1. What is selfmedication. <http://www.wsmi.org/about-self-care-and-self-medication/what-is-self-medication/> (1. 2. 2019).
2. Statistics on OTC use. <https://www.chpa.org/MarketStats.aspx#access> (1. 2. 2019).
3. Better regulation of nonprescription medicines. <http://www.aesgp.eu/publications/wsmi-publications/> (1. 2. 2019).

4. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use.
5. **Minghetti P., Casiraghi A., Cilurzo F., Montanari L.** The situation of OTC drugs in Italy compared to the other EU states. *Pharmacol. Res.* 2000; 42(1), 25–31.
6. AESPG Annual Report 2015–2016. <http://www.aesgp.eu/publications/library/> (1. 2. 2019).
7. **Vogler S., Arts D., Sandberger K.** Impact of pharmacy deregulation and regulation in European countries (2012). [https://ppri.goeg.at/technical\\_reports](https://ppri.goeg.at/technical_reports) (1. 2. 2019).
8. Market access in the Czech Republic. [http://www.pmlive.com/pharma\\_news/market\\_access\\_czech\\_republic\\_356414](http://www.pmlive.com/pharma_news/market_access_czech_republic_356414) (1. 2. 2019).
9. <http://www.sukl.eu/medicines/marketing-authorisation-of-pharmaceuticals> (1. 2. 2019).
10. Market data. Total non- prescriptions medicines market sales. <http://www.aesgp.eu/facts-figures/market-data/non-prescription-market/> (1. 2. 2019).
11. OECD Health Working Paper No.87. Pharmaceutical expenditure and policies: past trends and future challenges. [https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/pharmaceutical-expenditure-and-policies\\_5jm0q1f4cdq7-en](https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/pharmaceutical-expenditure-and-policies_5jm0q1f4cdq7-en) (1. 2. 2019).
12. Health at a Glance 2017. [https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-2017\\_health\\_glance-2017-en](https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-2017_health_glance-2017-en) (1. 2. 2019).
13. Product, Market and Regulatory Pathway Strategy. <https://www.freyrsolutions.com/regulatory-services-in-greece> (1. 2. 2019).
14. Healthcare Resource Guide: Greece. [https://build.export.gov/main/industry/health/healthcareresourceguide/eg\\_main\\_092012](https://build.export.gov/main/industry/health/healthcareresourceguide/eg_main_092012) (1. 2. 2019).
15. **Kontos N.** Are OTC's in Greece stepping into the new era? <https://www.linkedin.com/pulse/otcs-greece-stepping-new-era-nikos-kontos/> (1. 2. 2019).
16. Greek Ministry of Health. Creating of drug subcategory ΓΕ.ΔΙ.ΦΑ <http://www.moh.gov.gr/articles/ministry/grafeio-typoy/press-releases/3917> (1. 2. 2019).
17. Greece: Pharmaceutical advertising 2018. <https://iclg.com/practice-areas/pharmaceutical-advertising-laws-and-regulations/greece> (1. 2. 2019).
18. Active substances belonging to the subcategory ΓΕ.ΔΙ.ΦΑ <https://www.farmakeutikoskosmos.gr/article-f/ayth-einai-h-lista-me-tis-drastikes-oysi/17898> (1. 2. 2019).
19. Act No 378/2007 Coll., on Pharmaceuticals and on Amendments to some Related Acts.
20. <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php> (16. 10. 2016).
21. <http://www.eof.gr> (18. 10. 2016).
22. <https://www.galinos.gr> (18. 10. 2016).
23. AISLP 2018.3 (Automated System of Medical Preparations, version 2018.3) <https://www.aislp.cz/> (1. 2. 2019).

Sekce technologie léků České farmaceutické společnosti ČLS JEP a  
Farmaceutická fakulta VFU Brno – Ústav technologie léků

Vás zve na pracovní den, který se koná

4. 9. 2019 v 14:00 hodin v areálu VFU Brno, Palackého tř. 1, budova 44, na téma

## POKROKY VE FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGII

AKCE byla schválena a zaregistrovaná pod číslem 19493 a  
byla ohodnocena 14 body



### PROGRAM (14:00– 20:00)

***Půlitenost tablet – vliv formulačních a technologických parametrů na obsahovou stejnoměrnost polovin tablet získaných rozlomením tablety s půlicí rýhou***

Doc. Ing. Petr Zámstný, Ph.D., Vysoká škola chemicko-technologická Praha

***Může dynamika konsolidace pomoci v odhadu úhlu vnitřního tření?***

Mgr. Žofie Trpělková, doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph. D., Katedra farmaceutické technologie, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové

***Průtočná disoluce***

RNDr. Ludmila Butzková, Ing. Iva Martinová, Zentiva k.s., SOTAX Pharmaceutical Testing s.r.o.

***Biologická léčba***

MUDr. Eva Dokoupilová, Vedoucí lékařka soukromé revmatologické kliniky MEDICAL PLUS, Uherské Hradiště

***Lékové formy pro dětského pacienta***

Doc. PharmDr. Jan Gajdziok, Ph.D., Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta VFU, Brno

***Modelování dýchacích cest jako nástroj pro účinnější inhalační léčbu***

Ing. František Lízal, Ph.D. Odbor termomechaniky a techniky prostředí, Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně

***Filmové krytí na rány s dexpanthenolem***

PharmDr. Kateřina Tenorová, doc. PharmDr. Ruta Masteiková, Ph.D., Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta VFU, Brno

Doc. PharmDr. Kateřina Kubová, Ph. D.- předsedkyně sekce  
doc. PharmDr. Ing. Radka Opatřilová, Ph.D., MBA – děkanka FaF VFU

## 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, symposiích a jiných důležitých událostech, příspěvky z farmaceutické praxe, recenze knih a krátké informace (excerpta) ze zahraniční literatury. Uveřejňuje také limitované množství abstraktů z odborných akcí pořádaných Českou farmaceutickou společností. Počet a rozsah abstraktů je předem nutné dohodnout s redakcí časopisu.

Redakce přijímá pouze práce a příspěvky, které nebyly dosud uveřejněny ani zaslány k otištění jinému časopisu.

**Časopis Česká a slovenská farmacie nezpoplatňuje 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. 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> Haxon K. J., Burt H. M. Polymeric drug delivery of platinumloaded anticancer agents. J. Pharm. Sci. 2009; 98, 2299–2316.

<sup>2)</sup> Perlík F. Základy klinické farmakologie. 1. vyd. Praha: Galén 2008; 192 s.

<sup>3)</sup> Hauser W. A., Annegers J. F. Epidemiology of epilepsy. In: Laidlaw, J. P., Richens, A., Chadwick, D. eds. Textbook of epilepsy, 4th ed. New York: Churchill-Livingstone 1992.

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

<sup>5)</sup> Horák J. Standardní diagnostický a terapeutický postup u genetické (hereditární) hemochromatózy. <http://www.ceskahepatologie.cz/index.php?node=43> (21. 12. 2009)

<sup>6)</sup> Felton L. A. Characterization of coating systems. AAPS PharmSciTech. 2007; 8(4) Article 112. <http://aapspharmstech.org>.

11. Autor – celé jméno s tituly, korespondenční adresa, telefon, fax a e-mailová adresa.
12. Krátká sdělení – předběžná, stručná prezentace nových významných výsledků bez diskuze. Souhrn a klíčová slova viz bod 9; rozsah textu 1200–1500 slov max. se 3 tabulkami nebo obrázky a max. se třemi literárními citacemi.
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

### Požadavky na rukopis

**Rukopisy se zasílají pouze elektronicky.** Na literaturu se odkazuje číselným indexem nahoře se závorkou, např. Tomíček <sup>34)</sup>.

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, imprimované 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, Ph.D.

Redakce časopisu Česká a slovenská farmacie

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno,

Farmaceutická fakulta

Palackého 1/3, 612 42 Brno

e-mail: [kubovak@vfu.cz](mailto:kubovak@vfu.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. Only the papers and contributions are accepted that have not been published or submitted for publication to some other journal.

**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, a 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. Duplicity 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. Journal citations are presented with the full title of the article and the names of all authors. Do not use automatic numbering of citations and names of authors or titles of papers copied from the web! They can be lost when making up the page for printing.

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> **Haxon K. J., Burt H. M.** Polymeric drug delivery of platinumloaded anticancer agents. *J. Pharm. Sci.* 2009; 98, 2299–2316.

<sup>2)</sup> **Perlík F.** *Základy klinické farmakologie*. 1. vyd. Praha: Galén 2008; 192 s.

<sup>3)</sup> **Hauser W. A., Annegers J. F.** *Epidemiology of epilepsy*. In: Laidlaw, J. P., Richens, A., Chadwick, D. eds. *Textbook of epilepsy*, 4th ed. New York: Churchill-Livingstone 1992.

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

<sup>5)</sup> **Horák J.** *Standardní diagnostický a terapeutický postup u genetické (hereditární) hemochromatózy*. <http://www.ceskahepatologie.cz/index.php?node=43> (21. 12. 2009)

<sup>6)</sup> **Felton L. A.** *Characterization of coating systems*. *AAPS PharmSciTech*. 2007; 8(4) Article 112. <http://aapspharmstech.org>.

11. Author – full name with degrees, address for correspondence, phone, fax and e-mail address.
12. Short communications – preliminary, short presentation of new research results without discussion. For Summary and Keywords see item 9; extent of text 1200–1500 words maximally with 3 tables or figures and maximally with three references.
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

## Requirements for the manuscript

**Only electronic submissions are acceptable.** The literature is referred to by a number index above with a bracket, e.g. Tomíček<sup>34)</sup>.

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*

*Veterinární a farmaceutická univerzita Brno,*

*Farmaceutická fakulta*

*Palackého 1/3, 612 42 Brno*

*e-mail: kubovak@vfu.cz*