FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis
UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609
ISSN 2729-790X

4

V • 2023

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

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

Šéfredaktorka/Editor-in-Chief: *Jozef Nagy*
Výkonná redaktorka/Deputy/Managing Editor: *Jana Koščová*
Redakčná rada/Editorial Board: *Abu-Darwish, M. S. (Shoubak, Jordan), Boknik, P. (Münster, Germany), Castejon, A. M. (Fort Lauderdale, Florida, USA), Csöllei, J. (Brno, Czech Republic), Deelman, L. E. (Groningen, Netherlands), Devinyak, O. (Uzhhorod, Ukraine, El Naggar, El M. B. A. (Damanhour, Egypt), Getova, D. (Plovdiv, Bulgaria), Kyselovič, J. (Košice, Slovak Republic), Leddy, J. J. (Ottawa, Canada), Mojžiš, J. (Košice, Slovak Republic), Klimas, J. (Bratislava, Slovak Republic), Mučaji, P. (Bratislava, Slovak Republic), Opatřilová, R. (Brno, Czech Republic), Pirník, Z. (Bratislava, Slovak Republic), Pistl, J. (Košice, Slovak Republic), Roh, J. (Hradec Králové, Czech Republic). Şekeroğlu, N., (Turkey, Kilis), Šimůnek, T. (Hradec Králové, Czech Republic), Zitterl, K. (Vienna, Austria)*

Vydavateľ/Publisher:
© Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2019
Adresa redakcie/Editor Address:
Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, e-mail: folia.pharma@uvlf.sk
Technická redaktorka/Technical Editor:
Holečková, Z., tel.: +421 917 729 873, e-mail: zuzana.holeckova@uvlf.sk
Grafická úprava/graphic design:
Báštiová, I.

ISSN: 2585-9609
EVČ: EV 5741/18
IČO: 00 397 474

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

December 2023

FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

VYDÁVA
UNIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE V KOŠICIACH
SLOVAKIA

FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA
V., 4, 2023

PUBLISHED BY
THE UNIVERSITY OF VETERINARY MEDICINE AND PHARMACY IN KOŠICE
2023

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 4, 2023

O B S A H

Hirjaková, Daša; Holécyová, Monika; Štempeľová, Iveta; Polačko, Peter:
RÁDIOFARMAKÁ A ICH VYUŽITIE V DIAGNOSTIKE KOSTNÝCH OCHORENÍ
RADIOPHARMACEUTICALS AND THEIR USE IN THE BONE DISEASE DIAGNOSIS 5

Bartošová, Martina; Marcinčáková, Dana:
VPLYV EPILEPSIE NA KVALITU ŽIVOTA
THE EFFECT OF EPILEPSY ON THE QUALITY OF LIFE 17

Szabóová, Renáta; Galajda, Richard; Dravecká, Ingrid, Kubiková, Laura:
ANALÝZA EXPEDÍCIE AGONISTOV GLP-1 RECEPTOROV PRI LIEČBE *DIABETES MELLITUS* 2. TYPU
ANALYSIS OF EXPEDITION OF GLP-1 RECEPTOR AGONISTS IN THE TREATMENT OF TYPE 2 *DIABETES MELLITUS* 28

Krížová, Veronika; Šutorová, Martina; Bačkorová, Miriam:
POTENCIÁLNE NEVHODNÉ LIEČIVÁ UŽÍVANÉ V TERAPII KARDIOVASKULÁRNYCH OCHORENÍ U MUŽOV VO VYŠŠOM VEKU
POTENTIALLY INAPPROPRIATE DRUGS USED IN THE CAUSAL THERAPY OF CARDIOVASCULAR DISEASES IN ELDERLY MEN 41

Nagyová, Sára; Piešová, Elena; Bocko, Pavol:
ANALÝZA PRESKRIPCIE ANTIBIOTÍK V PRAXI STOMATOLÓGA
ANALYSIS OF ANTIBIOTIC PRESCRIPTION IN THE PRACTICE OF DENTISTRY 50

Beňová, Katarína; Falis, Marcel; Fonfer, Matej; Špalková, Michaela:
STANOVENIE LC50 ÚČINNEJ LÁTKY ZO SKUPINY NEONIKOTINOIDOV
DETERMINATION OF LC50 OF A NEONICOTINOID ACTIVE SUBSTANCE 58

Rohaľová, Simona; Wolaschka ,Tomáš; Juhasová, Kristína; Paulovičová, Katarína; Tóthová, Jana:
EVALUATION OF THERMOSENSITIVE POLYMERS FOR THE FORMULATION OF ORAL *IN SITU* GEL 65

Ungvarská Maľučká, Lucia; Uhrinová, Anna; Lysínová, Patrícia:
OPHIOCORDYCEPS SINENSIS, *CORDYCEPS MILITARIS*: ZDROJ BIOAKTÍVNYCH POLYSACHARIDOV
OPHIOCORDYCEPS SINENSIS, *CORDYCEPS MILITARIS*: A SOURCE OF BIOACTIVE POLYSACCHARIDES 78

Baloďanská, Sabína; Galdíková, Martina:
HODNOTENIE GENOTOXICKÉHO ÚČINKU KOMBINÁCIE PESTICÍDOV *IN VITRO*
EVALUATION OF THE GENOTOXIC EFFECT OF A COMBINATION OF PESTICIDES *IN VITRO* 87

Nociarová, Natália; Eftimová, Jarmila; Petrovič, Vladimír:
VPLYV EXTRAKČNÝCH ČINIDIEL NA BIOAKTÍVNE OBSAHOVÉ LÁTKY S ANTIOXIDAČNÝM POTENCIÁLOM A TOXICITA EXTRAKTOV TURANCA KANADSKÉHO (*ERIGERON CANADENSIS* L.)
EFFECT OF EXTRACTION REAGENTS ON BIOACTIVE CONTENTS WITH ANTIOXIDANT POTENTIAL AND TOXICITY OF EXTRACTS (*ERIGERON CANADENSIS* L.) 96

Pokyny pre autorov 107

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 4: 5 – 16, 2023

RÁDIOFARMAKÁ A ICH VYUŽITIE V DIAGNOSTIKE KOSTNÝCH OCHORENÍ

RADIOPHARMACEUTICALS AND THEIR USE IN THE BONE DISEASE DIAGNOSIS

Hirjaková, Daša[1]; Holécyová, Monika[1]; Štempeľová, Iveta[1,2]; Polačko, Peter[3]

[1]Katedra lekárenstva a sociálnej farmácie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika
[2]Ústav aplikované farmacie, Farmaceutická fakulta
Masarykova univerzita
Palackého třída 1946/1, 612 00 Brno
Česká republika
[3]Oddelenie nukleárnej medicíny Vivamed, s. r. o., Hollého 14, 081 81 Prešov
Slovenská republika

monika.fedorova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Štúdia sa zaoberá rádiofarmakami, ktoré sú využívané pri scintigrafickom vyšetrení skeletu. Scintigrafia skeletu patrí medzi diagnostické zobrazovacie metódy nukleárnej medicíny, ktorých výsledkom je detekcia a zobrazenie akumulácie rádiofarmaka emitujúceho ionizujúce žiarenie v kostiach na základe ich metabolickej aktivity a prekrvenia. Na tomto princípe je založené pozorovanie patologických procesov a kostných ochorení rôzneho pôvodu, onkologického, zápalového, ortopedického alebo metabolického. V práci je hodnotených 1284 jednotlivých scintigrafických vyšetrení skeletu, ktorých výsledkom je pozitivita kostných nálezov alebo ochorení až v 79,0 % prípadov. Prítomnosť artrotických a osteoartrotických zmien, ako najčastejšie sa vyskytujúci kostný nález, predstavuje až 70,1 % všetkých pozitívnych prípadov. Veľký význam a medicínsky prínos má scintigrafické vyšetrenie skeletu aj pri detekcii kostných metastáz, ktorých prítomnosť bola v našom hodnotení pozorovaná v 15,2 % všetkých onkologických pacientov.

Kľúčové slová: kostné ochorenia; nukleárna medicína; rádiofarmaká; scintigrafia skeletu

ABSTRACT

The study deals with radiopharmaceuticals used in skeletal scintigraphy. Skeletal scintigraphy is

one of the diagnostic imaging methods of nuclear medicine, which results in the detection and imaging of the accumulation of ionizing radiation-emitting radiopharmaceuticals in bones based on their metabolic activity and blood flow. The observation of pathological processes and bone diseases of different origin, oncological, inflammatory, orthopedic or metabolic, is based on this principle. In this paper, there are 1284 individual skeletal examinations evaluated, resulting in positive bone findings or diseases in up to 79.0 % of cases. The presence of arthrotic and osteoarthrotic changes, as the most frequently occurring bone finding, accounts for up to 70.1 % of all positive cases. Skeletal scintigraphy is also of great importance and medical benefit in the detection of bone metastases, the presence of which was confirmed in 15.2 % of all observed cancer patients.

Key words: bone diseases; nuclear medicine; radiopharmaceuticals; skeletal scintigraphy

ÚVOD

Rádiofarmaká predstavujú farmakologické prípravky alebo biologicky aktívne molekuly tvorené minimálne jedným rádionuklidom. Sú to zlúčeniny výnimočné nielen svojim zložením a vlastnosťami, ale hlavne svojou funkciou, a to tým, že predstavujú užitočný zdroj ionizujúceho žiarenia, ktorého detekcia má obrovský význam v diagnostickom zobrazovaní a terapii v nukleárnej medicíne.

V štúdii sa zameriavame na rádiofarmaká osteotrópne, teda analógy bisfosfonátov značených rádionuklidom – technéciom, ktoré sa vo zvýšenej miere akumulujú v miestach s intenzívnym kostným metabolizmom a prekrvením. Detekcia emitovaného žiarenia a sledovanie akumulácie týchto rádiofarmák v organizme a v skelete predstavuje základný princíp zobrazovania a diagnostiky v nukleárnej medicíne, a to vďaka využitiu len minimálnych množstiev rádiofarmák podaných pacientovi pred vyšetrením, a pri relatívne nízkej radiačnej záťaži pacienta (Van Den Wyngaert a kol., 2016).

Na Slovensku máme jediný registrovaný humánny liek (TechneScan HDP®) zaradený do indikačnej skupiny rádiofarmaká, ktorého zloženie je tvorené bisfosfonátom – dinatrii oxidronas. Liek je indikovaný na rádionuklidové vyšetrenie skeletu, pri ktorom sa zobrazujú oblasti so zmenenou osteogenézou. Špecifické kontraindikácie tohto lieku nie sú známe, rovnako nežiaduce účinky po jeho aplikácii sú veľmi vzácne. Pozorované môžu byť prejavy anafylaktoidnej reakcie, napr. vyrážky, nevoľnosť, hypotenzia alebo bolesti kĺbov. Akumulácia tohto rádiofarmaka môže byť znížená pri súčasnom podávaní prípravkov obsahujúcich iné bisfosfonáty, cheláty, tetracyklíny alebo zlúčeniny železa. Naopak, výrazne zvýšená akumulácia, a to najmä v pečeni, môže byť pozorovaná pri častom užívaní zlúčenín hliníka (napr. antacíd), pravdepodobne vytváraním značených koloidov (ŠUKL, 2023). Medzi bisfosfonáty využívané v zahraničí patria napr. metylén-difosfonát alebo medronát, hydroxyetylidén-difosfonát alebo dikarboxypropán-difosfonát.

Scintigrafické vyšetrenie skeletu patrí medzi najčastejšie vykonávané diagnostické zobrazovacie vyšetrenia na oddeleniach nukleárnej medicíny, a pomáha hodnotiť a diagnostikovať rôzne kostné ochorenia a stavy. Metabolicky aktívne kostné procesy a niektoré patologické stavy kostí je možné scintigraficky zobraziť už niekoľko týždňov alebo mesiacov skôr, než sa stanú viditeľné na klasických röntgenových snímkach (Vivamed, 2021). Práve preto má scintigrafia skeletu veľký význam najmä pri diagnostikovaní kostných metastáz, ktoré patria medzi najčastejšie pozorované a hodnotené nálezy na scintigrafických kostných obrazoch. Scintigrafickým vyšetrením skeletu vieme potvrdiť a diagnostikovať rôzne onkologické ochorenia, od primárnych nádorov kostí a kĺbovej chrupavky po kostné metastázy, už od počiatočnej diagnostiky, stagingu a monitorovania liečby pacientov s rakovinou (Montilla-Soler a Makanji, 2017). Scintigrafia skeletu poskytuje cenné informácie aj o rôznych kostných ochoreniach zápalového, ortopedického a metabolického pôvodu. Cieľom štúdie bolo

vyhodnotiť za obdobie 1 roka výsledky jednotlivých scintigrafických vyšetrení skeletu, pri ktorých sú využívané osteotrópne diagnostické rádiofarmaká.

MATERIÁL A METÓDY

Údaje použité na vyhodnotenie sme získavali na oddelení nukleárnej medicíny Vivamed, s. r. o. v Prešove pod záštitou MUDr. Petra Polačka, primára a vedúceho lekára na oddelení nukleárnej medicíny. Zber informácií a údajov sme realizovali po dobu jedného roka, konkrétne v období od 1.1.2022 do 30.12.2022. Na oddelení nukleárnej medicíny sme spracovávali záznamy, resp. výsledky všetkých scintigrafických vyšetrení skeletu, ktoré boli vykonané v roku 2022, a to v počte 1284.

Na oddelení nukleárnej medicíny, kde prebiehal náš výskum, je z rádiofarmák využívaný liek TechneScan HDP® indikovaný na rádionuklidové vyšetrenie skeletu, pri ktorom sa zobrazujú oblasti so zmenenou osteogenézou. Dinatrium oxidronát vo forme prášku je určený na značenie požadovanou aktivitou rádionuklidu – pertechnetátu/technecistanu sodného ($Na^{99m}TcO_4$) získavaného z molybdén-technéciového $^{99}Mo/^{99m}Tc$ generátora priamo na pracovisku nukleárnej medicíny. Za celý tento proces, od práce s generátorom, izolácie rádionuklidu, značenia kitu a uskladnenia, až po natiahnutie aplikačnej dávky pre pacienta do striekačky, je zodpovedný farmaceut. Injekčný roztok – rádiofarmakum pripravené farmaceutom je určené na intravenózne podanie, ktorým začína scintigrafické vyšetrenie.

Na oddelení, kde sme realizovali výskum, sú využívané dva zobrazovacie prístroje, resp. gamakamery, a to SPECT GE Sopha DST-Xli a SPECT GE NM 830 ES (Vivamed, 2021).

Na základe získaných informácií sme pacientov rozdelili podľa ich pohlavia a veku, zamerali sme sa na lekárov, ktorí indikovali vyšetrenie, a na indikácie, pre ktoré boli pacienti na toto vyšetrenie odporúčaní. Pri hodnotení výsledkov vyšetrení sme kostné nálezy a ochorenia, ktoré boli potvrdené alebo diagnostikované týmto vyšetrením, rozdelili do štyroch základných skupín ochorení – onkologické, zápalové, ortopedické a metabolické.

U pacientov sme sledovali prítomnosť nezhubných, ale hlavne zhubných kostných nálezov, či už išlo o primárne kostné nádory alebo kostné metastázy. Sledovali sme typy najčastejšie metastázujúcich nádorov a ich lokalizáciu. Ďalšou skupinou boli ochorenia zápalové, kde sme sa sústredili na typy jednotlivých zápalových ochorení a ich lokalizáciu v skelete. V časti venovanej ortopedickým nálezom sme sledovali hodnotenia fixácie TEP (totálnych kostných endoprotéz) u pacientov s TEP kolenného a bedrového kĺbu, pacientov s pozitívnym nálezom traumatického pôvodu, sústredili sme sa aj na prítomnosť artrotických a osteoartrotických zmien u pacientov a ich lokalizáciu. Vyhodnotili sme aj prítomnosť metabolických kostných ochorení, ktoré boli vo vzorke pacientov zaznamenané.

Všetky získané výsledky a nálezy jednotlivých scintigrafických vyšetrení skeletu sme znázornili formou grafov prostredníctvom softvérového programu Microsoft Excel.

VÝSLEDKY

1. Analýza súboru pacientov

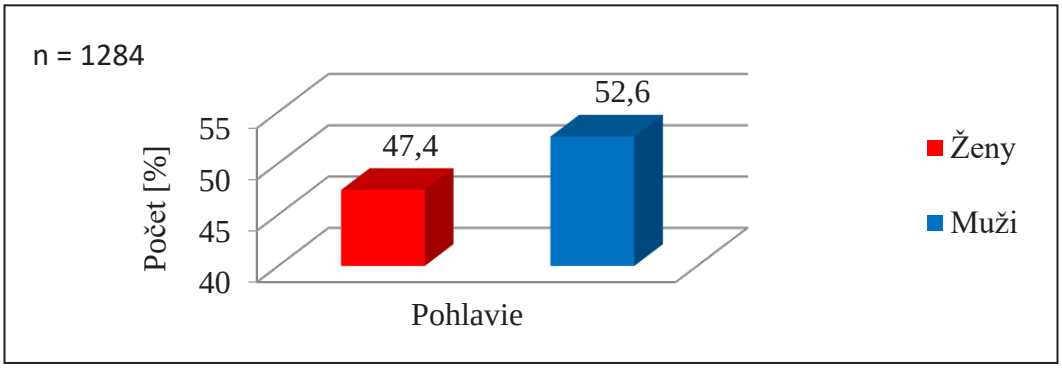
Z celkového počtu 1284 sledovaných pacientov, ktorí podstúpili scintigrafické vyšetrenie skeletu, tvorili 47,4 % (609) ženy a 52,6 % (675) muži (viď graf 1).

Najväčšiu skupinu predstavujúcu 46,3 % (595) zo všetkých 1284 pacientov tvorili pacienti vo vekovom rozmedzí 51 – 70 rokov. Naopak, najmenšiu skupinu tvoriacu 1,8 % (23) predstavovali najmladší pacienti do 18 rokov. Vekovú štruktúru pacientov znázorňuje graf 2.

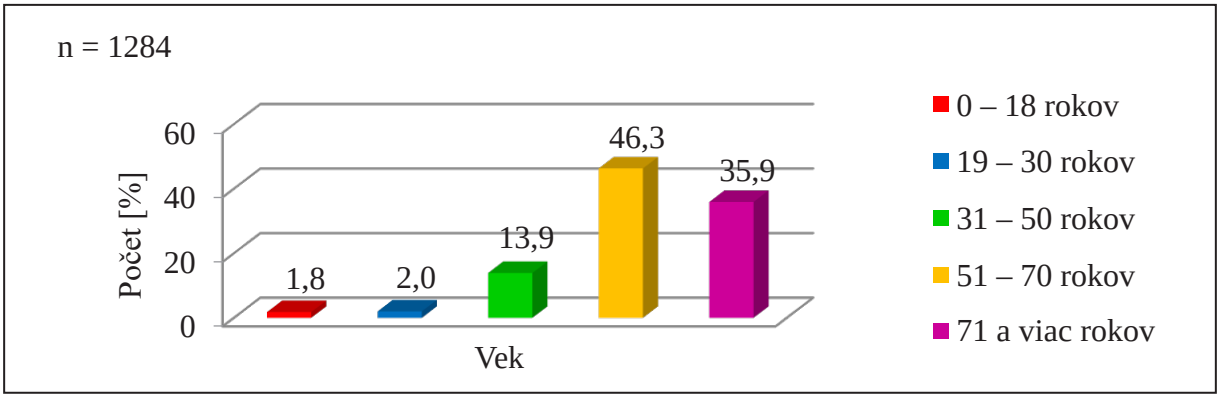
2. Indikácie scintigrafického vyšetrenia skeletu

Najčastejšou indikáciou na scintigrafické vyšetrenie skeletu bolo podozrenie, skríning alebo monitorovanie primárnych alebo sekundárnych zhubných nádorov v onkológii, čo bolo zaznamenané až v 62,3 % (800) prípadoch. Druhou najčastejšou indikáciou

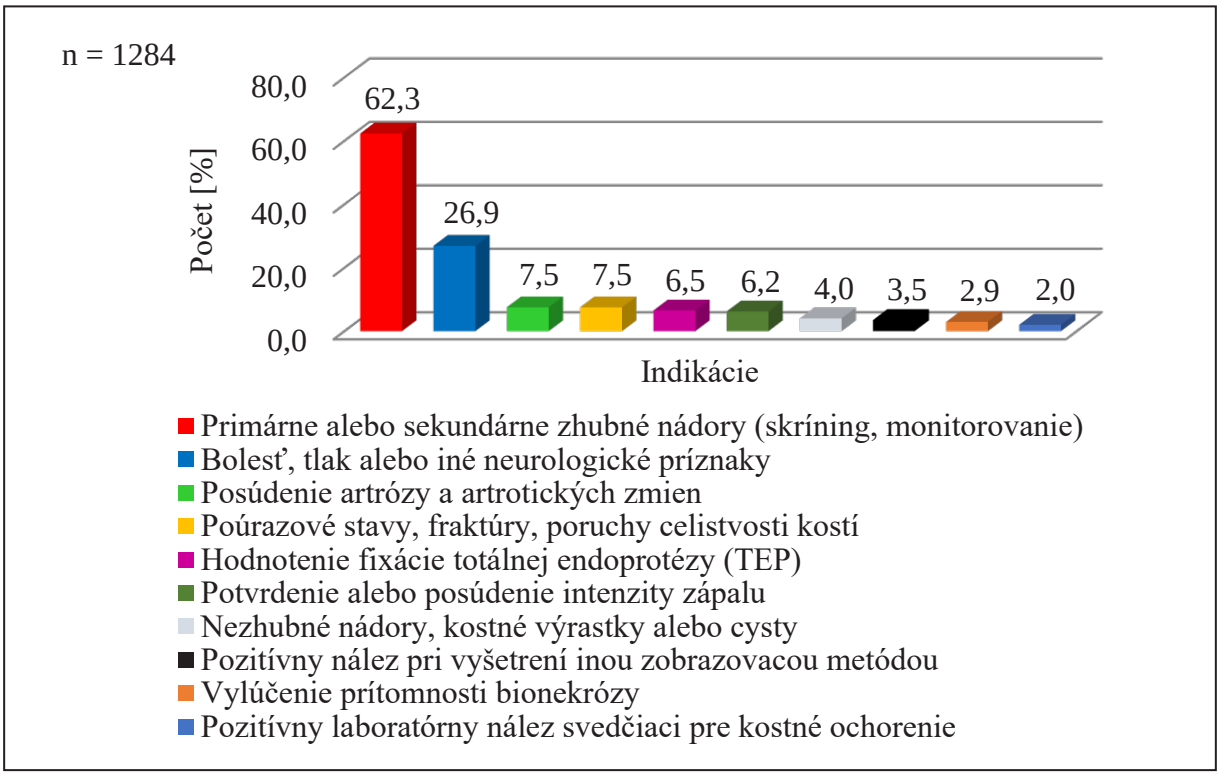
Graf 1: Pohlavie pacientov



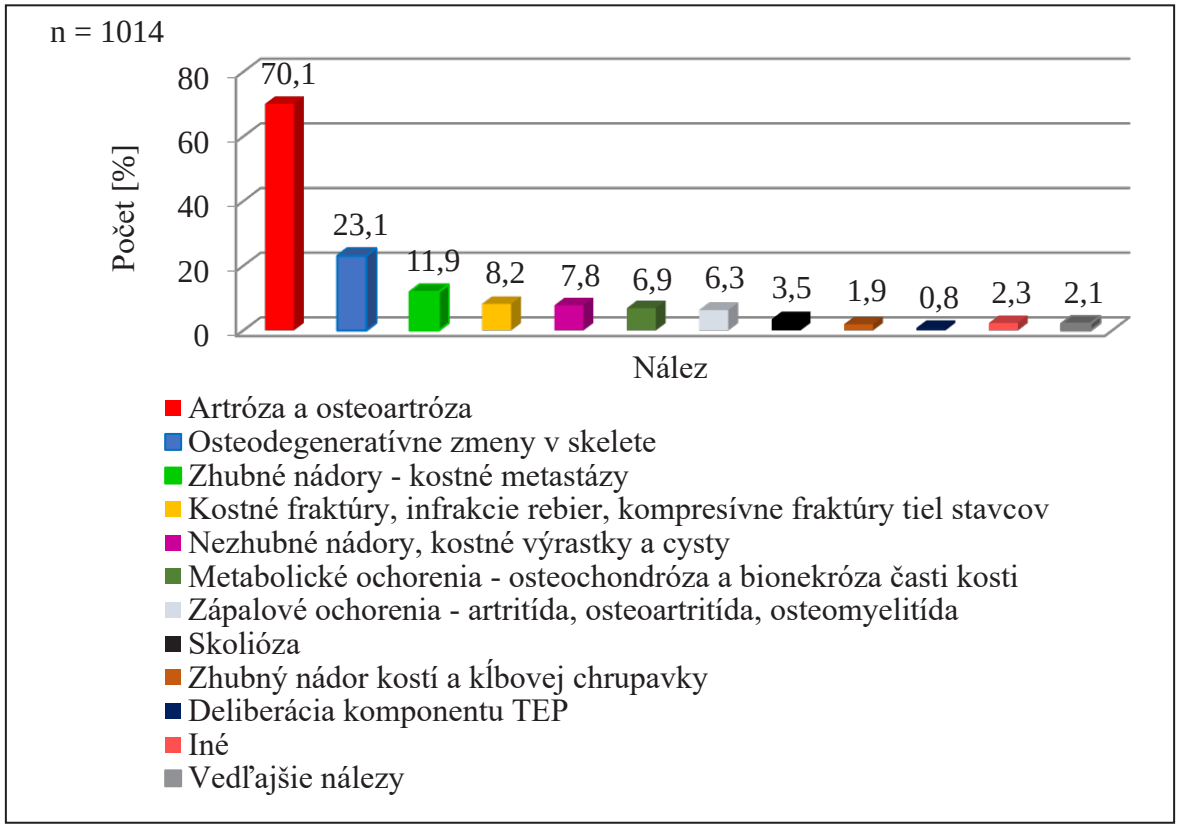
Graf 2: Vek pacientov



Graf 3: Indikácie



Graf 4: Pozitívne kostné nálezy



predstavujúcou 26,9 % (346) bola bolesť, tlak alebo iné neurologické príznaky. Jednotlivé indikácie zobrazuje graf 3.

3. Výsledky scintigrafického vyšetrenia skeletu

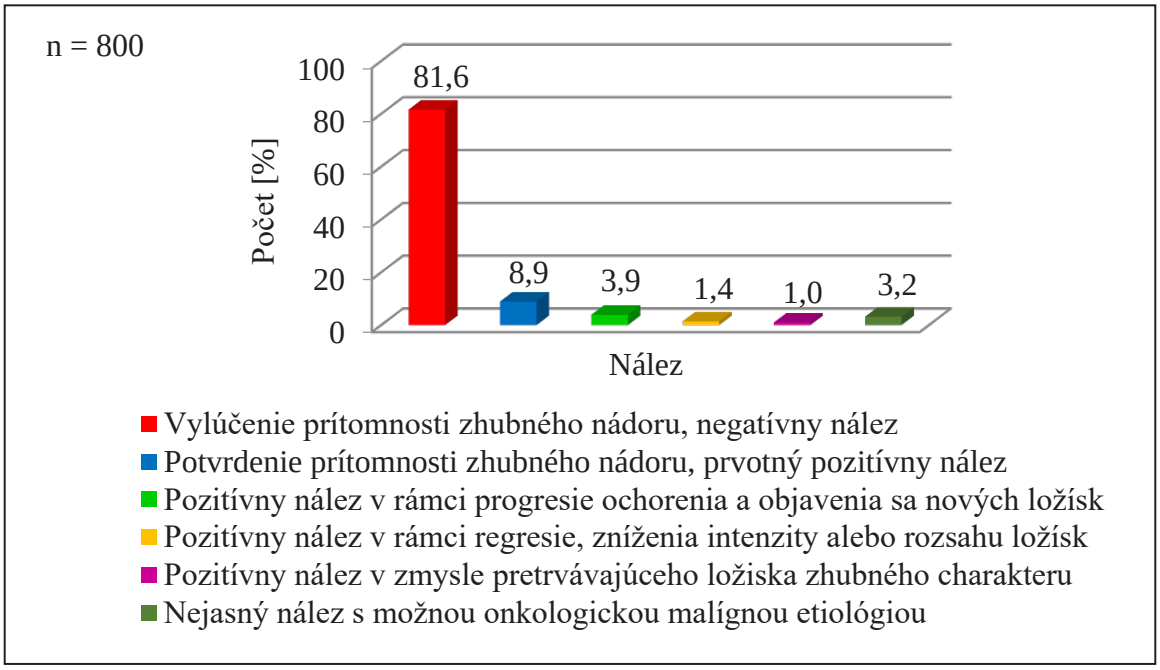
Z celkového počtu 1014 pozitívnych nálezov medzi najčastejšie pozorované nálezy pacientov patrili artrotické alebo osteoartrotické zmeny, ktorých prítomnosť bola potvrdená v 70,1 % (711). Nasledovala prítomnosť osteodegeneratívnych zmien v skelete predstavujúca 23,1 % (234). Do skupiny vedľajších nálezov predstavujúcich 2,1 % (21) patrili napr. dentálny fokus v mandibule, hydronefróza, menšia a nižšie uložená oblička alebo amyloidóza srdca. Pozitívne kostné nálezy zobrazuje graf 4.

4. Onkologické ochorenia

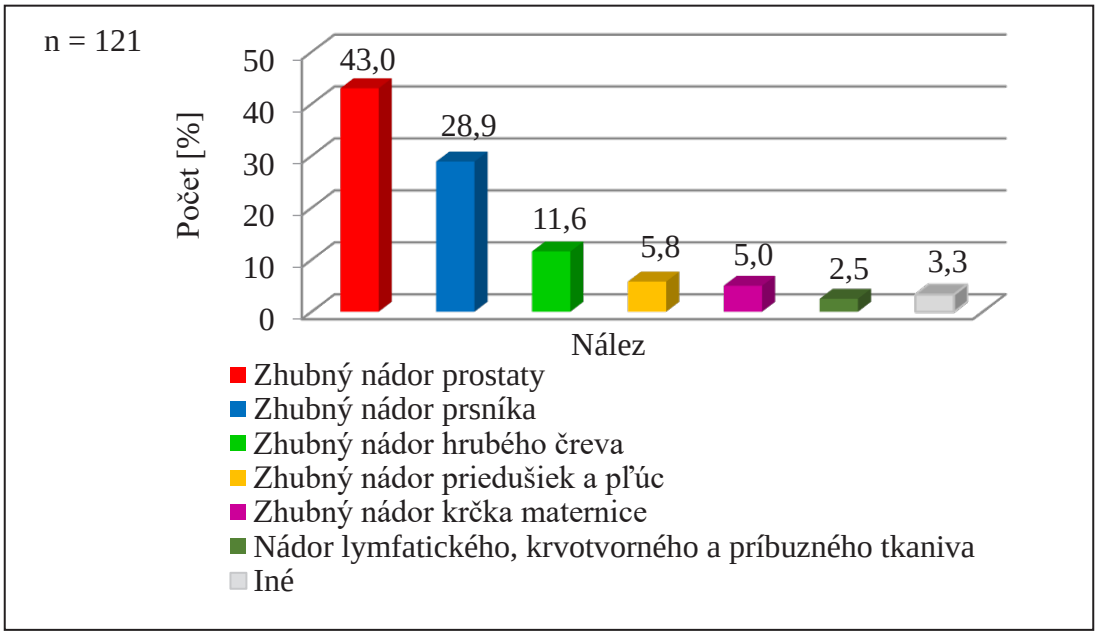
Vylúčenie prítomnosti kostného nádoru – metastázy, resp. negatívny nález sme pozorovali u 81,6 % (653) zo všetkých 800 onkologických pacientov, vrátane všetkých pacientov (19) s primárnym zhubným nádorom kostí a kĺbovej chrupavky. V rámci prvotného objavenia sa (u vyšetrení s cieľom detekcie metastáz, ale aj ako náhodný nález) sme metastázy pozorovali u 8,9 % (71) pacientov, v rámci progresie ochorenia u 3,9 % (31) a regresie ochorenia u 1,4 % (11) pacientov. Tieto údaje zobrazuje graf 5.

Zo 121 pacientov s pozitívnym nálezom kostných metastáz sme v 43,0 % (52) pozorovali metastázy pochádzajúce zo zhubného nádoru prostaty. Druhým najčastejšie metastázujúcim nádorom bol zhubný nádor prsníka predstavujúci 28,9 % (35). Primárne onkologické ochorenia sledovaných pacientov zobrazuje graf 6. Príklad scintigrafického obrazu pacienta so zhubným nádorom prostaty a kostnými metastázami zobrazuje obrázok 1.

Graf 5: Kostné metastázy u onkologických pacientov

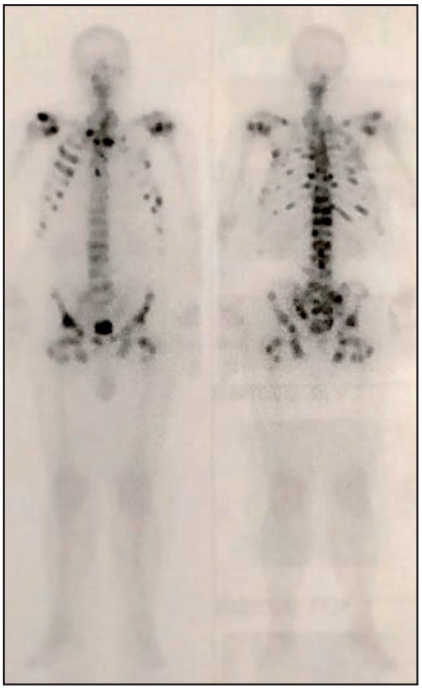


Graf 6: Primárne onkologické ochorenia

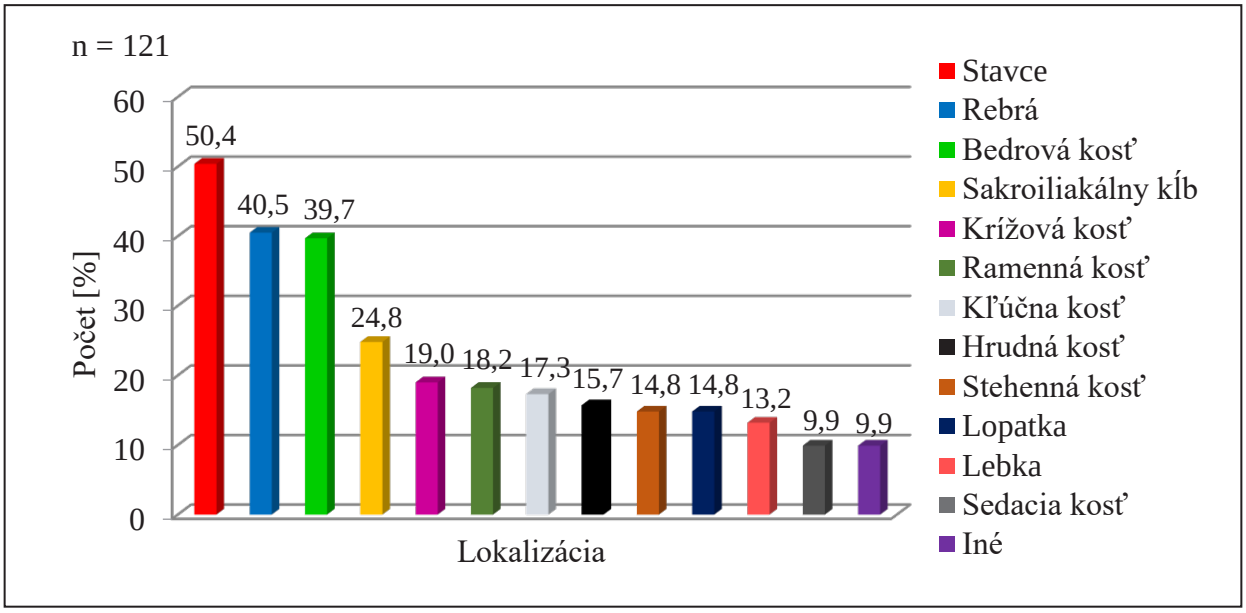


Zo 121 pacientov s pozitívnym nálezom metastáz sme metastázy najčastejšie pozorovali v stavcoch (50,4 %, 61); rebrách (40,5 %, 49) a bedrovej kosti (39,7 %, 48). K iným lokalitám (9,9 %, 12); v ktorých sa metastázy objavili, patrila holenná kosť alebo akromioklavikulárny kĺb spájajúci kľúčnu kosť a lopatku. Lokality, v ktorých sa kostné metastázy vyskytli zobrazuje graf 7.

Obr. 1: Scintigrafický obraz pacienta so zhubným nádorom prostaty, viacpočetné ložiská metastatického charakteru v oblasti panvy, stehennej kosti, stavcov, hrudnej kosti, lopatky, kľúčnej kosti, ramien



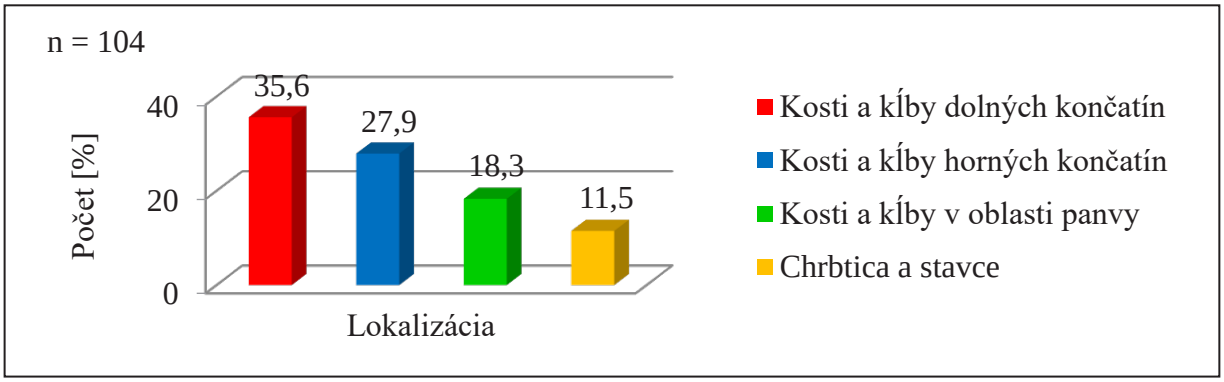
Graf 7: Lokalizácia kostných metastáz



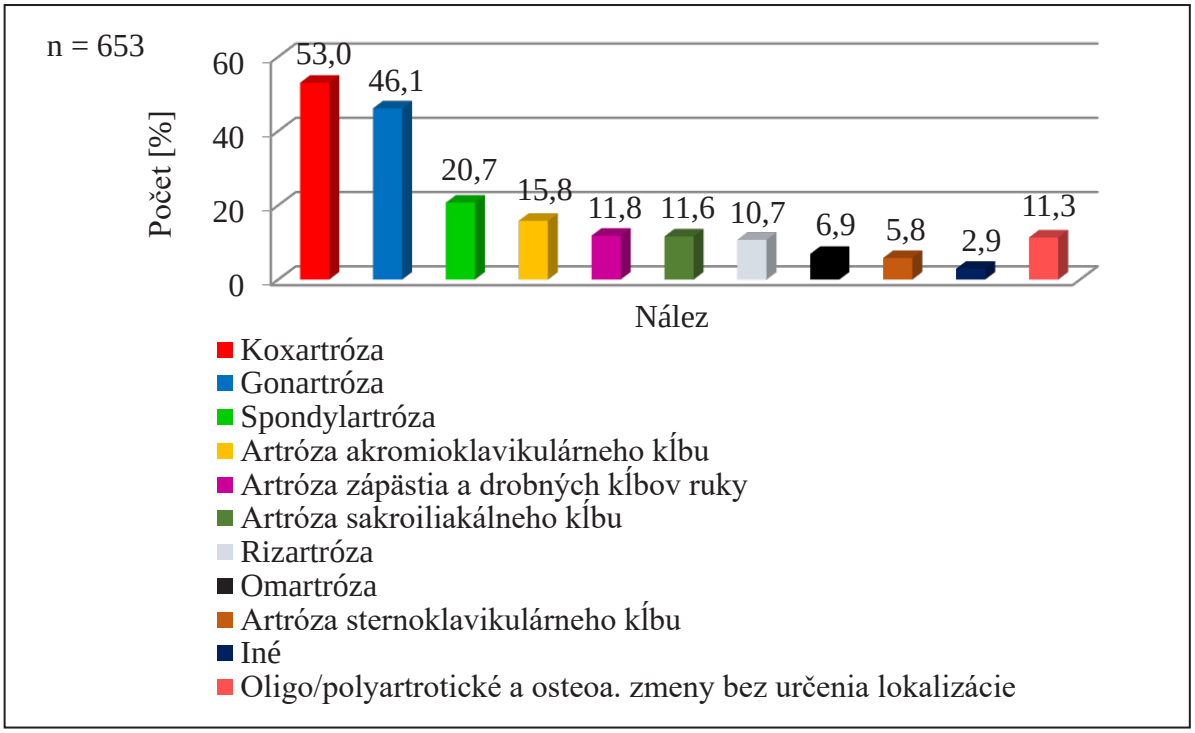
5. Zápalové ochorenia

Prítomnosť zápalových procesov bola pozorovaná u 104 pacientov, a to najčastejšie v kostiach a kĺboch dolných končatín v 35,6 % (37); a tiež kostí a kĺbov horných končatín v 27,9 % (29) prípadov. Tieto nálezy zobrazuje graf 8.

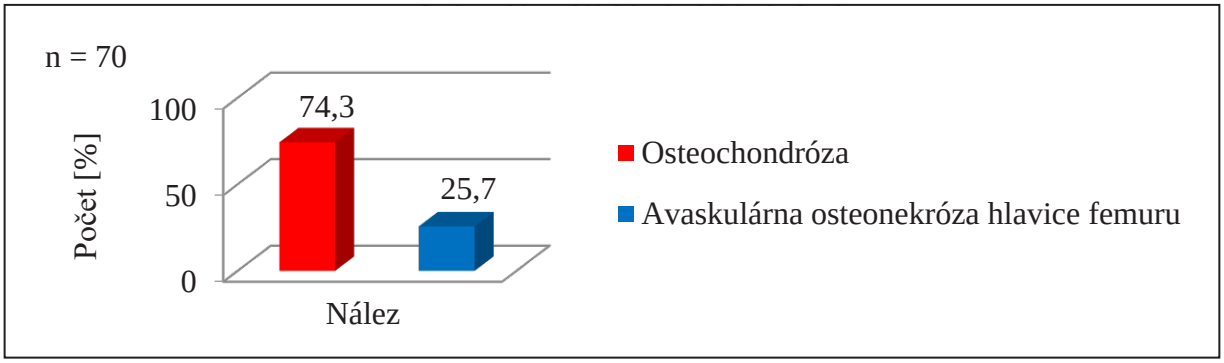
Graf 8: Lokalizácia zápalových nálezov



Graf 9: Lokalizácia artrotických a osteoartrotických zmien



Graf 10: Metabolické ochorenia



6. Ortopedické ochorenia

Artrotické a osteoartrotické zmeny boli pozorované u 653 pacientov. K najčastejšie sa vyskytujúcim typom artrotických zmien patrila v 53,0 % (346) prípadoch koxartróza a v 46,1 % (301) gonartróza. Z iných nálezov (2,9 %, 19) bola najčastejšie pozorovaná femoropatelárna artróza. Lokalizáciu a typy pozorovaných artrotických a osteoartrotických zmien zobrazuje graf 9.

7. Metabolické ochorenia

Metabolické kostné ochorenia boli pozorované v 70 prípadoch. Objavené boli dva typy metabolických ochorení znázornených v grafe 10. Prevažovala v 74,3 % (52) prípadoch osteochondróza; v 25,7 % (18) prípadoch bola u dospelých pacientov potvrdená avaskulárna osteonekróza hlavice femuru (stehennej kosti).

DISKUSIA

V roku 2022 bolo na sledovanom oddelení vykonaných 1284 scintigrafických vyšetrení skeletu. Toto vyšetrenie podstúpilo 52,6 % mužov a 47,4 % žien. Najväčšiu skupinu (46,3 %) tvorili pacienti vo vekovom rozmedzí 51 – 70 rokov. Vyššiu vekovú kategóriu pacientov bolo možné očakávať, a to kvôli skutočnosti, že vyšší vek pacientov rovnako predstavuje vyššiu pravdepodobnosť výskytu patologických kostných nálezov, pretože kosti sa vekom stávajú náchylnejšie na účinky rizikových faktorov a osteodegeneratívnych zmien (Loeser, 2010).

Pacienti boli na scintigrafické vyšetrenie skeletu najčastejšie odosielaní lekármi – špecialistami v odbore ortopédia (34,5 % prípadov) a v odbore onkológia alebo klinická onkológia (29,5 % prípadov). Nasledovali urológ/onkológ v urológii, neurológ, reumatológ, hematológ, ale aj chirurg a internista. Špecializácie indikujúcich lekárov súvisia aj s najčastejšie sa vyskytujúcimi indikáciami, pre ktoré boli pacienti na toto vyšetrenie odporúčaní. Najčastejšie sledovanou indikáciou u 62,3 % pacientov bolo podozrenie, skríning alebo monitorovanie primárnych alebo sekundárnych zhubných nádorov v onkológii. Nasledovala prítomnosť bolesti, tlaku, a iných neurologických príznakov, ktorá predstavovala 26,9 % prípadov.

Prvú časť hodnotení sme venovali pacientom s **onkologickou diagnózou**. Z celkového počtu 1014 pozitívnych kostných nálezov sme onkologické ochorenie zaznamenali v 21,6 % prípadoch (zhubné a nezhubné nádory, vrátane kostných metastáz). Ľudská kostra je po pľúcach a pečeni tretím najčastejším miestom zachytávajúcim metastatické bunky, a teda miestom s vysokou mierou výskytu metastáz (Jayarangaiah a kol., 2023). A práve prítomnosť týchto kostných metastáz v skelete bola počas nášho výskumu sledovaná u 15,2 % onkologických pacientov, neberúc do úvahy nejasný nález a negatívny nález. Najčastejšie bola prítomnosť kostných metastáz sledovaná v rámci prvotného objavenia sa, či už ako náhodný nález u pacientov bez pozitívnej onkologickej anamnézy alebo v rámci monitorovania pacientov s primárnym zhubným nádorom, a to v 8,9 % prípadov. V rámci progresie bol nález kostných metastáz potvrdený v 3,9 %; regresie ochorenia u 1,4 % pacientov, a v rámci pretrvávania prítomnosti kostných metastáz u 1,0 % pacientov. Až 43,0 % pacientom s pozitívnym nálezom kostných metastáz bol primárne diagnostikovaný zhubný nádor prostaty, druhú najväčšiu skupinu (28,9 %) tvorili pacienti s nádorom prsníka. Kostné metastázy sa objavili aj u pacientov s nádorom hrubého čreva (11,6 %); priedušiek a pľúc (5,8 %); krčka maternice (5,0 %) a lymfatického, krvotvorného alebo príbuzného tkaniva (2,5 %). Ako uvádzajú Ventura a kol. (2022), vzhľadom na vysokú prevalenciu karcinómov prsníka, prostaty a pľúc, predstavujú práve tieto tri typy viac ako 80 % všetkých prípadov metastatického ochorenia kostí a pravdepodobnosť výskytu kostných metastáz predstavuje pri rakovine prostaty 85 %, pri rakovine prsníka 70 %, rakovine pľúc a obličiek 40 % (Ventura a kol., 2022).

Na scintigrafických obrazoch onkologických pacientov sme zachytili kostné metastázy najčastejšie v stavcoch (50,4 %); rebrách (40,5 %); bedrovej kosti (39,7 %) a sakroiliakálnom kĺbe (24,8 %). Zostupne

pokračovali krížová, ramenná, kľúčna, hrudná a stehenná kosť, lopatka alebo lebka. Práve tieto miesta patria medzi lokality s najpravdepodobnejším výskytom metastáz. Prítomnosť kostných metastáz v chrbtici a stavcoch predstavuje až 70 % pravdepodobnosť, nasleduje oblasť panvy, rebrá a dlhé kosti (Challapalli a kol., 2020). Zaujímavým príkladom je aj štúdia vykonaná v roku 2019 (Prostate Cancer and Bone Metastases) zaoberajúca sa kostnými metastázami konkrétne u pacientov s najčastejšie sa vyskytujúcim zhubným ochorením prostaty. Táto štúdia potvrdzuje prítomnosť kostných metastáz v kostiach s výraznou prítomnosťou červenej kostnej drene – v oblasti rebier, panvy a chrbtice (Wong a kol., 2019).

Druhou sledovanou skupinou boli ochorenia **zápalového pôvodu**. Zápalové procesy boli pozorované v kostiach alebo kĺboch dolných končatín (35,6 %); konkrétne v oblasti stehna, kolena alebo členku, postihnutá bola aj patela (jabĺčko) alebo fibula (ihlica), v 27,9 % prípadov v oblasti horných končatín (zápästia a ramena), v panvovej oblasti bola pozorovaná koxitída alebo sakroilitída v 18,3 % a v oblasti chrbtice a stavcov v 11,5 % prípadov.

Ďalšiu skupinu predstavovali nálezy **ortopedického pôvodu**. Najčastejším pozorovaným pozitívnym kostným nálezom vôbec boli artrotické a osteoartrotické zmeny. Tie boli vyhodnotené u 70,1 % pacientov, pričom zaujímavé je, že až 71,5 % z týchto pozitívnych artrotických a osteoartrotickych prípadov bolo výsledkom náhodného nálezu. Medzi najčastejšie postihnuté kĺby patrili bedrový, resp. koxartróza (53,0 %) a kolenný kĺb, resp. gonartróza (46,1 %); spondylartróza (20,7 %); artróza akromioklavikulárneho kĺbu (15,8 %); nasledovali artrotické zmeny v zápästí a drobných kĺboch rúk, sakroiliakálneho kĺbu, rizartróza, omartróza a iné. Artróza je degeneratívnym ochorením, ktorého prítomnosť je podmienená aj vekom, u osôb nad 65 rokov je ním postihnutá viac ako polovica, a nad 75 rokov 80 % pacientov. Artróza je tiež výsledkom opotrebovania a nadmerného zaťažovania kĺbov, najmä váhonosných, kam patrí práve kĺb kolenný, bedrový, kĺby chrbtice, pravdepodobnosť výskytu je aj v oblasti drobných kĺbov rúk (Dungl a kol., 2014).

Poslednú sledovanú skupinu ochorení predstavovali kostné ochorenia **metabolického pôvodu**, ktoré boli vo všeobecnosti zaznamenané u 6,9 % pacientov s pozitívnym nálezom. V 74,3 % prípadov išlo o osteochondrózu, v 25,7 % prípadov sme mohli sledovať a potvrdiť prítomnosť avaskulárnej osteonekrózy hlavice stehennej kosti u dospelých pacientov.

Po zrátaní všetkých akýchkoľvek pozitívnych nálezov, ktoré boli výsledkom scintigrafického vyšetrenia skeletu, a ich rozdelení do 4 skupín kostných ochorení, môžeme vyhodnotiť, že onkologické pozitívne nálezy (zhubné aj nezhubné, primárne kostné nádory aj kostné metastázy) predstavovali 14,9 % prípadov, zápalové zmeny 4,4 %; ortopedické nálezy (vrátane deliberácie TEP, artrózy a osteoartrózy, fraktúr a infrakcií, ale aj iných osteodegeneratívnych zmien) 70,5 % a metabolické ochorenia 4,7 %. Ostatných 5,5 % diagnóz predstavovali iné nesledované kostné ochorenia (napr. skolióza) alebo vedľajšie extraoseálne nálezy (napr. nefyziologické uloženie obličky a iné).

Na základe týchto zistení sme dospeli k záveru, že medzi najčastejšie pozorované nálezy pri scintigrafickom vyšetrení skeletu patria artrotické a osteoartrotické zmeny, aj keď vo väčšine prípadov nie sú primárnou indikáciou na toto vyšetrenie. Dôležitú časť nálezov tvoria onkologické ochorenia, resp. prítomnosť kostných metastáz. Práve detekcia ich prítomnosti predstavuje najčastejšiu indikáciu na scintigrafické vyšetrenie, a vďaka zvyšujúcej sa tendencii pribúdania onkologických pacientov narastá aj záujem o toto vyšetrenie. Naopak, metabolické a akútne zápalové ochorenia sú vďaka nižšej prevalencii v porovnaní s degeneratívnymi a onkologickými menej časté, a rovnako lepšie a rýchlejšie vyliečiteľné.
Onkologickým, ale aj mnohým iným kostným ochoreniam, súvisiacim najmä s genetikou alebo vekom, nie je možné vždy predísť, aj keď relatívne vhodnou prevenciou je zdravý životný štýl a stravovanie, pohyb, v niektorých prípadoch to môže byť očkovanie. Kosť ako metabolicky aktívny a živý orgán si rovnako pýta dostatočné zásobenie výživy a stavebných

prvkov, ktoré je do istej miery možné v prípade ich fyziologickej nedostatočnosti získať okrem iného aj rôznymi potravinovými doplnkami či liekmi. V neposlednom rade je veľmi dôležité zachytenie včasných patologických zmien v metabolizme kostného tkaniva, teda včasných štádií kostných ochorení, k čomu prispievajú aj pravidelné preventívne prehliadky, ale čo je najdôležitejšie, hlavne správny diagnostický proces či vyšetrenie. A práve k tomuto včasnému a úspešnému diagnostickému procesu vo veľkej miere prispieva nukleárna medicína, a to svojimi významnými, vysoko citlivými, diagnostickými zobrazovacími metódami.

ZÁVER

V nukleárnej medicíne sú vlastnosti rádiofarmák predstavujúcich otvorené žiariče ionizujúceho žiarenia využívané na zobrazovanie a zistenie funkcií jednotlivých orgánov a tkanív. Osteotrópne rádiofarmaká poskytujú cenné informácie a umožňujú včasne diagnostikovať kostné ochorenia rôzneho pôvodu.

V štúdii sme retrospektívne hodnotili 1284 scintigrafických vyšetrení, pričom sme zaznamenali 79,0 % pozitivitu kostných nálezov alebo ochorení. Medzi najdôležitejšie kostné ochorenia, ktoré je možné diagnosticky potvrdiť pomocou scintigrafie kostí, patria ochorenia onkologické. Ide o primárne nádory a kostné metastázy, ktorých detekcia bola najčastejšie uvádzanou indikáciou na výkon scintigrafických vyšetrení skeletu, a to až v 62,3 % prípadov. Zo všetkých pozitívnych diagnóz a nálezov predstavovali všetky onkologické kostné nálezy 14,9 % prípadov, a medzi najčastejšie pozorované metastázujúce nádory patrili zhubný nádor prostaty (43,0 %) a prsníkov (29,8 %). V rámci onkológie má scintigrafia skeletu významnú úlohu nielen v počiatočnej diagnostike, ale aj stagingu a monitorovaní liečby pacientov s rakovinou a metastatickým ochorením.

Medzi najsledovanejšie kostné nálezy scintigrafických vyšetrení skeletu patrila prítomnosť rôznych osteodegeneratívnych ochorení, z ktorých má u pacientov obrovské zastúpenie artróza a osteoartróza. Tá bola týmto vyšetrením potvrdená u 70,1 % pacientov s pozitívnym kostným nálezom. Aj keď artrotické a osteoartrotické zmeny často primárne sledované nie sú, a ich nález bol až v 71,5 % náhodný, ich vysoký výskyt vyplýva najmä z vyššej vekovej štruktúry našich pacientov a skutočnosti, že ide o degeneratívne ochorenie, ale často aj z jeho nesymptomatického priebehu. Nie menej dôležité boli aj ochorenia metabolickej, zápalovej či traumatickej patofyziológie, ktoré sú rovnako pozorovateľné na scintigrafických obrazoch, ktorých výskyt je ale v porovnaní s inými nálezmi nižší.

Zistenia, ktoré sú výsledkom scintigrafického vyšetrenia skeletu môžu pomôcť lekárom včas odhaliť prítomnosť patologických stavov kostí, s cieľom predvídať výskyt symptómov a priaznivo zlepšiť prognózu ochorenia, a tým kvalitu života pacientov s kostným ochorením.

Dôležitú úlohu v celom tomto diagnostickom procese zohrávajú práve aj farmaceuti, ktorí sú neoddeliteľnou súčasťou oddelenia nukleárnej medicíny a sú zodpovední za celý proces prípravy rádiofarmák, od práce s generátorom, značenia kitov získaným rádionuklidom až po dávkovanie samotných rádiofarmák.

ZOZNAM LITERATÚRY

Dungl, P., Burian, M., Cinegr, P., Frydrychová, M., Gletner, D., Chomiak, J., Kofránek, I., Kolman, I., Kubeš, R., Lesenský, J., Majerníček, M., Matějíček, M., Matějovský, Z., Ošťádal, M., Podškubka, A., Tóth, L., Vaculík, J., Včelák, J., Bartoníček, J., Ehler, E., Chroustová, D., Štulík, J., Zvěřina, E., Žižkovská, K.: *Ortopedie* [Orthopedics]. 2. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2014. 1192 s.

Challapalli, A., Aziz, S., Khoo, V., Kumar, A., Olson, R., Ashford, R. U., Gabbar, O. A., Rai, B., Bahl, A.: Spine and non-spine bone metastases – current controversies and future directions. *Clinical Oncology*, 2020, 32 (11), 728 – 744. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0936655520302922>. Accessed April 4, 2023.

Jayarangaiah, A., Kemp, A. K., Theetha Kariyanna, P.: Bone Metastasis. *StatPearls*, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507911/>. Accessed April 8, 2023.

Loeser, R. F.: Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis. *Clinics in geriatric medicine*, 2010, 26 (3), 371 – 386. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2920876/>. Accessed March 28, 2023.

Montilla-Soler, J. L., Makanji, R.: Skeletal scintigraphy. *Cancer Control*, 2017, 24 (2), 137 – 146. <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/107327481702400206>. Accessed August 11, 2022.

ŠUKL. SPC. TechneScan HDP. ŠUKL Kód 66426. Registračné číslo 88/0503/96-S. Dátum revízie textu 08/2021. <https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=66426>. [cit. 2023-11-06].

Van den Wyngaert, T., Strobel, K., Kampen, W. U., Kuwert, T., van den Bruggen, W., Mohan, H. K., Gnanasegaran, G., Delgado-Bolton, R., Weber, W. A., Beheshti, M., Langsteger, W., Giammarile, F., Mottaghy, F. M., Paycha, F.: The EANM practice guidelines for bone scintigraphy. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 2016, 43 (9), 1723 – 1738. <https://www.eanm.org/publications/guidelines/EANM_Bone_Scintigraphy_GL_2016.pdf>. Accessed November 10, 2022.

Ventura, C., Núñez, S. V., Goncalves, A., Abreu, C., Costa, L.: Bone health in metastatic cancer. *Seminars in Oncology Nursing*, 2022, 38 (2). <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0749208122000316>. Accessed April 10, 2023.

VIVAMED. Scintigrafické vyšetrenie [Scintigrafhic examination], 2021. <https://www.vivamed.sk/pre-lekarov/#vysetrenia>. [cit. 2022-11-10].

Wong, S. K., Mohamad, N. V., Giaze, T. R., Chin, K. Y., Mohamed, N., Ima-Nirwana, S.: Prostate cancer and bone metastases: the underlying mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20 (10), 2587. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6567184/>. Accessed October 22, 2023.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 4: 17 – 27, 2023

VPLYV EPILEPSIE NA KVALITU ŽIVOTA

THE EFFECT OF EPILEPSY ON THE QUALITY OF LIFE

Bartošová, Martina; Marcinčáková, Dana

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

dana.marcincakova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Prítomnosť epilepsie u pacienta značne ovplyvňuje kvalitu života. Samotná liečba, resp. kontrola ochorenia zahŕňa množstvo postupov od správnej diagnostiky, vhodnej farmakoterapie pri špecifických typoch záchvatu až po samotnú compliance pacienta. Aj napriek tomu sa však stretávame so zlyhaním liečby z rôznych dôvodov.

V štúdii sú prezentované výsledky prieskumu zameraného na epileptikov Neurologickej ambulancie MUDr. Mareka Makaru v Michalovciach. Naše zistenia poukazujú na nižšiu kvalitu života potvrdenú respondentmi v prvom zbere dát zrealizovanom v januári až marci 2021. Toto obdobie je poznačené pandemickou situáciou, ktorá sa odzrkadlila aj v získaných údajoch.

Na určenie celkovej kvality života respondentov sme vyhodnotili sedem položiek: obavy zo záchvatu, kvalitu života, emócie, energiu, kognitívne funkcie, účinky liečby i sociálne funkcie. Porovnaním získaných priemerných skóre vo všetkých položkách sa potvrdila vyššia kvalita života v druhom zbere dát realizovanom v roku 2022. Najvyšší nárast priemerného skóre o 15,33 sme zaznamenali v oblasti obavy zo záchvatu. Najnižší nárast o 2,65 bol v oblasti sociálnych funkcií. V ostatných sledovaných položkách sa nárast kvality života pohyboval v rozmedzí od 5,7 do 9,97. Pri porovnaní kvality života z hľadiska pohlavia respondentov, vyššiu celkovú kvalitu života uviedli v prvom zbere dát ženy (39,18) a v druhom muži (47,03). Pri porovnaní údajov prvého a druhého zberu dát sme zaznamenali vyšší nárast kvality u mužov (8,1) ako u žien (6,05). Analýza dát z pohľadu veku poukázala na vyššie uvedené hodnoty respondentov vo veku od 40 do 50 rokov.

Kľúčové slová: epilepsia; kvalita života; QOLIE-31

ABSTRACT

The presence of epilepsy significantly affects the quality of patient life. The treatment itself or epilepsy control includes many procedures, starting from correct diagnosis, appropriate pharmacotherapy for specific seizure types, and patient compliance itself. Despite this, however, we encounter treatment failure for various reasons.

The practical part aimed to present the results of a survey focused on epileptics at the Neurological Outpatient Clinic of MUDr. Marek Makara in Michalovce. Our findings point to a lower quality of life confirmed by respondents in the first data collection carried out from January to March 2021. This period was marked by a pandemic situation. To determine the respondents' overall quality of life, we evaluated seven items: worry about the seizure, quality of life, emotions, energy, cognitive functions, effects of treatment, and social functions.

The comparison of the obtained average scores in all items confirmed a higher quality of life in the second data collection carried out in 2022. We recorded the highest increase in the average score by 15.33 in the area of fear of seizures. The lowest increase of 2.65 was in the area of social functions. The other monitored items, the increase in quality of life ranged from 5.7 to 9.97. Comparing the quality of life in terms of the gender of the respondents, a higher overall quality of life was reported by women (39.18) in the first data collection and by men (47.03) in the second. Comparing the first and second data collection, we noted a higher increase in quality in men (8.1) than in women (6.05). The analysis of data from the point of view of age pointed to the above-mentioned values of respondents aged between 40 and 50 years.

Key words: epilepsy; quality of life; QOLIE-31

ÚVOD

Epilepsia je považovaná za jedno z najčastejších neurologických ochorení detí i dospelých. Je sprevádzaná opakovanými a nekontrolovateľnými záchvatmi, ktoré sú výsledkom nadmerných elektrických výbojov nervových buniek v rôznych častiach mozgu. Odhaduje sa, že na svete je 60 miliónov ľudí s epilepsiou, z ktorých až 75 % žije v krajinách chudobných na ľudské zdroje, s obmedzeným alebo žiadnym prístupom k lekárskym službám, liekom, resp. liečbe (Magiorkinis a kol., 2010).

Samotní pacienti vnímajú epilepsiu nielen ako zdravotný, ale aj ako spoločenský problém. Nepochopenie, diskriminácia či spoločenská stigma sprevádzajú epileptikov po stáročia. Tento humanitný problém pretrváva v niektorých krajinách aj v dnešnej dobe a môže mať negatívny vplyv na kvalitu života pacientov a ich rodín.

Farmakologická terapia je základom liečby a kontroly nad epilepsiou. Podľa údajov Svetovej zdravotníckej organizácie až 70 % ľudí trpiacich epilepsiou sa môže zbaviť záchvatov, ak sú zvolené vhodné antiepileptiká (AE). Asi 20 – 30 % pacientov napriek tomu vykazuje farmakorezistenciu. V súčasnosti existuje rad pokročilých zákrokov a metód, ktoré umožňujú v indikovaných prípadoch úspešnú kontrolu nad epilepsiou. Zlyhanie antiepileptickej liečby sa môže vysvetliť aj nesprávnym terapeutickým plánom, genetickými faktormi – poruchy v transportných systémoch, prípadne nedostatočnou spoluprácou s pacientom.

Predkladaná štúdia je zameraná na zhodnotenie súčasných trendov v liečbe epilepsie, skúma vplyv ochorenia na kvalitu života pacientov a vyhodnocuje efektivitu liečby v klinickej praxi. Zároveň vyhodnocuje kvalitu života 40 pacientov s epilepsiou.

MATERIÁL A METÓDY

Všetky dáta boli získané od pacientov neurologickej ambulancie v Michalovciach. Nakoľko pacient s epilepsiou má zdravotné záznamy obsahujúce množ-

stvo informácií, pre účely štúdie sme sa zamerali hlavne na nasledujúce parametre: vek pacienta, pohlavie, diagnóza, užívanie antiepileptík, hodnotenie kvality života.

Zber dát prebiehal počas rokov 2021 a 2022. Do výberu boli zaradení iba dospelí pacienti v produktívnom veku, ktorí spĺňali nasledujúce kritériá:

– diagnóza epilepsie podľa kritérií Medzinárodnej ligy proti epilepsii
– trvanie choroby minimálne 1 rok.

Do zberu dát sme nezaradili pacientov, u ktorých sa potvrdila prítomnosť významnej komorbidity, nesúvisiacej s epilepsiou.

Pre hodnotenie kvality života pri epilepsii sme použili dotazník Kvalita života s epilepsiou (Quality of Life in Epilepsy) QOLIE-31. Ten obsahuje sedem viacpoložkových škál, ktoré vyhodnocujú emocionálnu pohodu, sociálne fungovanie, energiu/únavu, kognitívne funkcie, záchvatové obavy, účinky liekov a celkovú kvalitu života. Získané údaje sme štatisticky vyhodnocovali prostredníctvom jednoduchej metódy, ktorá je dostupná v rámci počítačového programu Microsoft Excel 2009. Celkové skóre QOLIE-31 sme získali pomocou váženého priemeru skóre na škále viacerých položiek. QOLIE-31 tiež obsahuje jednu položku, ktorá hodnotí celkový zdravotný stav.

QOLIE-31 tiež obsahuje celkovú škálu kvality života, ktorá pozostáva z jednej položky zo štúdie o preferenciách pacientov (Hadorn a Hays, 1991) a jednej položky Dartmouth COOP Chart (Nelson a kol., 1990). Jedna položka pre obavy zo záchvatov a jedna položka kognitívneho fungovania boli pôvodne vyvinuté pre inventár epileptickej chirurgie-55 (Vickrey, 1993).

Jediná položka týkajúca sa celkového zdravia bola upravená z existujúcej vizuálnej analógovej stupnice (Brazier a kol., 2014) a pridaná do QOLIE-31 po testovaní ďalších 30 položiek. T-skóre je získané prevodom celkového skóre pomocou kľúča, ktorý obsahuje skórovací manuál.

Pri spracovaní údajov sme zisťovali priemerné skóre jednotlivých posudzovaných škál a zároveň sme vyčíslili, aká je najvyššia a najnižšia hodnota dosiahnutého skóre u jednotlivých respondentov. Sčítali sme prepočítané skóre a pre každú mierku zaznamenali medzisúčet. Ten sme vydelili počtom položiek v stupnici. Súčet čiastkových stupníc sme vynásobili reverzným skóre, t. j. bodom núdze. Takýmto spôsobom sme získali hodnotu konečného skóre. Vypočítané výsledky sú spracované v tabuľkách jednotlivých položiek. T-skóre sme určili pomocou kľúča, ktorý je súčasťou skórovacieho manuálu.

VÝSLEDKY

Pri vyhodnocovaní kvality života sme použili skórovací manuál, ktorý nám spolu s povolením realizovať prieskum poskytla predstaviteľka Epilepsy Therapy Project Joyce Cramer. Lingvistická validita dotazníka bola zabezpečená poskytnutím slovenskej verzie. Celkovo sme vyhodnocovali 7 položiek, na základe ktorých sme získali podklady na sumárnu kvalitu života respondentov.

Obavy zo záchvatov

Sprievodným znakom epilepsie sú **epileptické záchvaty**. Každý pacient sa s touto skutočnosťou vyrovnáva odlišne. V položke na zisťovanie obáv zo záchvatov bolo zaradených 5 otázok. Spracované výsledky boli zaznamenané v tabuľke 1.

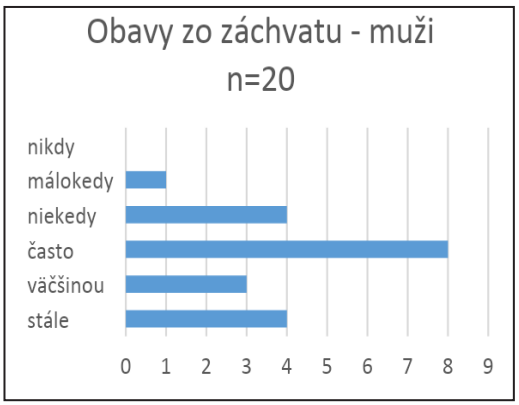
Dotazník bol distribuovaný prvýkrát v januári 2021 a druhýkrát v marci 2022. Do obidvoch zberov dát boli zapojení rovnakí respondenti. V skupine respondentov nebol ani jeden, ktorý by uviedol, že nemá žiadne obavy z ďalšieho záchvatu. V roku 2021 extrémne trápili záchvaty 7 žien starších ako 40 rokov (35 %). V roku 2022 uviedli extrémny strach zo záchvatu 2 ženy (10 %). U mužov sa prejavovali väčšie obavy zo záchvatov vo veku nad 50 rokov. Konkrétne hodnoty z roku 2022 týkajúcich sa miery znepokojenia z ďalšieho záchvatu sú znázornené v grafoch 1 a 2.

Pri vyhodnocovaní obáv zo záchvatu prejavili respondenti obavy zo zranení (5 mužov, t. j. 25 % a 11 žien, t. j 55 %), zahanbenia a ďalších sociálnych problémov, ktoré môžu nastať pri epileptických zá-

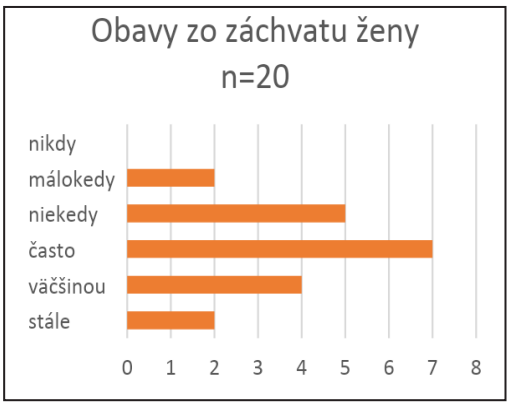
Tab. 1: QOLIE-31 Obavy zo záchvatu

Obavy zo záchvatu (n = 40)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
16,06	**24,18**	12,64	19,33	33,16	37,05
Obavy zo záchvatu (ženy, n = 20)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
14,61	29,52	12,64	19,33	30,72	33,36
Obavy zo záchvatu (muži, n = 20)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
17,52	32,85	22,64	29,28	33,16	37,05

Graf 1: Obavy zo záchvatu – muži



Graf 2: Obavy zo záchvatu – ženy



Tab. 2: QOLIE-31 Kvalita života

QOLIE-31 Skóre (n = 40)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
21,71	**31,48**	7,50	13,50	41,07	42,65
QOLIE-31 Skóre (ženy, n = 20)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
21,95	31,57	7,50	26,54	41,07	41,53
QOLIE-31 Skóre (muži, n = 20)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
20,57	30,54	7,50	13,50	28,93	42,65

Tab. 3: QOLIE-31 Energia

Energia (n = 40)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
28,75	**35,05**	10	20	50	50
Energia skóre (ženy, n = 20)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
28,50	33,75	15	20	40	50
Energia skóre (muži, n = 20)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
29,00	36,25	10	20	50	50

chvatoch (5 mužov, t. j. 25 % a 12 žien, t. j 60 %). Z hľadiska veku boli väčšie obavy u vekovo starších respondentov. T-skóre sa pohybovalo v rozmedzí od 32 do 43. Najvyššie hodnoty T-skóre mali žena vo veku 28 rokov (43) a muž vo veku 45,3 (42).

Kvalita života

Kvalitu života vyhodnocovali dve otázky, v ktorých respondenti vyjadrovali svoje subjektívne pocity. Pri porovnaní kvality života z pohľadu pohlavia bola v obidvoch rokoch zaznamenaná vyššia kvalita života u žien. V roku 2021 hodnotili najvyššie kvalitu života ženy vo veku od 40 do 50 rokov. Najnižšie hodnoty uviedla 67-ročná žena. U mužov boli najvyššie uvádzané hodnoty kvality života vo veku do 40 rokov. V roku 2022 uvádzali najnižšiu kvalitu života ženy vo veku nad 50 rokov a muži vo veku nad 60 rokov.

T-skóre kvality života sa pohybovalo v rozmedzí od 17 do 36. V roku 2022 bolo zaznamenané najvyššie aj najnižšie T-skóre u mužov vo veku 41,2 rokov (36) a 60,2 rokov (17). U žien boli hodnoty T-skóre od 28 do 36.

Emócie

Emocionálna stránka kvality života bola posudzovaná prostredníctvom piatich otázok, v ktorých respondenti vyjadrovali názor týkajúci sa emócií z uplynulých štyroch týždňov. Pri komparácii hodnôt z hľadiska pohlavia uvádzali vyššiu kvalitu života v oblasti emócií v obidvoch rokoch muži. V roku 2021 sa 11 žien, t. j. 55 % cítilo väčšinou nervózne; 5 žien, t. j. 25 % sa stále cítilo skleslo a deprimovane. Ani jeden respondent u žien ani mužov neuviedol, že je stále pokojný a vyrovnaný.

Energia

Na získanie informácií v súvislosti s kvalitou života a **energiou** boli zamerané štyri otázky. Priemerné skóre všetkých respondentov sa v roku 2021 pohybovalo v rozmedzí od 10 do 50 a v roku 2022 od 20 do 50. Menší rozptyl hodnôt sme zaznamenali v prvom zbere dát u žien. Ich hodnoty sa pohybovali v rozmedzí od 15 do 40. U mužov sme zaznamenali v obidvoch zberoch dát nemenné najvyššie skóre. To malo hodnotu 50. Konkrétne údaje jednotlivých skóre sú zaznamenané v tabuľke 3.

Najviac zastúpenou odpoveďou na otázku, či mali respondenti v posledných štyroch týždňoch dostatok energie bola u 7 žien, t. j. 35 %, že iba málokedy. Dvaja muži, t. j. 10 % uviedli, že mali často dostatok energie. V prvom zbere dát v roku 2021 sme zaznamenali u dvoch žien, t. j. 10 % a troch mužov, t. j. 15 %, že sa stále cítia unavení. V druhom zbere dát sme

Tab. 4: QOLIE-31 Kognitívne funkcie

Kognitívne funkcie (n = 40)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
37,93	**41,75**	10	26	55	55
Kognitívne funkcie Skóre (ženy, n = 20)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
38,71	40,65	25	32	46,95	50
Kognitívne funkcie Skóre (muži, n = 20)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
37,15	42,85	10	26	55	55

Tab. 5: QOLIE-31 Účinky liečby

Účinky liečby (n = 40)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
44,90	**54,20**	8	28	81	81
Účinky liečby Skóre (ženy, n = 20)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
47,50	56,80	28	44	81	81
Účinky liečby Skóre (muži, n = 20)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
42,50	51,40	8	28	81	81

takúto odpoveď zaznamenali iba u jedného muža vo veku nad 60 rokov, t. j. 5 %. Často unavenými bolo v prvom zbere dát osem žien, t. j. 40 % a šesť mužov, t. j. 30 %. V druhom zbere dát takúto odpoveď uviedlo šesť žien, t. j. 30 % vo veku nad 50 rokov a dvaja muži, t. j. 10 % tiež vo veku nad 50 rokov. Hodnoty T-skóre sa u mužov pohybovali v rozmedzí od 29 do 47 a žien od 31 do 47.

Kognitívne funkcie

Kognitívne funkcie a ich vplyv na kvalitu života sme overovali prostredníctvom šiestich otázok. V tab. 4 sú zaznamenané hodnoty jednotlivých skóre zo zberu dát v roku 2021 a 2022.

Priemerné skóre všetkých respondentov sa pohybovalo v prvom zbere dát v rozmedzí od 10 do 55 a v druhom zbere dát od 26 do 55. Otázky v kognitívnej oblasti boli zamerané na ťažkosti so sústredením, pamäťou či riešením problémov. Z celkového počtu 40 respondentov uviedlo päť žien, t. j. 25 % a štyria muži, t. j. 20 %, že majú ťažkosti s rozmýšľaním a riešením problémov. V druhom zbere dát bol za-

Tab. 6: QOLIE-31 Sociálne funkcie

Sociálne funkcie (n = 40)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
36,10	**37,42**	9	24	57	50
Sociálne funkcie Skóre (ženy, n = 20)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
36,15	36,15	23	24	52	49
Sociálne funkcie Skóre (muži, n = 20)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
36,05	38,70	9	24	57	50

chovaný rovnaký počet zaznamenaných odpovedí k danej problematike. Dve ženy, t. j. 10 % uviedlo v prvom zbere dát ťažkosti s pamäťou do veľkej miery. V druhom zbere takéto ťažkosti uviedla iba jedna žena, t. j. 5 % , vo veku 51,2. Ťažkosti so sústredením sa vo veľkej miere nevyznačovali ani u jedného respondenta ani v jednom zbere dát. Zaregistrovali sme odpovede s častými ťažkosťami na sústredenie sa na vykonávanie jednej veci v prvom zbere dát u piatich žien, t. j. 25 % a šiestich mužov, t. j. 30 %. V druhom zbere dát sme takéto tvrdenie zaznamenali u štyroch mužov i žien. V obidvoch zberoch to boli respondenti nad 40 rokov. Ťažkosti s pamäťou extrémne trápia sedem žien, t. j. 35 % a päť mužov, t. j. 25 %. Najmladší respondent, ktorý uviedol extrémne problémy s pamäťou, bola žena vo veku 30,6 rokov. Ťažkosti s pamäťou vôbec netrápia jednu ženu, t. j. 5 % a dvoch mužov, t. j. 10 %. Hodnoty T-skóre sa pohybovali v rozmedzí od 29 do 46.

Vplyv účinkov liečby

Vplyv **účinkov liečby** na kvalitu života sme overovali prostredníctvom troch otázok. Dosiahnuté priemerné skóre jednotlivých zberov dát je zaznamenané v tabuľke 5.

Priemerné skóre sa v roku 2021 pohybovalo v rozmedzí od 8 do 81. V obidvoch zberoch dát sme zaznamenali menší rozptyl u žien. Z hľadiska pohlavia sme zaznamenali v obidvoch zberoch dát rovnaké najvyššie skóre. Jedna žena, t. j. 5 % vo veku nad 60 rokov uvádza veľké obavy zo škodlivosti liekov z dlhodobého hľadiska. Rovnaké stanovisko majú dvaja muži, t. j. 10 %. Boli to muži vo veku 51,4 a 66 rokov. Telesné účinky antiepileptík v prvom zbere dát extrémne trápili 5 žien, t. j. 25 % a dvoch mužov, t. j. 10 %. V druhom zbere dát telesné účinky antiepileptík extrémne trápili dve ženy, t. j. 10 % a nezmenený počet mužov. Ani u jedného respondenta nebolo zaznamenané v žiadnom zbere dát, že by ho vôbec netrápili duševné ani telesné účinky antiepileptík. Hodnoty T--skóre sa pohybovali od 34 do 58.

Vplyv sociálnych funkcií

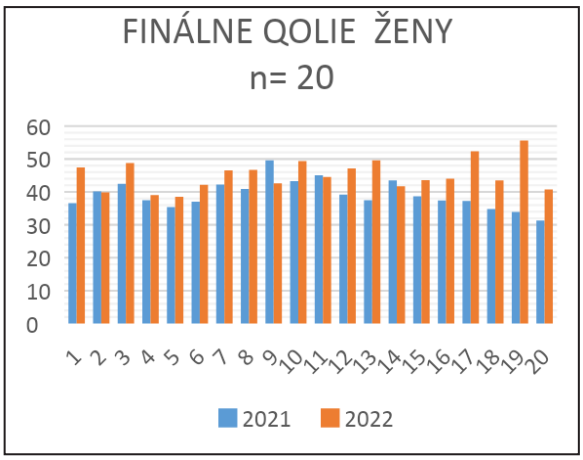
Vplyv **sociálnych funkcií** na kvalitu života sme overovali prostredníctvom piatich otázok. Dosiahnuté priemerné skóre jednotlivých zberov dát je zaznamenané v tabuľke 6. Najväčší rozptyl bol zaznamenaný u mužov v prvom zbere dát. Údaje sa pohybovali v rozmedzí od 9 do 57. U žien bolo zaznamenané rovnaké priemerné skóre v obidvoch zberoch dát a malo hodnotu 36,15. U mužov bol v druhom zbere dát zaznamenaný pokles hodnoty najvyššieho skóre z 57 na 50.

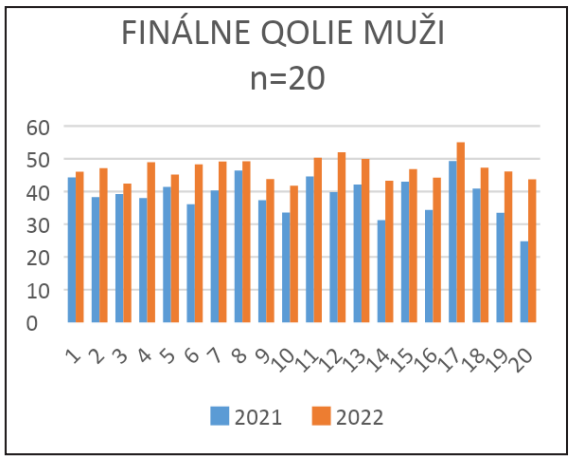
Celkovo šesť žien, t. j. 30 % a dvaja muži, t. j. 10 %

Tab. 7: FINÁLNE QOLIE-31

FINÁLNE QOLIE-31 Skóre (n = 40)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
39,05	**46,10**	24,76	38,50	49,60	55,58
FINÁLNE QOLIE-31 Skóre (ženy, n = 20)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
39,18	45,18	31,29	38,50	49,60	55,58
FINÁLNE QOLIE-31 Skóre (muži, n = 20)					
Priemerné skóre		Najnižšie skóre		Najvyššie skóre	
r. 2021	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**	**r. 2021**	**r. 2022**
38,93	47,04	24,76	41,79	49,29	55,07

Graf 3: Finálne QOLIE





uviedli, že ich zdravie väčšinou obmedzovalo účasť na spoločenských akciách. Veľké ťažkosti pri trávení voľného času a koníčkoch uviedlo celkovo päť respondentov, t. j. 12,5 %; z nich boli dve ženy a traja muži. Z hľadiska pohlavia uviedli šiesti muži, t. j. 30 % a päť žien, t. j. 25 %, že im v uplynulej dobe štyroch týždňov zapríčinila epilepsia alebo používanie antiepileptík vo veľkej miere ťažkosti pri šoférovaní. V prvom zbere dát sme nezaznamenali ani u jedného respondenta, že ho vôbec netrápia obmedzenia v práci. V druhom zbere dát sme takéto obavy zaznamenali u jednej ženy, t. j. 5 % vo veku 40,6 rokov. Hodnoty T-skóre sa pohybovali v rozmedzí od 28 do 46.

Celková kvalita života

Celkovú kvalitu života sme vyhodnocovali na základe výsledkov spracovaných v predchádzajúcich položkách. Priemerné skóre jednotlivých zberov dát je zaznamenaná v tabuľke 7.

U obidvoch pohlaví sme v druhom zbere dát zaznamenali nárast priemerného skóre kvality života. Výsledky sú znázornené v grafe 3.

T-skóre sa pohybovalo v rozmedzí od 26 do 46. Väčší nárast celkovej kvality života sme zaznamenali

u mužov. Najvyššiu hodnotu T-skóre sme zaregistrovali u ženy vo veku 45,3 rokov (46). Najnižšia hodnota T-skóre, a teda aj respondentom vyjadrená kvalita života bola u muža vo veku 51,4 rokov (26).

DISKUSIA

Epilepsia postihuje 0,5 – 1 % populácie. S touto diagnózou žije vo svete viac ako 65 miliónov ľudí, pričom okolo 60 tisíc z nich evidujeme na území Slovenskej republiky. Dôkazom toho, že epilepsii je potrebné venovať našu pozornosť je fakt, že 26. marec je vyhlásený Svetovým dňom epilepsie.

Epilepsia je ochorenie, ktoré spôsobuje zhoršenie kvality života i obmedzenie bežných činností pacienta. Kvalita života nezávisí len od veku a zdravotného stavu človeka, ale aj od jeho emocionálneho stavu a kognitívneho ako aj sociálneho fungovania (Brown a kol., 2004).

V štúdii sme sa zamerali na zisťovanie kvality života práve pacientov, ktorým toto ochorenie spôsobuje ťažkosti vo viacerých sférach života. Výber respondentov nebol náhodný, ale zámerný. Našimi respondentmi boli pacienti neurologickej ambulancie MUDr. M. Makaru. Rozhodujúcimi kritériami boli vek pacientov nad 18 rokov, prítomnosť choroby viac ako jeden rok a zároveň absencia iných chorôb, ktoré by mohli ovplyvniť kvalitu života.

Zber dát sme realizovali dvakrát s časovým odstupom jeden rok. Prvý zber dát prebiehal v období od januára do marca 2021. Druhý zber dát prebiehal v mesiacoch máj, jún a júl 2022. V obidvoch zberoch boli dáta rovnakých respondentov.

Jedným z faktorov ovplyvňujúcim kvalitu života sú obavy zo záchvatu. Tie na základe získaných údajov znížili kvalitu života vo väčšej miere v prvom zbere dát. Z hľadiska pohlavia vykazovali ženy nižšiu kvalitu života v obidvoch zberoch dát. Španielsko patrí k jedným z najviac postihnutých krajín pandémiou. Z toho hľadiska bola vykonaná štúdia 255 pacientov vo veku 48,2 ± 19,9 rokov. Zvýšenie frekvencie záchvatov bolo zaznamenané u 25 pacientov, t. j. 9,8 %. Regresná analýza preukázala, že liekovo rezistentná epilepsia, nespavosť, strach z epilepsie i zníženie príjmu boli spojené s vyšším rizikom frekvencie záchvatov. U piatich pacientov bol diagnostikovaný COVID-19, pričom frekvencia záchvatov sa nezmenila (Fonseca a kol., 2020).

Počas pandémie sa ukázalo, že ľudia s už existujúcimi zdravotnými problémami, vrátane ľudí s epilepsiou, boli vystavení väčšiemu riziku závažnejších následkov COVID-19. V štúdii v Kórejskej republike, kde viac ako 200 000 dospelých vo veku od 20 rokov podstúpilo testovanie PCR SARS-CoV-2, Yoo a kol. (2020) zistili, že ľudia s epilepsiou nemajú vyššie riziko získania infekcie, avšak u jedincov, u ktorých sa vyvinula infekcia COVID-19, bolo vyššie riziko závažných komplikácií vrátane prijatia na jednotku intenzívnej starostlivosti, mechanickej ventilácie a smrti, čo sa preukázalo vo výsledku prieskumu 18,06 % oproti 9,72 % bez prítomnosti epilepsie.

U pacientov s epilepsiou viedla pandémia k odkladu ambulantných návštev, zrušeniu testov súvisiacich s epilepsiou ako elektroencefalogramy a štúdie zobrazovania magnetickou rezonanciou (MRI), dokonca aj k ťažkostiam pri pohotovostných situáciách v dôsledku saturácie zdravotníckych služieb. V tomto kontexte prechádzajú komunikačné technológie revolúciou, pričom telemedicína je vznikajúcou alternatívou na uľahčenie lekárskej starostlivosti u chronických pacientov.

Aby sa zabránilo šíreniu ochorenia COVID-19, aj Slovenská republika prijala opatrenia, ako je sociálne dištancovanie a obmedzenia vo vykonávaní určitých aktivít. Aj to bolo príčinou stresu ľudí z toho, že musia dodržiavať sociálny odstup a nemôžu sa venovať všetkým aktivitám ako doposiaľ. Predpokladá sa, že aj uvedené skutočnosti vo veľkej miere vplývali na vznik depresie, narušenie životného štýlu a taktiež mohli ovplyvniť frekvenciu záchvatov.

ZÁVER

Ľudia s epilepsiou čelia množstvu problémov, od života so záchvatmi a komorbiditami až po riešenie vedľajších účinkov liečby a zvýšenej šance na skorú

smrť. Stretávajú sa so zdravotným systémom, ktorý dôsledne neposkytuje dostupnú, vysoko kvalitnú a hodnotnú starostlivosť a ich starostlivosť je nedostatočne koordinovaná.

Z výsledkov našich zistení vyplýva, že nárast priemerného skóre vo všetkých položkách potvrdil vyššiu kvalitu života v druhom zbere dát realizovanom v roku 2022. Najvyšší nárast priemerného skóre o 15,33 sme zaznamenali v oblasti obavy zo záchvatu. Najnižší nárast o 2,65 bol v oblasti sociálnych funkcií. V ostatných sledovaných položkách sa nárast kvality života pohyboval v rozmedzí od 5,7 do 9,97. Pri porovnaní kvality života z hľadiska pohlavia, vyššiu celkovú kvalitu života uviedli v prvom zbere dát ženy (39,18) a v druhom muži (47,03). Pri porovnaní údajov prvého a druhého zberu dát sme zaznamenali vyšší nárast kvality u mužov (8,1) ako u žien (6,05). Analýza dát z pohľadu veku poukázala na vyššie uvádzané hodnoty respondentov vo veku od 40 do 50 rokov.

Na zabezpečenie vyššej kvality života epileptikov je potrebná komplexná starostlivosť, zahrňujúca starostlivosť ako o fyzické, tak aj duševné zdravie. Zdravotníci, ktorí sa starajú o ľudí s epilepsiou, potrebujú vedieť o epilepsii, jej diagnostike, liečbe a manažmente, ako aj o sprievodných ochoreniach a riziku predčasného úmrtia, aby mohli poskytovať vysokokvalitnú starostlivosť.

Posolstvom COVID-19 by mala byť rekonfigurácia služieb, ktorá bude pretrvávať aj naďalej, prinesie zlepšenie efektívnosti, pohodlia a kvality života pacientov trpiacich nie len epilepsiou. V čase nepochybne zvýšenej úzkosti, kvôli obavám z dodávok liekov či izolácie je dôležité, aby pacienti cítili podporu nielen zo strany rodiny, zdravotníkov, ale aj širokej verejnosti.

ZOZNAM LITERATÚRY

Ahrens, S. M., Ostendorf, A. P., Lado, F. A., Arnold, S. T., Bai, S., Bensalem-Owen, M. K., Chapman, K. E., Clarke, D. V., Eisner, M., Fountain, N. B., Gray, J. M., Gunduz, M. T., Hopp, J. L., Riker, E., Schuele, S. U., Small, B., Herman, S. T.: Impact of the COVID-19 epidemic on epilepsy center practice in the United States. *Neurology*, 2022, 98 (19), 1893 – 1901.

Alkhotani, A., Siddiqui, M. I., Almuntashri, F., Baothman, R.: The effect of COVID-19 pandemic on seizure control and self-reported stress on patient with epilepsy. *Epilepsy Behav.*, 2020,112, 107 323. Doi:10.1016/j.yebeh.2020.107323.

Andraus, M.: COVID-19, Epilepsy COV--E Study Group. Impact of the COVID-19 pandemic on people with epilepsy: Findings from the Brazilian arm of the COV-E study. *Epilepsy Behav.*, 2021, 123, 108 261. Doi: 10.1016/j.yebeh.2021.108261.

Bastuğ Gül, Z.: The impact of the coronavirus disease 2019 outbreak on the quality of life of patients with epilepsy. *Epilepsi*, 2021, 27, 78 – 84.

Brazier, J., Connell, J., Papaioannou, D., Mukuria, C., Mulhern, B., Peasgood, T., Lloyd Jones, M., Paisley, S., O'Cathain, A., Barkham, M., Knapp, M., Byford, S., Gilbody, S., Parry, G.: A systematic review, psychometric analysis and qualitative assessment of generic preference-based measures of health in mental health populations and the estimation of mapping functions from widely used specific measures. *Health Technology Assessment*, 2014, 18 (34), 1 – 188. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24857402/>. Accessed December 19, 2021.

Brown, J.: Models of quality of life: a taxonomy, overview and systematic review of the literature. *European Forum on Population Ageing Research*, 2004, 113 p. <https://eprints.kingston.ac.uk/id/eprint/17177/>. Accessed December 19, 2021.

Cramer, J. A.: Principles of health-related quality of life: assessment in clinical trials. *Epilepsia*, 2002, 43 (9), 1084 – 95. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12199735/>. Accessed December 19, 2021.

Fonseca, E., Quintana, M., Lallana, S., Restrepo, J. L., Abraira, L., Santamarina, E., Seijo-Raposo, I., Toledo, M.: Epilepsy in time of COVID-19: A survey-based study. *Acta Neurol. Scand.*, 2020, 142 (6), 545 – 554.

Hadorn, D. C., Hays, R. D.: Multitrait-multimethod analysis of health-related quality-of-life

measures. *Medical Care*, 1991, 829 – 840.

Haraldstad, K., Wahl, A., Andenæs, R., Andersen, J. R., Andersen, M. H., Beisland, E., Borge, C. R., Engebretsen, E., Eisemann, M., Halvorsrud, L., Hanssen, T. A., Haugstvedt, A., Haugland, T., Johansen, V. A., Larsen, M. H., Løvereide, L., Løyland, B., Kvarme, L. G., Moons, P., Norekvål, T. M., Ribu, L., Rohde, G. E., Urstad, K. H., Helseth, S., LIVSFORSK network: A systematic review of quality of life research in medicine and health sciences. *Quality of life Research*, 2019, 28 (10), 2641 – 2650.

Magiorkinis, E., Sidiropoulou, K., Diamantis, A.: Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. *Epilepsy and Behavior*, 2010, 17 (1), 103 – 108.

Veenhoven, R.: The four qualities of life. *Journal of Happiness Studies*, 2000, 1 (1), 139.

Vickrey, B. G.: Procedure for developing a quality-of-life measure for epilepsy surgery patients. *Epilepsia*, 1993, 34, 22 – 27.

WHOQOL group: The World Health Organization Quality of Life assessment (WHOQOL): development and general psychometric properties. *Soc. Sci. Med.*, 2000, 46, 1569 – 1585.

Yoo, J., Kim, J. H., Jeon, J., Kim, J., Song, T.-J.: Risk of COVID-19 infection and severe complications among people with epilepsy: a nationwide cohort study. *Neurology*, 2022, 98 (19), 1886 – 1892.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 4: 28 – 40, 2023

ANALÝZA EXPEDÍCIE AGONISTOV GLP-1 RECEPTOROV PRI LIEČBE *DIABETES MELLITUS* 2. TYPU

ANALYSIS OF EXPEDITION OF GLP-1 RECEPTOR AGONISTS IN THE TREATMENT OF TYPE 2 *DIABETES MELLITUS*

Szabóová, Renáta[1]; Galajda, Richard[1]; Dravecká, Ingrid[2], Kubiková, Laura[1]

[1]Katedra biológie a fyziológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach Komenského 73, 041 81 Košice
[2] I. interná klinika, Lekárska fakulta
Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Trieda SNP 1, 040 11 Košice
Slovenská republika

renata.szaboova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Agonisty GLP-1 receptorov – GLP-1 RA patria medzi inkretínové mimetiká, ktoré v súčasnosti zaujímajú v terapii *diabetes mellitus* 2. typu popredné miesto. Cieľom tejto štúdie bolo sledovať a analyzovať aktuálne trendy v preskripcii a expedícii jednotlivých druhov GLP-1 RA na klinickom trhu, a to v troch slovenských a troch českých verejných lekárňach počas obdobia dvoch rokov. Výsledky štúdie naznačujú postupnú implementáciu spomínaných inkretínových mimetík v rámci ich uplatnenia ako aktuálnych terapeutík v klinickej praxi. V Slovenskej aj v Českej republike je v súčasnom období 72 registrovaných liekov s obsahom GLP-1 RA, akými sú exenatid, lixisenatid, liraglutid, dulaglutid a semaglutid. Z celkového počtu expedovaných liekov 70,85 % predstavovali lieky s obsahom GLP-1 RA v Českej republike a 29,15 % v Slovenskej republike za sledované obdobie. Z celkového množstva 2041 expedovaných liekov vo všetkých šiestich sledovaných lekárňach mali najväčšie zastúpenie lieky s obsahom liraglutidu – expedovaných bolo celkovo 795 ks, s obsahom dulaglutidu 634 ks, semaglutidu 592 ks a lixisenatidu v počte 20 expedovaných liekov. Perorálne podávaný semaglutid je prvým perorálnym GLP-1 RA, ktorý má reálny potenciál klinického využitia. Perorálna aplikačná cesta GLP-1 RA tak môže predstavovať budúcnosť tejto liečby a značne napomôcť širšiemu uplatneniu terapeutických odporúčaní v liečbe *diabetes mellitus*.

Kľúčové slová: agonisty GLP-1 receptorov; *diabetes mellitus*; expedícia; preskripcia

ABSTRACT

GLP-1 receptor agonists – GLP-1 RA belong to incretin mimetics and are currently of interest leading place in *diabetes mellitus* 2 therapy. The aim of this study was to monitor and analyze current trends in the prescription and expedition of individual types of GLP-1 receptor agonists on the clinical market, in three Slovak and three Czech public pharmacies over a period of two years. The results of the study indicate the gradual implementation of the mentioned incretin mimetics application as current therapeutics in clinical practice. Nowadays we recognize 72 registered medicines containing GLP-1 RA in Slovakia and in the Czech Republic, such as exenatide, lixisenatide, liraglutide, dulaglutide and semaglutide. In total, 70.85 % of medicines containing GLP-1 RA were shipped in the Czech Republic and 29.15 % in the Slovak Republic during the monitored period. Out of the total number of 2041 shipped medicines in all six monitored pharmacies, medicines containing liraglutide were the most represented – a total of 795 were dispatched, dulaglutide with the shipment of 634 pieces, semaglutide with 592 and lixisenatide with 20 pieces of medicine. However, orally administered semaglutide is the first oral GLP-1 RA that has real potential for clinical use. The oral application way of GLP-1 RA can represent the future of therapeutic recommendations in the *diabetes mellitus* treatment.

Key words: *diabetes mellitus*; expedition; GLP-1 receptor agonists; prescription

ÚVOD

Diabetes mellitus (*DM*) je metabolické ochorenie charakterizované neschopnosťou organizmu utilizovať glukózu a udržiavať jej hladinu v krvi v intervale referenčných hodnôt v dôsledku absolútneho alebo relatívneho nedostatku inzulínu. Základným prejavom *DM* je chronická hyperglykémia (Marek a Vrablík, 2019); pričom dochádza k nedostatočnému vychytávaniu glukózy tkanivami, výsledkom čoho môžu byť závažné zdravotné komplikácie (Mirossay a Mojžiš, 2021).

Diabetes mellitus (*DM*) je rapídne sa vyvíjajúce metabolické ochorenie v rámci jeho výskytu a dynamiky. V roku 2021 bolo na *DM* postihnutých viac ako pol miliardy ľudí na svete, pričom sa odhaduje, že do roku 2030 sa počet pacientov zvýši na 643 miliónov (Vohnout a Lisičanová, 2022). Pacienti s *DM* majú významne vyššie riziko úmrtia z kardiovaskulárnych

Tab. 1: Klasifikácia *DM* a hraničných porúch glukózovej homeostázy

Diabetes mellitus	**Používaná skratka**
1. Diabetes mellitus 1. typu	DM 1T, vrátane klinického priebehu LADA
a) imunitne podmienený	
b) idiopatický	
2. Diabetes mellitus 2. typu	*DM* 2T
3. Gestačný *diabetes mellitus*	*GDM*
4. Ostatné špecifické typy *diabetes mellitus*	napr. monogénny diabetes – MODY
Prediabetes	**Obvyklá skratka**
Hraničná glykémia nalačno	IFG (impaired fasting glucose)
Porucha glukózovej tolerancie	IGT (impaired glucose tolerance)
Kombinácia oboch porúch	IFG + IGT

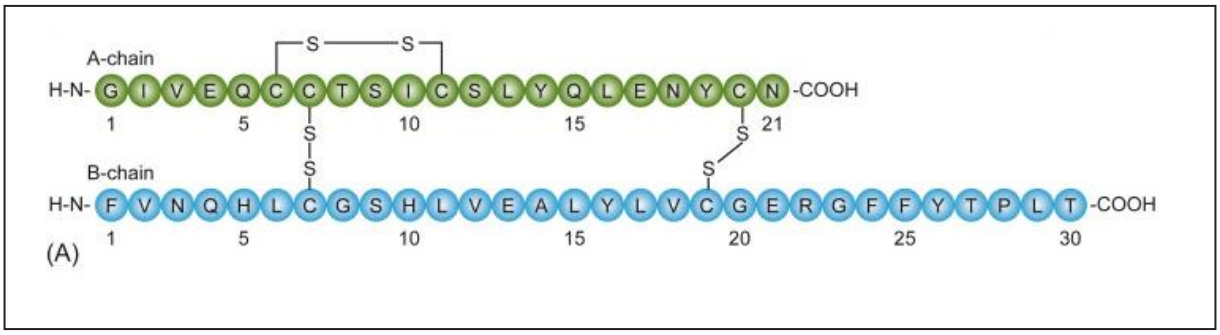
LADA – latentný autoimunitný diabetes u dospelých (latent autoimmune diabetes in adults)
Zdroj: Karen a Svačina, 2020

Tab. 2: Súhrn metabolických účinkov inzulínu

Účinok	Pečeň	Kostrový sval	Tukové tkanivo
↑ transport glukózy do buniek	(+)	+	+
↑ glykolýza	+	+	+
↑ syntéza (a ukladanie) glykogénu	+	+	
↓ glukoneogenéza	+		
↑ syntéza proteínov	+	+	
↓ katabolizmus proteínov		+	
↑ lipogenéza	+		+
↑ lipolýza (↓ tvorba ketolátok)			+

+ účinok je prítomný
Zdroj: Vlček a Fialová, 2010

Obr. 1: Primárna štruktúra inzulínu, sekvencia aminokyselín A-reťazca a B-reťazca molekuly inzulínu



A-chain – A-reťazec, B-chain – B-reťazec
Zdroj: Litwack, 2022

(KV) príčin oproti nediabetickej populácii.

Súčasná klasifikácia zahŕňa 4 skupiny *DM* a 2 skupiny označované ako hraničné poruchy glukózovej homeostázy (*prediabetes*) (viď tab. 1) (Karen a Svačina, 2020).

Inzulín je prirodzený ľudský proteohormón presne definovanej štruktúry (viď obr. 1). Pozostáva z 51 aminokyselín (AMK) usporiadaných do dvoch polypeptidových reťazcov A (21 AMK) a B (30 AMK) spojených dvoma disulfidickými mostíkmi. Syntetizuje sa v ß-bunkách Langerhansových ostrovčekov pankreasu vo forme prekurzorovej molekuly preproinzulínu. Po odštiepení signálneho peptidu je molekula proinzulínu lokalizovaná v Golgiho aparáte, odkiaľ sa dostáva do sekrečných granúl. Pred uvoľnením z ß-bunky sa časť molekúl proinzulínu štiepi na C-peptid (30 AMK) a inzulín (51 AMK), ktoré sa exocytózou v ekvimolárnom množstve uvoľnia do portálnej cirkulácie (Vlček a Fialová, 2010). Súčasne sa uvoľňuje malé množstvo nerozštiepeného proinzulínu (Marek a Vrablík, 2019).

Inzulín pôsobí v cieľových tkanivách (v pečeni, kostrovom svalstve a tukovom tkanive) (viď tab. 2) prostredníctvom špecifických väzobných miest, inzulínových receptorov, tvorených dvomi α a dvomi ß-podjednotkami (Mirossay a Mojžiš, 2021).

Hlavným faktorom regulujúcim syntézu a sekréciu inzulínu je glykémia. Odpoveď na zvýšenú kon-

centráciu glukózy v krvi je dvojfázová. Počiatočná rýchla fáza odráža uvoľnenie zásobného inzulínu zo sekrečných granúl (táto fáza chýba u pacientov s *DM* 2T). Následná pomalšie prebiehajúca fáza (trvajúca asi 1 h) je daná sčasti pokračujúcim uvoľňovaním inzulínu z granúl, predovšetkým však jeho syntézou *de novo* (Vlček a Fialová, 2010).

Klinická manifestácia *DM* závisí od stupňa a dĺžky trvania hyperglykémie. Medzi typické prejavy patrí glykozúria, pričom pri výraznejšej glykozúrii dochádza k rozvoju osmotickej polyúrie vedúcej k dehydratácii. Ďalšími príznakmi sú polydipsia, nyktúria, strata telesnej hmotnosti pri zachovaní chuti do jedla, zhoršenie a spomalenie hojenia rán, únava, malátnosť, prechodné poruchy zrakovej ostrosti. Pri metabolickej dekompenzácii *DM* môže dôjsť k rozvoju niektorého z akútnych hyperglykemických stavov s poruchou vedomia. Uvedené príznaky môžu patriť do klinického obrazu obidvoch typov *DM* – *DM* 1. a *DM* 2. typu. V čase diagnózy ich však častejšie nachádzame u pacientov s *DM* 1. typu – rozvoj hyperglykémie v porovnaní s *DM* 2. typu je rýchlejší a výraznejší. Manifestácia *DM* 2. typu je často nenápadná, ochorenie môže mať mesiace až roky latentný priebeh (Vlček a Fialová, 2010; Češka a kol., 2020).

Akútne komplikácie *DM* predstavujú závažné, často život ohrozujúce zdravotné stavy. Radíme sem hyperglykemický hyperosmolárny, neketotický stav, diabetickú ketoacidózu, laktátovú acidózu a hypoglykemické stavy, ktoré môžu vyústiť až do hypoglykemickej kómy (Češka a kol., 2020). Chronické komplikácie *DM* sú výsledkom dlhodobo pretrvávajúcej hyperglykémie a majú najčastejšie súvis s postihnutím ciev. Rozdeľujú sa na špecifické mikrovaskulárne a nešpecifické makrovaskulárne komplikácie. Mikrovaskulárne komplikácie sa častejšie vyskytujú u pacientov s *DM* 1. typu a sú reprezentované diabetickou retinopatiou, diabetickou nefropatiou a diabetickou polyneuropatiou, ktorá je hlavnou príčinou vzniku diabetickej nohy. Makrovaskulárne komplikácie sú typické pre pacientov s *DM* 2. typu, vznikajú na podklade aterosklerotických zmien stredne veľkých a veľkých tepien a zahŕňajú chronický koronárny systém, periférne artériové ochorenie dolných končatín (ICHDK) a cievnu mozgovú príhodu (CMP) (Fejfarová a Jirkovská, 2009).

K možnostiam neinzulínovej injekčnej farmakoterapie *DM* 2. typu patrí užívanie agonistov GLP-1 receptorov (GLP-1 RA) s krátkodobým (exenatid a lixisenatid), strednodobým (liraglutid) a dlhodobým účinkom (exenatid QW, albiglutid, dulaglutid a semaglutid) (Švihovec a kol., 2018; Rašlová, 2020).

GLP-1 RA patria do skupiny inkretínových mimetík. Glukóza podaná perorálne vyvoláva väčšiu sekréciu inzulínu ako jej rovnaké množstvo aplikované intravenózne. Tento rozdiel sa označuje ako inkretínový efekt (Klen a Dolžan, 2022). Inkretínovú aktivitu vykazuje niekoľko neurotransmiterov a hormónov tráviaceho traktu. Medzi hlavné peptidové hormóny zodpovedné za potravou stimulovanú sekréciu inzulínu patrí glukózo-dependentný inzulinotropný polypeptid (GIP) a glukagónu podobný peptid GLP-1 (Ilavská, 2007). Účinok GLP-1 je sprostredkovaný interakciou s GLP-1 receptorom, ktorý sa exprimuje najmä na povrchu ß-buniek Langerhansových ostrovčekov pankreasu, ale aj v žalúdku, pľúcach, srdci, cievach a nervovom tkanive. GLP-1 ovplyvňuje metabolizmus glukózy komplexným mechanizmom – stimuluje syntézu a sekréciu inzulínu z ß-buniek pankreasu v závislosti od perorálne prijatej glukózy (zodpovedá až za 70 % sekrécie inzulínu vyvolanej ako odpoveď na príjem potravy), inhibuje motilitu žalúdka, podieľa sa na regulácii príjmu potravy zvýšením pocitu sýtosti, blokuje glukoneogenézu a glykogenolýzu, stimuluje tvorbu glykogénu, má významný vplyv na rast a prežívanie ß-buniek (Švihovec a kol., 2018; Rašlová, 2020).

Pri užívaní GLP-1 RA antidiabetík boli zaznamenané pleiotropné účinky, akými sú ovplyvnenie tlaku krvi, nefroprotektívne účinky (Mokáň a Galajda, 2021); priaznivý vplyv na aterogenézu a trombogenézu a funkciu myokardu (Mokáň a Galajda, 2021); redukciu telesnej hmotnosti a priaznivú remodeláciu tukového tkaniva (Sefa a kol., 2019; Mokáň a Galajda, 2021).

Tab. 3: Prehľad expedovaných liekov s obsahom GLP-1 RA v sledovaných lekárňach

Názov lieku	Lieková forma	Podanie	Výdaj	Indikačná skupina	Účinná látka	ATC kó
Trulicity 1,5 mg	SOL INJ – injekčný roztok	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	dulaglutid	A10BJ05
Xultophy 100 jednotiek/ml + 3,6 $mg.ml^{-1}$	SOL INJ – injekčný roztok	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	inzulín degludek a liraglutid	A10AE56
Ozempic 0,5 mg	SOL INJ – injekčný roztok	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	semaglutid	A10BJ06
Saxenda 6 $mg.ml^{-1}$	SOL INJ – injekčný roztok	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	liraglutid	A10BJ02
Ozempic® 1 mg	SOL INJ – injekčný roztok	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	semaglutid	A10BJ06
Victoza® 6 $mg.ml^{-1}$	SOL INJ – injekčný roztok	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	liraglutid	A10BJ02
Ozempic® 0,25 mg	SOL INJ – injekčný roztok	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	semaglutid	A10BJ06
Suliqua® 100 jednotiek/ml + 33 $mg.ml^{-1}$	SOL INJ – injekčný roztok	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	inzulín glargin, lixisenatid	A10AE54
Suliqua® 100 jednotiek/ml + 50 $mg.ml^{-1}$	SOL INJ – injekčný roztok	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	inzulín glargin, lixisenatid	A10AE54
Rybelsus® 3 mg	TBL – tablety	perorálne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	semaglutid	A10BJ06
Rybelsus® 14 mg	TBL – tablety	perorálne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	semaglutid	A10BJ06
Bydureon® 2 mg	PLU IGF – prášok a disperzné prostredie na inj. suspenziu s predĺženým uvoľňovaním	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	exenatid	A10BJ01

Byetta® 10 µg	SOL INJ – injekčný roztok	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	exenatid	A10BJ01
Byetta® 5 µg	SOL INJ – injekčný roztok	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	exenatid	A10BJ01
Lyxumia® 10 µg	SOL INJ – injekčný roztok	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	lixisenatid	A10BJ03
Lyxumia® 20 µg	SOL INJ – injekčný roztok	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	lixisenatid	A10BJ03
Trulicity® 0,75 mg	SOL INJ – injekčný roztok	subkutánne	viazaný na lekársky predpis	18 – Antidiabetica (vrátane inzulínu)	dulaglutid	A10BJ05

MATERIÁL A METÓDY

Cieľom štúdie bolo analyzovať aktuálne trendy v preskripcii a expedícii vybraných registrovaných liekov s obsahom GLP-1 RA v 3 českých a 3 slovenských verejných lekárňach počas sledovaného obdobia 2 rokov, t. j. v období od 01.11.2020 do 01.11.2022. Expedíciu liekov s obsahom GLP-1 RA sme v Slovenskej republike sledovali v 3 verejných „streetových“ lekárňach – v 2 lekárňach v Starej Ľubovni, ktoré sme označili ako Lekáreň A a Lekáreň B a v 1 lekárni v Košiciach, ktorú sme označili ako Lekáreň C. Expedíciu liekov s obsahom GLP-1 RA v Českej republike sme sledovali v 3 verejných lekárňach v Prahe – v 1 lekárni nachádzajúcej sa v obchodnom centre, ktorú sme označili ako Lekáreň D, v 1 lekárni na poliklinike, ktorú sme označili ako Lekáreň E a v 1 „streetovej“ lekárni, ktorej sme pridelili označenie Lekáreň F. Údaje o počte expedovaných liekov sme získali z lekárenských informačných systémov týchto lekární – WinLSS, Pharmacy HIIT, Mediox 3000 a FaRMIS2. Zo zozbieraných údajov sme vytvorili grafické prehľady počtu expedovaných liekov s obsahom GLP-1 RA v jednotlivých lekárňach a navzájom ich porovnali.

Medzi základné kritériá, ktoré sme pri detailnej analýze expedovaných liekov s obsahom GLP-1 RA zohľadnili patria:

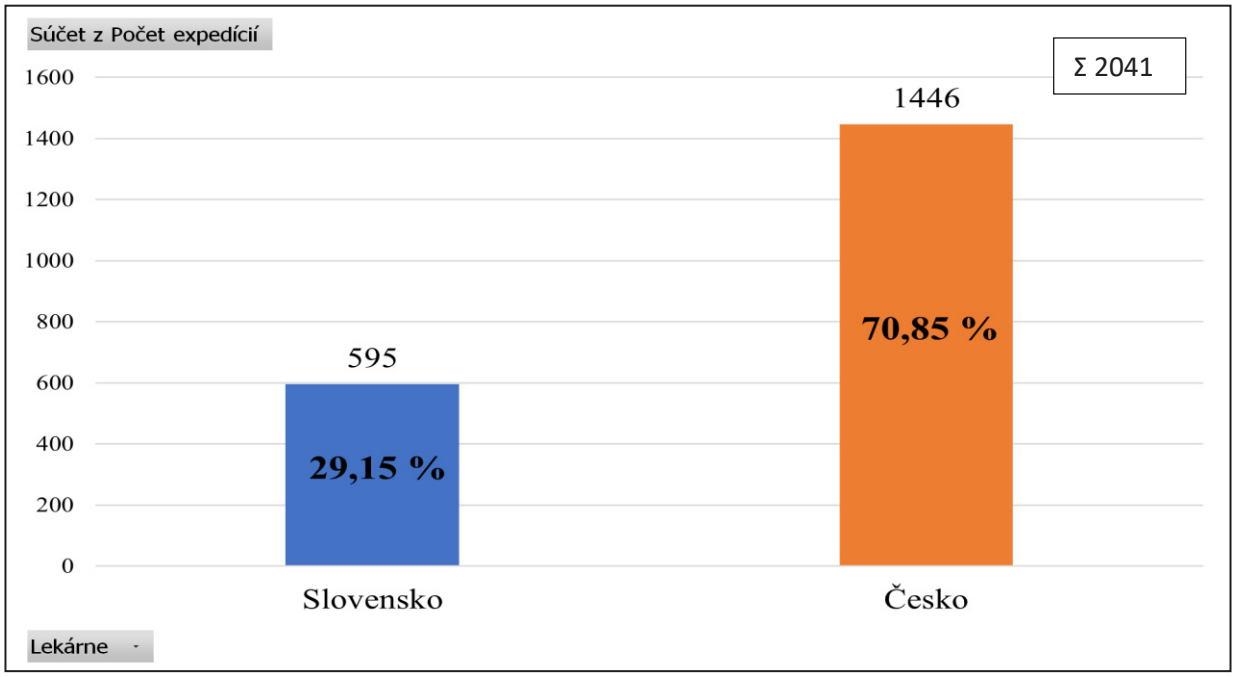
- typ lekárne („streetová“, poliklinická, v obchodnom centre)
- lokalita, v ktorej sa lekáreň nachádzala
- počet obyvateľov
- preskripcia GLP-1 RA v klinickej praxi v súlade s najnovšími odporúčaniami
- dostupnosť liekov na klinickom trhu.

VÝSLEDKY

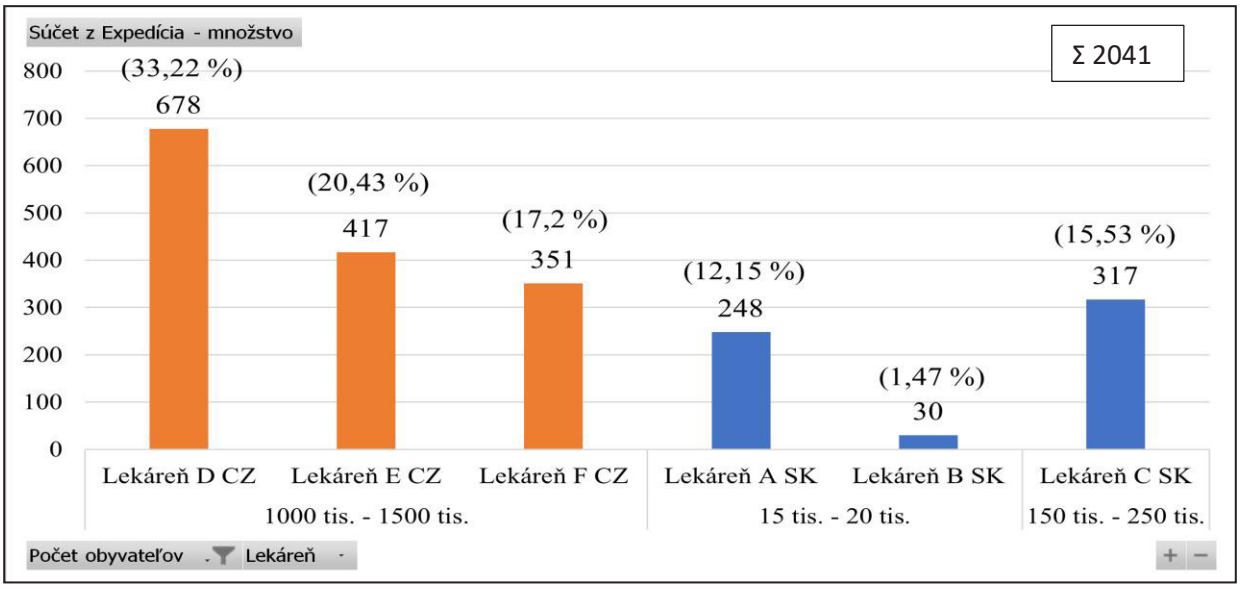
Prehľad liekov s obsahom GLP-1 RA, ktorých expedíciu sme sledovali v období od 01.11.2020 do 01.11.2022 v 3 slovenských a 3 českých verejných lekárňach sme znázornili v tabuľke 3.

Celkovo bolo v 6 sledovaných lekárňach v Slovenskej republike a v Českej republike za obdobie dvoch

Graf 1: Percentuálny podiel expedovaných liekov s obsahom GLP-1 RA (n = 2041) v sledovaných lekárňach v Slovenskej republike a v Českej republike

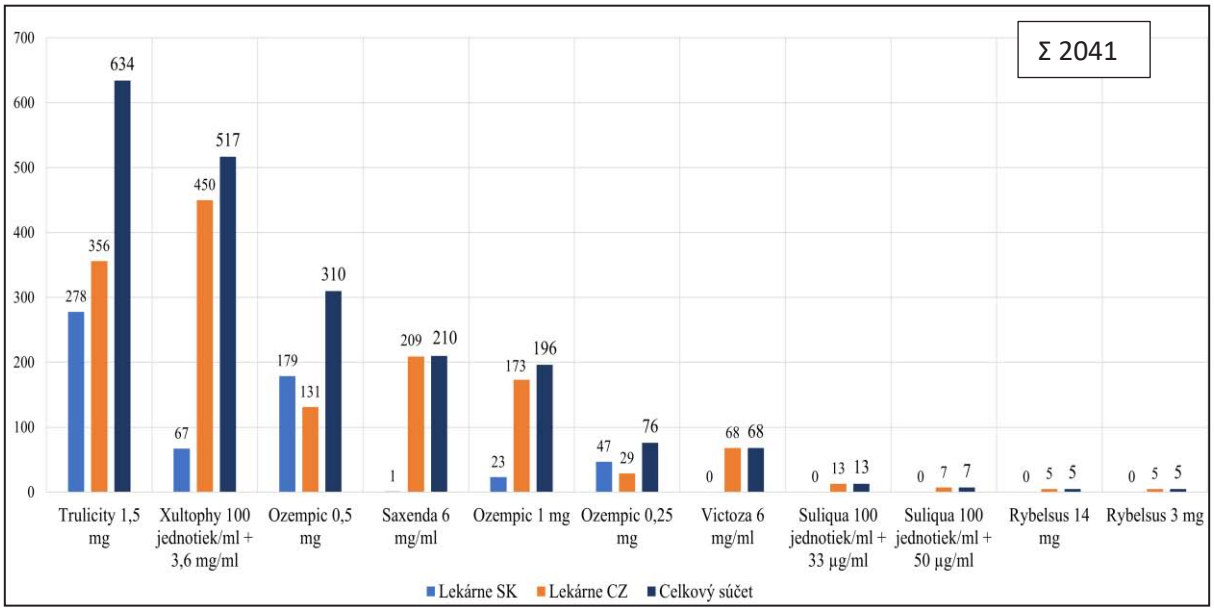


Graf 2: Prehľad počtu expedovaných liekov s obsahom GLP-1 RA (n = 2041) v jednotlivých sledovaných lekárňach (so zohľadnením počtu obyvateľov miest, v ktorých sa nachádzali)



CZ – Česká republika; SK – Slovenská republika

Graf 3: Expedícia jednotlivých liekov s obsahom GLP-1 RA (n = 2041) v sledovaných lekárňach v Slovenskej republike a v Českej republike



SK – Slovenská republika, CZ – Česká republika

rokov expedovaných 2041 liekov s obsahom GLP-1 RA, z toho 595 v slovenských a 1446 v českých lekárňach (viď graf 1 a graf 2).

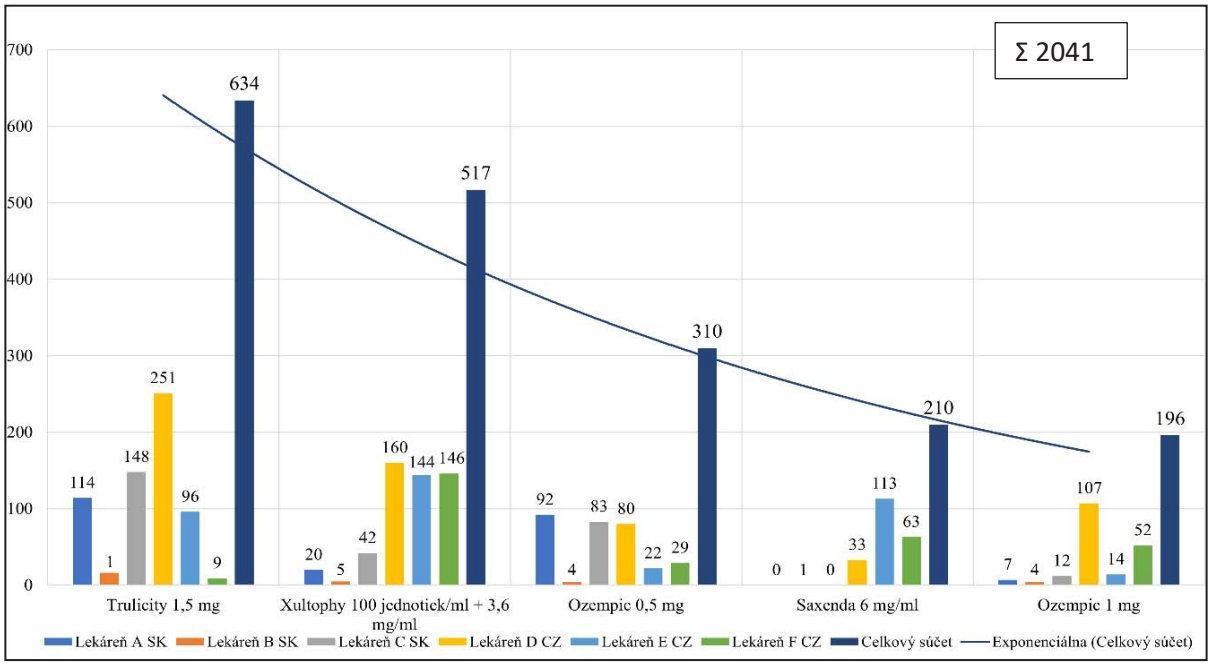
Z liekov uvedených v tabuľke 3 sme vo všetkých sledovaných lekárňach nezaznamenali žiadnu expedíciu v prípade 6 liekov: Bydureon® 2 mg s účinnou látkou exenatid, Byetta® 5 µg a Byetta® 10 µg s účinnou látkou exenatid, Lyxumia® 10 µg a Lyxumia® 20 µg s účinnou látkou lixisenatid.

Medzi lieky, ktorých expedíciu sme zaznamenali počas sledovaného obdobia len v českých lekárňach, patrí Victoza® 6 mg.ml^{-1} s účinnou látkou liraglutid, Suliqua® 100 jednotiek/ml + 33 µg.ml^{-1} a Suliqua® 100 jednotiek/ml + 50 µg.ml^{-1} s účinnou látkou inzulín glargin a lixisenatid, Rybelsus® 3 mg a Rybelsus® 14 mg s účinnou látkou semaglutid, pričom Rybelsus® 3 mg a Rybelsus® 14 mg nie sú dostupné na Slovensku.

Najviac expedovaným liekom s obsahom GLP-1 RA v sledovanom období bol v lekárňach v Českej republike liek Xultophy® 100 jednotiek/ml + 3,6 mg.ml^{-1} s účinnou látkou inzulín degludek a liraglutid (450 ks). V lekárňach v Slovenskej republike sme najvyšší počet expedícií zaznamenali v prípade lieku Trulicity® 1,5 mg s účinnou látkou dulaglutid (278 ks) (viď graf 3).

Medzi zaznamenanými 5 liekmi s obsahom GLP-1 RA s najväčším počtom expedícií v sledovaných lekárňach na Slovensku a v Česku patria lieky Trulicity® 1,5 mg s účinnou látkou dulaglutid, expedovaný v celkovom množstve 634 ks, čo predstavuje 31,06 % podiel; Xultophy® 100 jednotiek/ml + 3,6 mg.ml^{-1} s účinnou látkou inzulín degludek a liraglutid, expedovaný v množstve 517 ks, čo predstavuje 25,33 % podiel; Ozempic® 0,5 mg s účinnou látkou semaglutid, expedovaný v množstve 310 ks (z toho 179 ks v slovenských lekárňach a 131 ks v českých lekárňach), čo predstavuje 15,19 % podiel; Saxenda® 6 mg.ml^{-1} s účinnou látkou liraglutid, expedovaný v množstve 210 ks, čo predstavuje 10,29 % podiel; Ozempic® 1

Graf 4: Prehľad expedícií 5 najpočetnejších liekov s obsahom GLP-1 RA v sledovaných lekárňach v Slovenskej republike a v Českej republike



mg s účinnou látkou semaglutid, expedovaný v celkovom množstve 196 ks, čo predstavuje 9,6 % podiel (viď graf 4).

Z celkového množstva 2041 expedovaných liekov vo všetkých sledovaných lekárňach mali najväčšie zastúpenie lieky s obsahom liraglutidu – expedovaných bolo celkovo 795 ks (z toho 68 ks na Slovensku a 727 ks v Česku), čo predstavuje 38,95 % podiel. Dulaglutid sme zaznamenali v 634 expedovaných liekoch, semaglutid v 592 expedovaných liekoch a lixisenatid v 20 expedovaných liekoch. Exenatid nebol expedovaný v žiadnej zo sledovaných lekární (viď graf 5).

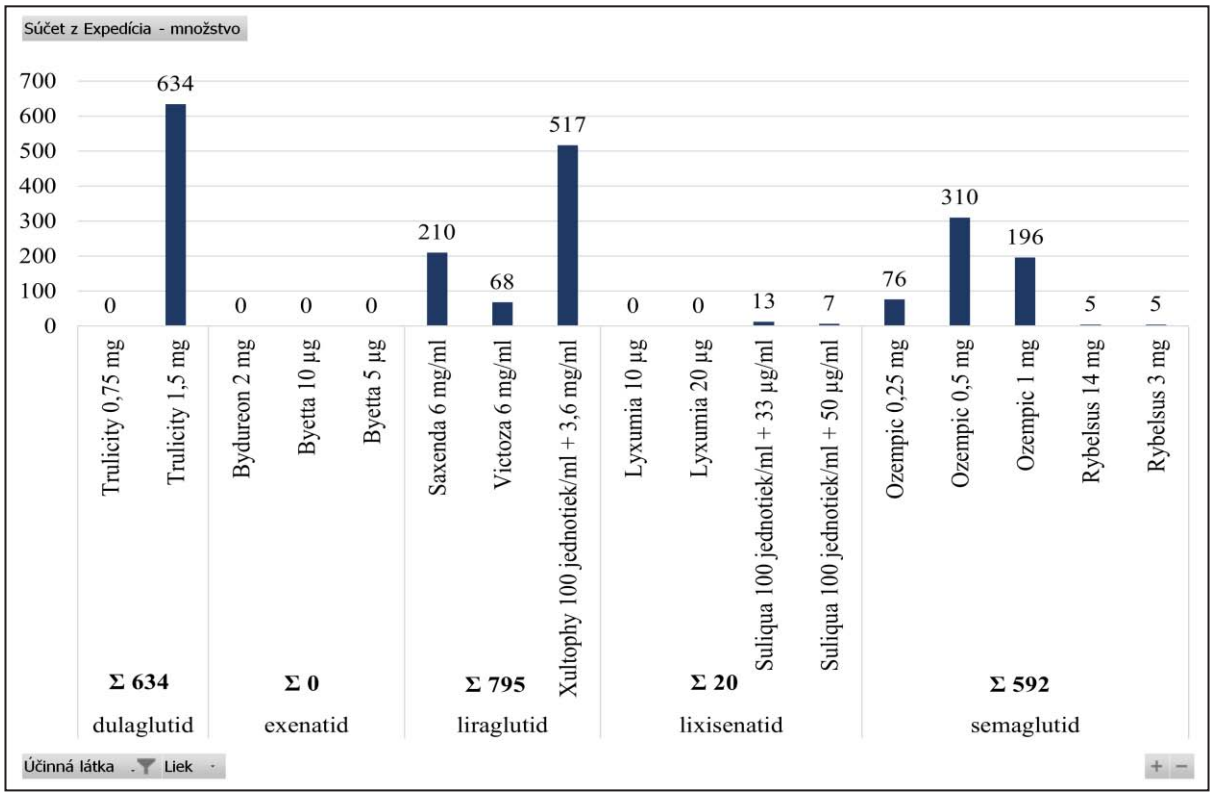
Z počtu 595 expedovaných liekov s obsahom GLP-1 RA v sledovaných lekárňach na Slovensku mali najväčšie zastúpenie lieky s obsahom dulaglutidu – expedovaných bolo celkovo 278 ks, čo predstavuje 46,72 % podiel. Semaglutid sme zaznamenali v 249 expedovaných liekoch a liraglutid v 68 expedovaných liekoch. Na Slovensku sme na rozdiel od Česka nezaznamenali žiadnu expedíciu nielen v prípade liekov s účinnou látkou exenatid, ale aj v prípade liekov s obsahom lixisenatidu.

Z počtu 1446 expedovaných liekov s obsahom GLP-1 RA v sledovaných lekárňach v Česku mali najväčšie zastúpenie lieky s obsahom liraglutidu – expedovaných bolo celkovo 727 ks, čo predstavuje 50,28 % podiel. Dulaglutid sme zaznamenali v 356 expedovaných liekoch, semaglutid v 343 expedovaných liekoch a lixisenatid bol účinnou látkou 20 expedovaných liekov. V českých lekárňach neboli expedované žiadne lieky s obsahom exenatidu (viď graf 5.

DISKUSIA

Medzi kľúčové skupiny antidiabetík v manažmente farmakoterapie *DM* 2. typu patria inkretínové mimetiká GLP-1 RA, ktoré sú štruktúrnymi analógmi natívneho GLP-1 a ich prínos sa vysvetľuje ich pleiotropnými účinkami (vykazujú inzulinotropný efekt, inhibujú motilitu žalúdka, zvyšujú pocit sýtosti, priaznivo ovplyvňujú proces aterogenézy a trombogenézy, redukujú telesnú hmotnosť a hodnotu systolického tlaku krvi), pričom sa odporúča začiatok liečby

Graf 5: Zastúpenie GLP-1 RA v expedovaných liekoch vo všetkých sledovaných lekárňach



pomocou GLP-1 RA v druhom kroku terapie *DM* 2. typu, a to s podmienkou aspoň 6- mesačnej liečby metformínom s hodnotou glykovaného hemoglobínu HbA1c nad 7 % (Vohnout a Lisičanová, 2022).

GLP-1 RA sú v rámci ATC klasifikácie zaradené do skupiny A10B – antidiabetiká s výnimkou inzulínov. V súčasnosti sa v tejto skupine nachádza 56 liečiv, GLP-1 RA tvoria 12,5 % podiel. Medzi GLP-1 RA v registrovaných liekoch na Slovensku a v Česku patrí exenatid, lixisenatid, liraglutid, dulaglutid a semaglutid. V Slovenskej aj v Českej republike je dnes 72 registrovaných liekov s obsahom GLP-1 RA. V najväčšej miere je v nich zastúpený semaglutid, ktorý je ako jediný zo skupiny GLP-1 RA k dispozícii aj v perorálnej aplikačnej forme, všetky ostatné GLP-1 RA sa podávajú subkutánne.

Cesta podania je jedným z hlavných faktorov ovplyvňujúcich adherenciu pacienta k predpísanej terapii a jeho kompliancíu. Samoš a Mokáň (2021) uvádzajú, že širšiemu uplatneniu GLP-1 RA v klinickej praxi často bráni práve nutnosť ich dlhodobej subkutánnej aplikácie, ktorú pacienti často odmietajú. Potrebu dostupnosti lieku s obsahom GLP-1 RA s pohodlným podávaním vo forme perorálnych tabliet napĺňa liek Rybelsus® s účinnou látkou semaglutid. Tento liek bol na Slovensku a v Česku registrovaný v roku 2020 (https://www.sukl.sk/, https://www.sukl.cz/), avšak nie je dostupný. Za sledované obdobie od 01.11.2020 do 01.11.2022 bol perorálny semaglutid zo všetkých GLP-1 RA expedovaný v najmenšom objeme – 10 ks. Možno konštatovať, že perorálny semaglutid je prvým perorálnym GLP-1 RA, ktorý má reálny potenciál klinického využitia v rámci perorálnej aplikačnej cesty GLP-1 RA, ktorá tak môže predstavovať ďalšiu možnosť tejto liečby a značne napomôcť širšiemu uplatneniu aktuálnych terapeutických odporúčaní v klinickej praxi.

Z vyššie uvedených skutočností tiež vyplýva, že

medzi faktory ovplyvňujúce súčasné trendy v preskripcii GLP-1 RA jednoznačne patrí aj to, ako dlho je liek na klinickom trhu dostupný. Vplyv má aj samotná skúsenosť lekára s jeho predpisovaním. Žiadnu expedíciu sme v sledovaných lekárňach nezaznamenali v prípade liekov Bydueron® a Byetta®, ktoré obsahujú ako účinnú látku exenatid a v prípade lieku Lyxumia® s účinnou látkou lixisenatid, čo možno okrem dôvodu ich dlhodobej nedostupnosti vysvetliť aj tým, že ide o staršie molekuly zo skupiny GLP-1 RA, ktoré boli do klinickej praxe zavedené ako prvé a dnes sú nahrádzané novšími.

Ako ďalší faktor ovplyvňujúci kompliancíu pacienta a tým aj samotnú preskripciu možno spomenúť nežiaduce účinky liekov. Podľa autorov Schroner a Uličiansky (2019) medzi možné dôvody uprednostnenia terapie GLP-1 RA patrí predovšetkým nízke riziko hypoglykémie a nízky výskyt závažných nežiaducich účinkov, akými sú nevoľnosť, závrat, hnačka, obstipácia, nauzea, vracanie, bolesť v oblasti brušnej dutiny, dehydratácia.

Na preskripciu GLP-1 RA majú vplyv aj ekonomické aspekty. V súčasnosti je možné hradenú liečbu na Slovensku indikovať len pacientom spĺňajúcim platné indikačné obmedzenia pre GLP-1 RA. Ako uvádzali autori Schroner a Uličiansky (2019), hradená liečba GLP-1 RA sa mohla indikovať u obéznych pacientov (BMI > 30 kg/m^2 pri semaglutide, BMI > 35 kg/m^2 pri dulaglutide) s *DM* 2T v kombinácii s metformínom alebo v kombinácii s metformínom a sulfonylureou, a to ak predchádzajúca minimálne 6-mesačná terapia maximálnymi tolerovanými dávkami perorálnych antidiabetík neviedla k uspokojivej metabolickej kompenzácii, kedy hladina glykovaného hemoglobínu v krvi – HbA1$_c$ presiahla úroveň 7 %. V súčasnosti platí u pacientov *DM* 2. typu nasledovná indikácia pri užívaní GLP-1 RA: po najmenej 6-mesačnej liečbe maximálne tolerovanými dávkami metformínu s HbA1c nad 7 % (https://www.prolekare.cz/en/journals/forum-diabetologicum/2021-supplementum-2-2/6-odporucane-postupy-pre-liecbu-diabetes-mellitus-2-typu-128762/download?hl=cs). Ďalším aspektom je fakt, že existuje značný nepomer v preskripcii niektorých preparátov, a to z dôvodu ich nedostupnosti na Slovensku, aj keď sú na Slovensku registrované.

Pri detailnej analýze expedície GLP-1 RA sme v sledovaných lekárňach na Slovensku a v Česku za obdobie 2 rokov zaznamenali celkovo 2041 expedovaných liekov s obsahom GLP-1 RA. Najviac expedovaným liekom v rámci všetkých sledovaných lekární bol liek Trulicity® 1,5 mg s účinnou látkou dulaglutid. V rámci sledovaných lekární v Českej republike sme pozorovali trend preskripcie lieku Xultophy® 100 jednotiek/ml + 3,6 mg.ml^{-1}, ktorý je fixnou kombináciou inzulínu degludek s liraglutidom. V slovenských lekárňach bol pozorovaný najvýraznejší trend predpisovať liek Trulicity®. Z pohľadu samotných GLP-1 RA sme celkovo zaznamenali najviac expedovaných liekov s obsahom liraglutidu. V rámci vybraných sledovaných lekární na Slovensku bolo trendom predpisovať lieky s obsahom dulaglutidu, v rámci sledovaných lekární v Česku lieky s obsahom liraglutidu.

Medzi kritériá, ktoré ovplyvnili expedíciu liekov s obsahom GLP-1 RA v jednotlivých lekárňach možno zaradiť typ lekárne, lokalitu, v ktorej sa lekáreň nachádza, napr.: diabetologická ambulancia v spádovej oblasti lekárne, dostupnosť liekov a preskripciu GLP-1 RA v súlade s najnovšími odporúčaniami.

Možno povedať, že výsledky detailnej analýzy expedície registrovaných liekov s obsahom GLP-1 RA v sledovaných lekárňach na Slovensku a v Česku naznačujú, že v klinickej praxi dochádza k postupnej implementácii vedeckých poznatkov farmakoterapeutických účinkov GLP-1 RA. V terapii *DM* 2T tak nastáva odklon od tzv. glukocentrického prístupu, k prístupu s preferenčným výberom farmák na základe ich preukázaných benefitov a klinických charakteristík pacientov. Tento trend sme výraznejšie pozorovali v českých lekárňach.

ZÁVER

DM je celoživotným civilizačným ochorením, ktoré zásadne zvyšuje riziko vzniku kardiovaskulárnych

oborení, ktoré sú zaradené na prvom mieste v príčinách chorobnosti a úmrtnosti pacientov s *DM* 2T.

Významné postavenie v manažmente farmakoterapie ochorenia *DM* 2T zaujíma skupina inkretínových mimetík GLP-1 RA. Jednou z nevýhod terapie GLP-1 RA bola donedávna potreba ich subkutánnej aplikácie. K širšiemu uplatneniu GLP-1 RA v klinickej praxi môže v súčasnosti prispieť perorálne podávaný semaglutid, ktorý je prvým perorálnym GLP-1 RA, pričom expedíciu tohto liečiva sme zaznamenali zatiaľ len v českých lekárňach, a to z dôvodu, že na Slovensku nie je spomínané liečivo dostupné.

Medzi faktory ovplyvňujúce aktuálne trendy v preskripcii GLP-1 RA patrí dostupnosť liekov s obsahom GLP-1 RA na klinickom trhu, lieková forma, nežiaduce účinky, ekonomické aspekty v podobe indikačných obmedzení, najnovšie terapeutické algoritmy odborných spoločností a ochota lekárov uplatňovať ich v klinickej praxi.

Výsledky tejto štúdie naznačili, že v klinickej praxi dochádza k postupnej implementácii preskripcie a expedície GLP-1 RA na českom, ako aj slovenskom trhu.

ZOZNAM LITERATÚRY

Češka, R., Štulc, T., Tesař, V., Lukáš, M.: *Interna* [Internal Medicine]. 3. vyd. Česká republika: Praha, Triton, 2020. 979 s.

Fejfarová, V., Jirkovská, A.: Makrovaskulární komplikace diabetu [Macrovascular complications in *diabetes mellitus*]. *Int. Med. Prax.*, 2009, 11, 9.

Ilavská, A.: Inkretíny, inkretínový efekt a *diabetes mellitus* [Incretin, incretin effect and *diabetes mellitus*]. *Via pract.*, 2007, 4, S4.

Karen, I., Svačina, Š.: *Diabetes mellitus:* Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné a praktické lékaře [*Diabetes mellitus*: recommended therpeutical procedures for general practitioners]. Česká republika: Praha, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2020, 24 s.

Klen, J., Dolžan, V.: Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the management of type 2 *diabetes mellitus* and obesity: the impact of pharmacological properties and genetic factors. *Int. Mol. J. Sci.*, 2022, 23 (7), 3451.

Litwack, G.: Chapter 6 – Pancreatic hormones: insulin and glucagon. In Litwack, G. (Ed.). *Hormones* (4th edn.). Unites States: Elsevier, Academic Press, 2022. 123 – 157.

Marek, J., Vrablík, M.: Markova farmakoterapie vnitřních nemocí [Mark's Pharmacotherapy of Internal Diseases]. 5. vyd. Česká republika: Praha, Grada Publishing, 2019. 896 s.

Martinka, E., Tkáč, I., Mokáň, M., Rašlová, K., Fábryová, Ľ., Galajda, P., Schroner, Z., Dókušová, S., Martinková, B., Doničová, V., Lacka, J.: *For. Diabetol.*, 2021, 10, 2. https://www.prolekare.cz/en/journals/forum-diabetologicum/2021-supplementum-2-2/6-odporucane-postupy-pre-liecbu-diabetes-mellitus-2-typu-128762/download?hl=cs. [cit. 23-06-2023].

Mirossay, L., Mojžiš, J.: Základná farmakológia a farmakoterapia I [Essential Pharmacology and Pharmacotherapy]. 2. vyd. Slovenská republika: Košice, Equilibria, 2021. 760 s.

Mokáň, M., Galajda, P.: Kardioprotektívny efekt liečby GLP1-analógmi vo svetle výsledkov najnovších klinických štúdií [Cardioprotective effect of treatment with GLP1-analogs in the results of the latest clinical studies]. *For. Diabetol.*, 2021, 10, 2. <https://www.forumdiabetologicum.sk/casopisy/forum-diabetologicum/2021-2-26/kardioprotektivny-efekt-liecby-glp1-analogmi-vo-svetle-vysledkov-najnovsich-klinickych-studii-127831>. [cit.13-01-23].

Rašlová, K.: Metabolické efekty agonistov glucagon-like peptide-1 receptora [Metabolic effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists]. *Int. Med.*, 2020, 20, S5. <https://www.amedi.sk/files/files/suplement5_im_12_2020_raslova.pdf>. [cit. 14-06-2023].

Samoš, M., Mokáň, M.: Perorálny semaglutid: budúcnosť agonizmu GLP1-receptorov? *For. Diabetol.*, 2021, 10, 3. <https://www.prolekare.cz/

casopisy/forum-diabetologicum/2021-3-26/peroralny-semaglutid-buducnost-agonizmu-glp1-receptorov-129625>. [cit. 14-06-2023].

Sefa, S., Szabóová, R., Babíková, J.: Vplyv podávaného semaglutidu na hladinu glykovaného hemoglobínu HbA1c u pacientov s *diabetes mellitus* [The effect of semaglutide administration on the level of glycated hemoglobin HbA1c in patients with *diabetes mellitus*]. *Folia Pharm. Cass.*, 2022, 4 (2), 46 – 58.

Schroner, Z., Uličiansky, V.: Miesto agonistov GLP1 receptorov a ich fixná kombinácia s inzulínom v liečbe *diabetes mellitus* 2. typu [The role of GLP-1 receptor agonists and their fixed combination with insulin in the treatment of type 2 *diabetes mellitus*]. *Vnit. lék.*, 2019, 65, 4. <https://www.prolekare.cz/casopisy/vnitrni-lekarstvi/2019-4/miesto-agonistov-glp1-receptorov-a-ich-fixna-kombinacia-s-inzulinom-v-liecbe-diabetes-mellitus-2-typu-109706>. [cit. 21-05-2023].

Státní ústav pro kontrolu léčiv [State Institute for Drug Control]. https://www.sukl.cz/. [cit. 10-06-2023].

Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., Votava, M.: *Farmakologie* [Pharmacology]. 1. vyd. Česká republika: Praha, Grada Publishing, 2018. 1008 s.

Vlček, J., Fialová, D.: Klinická farmacie I. [Clinical Pharmacy I.] 1. vyd. Česká republika: Praha, Grada Publishing, 2010. 368 s.

Vohnout, B., Lisičanová, J.: Agonisti GLP-1 receptorov a ateroskleróza [GLP1 receptor agonists and atherosclerosis]. *Ath. Rev.*, 2022, 7, 2. <https://www.atheroreview.eu/en/journals/athero-review/2022-2-22/glp-1-receptor-agonists-and-atherosclerosis-131280?hl=cs>. [cit. 13-05-2023].

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 4: 41 – 50, 2023

POTENCIÁLNE NEVHODNÉ LIEČIVÁ UŽÍVANÉ V TERAPII KARDIOVASKULÁRNYCH OCHORENÍ U MUŽOV VO VYŠŠOM VEKU

POTENTIALLY INAPPROPRIATE DRUGS USED IN THE CAUSAL THERAPY OF CARDIOVASCULAR DISEASES IN ELDERLY MEN

Krížová, Veronika[1]; Šutorová, Martina[2]; Bačkorová, Miriam[1]

[1]Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika
[2]Ústav aplikované farmacie, Farmaceutická fakulta, Masarykova univerzita,
Palackého třída 1946/10, 612 00 Brno
Česká republika

miriam.backorova@uvlf.sk

ABSTRAKT

V dôsledku nadmerného užívania liekov u pacientov starších ako 65 rokov je farmakoterapia spojená s možným výskytom potenciálne nevhodných liečiv. V súčasnosti sú potenciálne nevhodné liečivá predmetom záujmu mnohých vedeckých kolektívov. V tomto výskume bola analyzovaná spotreba kardiovaskulárnych liečiv v rámci jednotlivých anatomicko-terapeuticko-chemických podskupín. Modelovú skupinu tvorili pacienti mužského pohlavia vo veku ≥ 65 rokov, ktorým boli liečivá predpisované v priebehu roku 2018. Z celkového počtu vydaných balení boli najčastejšie expedované hypolipidemiká, liečivá s účinkom na renín-angiotenínový systém a betablokátory. Porovnaním liečiv s Európskym zoznamom potenciálne nevhodných liečiv boli detegované potenciálne nevhodné liečivá. Najčastejšie sa vyskytovali v podskupinách kardiaká, antihypertenzíva a blokátory kalciového kanála. V podskupine kardiaká bolo identifikovaných 6 potenciálne nevhodných liečiv (digoxín, propafenón, dronedarón, flekainid, amiodarón a trimetazidín). Antihypertenzíva obsahovali 2 potenciálne nevhodné liečivá moxonidín a rilmenidín. Nevhodným liečivom z podskupiny blokátorov kalciového kanálu bol verapamil. Farmakoterapia u starších pacientov by mala byť individuálna, bezpečná a účinná. Optimalizácia liečby by mala byť výsledkom spolupráce lekára a farmaceuta.

Kľúčové slová: farmakoterapia; potenciálne nevhodná preskripcia; srdcovocievne ochorenia; starší pacienti

ABSTRACT

As a result of medication overuse in patients over 65 years of age, pharmacotherapy is associated with the possible occurrence of potentially inappropriate medications. Currently, potentially inappropriate drugs are of interest to many scientific groups. In this research, the consumption of cardiovascular drugs was analyzed within different anatomical-therapeutic-chemical subgroups. The model group consisted of male patients aged ≥ 65 years who were prescribed drugs during 2018. Of the total number of packs dispensed, hypolipidemics, drugs with an effect on the renin-angiotensin system, and beta-blockers were the most frequently dispensed. Potentially unsuitable medicines were detected by comparing the medicines with the European List of Potentially Unsuitable Medicines. The most frequent subgroups were cardiac drugs, antihypertensives and calcium channel blockers. In the cardiac subgroup, 6 potentially inappropriate drugs were identified (digoxin, propafenone, dronedarone, flecainide, amiodarone and trimetazidine). Antihypertensives included 2 potentially inappropriate drugs, moxonidine and rilmenidine. An inappropriate drug from the calcium channel blocker subgroup was verapamil. Pharmacotherapy in elderly patients should be individualized, safe, and effective. Optimization of treatment should be a result of collaboration between physician and pharmacist.

Key words: cardiovascular diseases; elderly patients; pharmacotherapy; potentially inappropriate prescription

ÚVOD

Rýchle zmeny vo svetovej demografii spôsobili nárast počtu pacientov vyššieho veku žijúcich s rozličnými zdravotnými problémami, ktoré ovplyvňujú kvalitu ich života (Kaski, Tamargo, Savarese, 2020). Starší pacienti predstavujú špecifickú skupinu s charakteristickými funkčnými a morfologickými odlišnosťami. Pre farmakoterapiu v staršom veku je príznačné užívanie viacerých skupín liečiv, prítomnosť nežiaducich účinkov liečiv a ich vzájomných interakcií (Perpétuo a kol., 2021). Vzhľadom na fyziologické zmeny vo farmakokinetike a farmakodynamike môže byť pre lekárov pomerne náročné zvoliť vhodnú farmakoterapiu. Napriek výhodám užívania liekov u starších pacientov, súbežnosť chronických ochorení vedie k polypragmázii (polyfarmácii) a k samoliečbe (Hosseini a kol., 2018). Vzhľadom na uvedené skutočnosti je veľmi dôležité monitorovať účinnosť a bezpečnosť používaných liekov, keďže niektoré z nich sú klasifikované ako potenciálne nevhodné (PIM) pre starších ľudí (de Araújo a kol., 2020). Tieto liečivá sú definované ako liečivá s neistou terapeutickou účinnosťou, alebo tie, ktorých potenciálne nežiaduce reakcie prevažujú klinický úžitok (Pohontsch a kol., 2017). Preskripcia PIM je spojená s negatívnymi zdravotnými výsledkami, ktoré zahŕňajú nárast hospitalizácií či mortality (Cardwell a kol., 2020). Konkrétna predstava o užívaní PIM je nevyhnutná pre správnu a bezpečnú farmakoterapiu geriatrického pacienta (Roux a kol., 2019). Podľa Organizácie pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD, 2019) sú kardiovaskulárne ochorenia (KVO) spolu s rôznymi typmi nádorových ochorení v krajinách Európskej únie (EÚ) hlavnými príčinami úmrtnosti. Najdôležitejšími behaviorálnymi rizikovými faktormi vzniku KVO sú, podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO), nezdravá strava, nedostatok fyzickej aktivity, fajčenie, či užívanie alkoholu. Tieto rizikové faktory sa najčastejšie prejavujú zvýšeným krvným tlakom, zvýšenou hladinou glukózy a lipidov v krvi, nadváhou či obezitou. Identifikáciou pacientov s najvyšším rizikom KVO a zabezpečením vhodnej liečby je možné včas zabrániť predčasným odvrátiteľným úmrtiam (WHO, 2017).

MATERIÁL A METÓDY

Predmetom analýzy a ďalšieho spracovania boli dáta o spotrebe predpísaných humánnych liekov z anatomicko-terapeuticko-chemickej (ATC) skupiny C – kardiovaskulárny systém, ktoré poskytlo Národné centrum zdravotníckych informácií (NCZI). Databáza obsahovala informácie v podobe: ATC kód liečiva, ŠÚKL kód lieku a počet vydaných balení hradených z verejného zdravotného poistenia na území Slovenskej republiky. Údaje boli hodnotené u ambulantných pacientov mužského pohlavia vo veku ≥ 65 rokov, za obdobie od 01.01.2018 do 31.12.2018. Na základe Zoznamu kategorizovaných liekov, ktorý vydáva Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky, boli k jednotlivým ŠÚKL kódom priradené konkrétne obchodné názvy liekov a ich špecifické údaje. Bezpečnosť a vhodnosť farmakoterapie starších pacientov bola zhodnotená detegovaním prítomnosti PIM, s použitím EU(7)-PIM listu (Renom-Guiteras, Meyer, Thürmann, 2015). Vyhodnotené údaje boli spracované vo forme grafov v programe Microsoft Excel 2010.

VÝSLEDKY

Analyzovaný súbor zahŕňal celkovú spotrebu humánnych liekov na kardiovaskulárny systém (ATC C) v mužskej populácii, ktorú v roku 2018 predstavovalo 1 339 230 vydaných balení. Najviac zastúpenými skupinami podľa jednotlivých ATC podskupín boli hypolipidemiká (C10) – 22,61 % a liečivá s účinkom na renín-angiotenínový systém (RAS) (C09) – 22,39 % (viď graf 1). Tretiu najčastejšie predpisovanú podskupinu liečiv tvorili betablokátory (C07) – 19,87 %. Poradie ostatných podskupín je znázornené v grafe 1.

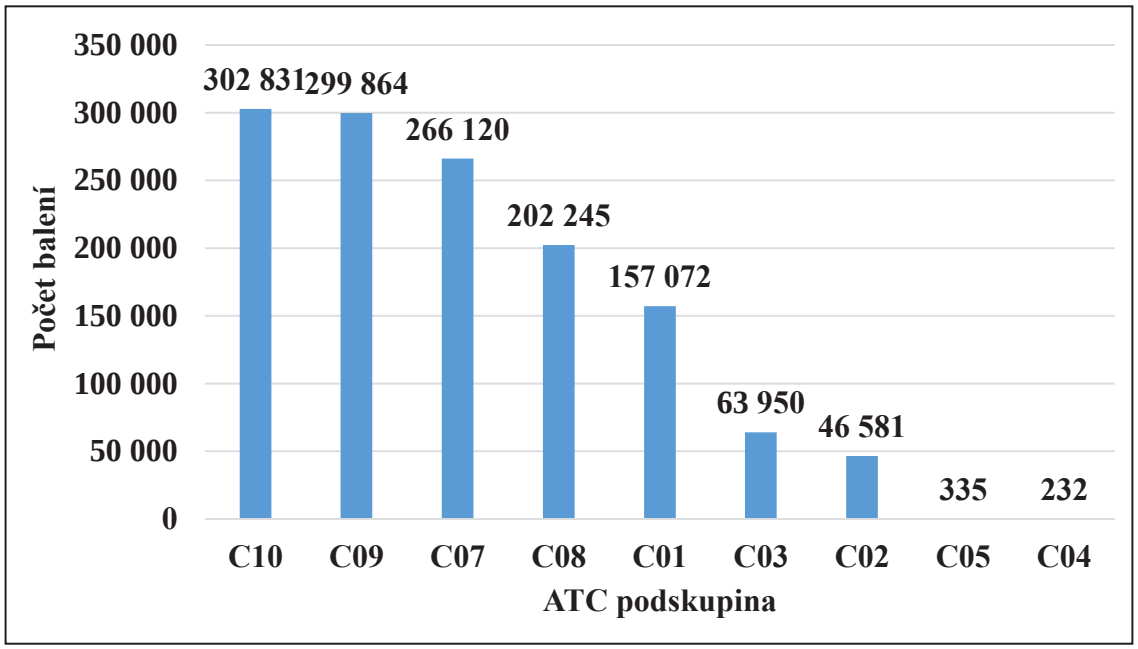
Najviac zastúpené liečivá v podskupine C10, C09 a C07

ATC podskupina hypolipidemiká (C10) bola reprezentovaná 10 rôznymi liečivami (viď graf 2) obsiahnutými v 62 kategorizovaných liekoch. Celkovo bolo z tejto skupiny vydaných 302 831 balení liekov. Najčastejšie predpisovanými liečivami boli atorvastatín, v počte 240 203 balení, simvastatín v 30 202 baleniach a kombinácia atorvastatínu s amlodipínom, v množstve 9763 balení. Najmenej predpisovaným liečivom bol fenofibrát. Najviac vydávanými liekmi boli Atoris 20 tbl flm 90 x 20 mg (30 650 balení), Torvacard Novum 20 mg tbl flm 90 x 20 mg (30 266 balení) a Atorvastatin Actavis 20 mg tbl flm 100 x 20 mg (19 271 balení).

Najpočetnejšou skupinou liečiv, z pohľadu ich rôznorodosti, bola podskupina liečiv s účinkom na renín-angiotenzínový systém (RAS) (C09). Obsahovala celkovo 27 liečiv a ich kombinácií. Celková spotreba v rámci tejto podskupiny predstavovala 299 864 vydaných balení 126 rôznych registrovaných humánnych liekov. Najviac zastúpenými liečivami boli trandolapril v množstve 79 765 balení, perindopril, v počte 46 217 balení liekov, kombinácia perindoprilu a amlodipínu v počte 35 687 balení. Ostatné liečivá boli zastúpené v menej ako 6 % (viď graf 3). Niektoré liečivá boli predpisované samostatne, ale aj v kombinácii s diuretikami, napr. kandesartan, irbesartan a telmisartan. Medzi dvojkombinácie liečiv s nižším percentuálnym zastúpením patrili dvojice ramipril a amlodipín a lizinopril a amlodipín. Najčastejšie vydávaným liekom na lekársky predpis v tejto skupine bol v počte 41 857 vydaných balení liek Prenessa 4 mg tbl 30 x 4 mg.

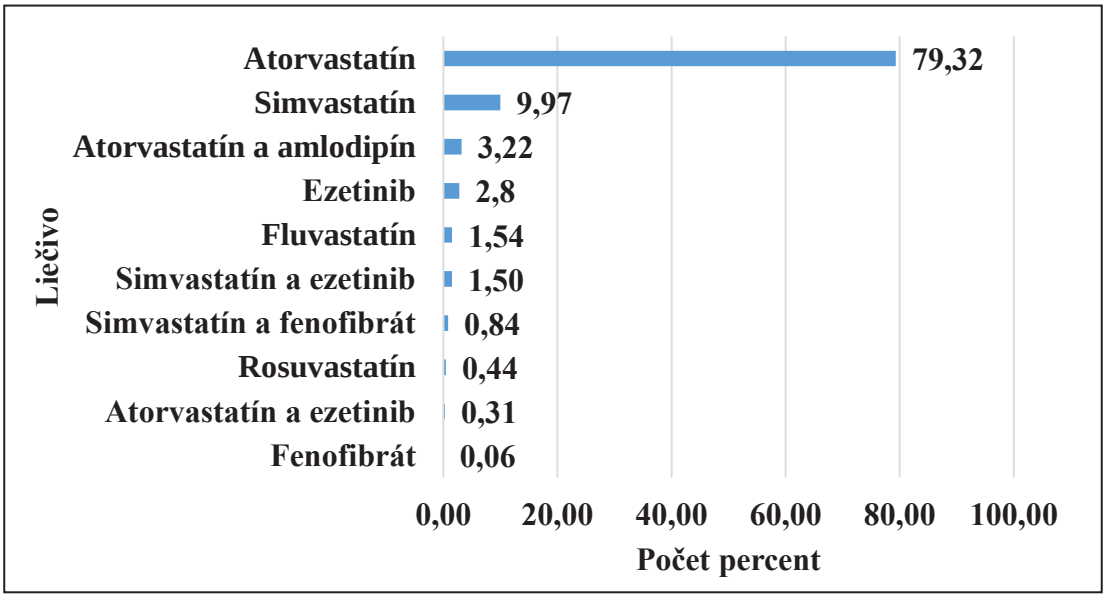
ATC podskupina betablokátorov (C07) obsahovala 8 predpisovaných liečiv. Často predpisovanými liečivami boli metoprolol, v množstve 87 417 balení, nebivolol v celkovom počte 63 852 balení, bisoprolol, v počte balení 59 179, karvedilol, v počte 25 217 balení, betaxolol, v množstve 9 791. Medzi liečivá, ktoré boli zastúpené menej ako 3 % patrili: atenolol, s počtom 5 897 balení, kombinácia bisoprololu s amlodipínom v množstve 5 343 vydaných balení, bisoprolol v kombinácii s tiazidmi vydanými v počte 9 424 balení (viď graf 4). Najčastejšie vydávaným liekom s počtom 63 852 expedovaných kusov bol Nebilet 5 mg tbl 28 x 5 mg.

Graf 1: Porovnanie ATC podskupín z hľadiska výdaja

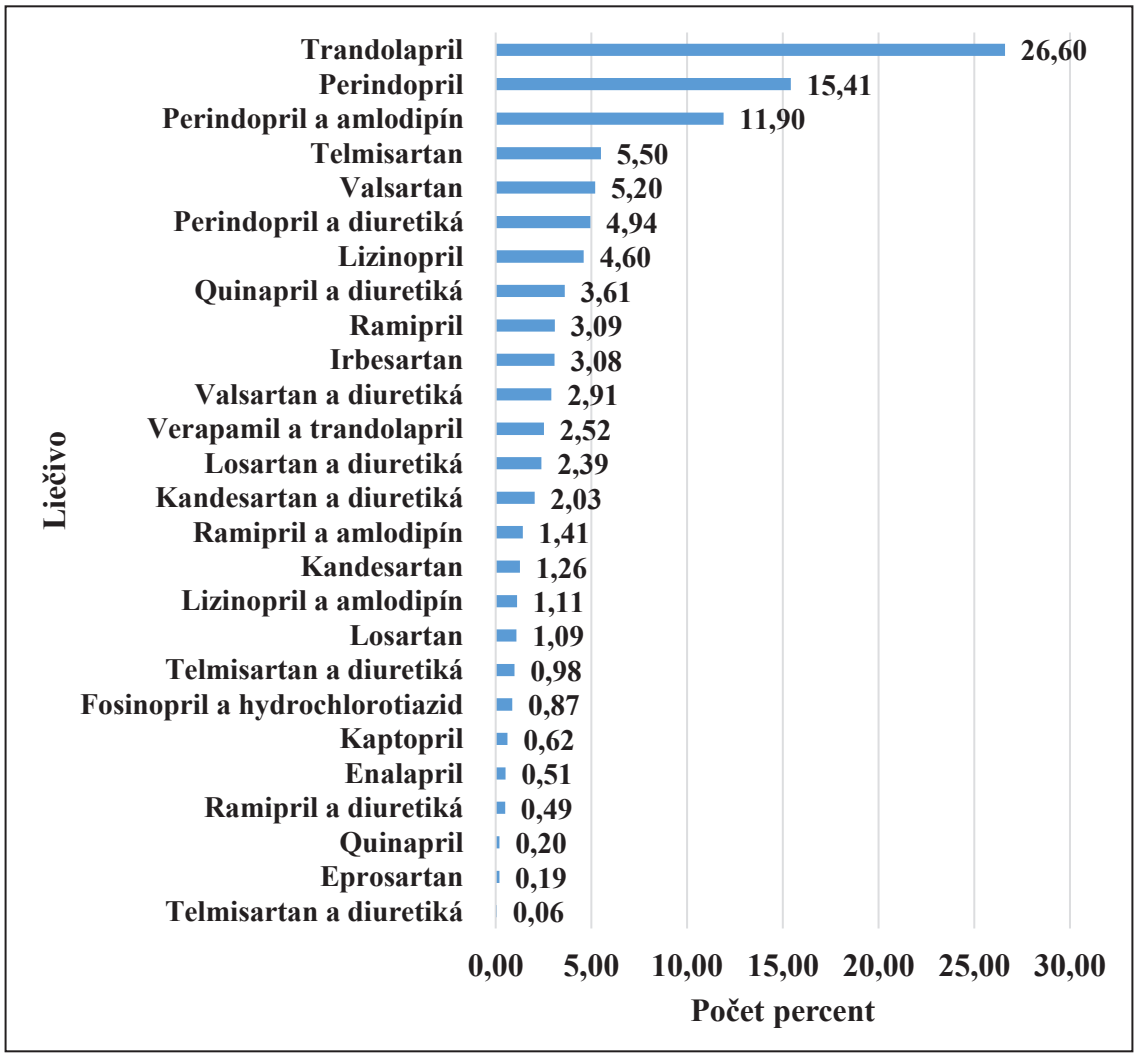


C01 – kardiaká, C02 – antihypertenzíva, C03 – diuretiká, C04 – periférne vazodilatanciá, C05 – vazoprotektíva, C07 – betablokátory, C08 – blokátory kalciového kanála, C09 – liečivá s účinkom na renín-angiotenzínový systém, C10 – hypolipidemiká

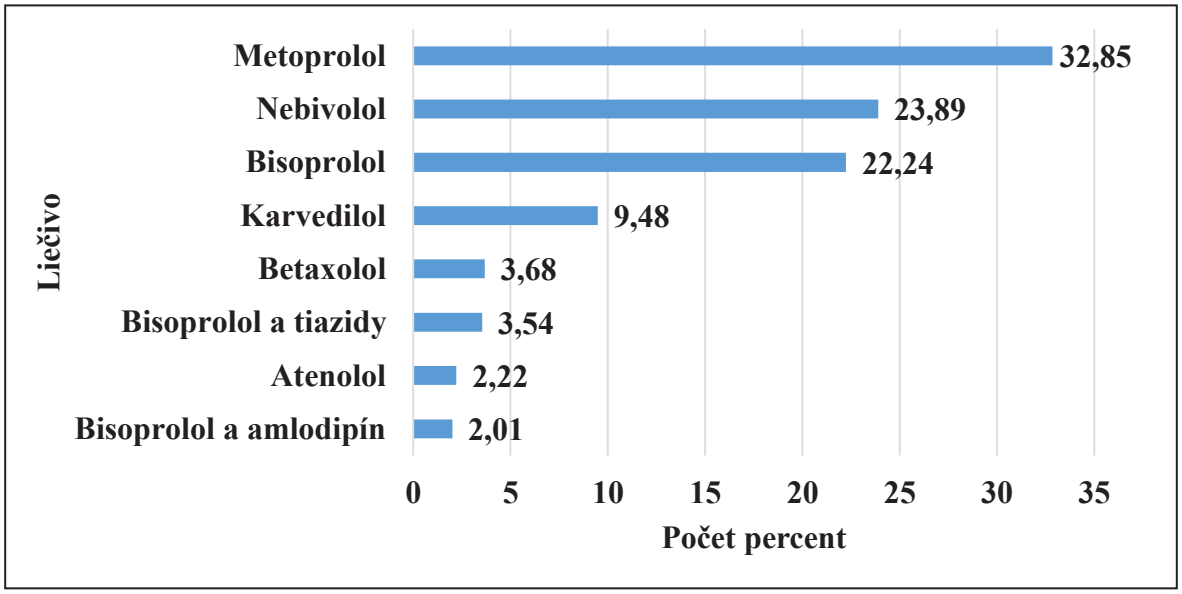
Graf 2: Zastúpenie liečiv z ATC podskupiny hypolipidemiká (C10)



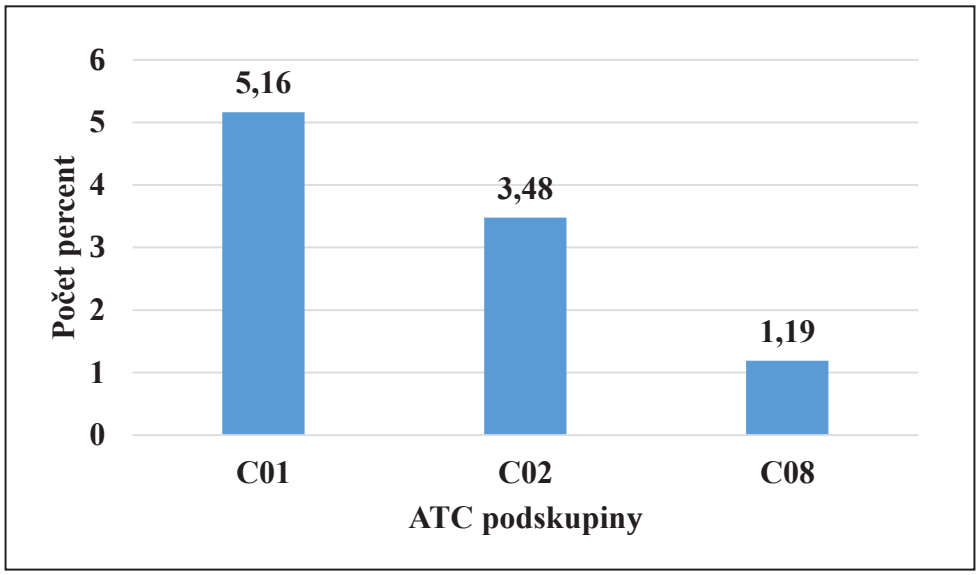
Graf 3: Zastúpenie liečiv v ATC podskupine liečivá s účinkom na RAS (C09)



Graf 4: Zastúpenie liečiv z ATC podskupiny betablokátory (C07)



Graf 5: Percentuálne vyjadrenie najčastejšieho výskytu PIM v jednotlivých ATC podskupinách



C01 – kardiaká, C02 – antihypertenzíva, C08 – blokátory kalciového kanála

ATC podskupiny s najväčším zastúpením PIM

Najčastejší výskyt PIM bol detegovaný v ATC podskupinách kardiaká (C01), antihypertenzíva (C02) a blokátory kalciového kanála (C08) (viď graf 5).

Podskupina kardiaká obsahovala celkovo 13 predpisovaných liečiv. Zistili sme, že v tejto podskupine bolo prítomných 6 PIM, predstavujúcich 46,15 % z celkového výdaja. Konkrétne šlo o liečivá trimetazidín, propafenón, digoxín, dronedarón, flekainid a amiodarón. Liečivo trimetazidín obsahovalo 34 440 balení liekov (21,93 %); propafenón 16 870 balení (10,74 %); digoxín obsahovalo 9 612 balení liekov (6,12 %); amiodarón bol v 6 023 baleniach (3,83 %). Dronedarón bol liečivom obsiahnutým v 1 769 baleniach liekov (1,13 %) a flekainid obsahovalo 349 balení liekov (0,22 %).

Podskupina antihypertenzíva obsahovala 2 liečivá predpisované celkovo v 46 581 baleniach humánnych liekov. Boli to liečivá moxonidín v množstve 34 373 balení (73,79 %) a rilmenidín v počte 12 208 balení (26,21 %). Obe liečivá patria medzi potenciálne nevhodné a sú uvedené v EU(7)-PIM liste.

ATC podskupina blokátory kalciového kanála obsahovala 6 liečiv vydávaných v 202 245 baleniach liekov. Medzi blokátory kalciového kanála patrili liečivá verapamil, felodipín, nimodipín, nitrendipín, amlodipín a lacidipín. Podľa EU(7)-PIM listu, medzi PIM liečivá tejto skupiny patria verapamil, nifedipín a diltiazem. V našom súbore dát sa objavovalo len liečivo verapamil. Bol vydávaný v množstve 15 934 balení humánnych registrovaných liekov (7,88 %).

DISKUSIA

Z hľadiska farmakologickej liečby sú starší pacienti vo veku ≥ 65 rokov považovaní za vysoko vulnerabilnú časť populácie a patria k najrýchlejšie rastúcej skupine pacientov (Wawruch a kol., 2008). Starší pacienti s chronickými ochoreniami a kombinovanou liečbou sú vystavení vysokému riziku vzniku preskripčnej kaskády. S pribúdajúcim vekom sú spojené aj fyziologické zmeny kardiovaskulárneho systému (KVS). Podľa štúdie Hosseini a kol. (2018) vykonanej na vzorke 1 616 pacientov vo veku ≥ 65 rokov boli najviac zastúpenými skupinami liečiv práve liečivá s účinkom na KVS, ktoré užívalo 35,40 % mužov a 50,05 % žien. Tieto výsledky potvrdzujú aj

naše výsledky. V priebehu kalendárneho roku 2018 sme u ambulantných pacientov mužského pohlavia vo veku ≥ 65 rokov zaznamenali 36,19 % preskripciu liečiv práve s účinkom na KVS.

U starších pacientov ≥ 65 rokov je vyššia prevalencia výskytu aterosklerotických kardiovaskulárnych ochorení. Najúčinnejšou terapiou aterosklerózy je liečba statínmi, ktoré preukázateľne znižujú riziko mŕtvice a koronárnych ochorení (Švihovec a kol., 2018). V súbore dát boli podľa ATC podskupiny najviac zastúpené hypolipidemiká, ktoré reprezentovali atorvastatín, simvastatín a kombinácia atorvastatínu s amlodipínom. Nežiaduce účinky statínov sa objavujú zvyčajne pri vysokých dávkach a v prítomnosti iných liečiv, zasahujúcich do metabolizmu statínov. U starších pacientov bol preukázaný lepší terapeutický efekt v liečbe atorvastatínom užívaním nižších dávok, konkrétne v dávke 5 mg/deň, než vo vyšších dávkach 10 mg/deň. Podľa Kuželovej a kol. (2019) je v terapii starších pacientov pri väčšine hypolipidemík overené použitie nižšej dávky.

Starnutie je spojené s nárastom chronických ochorení. Starší pacienti s väčšou pravdepodobnosťou užívajú viacero liekov, preto sú vystavení väčšiemu riziku potenciálne nevhodných liečiv (PIM) (Roux a kol., 2020). S problematikou nevhodnej preskripcie (inappropriate prescribing) a nevhodných liečiv u starších pacientov sa prvýkrát zaoberali v 90. rokoch minulého storočia v USA pri vytvorení tzv. Beersových kritérií. Zahŕňali poznatky z psychofarmakológie, farmakoepidemiológie, aplikovanej geriatrickej farmakológie a geriatrickej medicíny. Ich cieľom bolo edukovať lekárov v zariadeniach sociálnych služieb, a tým znížiť výskyt nežiaducich účinkov a liekových komplikácií u starších pacientov (Komjáthy, 2020).

Bartošovič a kol. (2023) vo svojej klinickej štúdii, ktorej sa zúčastnilo 388 seniorov vo veku nad 65 rokov žijúcich v dvoch rôznych sociálnych zariadeniach, uvádza rapídny nárast polyfarmácie v priebehu 18 rokov. Pozorovaný bol výrazný rozdiel v počte pravidelne užívaných liekov o viac ako 50 %. Polyfarmáciou a správnou farmakoterapiou sa zaoberal aj projekt európskych krajín SHELTER (Services and Health for Elderly in Long Term Care), ktorý hodnotil 4 023 seniorov z 8 európskych krajín. Počet užívaných liekov u starších pacientov bol v priemere 7. V súbore dát bolo 74,0 % pacientov užívajúcich 5 a viac liekov a 24,3 % pacientov užívajúcich 10 a viac liekov (Onder a kol., 2012). Európsky zoznam potenciálne nevhodných liekov EÚ(7)-PIM bol vytvorený na základe nemeckého zoznamu potenciálne nevhodných liekov PRISCUS a ďalších zoznamov PIM pochádzajúcich z USA, Kanady a Francúzska. Vypracovali ho odborníci zo siedmich európskych krajín a umožňuje identifikovať a porovnávať preskripciu PIM u starších pacientov v jednotlivých európskych krajinách. Zoznam obsahuje nevhodné liečivo, dôvod nevhodnosti, úpravu dávky pri špeciálnych stavoch, ako je napr. znížená renálna funkcia a vhodnú alternatívu (Renom-Guiteras, Meyer, Thürmann, 2015).

Rovnako ako v predchádzajúcich štúdiách (Komjáthy, 2016; Hosseini a kol., 2018) analyzujúcich prekripciu PIM u starších pacientov vo veku ≥ 65 rokov bol zistený výskyt preskripčných chýb u viac ako 30 %. Išlo o nesprávnu voľbu geriatrickej dávky, nesprávny dávkovací interval, liekovú duplikáciu, relatívnu kontraindikáciu a liekovú interakciu. Prítomnosť väčšieho množstva PIM môže súvisieť s komorbiditami a polyfarmáciou u starších pacientov. V dvoch zdravotníckych zariadeniach v Českej republike bola sledovaná prevalencia výskytu KVS PIM u seniorov vo veku nad 65 rokov s využitím EU(7)-PIM listu. Zistilo sa, že prevalencia aspoň jedného PIM bola 77,6 %. Analýza poukazuje na veľmi vysokú prevalenciu KVS PIM u seniorov, aj keď štúdia bola vykonávaná na malej vzorke pacientov (Bartošovič a kol., 2023).

V našej štúdii sme zistili, že z hľadiska ATC C sa najviac PIM vyskytovalo v podskupinách kardiaká, antihypertenzíva a blokátory kalciového kanála. V podskupine kardiaká to boli trimetazidín, propafenón, digoxín, amiodarón, dronedarón, a flekainid. Samotný trimetazidín sa používa na liečbu ischemickej choroby srdca (*angina pectoris*). Lekári by ho nemali predpisovať pacientom s Parkinsonovou chorobou a pacientom s vážnou poruchou

obličiek. Na základe EU(7)-PIM listu sa v hodnotenom súbore vyskytoval aj digoxín. Užívanie digoxínu je spojené so zvýšeným rizikom vzniku intoxikácie u starších pacientov. Pri dávke nad 0,125 mg/deň je u starších pacientov zvýšené riziko kumulácie liečiva v organizme. Nevhodná je aj kombinácia digoxínu s liečivami verapamil a diltiazem. Pri tachykardii a fibrilácii predsiení je vhodná náhrada digoxínu za betablokátory okrem propanololu, soltalolu a labetalolu. Misiazek a kol. (2005) zistili, že viac ako 80 % starších pacientov vo veku ≥ 65 rokov užívalo vyššie dávky digoxínu, v porovnaní s odporúčanými dávkami. V dôsledku starnutia je vzhľadom na farmakokinetické zmeny odporúčané začať nižšími dávkami, s následnou úpravou a pod neustálym lekárskym dohľadom. Vyššie riziko liekových interakcií a nežiaducich účinkov bolo popísané pri liečivách flekainid, propafenón a dronedarón. Hoci sme sa venovali PIM u seniorov len pri liečivách s účinkom na KVS, môžeme potvrdiť relatívne vysoký výskyt užívania PIM u seniorov, porovnaním so štúdiami vykonávanými v iných európskych krajinách. Prevalencia výskytu PIM u starších pacientov korelovala s výsledkami zistenými v Českej republike, Taliansku a Fínsku (Wawruch a kol., 2006).

V rámci celkovej populácie starších pacientov je predložená štúdia týkajúca sa PIM preskúmaná iba v malom rozsahu. Pozorovali sme preskripciu PIM u starších pacientov mužského pohlavia vo veku ≥ 65 rokov, ktorí boli liečení v ambulanciách. Dostupné vedecké štúdie zaoberajúce sa PIM hodnotili starších pacientov, ktorí boli hospitalizovaní v nemocničných zariadeniach alebo v zariadeniach sociálnej starostlivosti. Na základe dostupných informácií pomocou ATC nevieme priradiť predpísané liečivá a vydané lieky ku konkrétnym pacientom.

Dobrým pomocníkom na zvládnutie bezpečnej farmakoterapie staršieho pacienta môže byť aj elektronické zdravotníctvo. Vývoj elektronického predpisovania liečiv by mohol v budúcnosti ponúknuť lekárnikom možnosť nahliadnuť do zdravotnej dokumentácie pacienta a pomôcť včasne odhaliť problémy s preskripciou liečiv (Quek a kol., 2023).

ZÁVER

V súbore dát sme sa zamerali na analýzu potenciálne nevhodnej preskripcie, určenej ambulatným pacientom v mužskej populácii vo veku ≥ 65 rokov s účinkom na KVS. Najviac predpisovanými podskupinami liečiv z ATC skupiny C – kardiovaskulárny systém boli hypolipidemiká, liečivá s účinkom na RAS a betablokátory. Najčastejšie predpisovanými liečivami boli atorvastatín, trandolapril a metoprolol. V našom hodnotení sme zistili nárast užívania potenciálne nevhodných liečiv. Boli to liečivá trimetazidín digoxín, atorvastatín, rilmenidín, moxonidín, enalapril, kaptopril, amiodarón, propafenón. Správnym výberom liečiva s prihliadnutím na diagnózu, celkový zdravotný stav pacienta dokážeme docieliť bezpečnú a racionálnu farmakoterapiu u starších pacientov a zabezpečiť im dôstojný a kvalitný život.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola podporená grantovým projektom MUNI/A/1189/2022.

ZOZNAM LITERATÚRY

Bartošovič, I., Bartošovičová, Ivánková, I., Zrubáková, K., Mikus, P., Ochaba, R., Goljerová, I.: Porovnanie polyfarmácie a farmakoterapie u seniorov v sociálnych inštitúciách v rokoch 2001 a 2019 [Comparison of polyprahracy and pharmacotherapy among seniors in social institutuons in 2001 and 2019]. *Vnitřní lékařství*, 2023, 69 (2), 4 – 9.

Cardwell, K., Kerse, N., Hughes, C. M., Teh, R., Moyes, S. A., Menzies, O., Rolleston, A., Broad, J. B., Ryan, C.: Does potentially inappropriate prescribing predict an increased risk of admission to hospital and mortality? A longitudinal study of the 'oldest old'. *BMC Geriatr.*, 2020, 20 (28), 1 – 9.

de Araújo, N. C., Silveira, E. A., Mota, B. G., Neves Mota, J. P., de Camargo Silva, A. E. B., Alves Guimarães, R., Pagotto, V.: Potentially inappropriate medications for the elderly: Incidence and impact on

mortality in a cohort ten-year follow-up. *PLoS One*, 2020, 15 (10), e0240104.

Hosseini, S. R., Zabihi, A., Amiri, S. R. J., Bijani, A.: Polypharmacy among the elderly. *Journal of Mid-Life Health*, 2018, 9 (2), 97 – 103.

Kaski, J. K., Tamargo, J., Savarese, G.: Cardiovascular pharmacotherapy in older people: challenges posed by cardiovascular drug prescription in the elderly. *European Heart Journal – Cardiovascular Pharmacotherapy*, 2020, 6 (5), 277 – 279.

Komjáthy, H.: Vplyv farmakoterapie na starších pacientov [Effect of pharmacotherapy on elderly patients]. *Praktické lekárnictvo*, 2020, 10 (1), 13 – 16.

Kužeľová, M., Jankyová, S., Foltánová, T., Puchoň, E.: *Bezpečná farmakoterapia seniorov* [Safe Pharmacotherapy of Seniors], 1 vyd. Bratislava, 2019. 77 – 97.

Misiazek, B., Heckman, G. A., Merali, F., Turpie, I. D., Patterson, J. Ch., Flett, N., McKevie, R. S.: Digoxin prescribing for heart failure in elderly residents of long-term care facilities. *The Canadian Journal of Cardiology*, 2002, 21 (3), 6 – 281.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). "Mortality from circulatory diseases", in Health at a Glance 2019: OECD Indicators, OECD Publishing, Paris. https://www.oecd--ilibrary.org/sites/4b1b32a8-en/index.html?itemId=/content/component/4b1b32a8-en. Accessed October 23, 2023.

Onder, G., Liperoti, R., Fialova, D., Topinkova, E., Tosato, M., Danese, P., Gallo, P. F., Carpenter, I., Finne-Soveri, H., Gindin, J., Bernabei, R. Landi, F.: Polypharmacy in nursing home in Europe: results from the SHELTER study. *Journal of Gerontology: MEDICAL SCIENCES*, 2012, 67 A (6), 698 – 704.

Perpétuo, C., Plácido, A. I., Rodrigues, D., Aperta, J., Pineiro-Lamas, M., Figueiras, A., Herdeiro, M. T., Roque, F.: Prescription of potentially inappropriate medication in older inpatients of an internal medicine ward: concordance and averlap Among the EU(7)-PIM list and Beers and STOPP criteria. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12 (34), 12 – 64.

Pohontsch, N. J., Heser, K., Löffler, A., Haenisch, B., Parker, D., Luck, T., Riedel-Heller, S. G., Maier, W., Jessen, F., Scherer, M.: General practitioners' views on (long-term) prescription and use of problematic and potentially inappropriate medication for oldest-old patients – a qualitative interview study with GPs (CIM-TRIAD study). *BMC Fam. Pract.*, 2017, 18 (1), 22, 1 – 12.

Quek, H. W., Etherton-Beer, Ch., Page, A., McLachan, A. J., Lo, S. Y., Naganathan, V., Kearney, L., Hilmer, S. N., Comans, T., Mangin, D., Lindley, R. I., Potter, K.: Deprescribing for older people living in residential aged care facilities: pharmacist recommendations, doctor acceptance and implementation. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 2023, 107 (4), 10 – 49.

Renom-Guiteras, A., Meyer, G., Thürmann, P. A.: The EU(7)-PIM list: a list of potentially inappropriate medications for older people consented by experts from seven European countries. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2015, 71 (3), 861 – 875.

Roux, B., Sirois, C., Simard, M., Gagnon, M. E., Laroche, M. L.: Potentially inappropriate medications in older adults: a population-based cohort study. *Family Practice*, 2020, 37 (2), 173 – 179.

Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., Votava, M.: *Farmakologie*. [Pharmacology]. Praha: Grada Publishing, a. s., 2018. 701 – 756.

Wawruch, M., Foltánová, T., Žikavská, M., Kuželová, M., Weber, P., Tisoňová, J., Mladosievičová, B., Krutý, P., Kriška, M.: Indikátory kvality farmakoterapia v geriatrii [Quality indicators of pharmacotherapy in geriatrics]. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2006, 3 (20), 135–139.

World Health Organisation (WHO). Ageing, 2017. <https://www.who.int/health-topics/cardiovasculardiseases#tab=tab_1>. Accessed December 20, 2022.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 4: 50 – 57, 2023

ANALÝZA PRESKRIPCIE ANTIBIOTÍK V PRAXI STOMATOLÓGA

ANALYSIS OF ANTIBIOTIC PRESCRIPTION IN THE PRACTICE OF DENTISTRY

Nagyová, Sára[1]; Piešová, Elena[2]; Bocko, Pavol[3]

[1]Lekáreň Azaela, Škultétyho 1, 982 01 Tornaľa
[2] Katedra biológie a fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
[3]MiMaRiJe s. r. o., Bohúňovo 52, 982 01Tornaľa
Slovenská republika

elena.piesova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Štúdia sa zameriava na analýzu preskripcie antibiotík v stomatologickej praxi. Obsahuje základnú charakteristiku jednotlivých antibiotík, ale predovšetkým sa venuje analýze lekárskych predpisov, ktoré boli vystavené zubným lekárom počas 2 mesiacov. Analyzovaný súbor tvorilo 94 pacientov vo veku od 6 do 89 rokov. Zistili sme, že medzi najčastejšie predpisované antibiotiká patril amoxicilín v kombinácii s kyselinou klavulánovou, cefprozil a klindamycín. Nakoniec sme získané výsledky znázornili graficky, vyjadrili v percentách a porovnali so zahraničnými odporúčaniami pre ich preskripciu, čím sme splnili náš hlavný cieľ, ktorým bolo zhodnotiť, ako sa reálne v praxi stomatológa predpisujú antibiotiká.

Kľúčové slová: analýza; antibiotiká; preskripcia; stomatológ

ABSTRACT

The study is focused on the analysis of prescription of antibiotics in dental practice. It also contains a basic characterization of various antibiotics, but first of all it is devoted to the analysis of medical prescriptions which were issued by a dentist for 2 months. The analysed group consisted of 94 patients aged between 6 and 89 years. We found that the most frequently prescribed antibiotics included amoxicillin combined with clavulanic acid, cefprozil and clindamycin. Finally, we illustrated the obtained results graphically, expressed as a percentage and compared with the foreign recommendations of prescription, thus fulfilling our main goal which was to show how antibiotics are actually prescribed in dental practice.

Key words: analysis; antibiotics; dentist; prescription

ÚVOD

Vo všeobecnosti antibiotiká predstavujú jedny z najčastejšie predpisovaných a vydávaných liekov. Ide o lieky používané najmä na terapiu infekcií vyvolaných rôznymi bakteriálnymi druhmi. Viaceré baktérie sú súčasťou normálnej ústnej mikroflóry, avšak okrem nich existujú aj druhy, ktoré sa podieľajú na vzniku ochorení ústnej dutiny (Patil a kol., 2013). Medzi tie môžeme zaradiť napr. odontogénne infekcie, na ktoré sa indikujú práve antimikrobiálne látky. Z toho vyplýva, že antibiotiká tvoria súčasť praxe nielen farmaceuta, ale aj stomatológa (Berberi a kol., 1997). Antibiotiká sa v zubolekárskej praxi môžu aplikovať terapeuticky aj profylakticky, avšak musia sa zachovať základné princípy antibiotickej terapie.

Našim zámerom bolo zhrnúť najdôležitejšie informácie o jednotlivých antibiotikách, priblížiť preskripciu antibiotík z hľadiska stomatológie, ako aj predstaviť najvhodnejšie antibiotiká pre dentálne indikácie a taktiež poukázať na ich reálnu preskripciu v praxi bežného stomatológa. Zaoberať sa touto tematikou sme pokladali za dôležité aj preto, že v súčasnosti môžeme pozorovať nadmernú preskripciu antibiotík až ich zneužívanie v rôznych oblastiach medicíny, tak aj v stomatológii, aj keď ich neodôvodnené užívanie zvyšuje náklady na terapiu a predstavuje riziko antimikrobiálnej rezistencie.

MATERIÁL A METÓDY

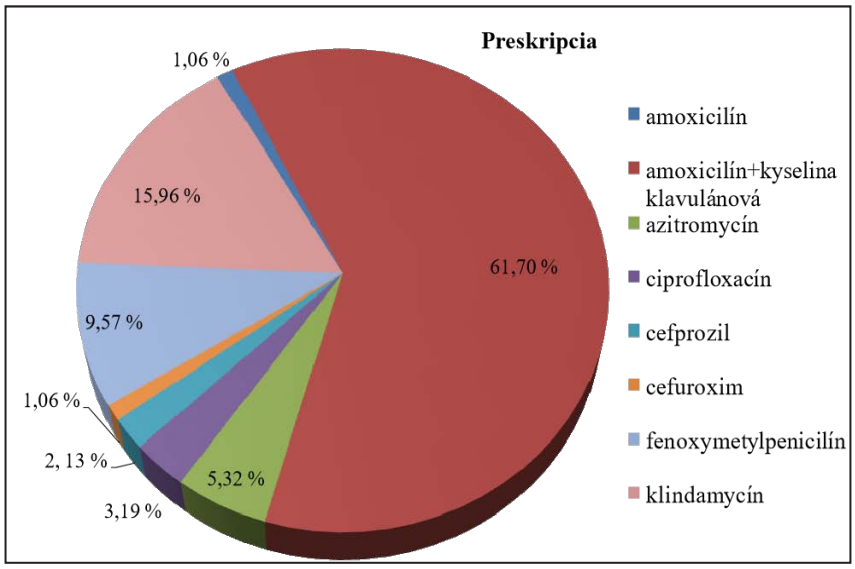
Všetky údaje potrebné na vykonanie analýzy boli získané v spolupráci so stomatologickou ambulanciou MiMaRiJe s. r. o. v Tornali. Ako metodiku na uskutočnenie analýzy sme zvolili retrospektívny spôsob, teda sme zbierali údaje z minulých záznamov a najdôležitejším materiálom bol samotný lekársky softvér stomatológa, pomocou ktorého sme vyhľadali zubným lekárom vystavené predpisy v rámci nami skúmaného časového obdobia. Konkrétne sa jednalo o obdobie 2 mesiacov od 19. januára 2021 do 19. marca 2021. Spomedzi vyhľadaných receptov sme sa zamerali len na predpisy s obsahom antibiotických látok. Celkovo sme tak spracovali 94 predpisov, čo zodpovedalo preskripcii antibiotík jedného stomatológa v súkromnej ambulancii. Z receptúrnych blankiet sme zistili potrebné údaje na uskutočnenie analýzy, a to pohlavie a vek pacientov, predpísané liečivo, diagnózu a dĺžku terapie antibiotikami. Zozbierané dáta sme porovnali so zahraničnými štúdiami a odporúčaniami pre preskripciu antibiotík, po čom nasledovala grafická interpretácia výsledkov. Pre lepší prehľad sme naše zistenia spracovali vo forme tabuliek a grafov. Počas získavania a spracovania údajov a výsledkov sme postupovali v súlade so zákonom o ochrane osobných údajov.

VÝSLEDKY

Súbor pacientov, ktorým boli indikované antibiotiká v ambulancii zubného lekára, predstavoval 94 osôb. Z uvedeného celkového počtu 63,83 % tvorili ženy (60 pacientok) a 36,17 % muži (34 pacientov). Recepty boli vystavené rôznym vekovým kategóriám od 6 do 89 rokov, pričom priemerný vek pacientov bol 40,29 roka a najviac antibiotík bolo predpísaných pre osoby od 31 – 40 rokov.

Počas analýzy sme zistili predpis rôznych skupín antibiotík: penicilíny, makrolidy, cefalosporíny, fluorochinolóny a linkozamidy. Konkrétne išlo o 8 aplikovaných liečiv, a to: amoxicilín samotný (Duomox 500 mg), amoxicilín v kombinácii s kyselinou klavulánovou (Amoksiklav 375 mg aj 625 mg, Augmentin 625 mg, Medoclav 625 mg), azitromycín (Azitromycin Mylan 500 mg), cefprozil (Cefzil 500 mg), cefuroxim (Zinnat 500 mg), ciprofloxacín (Ciprofloxacin Sandoz 500 mg), fenoxymetylpenicilín (V PNC 750 mg) a klindamycín (Dalacin C 150 mg aj 300 mg). Naše výsledky jednoznačne ukázali, že najčastejšie používaným antibiotikom v stomatologických indikáciách bol amoxicilín kombinovaný s klavulanátom (viď graf 1). V nestomatologických indikáciách sa predpisoval ciprofloxacín – až 100 % receptov tvorila diagnóza spadajúca pod choroby dýchacieho systému (J01.0 – zápal čeľustnej dutiny). Antibiotiká z cefalosporínovej rady, konkrétne cefprozil sa používali iba

Graf 1: Predpísané antibiotiká



Tab. 1: Prehľad diagnóz a ich percentuálny podiel

Kód diagnózy	Názov	Percentuálny podiel diagnózy
K00.8	Iná porucha zubného vývinu	14,89
K03.8	Iné choroby tvrdých tkanív zubov, bližšie určené	5,32
K04.0	Zápal zubnej drene	1,06
K04.4	Akútna apikálna periodontitída dreňového pôvodu	3,19
K04.5	Chronická apikálna periodontitída	18,09
K04.6	Periapikálny absces s fistulou	8,51
K05.0	Akútny zápal ďasien	1,06
K05.1	Chronický zápal ďasien	1,06
K05.4	Parodontóza	5,32
K08.1	Strata zubov po úraze, extrakciou alebo lokálnou chorobou parodontu	2,13
K08.3	Retinovaný zubný koreň [radix relicta]	18,09
K10.3	Alveolitída čeľustí	6,38
K11.3	Absces slinnej žľazy	1,06
K12.3	Zápal sliznice úst (ulcerózny)	2,13
J01.0	Akútny zápal čeľustnej dutiny	3,19

u pacientov, ktorí mali v anamnéze potvrdenú alergiu na penicilíny.

Zistili sme rôzne dĺžky antibiotickej terapie, pričom priemerná dĺžka bola 6 dní. Odlišnosti v trvaní liečby súviseli aj s rôznymi dávkovacími schémami jednotlivých antibiotík. Najdlhšie (10 dní) sa užíval V PNC s účinnou látkou fenoxymetylpenicilín, ktorý sa podával každých 8 hodín. S rovnakým časovým odstupom sa užívali aj lieky s obsahom amoxicilínu a inhibítora betalaktamázy, ktoré sa podávali po dobu

7 dní, v dvoch prípadoch až 14 dní. Samotný amoxicilín tiež vyžadoval sedemdňovú liečbu. Po kratšiu dobu sa bral klindamycín (5 a pol dňa). Liečba ciprofloxacínom a cefalosporínmi (cefprozilom a cefuroximom) trvala 5 dní s frekvenciou podávania každých 12 hodín. V prípade makrolidu azitromycínu, ktorý sa dávkuje každých 24 hodín, zvyčajne trojdňová terapia nestačila. Z piatich pacientov liečených azitromycínom až štyria potrebovali liečbu trvajúcu 6 dní.

V analyzovanom súbore sme sa stretli s diagnózami z dvoch skupín Medzinárodnej klasifikácie chorôb (MKCH). Väčšina (93,75 %) z nich spadala pod choroby tráviaceho traktu (K00 – K93), len jedna diagnóza bola zo skupiny chorôb dýchacieho systému (J00 – J99) (viď tab. 1).

Ako sme už vyššie spomínali, najčastejším liečivom bol amoxicilín klavulanát; z uvedeného aj vyplýva, že väčšina diagnóz sa liečila touto kombináciou, dokonca pri zápale zubnej drene (K04.0) a akútnej apikálnej periodontitídy (K04.4) boli recepty vystavené iba na toto liečivo. Pacientom trpiacim akútnym (K05.0) a chronickým zápalom ďasien (K05.1) sa indikoval len fenoxymetylpenicilín a na liečbu abscesu slinnej žľazy (K11.3) iba azitromycín. Tie sa však vyskytovali len po jednom prípade. Viac signifikantné zistenie bolo v prípade akútneho zápalu čeľustnej dutiny (J01.0). Fluorochinolón ciprofloxacín sa totiž nepoužíval v stomatologických indikáciách vôbec, predpisoval sa výlučne na túto diagnózu spadajúcu už pod choroby dýchacej sústavy. Dané ochorenie bolo potvrdené röntgenovým snímkom v ambulancii zubného lekára a následne sa tam indikovala aj liečba.

Preskripciu antibiotík môžeme analyzovať aj v súvislosti veku a diagnózy. Mladších pacientov skôr postihovala iná porucha zubného vývinu (K00.8), chronický zápal ďasien (K05.1) a zápal zubnej drene (K04.0). Osoby stredného veku trpeli inými chorobami tvrdých tkanív zubov, periapikálnym abscesom s fistulou, akútnym zápalom ďasien a abscesom slinnej žľazy. Tiež sa im aplikovali antibiotiká s profylaktickým účelom po extrakcii zubov. U starších pacientov sa vyskytovala chronická apikálna periodontitída, parodontóza, alveolitída čeľustí a ulcerózny zápal sliznice úst. Približne s rovnakým zastúpením sme sa u všetkých troch vekových kategórií stretli s akútnou apikálnou periodontitídou dreňového pôvodu, nekrózou zubnej drene, retinovaným zubným koreňom a akútnym zápalom čeľustnej dutiny.

DISKUSIA

Antibiotiká majú nezastupiteľnú úlohu v praxi zubného lekára. Počas analýzy preskripcie, ktorá trvala 2 mesiace, sme sa stretli s pomerne veľkým množstvom antibiotických predpisov. Zvyšujúci sa trend predpisovania antibiotík stomatológmi naznačila aj štúdia Pipalovej, Vlčeka a Slezáka z roku 2014. Štúdia hodnotila preskripciu antibiotík v Českej republike.

Pipalová, Vlček a Slezák (2014) ako najčastejšie predpisované liečivo uvádzajú amoxicilín v kombinácii s kyselinou klavulánovou (Augmentin) a klindamycín (Dalacin C). Toto zistenie koreluje aj s našimi výsledkami, avšak okrem Augmentinu sa predpisovali aj iné lieky s obsahom amoxicilínu a inhibítora betalaktamázy, a to Amoksiklav a Medoclav. Taktiež uvádzajú, že v dôsledku častejšieho predpisovania aminopenicilínov s inhibítormi betalaktamáz a klindamycínu dochádza k poklesu použitia úzkospektrálnych penicilínov, tetracyklínov a makrolidov. Viaceré štúdie udávajú pokles v predpisovaní fenoxymetylpenicilínu, túto skutočnosť vysvetľujú tým, že dané liečivo sa musí užiť s dostatočným odstupom pred jedlom, oproti amoxicilínu, ktorého dávkovanie je nezávislé na príjme potravy (Palmer a kol., 2016; Ford a kol., 2017; Fouad a kol., 2017; Teoh a kol., 2018). Iné literatúry ako dôvod naznačujú, že zubári môžu mať pochybnosti o účinku tohto liečiva a taktiež, že si často neuvedomujú, že fenoxymetylpenicilín je preferovaným liečivom na liečbu endodontických infekcií (Eick, Pfister, Straube, 1999; Handal a Olsen, 2000; Handal a kol., 2005). Všetky tieto štúdie potvrdzujú aj naše zistenia. Na odlišné výsledky ale poukazujú zdroje Akhavan, Khanna, Vijhani (2000) a Halling a kol. (2017), podľa ktorých najčastejšie indikovaným liečivom v zubolekárskej praxi je samotný amoxicilín bez inhibítora betalaktamáz. Teoh a kol. (2018) zase

uvádzajú, že nie klindamycín, ale metronidazol je druhým najviac predpisovaným liečivom, ktorý sa ale v našom analyzovanom súbore nevyskytoval ani raz. Aplikácia cefalosporínov sa tiež nezhoduje s našim záverom, nakoľko Teoh a kol. (2018) uvádzajú ako najčastejšie používaný cefalosporín cefalexín, kým u nás to bol cefprozil.

Môžeme skonštatovať, že pacientom alergickým na penicilíny sa v každom prípade predpisoval cefprozil, zatiaľ čo podľa British National Formulary (2002) je vhodnejší klindamycín a metronidazol. Avšak novšia štúdia Peedikayila a kol. (2016) ukázala, že existuje nízka pravdepodobnosť skríženej reakcie medzi penicilínmi a cefalosporínmi, takže ich použitie neodmieta. Za vhodnú alternatívu penicilínov považujú vo svojich štúdiách Buset a kol. (2015) a Singh a kol. (2018) aj azitromycín.

Dávkovanie antibiotík u detí ukazovalo určité odlišnosti. Dospeli sme k záveru, že deťom do 10 rokov sa v prvom rade podával klindamycín. Naproti tomu Alpöz, Sipahi a Gürbüz (2005) opisujú ako najpoužívanejšie antibiotikum u detí samotný amoxicilín, jeho kombináciu so sulbaktámom alebo klavulanátom, resp. cefalosporíny. Tento stav je možné vysvetliť aj prípadnými rozličnými diagnózami, avšak to je iba predpoklad, keďže zo spomínanej štúdie nevyplýva jednoznačne na aké jednotlivé diagnózy užívali antibiotiká pediatrickí pacienti. Na našom trhu sme prípravky s obsahom amoxicilínu a sulbaktámu nenašli.

Predpisy zubných lekárov vystavené pacientom staršieho stredného veku v 12 %-ách obsahovali predpisy antibiotík, zatiaľ čo deťom a starším osobám antibiotiká boli predpisované v menej ako v 1 % (Pipalová, Vlček, Slezák, 2014). K podobným výsledkom sme sa dopracovali aj my, keďže predpisy na antibiotiká sa vyskytovali v najväčšom rozsahu pri vekovej kategórii od 31 do 40 rokov (25 predpisov), kým u detí do 18 rokov to bolo len 7 receptov a nad 70 rokov 6 receptov.

V štúdii Pipalovej, Vlčeka a Slezáka (2014) pacienti užívali antibiotiká v rozmedzí 5 – 90 dní. Do tohto časového rozmedzia spadajú aj naše výsledky. Dĺžka liečby uvádzaná v odborných článkoch je 6,92 dňa (Epstein, Chong, Le, 2000); 7,58 dňa (Yingling, Byrne, Hartwell, 2002) alebo sa udáva rozmedzie 7 – 10 dní (Poveda-Roda a kol., 2007). V našej štúdii za priemernú dĺžku terapie považujeme 6 dní.

Na základe odborných štúdií sú odporúčané dávky amoxicilínu v rozmedzí 250 – 500 mg a jeho kombinácie s kyselinou klavulánovou 375 – 625 mg podávaných každých 8 hodín. Tieto údaje sú v súlade aj s našimi výsledkami. Klindamycín sa odporúča podávať v množstve 150 – 450 mg každých 6 hodín (British National Formulary, 2002); u nás sa aplikoval každých 8 hodín.

Indikácie antibiotík v zubnom lekárstve sú veľmi úzko limitované (Alpöz, Sipahi, Gürbüz, 2005). Udáva sa, že antibiotická terapia sa má používať ako podporná liečba a nie ako náhrada konvenčných chirurgických procedúr. Pre správnu diagnostiku sa vyžaduje röntgenový snímok, vďaka ktorému stomatológ vie určiť, či je vhodné ošetrenie koreňových kanálikov alebo extrakcia zuba (Kandemir a Ergül, 2000). Avšak v uvádzanej literatúre, rovnako ako aj v našom súbore, röntgenový snímok vo väčšine prípadov nebol zhotovený. Pri výbere antibiotík by sa mala zvoliť látka s najužším spektrom účinku kvôli zníženiu rizika vývoja rezistentných kmeňov (Handal a Olsen, 2000). Niektoré zdroje udávajú, že u inak zdravých pacientov sa má antibiotická terapia indikovať iba v prípade periapikálneho abscesu, nekrotizujúcej ulceratívnej gingivitídy, agresívnej periodontitídy, refraktérnej periodontitídy, perikoronitídy, celulitídy (okrem chronickej formy), infekčnej osteitídy, bakteriálnej stomatitídy a bakteriálnych infekcií slinných žliaz. Pri paradentóze dospelých antibiotiká, zvyčajne ako monoterapia, môžu byť predpísané ako druhá línia liečby na podporu konvenčných mechanických postupov. Ďalej sa uvádza, že terapia antibiotikami nie je vhodná pri zubnom kaze, chorobách a nekróze zubnej drene, chronickej gingivitídy, periodontálneho abscesu, dočasných problémov s erupciou zubov, chronickej celulitídy a periimplantitídy. Uvedené však ale neplatí pri rizikových pacientoch (napr. imunokompromitovaní pacienti, pacienti s nekontrolovaným chronickým ochorením alebo

liečení cyklosporínom, pacienti s rizikom infekčnej endokarditídy) [French Health Products Safety Agency (AFSSAPS), 2003]. U nich sa odporúča, aby v prípade spomínaných diagnóz boli krytí antibiotikami. Z uvedených diagnóz sa niektoré riešili aplikáciou antibiotík aj v našom súbore pacientov. Boli to napr. pulpitída, nekróza zubnej drene a poruchy zubného vývinu. Na základe dostupných údajov však nevieme jednoznačne posúdiť, či v našich prípadoch išlo o indikáciu zodpovedajúcu zahraničným odporúčaniam a či teda pacienti patrili do rizikovej skupiny. V prípade pulpitídy, akútnej apikálnej periodontitídy a chronickej apikálnej periodontitídy antibiotická liečba zvyčajne nie je indikovaná a je zvyčajne aj neúčinná, ak je dentálna infekcia uzavretá v pulpálnom tkanive alebo v bezprostrednom okolitom tkanive (Lazarin a Chappuis, 2019). Toto zistenie nie je v súlade s našimi výsledkami. Spomedzi analyzovaných lekárskych predpisov sme našli indikované antibiotiká aj na vyššie uvedené diagnózy. Udáva sa, že v prípade akútnych dentoalveolárnych infekcií sa odporúča fenoxymetylpenicilín (Dental Practitioners Formulary, 1996 – 1998). Akútna apikálna periodontitída v dôsledku odumretia zubnej drene sa má liečiť zmiernením zápalového procesu v periapikálnom priestore, čo sa väčšinou dosiahne prístupom cez zub a extirpáciou nekrotickej drene. Ďalšia liečba môže zahŕňať okrem kortikosteroidov a analgetík aj antibiotiká aplikované samostatne alebo v spojení s pulpektómiou, avšak keďže bolesť sprevádzajúca akútnu apikálnu periodontitídu nie je infekčného pôvodu, ich použitie treba zvážiť (Sutherland a Matthews, 2003). V našom prieskume na základe dostupných údajov nevieme posúdiť, či pacienti s touto diagnózou boli podrobení pulpektómii alebo ich liečba pozostávala len z aplikácie antibiotík z betalaktámovej rady.

Aj keď všeobecne platí, že antibiotická terapia sa neodporúča pri chronických stavoch, Alpöz, Sipahi, Gürbüz (2005) opisujú prípad, kedy bol chronický apikálny absces liečený aplikáciou antibiotík. Počas analýzy lekárskych predpisov sme sa tiež stretli s preskripciou antibiotík na chronické stavy, ako sú chronická apikálna periodontitída (K04.5), chronický zápal ďasien (K05.1) a parodontóza (K05.4).

Počas analýzy sme zistili, že počas tehotenstva bol naordinovaný amoxicilín. Podobne aj zahraničné štúdie uvádzajú, že užívanie amoxicilínu sa považuje za bezpečné počas tehotenstva aj laktácie (Ouanounou a Haas, 2012; Ahmadi, Ebrahimi, Ahmadi, 2021).

ZÁVER

Antibiotiká sú nevyhnutnou súčasťou zubného lekárstva, či už je ich aplikácia terapeutická alebo profylaktická.

Na základe vykonanej analýzy preskripcie antibiotík sme dospeli k záveru, že najčastejšie použitým antimikrobiálnym liečivom v stomatologických indikáciách bol amoxicilín kombinovaný s kyselinou klavulánovou, výnimku tvorili pacienti s potvrdenou penicilínovou alergiou v anamnéze, im sa totiž podával cefalosporín cefprozil. Tiež môžeme skonštatovať, že najčastejšie sa vyskytujúce diagnózy boli chronická apikálna periodontitída (K04.5) a retinovaný zubný koreň (K08.3). Priemerná dĺžka liečby bola 6 dní.

Za sledované obdobie 2 mesiacov sme spracovali spolu 94 receptov, čo svedčí o prekvapivo vysokom počte preskripcie antibiotík stomatológmi. Vzhľadom na to, že nadmerné používanie antibiotík môže viesť ku globálnym problémom, sledovanie frekvencie predpisovania antibiotík aj u stomatológov vyžaduje rozsiahlejšiu štúdiu. A preto by sme na záver odporučili ich aplikáciu iba v adekvátnych prípadoch a nenahradzovať lokálnu terapiu antibiotickou liečbou.

ZOZNAM LITERATÚRY

AFSSAPS. Prescribing antibiotics in odontology and stomatology. Recommendations by the French Health Products Safety Agency. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 2003, 17, 725 – 729.

Ahmadi, H., Ebrahimi, A., Ahmadi, F.: Antibiotic therapy in dentistry. *International Journal of Dentistry*, 2021. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33574843/. Accessed May 30, 2021.

Akhavan, B. J., Khanna, N. R., Vijhani, P.: *Amoxicillin*. San Fransisco, California, USA: Stat Pearls Publishing, 2020.

Alpöz, A. R., Sipahi, M., Gürbüz, C.: Evaluation the prescribing of antibiotics due to orodental problems in children. *Balkan Journal of Stomatology*, 2005, 9, 56 – 59.

Berbari, E. F., Cockerill, F. R., Steckelberg, J. M.: Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganisms. *Mayo Clinic Proceedings*, 1997. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9179137/. Accessed February 2, 2021.

British National Formulary. www.bnf.org. Accessed May 22, 2021.

Buset, S. L., Zitzmann, N. U., Weiger, R., Walter, C.: Non-surgical periodontal therapy supplemented with systemically administered azithromycin: a systematic review of RCTs. *Clin. Oral Investig.*, 2015, 19 (8), 1763 – 1775.

Dental Practitioners Formulary 1996 – 1998. *British National Formulary No. 32*. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain and The British Medical Association, London.

Eick, S., Pfister, W., Straube, E.: Antimicrobial susceptibility of anaerobic and capnophilic bacteria isolated from odontogenic abscesses and rapidly progressive periodontitis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1999, 12, 41 – 46.

Epstein, J. B., Chong, S., Le, N. D.: A survey of antibiotic use in dentistry. *The Journal of the American Dental Association*, 2000, 131, 1600 – 1609.

Ford, P. J., Saladine, C., Zhang, K., Hollingworth, S. A.: Prescribing patterns of dental practitioners in Australia from 2001 to 2012. Antimicrobials. *Aust. Dent. J.*, 2017, 62 (1), 52 – 57.

Fouad, A. F., Chair, B., Byrne, E., Diogenes, A. R., Sedgley, Ch. M., Cha, B. Y.: AAE Guidance on the Use of Systemic Antibiotics in Endodontics. *American Association of Endodontics*, 2017, 43, 1409 – 1413.

Halling, F., Neff, A., Heymann, P., Ziebart, T.: Trends in antibiotic prescribing by dental practitioners in Germany. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2017, 45 (11), 1854 – 1859.

Handal, T., Olsen, I.: Antimicrobial resistance with focus on oral beta-lactamases. *European Journal of Oral Sciences*, 2000, 108, 163 – 174.

Handal, T., Olsen, I., Walker, C., Caugant, D. A.: Detection and characterization of beta-lactamase genes in subgingival bacteria from patients with refractory periodontitis. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 242, 319 – 324.

Kandemir, S., Ergül, N.: Grievances in cases using antibiotics due to orodental problems and assessment of the need for antibiotics. *International Dental Journal*, 2000, 50, 73 – 77.

Lazarin, R., Chappuis, V.: Management of Odontogenic Infections: Indications for antibiotics. *Management of Dental Emergencies in Children and Adolescents*. 1. vyd. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2019, 22 – 34.

Ouanounou, A., Haas, D. A.: Drug therapy during pregnancy: implications for dental practice. *British Dental Journal*, 2012, 220, 413 – 417.

Palmer, N. O. A. et al.: *Antimicrobial prescribing for general dental practitioners*. 2nd edn. London, UK: Faculty of General Dental Practice. 2016, 118.

Patil, S., Rao, R. S., Amrutha, N., Sanketh, D. S.: Oral microbial flora in health. *World Journal of Dentistry*, 2013, 4 (4), 262 – 266.

Peedikayil, F.: Antibiotics in odontogenic infections-an update. *Journal of Antimicrobial Agents*, 2016, 2, 102 – 105.

Pipalová, R., Vlček, J., Slezák, R.: The trends in antibiotic use by general dental practitioners in the Czech Republic (2006 – 2012). *International Dental Journal*, 2014, 64, 138 – 143.

Poveda-Roda, R., Bagán, J. V., Sanchis--Bielsa, J. M., Carbonell-Pastor, E.: Antibiotic use in dental practice: a review. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 2007, 12, 186 – 192.

Singh, V. P., Nayak, S., Nettemu, S. K., Nettem, S.: Azithromycin in periodontal therapy: beyond the antibiotics. *Journal of Nepalese Society of Periodontology and Oral Implantology*, 2018, 2,

61 – 66.

Sutherland, S., Matthews, D. C.: Emergency management of acute apical periodontitis in the permanent dentition: a systematic review of the literature. *Journal of Canadian Dental Association*, 2003, 69, 160 – 165.

Teoh, L., Stewart, K., Marino, R. J., McCullough, M. J.: Current prescribing trends of antibiotics by dentists in Australia from 2013 to 2016. Part 1. *Australian Dental Journal*, 218, 63, 329 – 337.

Yingling, N. M., Byrne, B. E., Hartwell, G. R.: Antibiotic use by members of the American Association of Endodontists in the year 2000: report of a national survey. *Journal of Endodontics*, 2002, 28, 396 – 404.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 4: 58 – 64, 2023

STANOVENIE LC50 ÚČINNEJ LÁTKY ZO SKUPINY NEONIKOTINOIDOV

DETERMINATION OF LC50 OF A NEONICOTINOID ACTIVE SUBSTANCE

Beňová, Katarína[1]; Falis, Marcel[2]; Fonfer, Matej[2]; Špalková, Michaela[3]

[1]Katedra biológie a fyziológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
[2]Katedra farmakológie a toxikológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
[3]Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

katarina.benova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo stanoviť hodnotu LC_{50} účinnej látky zo skupiny neonikotinoidov (thiamethoxam) na modelovom organizme *Artemia franciscana*. Naupliárne štádiá boli vystavené koncentráciám 0,01; 0,1; 1; 10; 100 a 1000 mg.l^{-1}. Hodnoty letality sme zaznamenávali každých 24 hodín. Po prvých 24 hodinách sme navyše sledovali morfologické zmeny jedincov vystavených koncentrácii 1000 mg.l^{-1}. Hodnota LC_{50} po 96 hodinách vypočítaná dvojdávkovou interpolačnou metódou bola 11,33 mg.l^{-1} s intervalom spoľahlivosti 5,3 – 23,98 mg.l^{-1} LC_{50} po 96 hodinách vypočítaná programom ToxRat predstavovala hodnotu 23,178 mg.l^{-1} (táto hodnota spadá do vypočítaného intervalu spoľahlivosti dvojdávkovou interpolačnou metódou). Hodnoty LOEC a NOEC boli po 48 hodinách 0,1 a 0,01 mg.l^{-1}. Sledovanie morfologických zmien ukázalo znížený rast jedincov vystavených thiamethoxamu v koncentrácii 1000 mg.l^{-1} počas 24 hodín v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

Kľúčové slová: *Artemia franciscana*; LC_{50}; thiamethoxam

ABSTRACT

The aim of the study was to determine the LC_{50} value of an active substance from the neonicotinoid group (thiamethoxam) on the model organism *Artemia franciscana*. Naupliar stages were exposed to concentrations of 0,01; 0,1; 1; 10; 100 and 1000 mg.l^{-1}. The lethality values were recorded every 24 hours. In addition, after the first 24 hours, we monitored morphological changes

of individuals exposed to the 1000 mg.l^{-1} concentration. The LC_{50} value after 96 hours calculated by the two-dose interpolation method was 11,33 mg.l^{-1} with a confidence interval of 5,3 – 23,98 mg.l^{-1}. The LC_{50} after 96 hours calculated by ToxRat application was 23,178 mg.l^{-1} (this value is within the range of calculated confidence interval by the two-dose interpolation method). The LOEC and NOEC values after 48 hours were 0,1 and 0,01 mg.l^{-1}, respectively. Monitoring of morphological changes showed reduced growth of individuals exposed to thiamethoxam at a concentration of 1000 mg.l^{-1} for 24 hours in comparison to the control sample.

Key words: *Artemia franciscana*; LC_{50}; thiamethoxam

ÚVOD

Trh s pesticídmi sa neustále vyvíja. Výskumy prichádzajú s novými poznatkami, ktoré ho priamo ovplyvňujú. Nové informácie o používaných látkach sa stávajú zásadnými pre pochopenie škodlivých nežiaducich účinkov a ich vplyvu na životné prostredie. Európska únia zakázala v roku 2018 vonkajšie použitie troch hlavných neonikotinoidov (klotianidín, imidacloprid a thiamethoxam). V roku 2019 United States Environmental Protection Agency (US EPA) zrušila 12 produktov obsahujúcich neonikotinoidy. Napriek tomu v 35 % všetkých krajín neexistuje žiadna legislatíva týkajúca sa pesticídov, takže spomínané tri neonikotinoidy sú naďalej na svete najpoužívanejšie (Klingelhöfer a kol., 2022). Výnimku netvorí ani Slovensko. V novembri 2022 udelil agrorezort núdzové povolenie pre použitie thiamethoxamu na morenie osiva cukrovej repy (Koreň, 2023). Neonikotinoidy sú aktívne v extrémne nízkych dávkach a požívajú sa napríklad na ošetrenie semien, listov a pôdy, pričom ošetrené rastliny chránia dlhodobo (Matthews, 2015). Patria medzi systémové insekticídy. Sú absorbované a transportované v celej rastline, čo vedie k rezíduám pesticídov vo všetkých častiach rastliny (listy, korene, stonky), vrátane peľu a nektáru (Anadón a kol., 2020). Hoci sa všeobecne predpokladalo, že neonikotinoidy pôsobia selektívne na nAChR hmyzu a nemajú prakticky žiadnu afinitu k receptorom stavovcov, publikované údaje (Costas-Ferreira a Faro, 2021) tento predpoklad vážne spochybnili.

Najvyšší súd EÚ 19. 1. 2023 rozhodol, že krajinám EÚ by sa už nemali povoľovať dočasné výnimky pre zakázané neonikotinoidné pesticídy, čím sa ukončila polovica všetkých takýchto výnimiek. Súdny dvor Európskej únie (SDEÚ) potvrdil, že členské štáty nebudú môcť udeľovať výnimky, ktoré dočasne povoľujú používanie osív ošetrených prípravkami na ochranu rastlín podľa práva EÚ (Andrés, 2023).

Cieľom štúdie bolo na modelovom organizme *Artemia franciscana* stanoviť LC_{50} thiamethoxanu.

MATERIÁL A METÓDY

V experimente sme použili naupliové štádiá *Artemia franciscana*. Liahnutie prebiehalo v sklenenej infúznej fľaši, do ktorej sme aplikovali 5 g encystovaných dehydratovaných vajíčok a 500 ml morskej vody (Dvořák, 1995). Pre zabezpečenie vysokej liahnivosti je dôležitá oxygenácia a neustály pohyb cýst. Tieto podmienky sme zabezpečili aerátorom používaným v akvaristike.

Naupliárne štádiá boli vystavené koncentráciám 0,01; 0,1; 1; 10; 100 a 1000 mg.l^{-1} thiamethoxamu. Pomocou plastovej pipety sme do každej pripravenej misky preniesli 10 jedincov. Jedna skupina obsahovala 60 jedincov (50 jedincov pre sledovanie letality a 10 jedincov pre sledovanie morfologických zmien). Spolu sme pri tomto pokuse použili 420 jedincov. Hodnoty letality sme zaznamenávali každých 24 hodín.

Z misiek určených pre morfológiu sme z uvedených skupín preniesli pomocou pipety jedincov na podložné sklíčko s jamkami. Pre usmrtenie pozorovaných jedincov sme použili zlúčeninu DMSO (dimetylsulfoxid), ktorú sme kvapli do jamiek na podložnom sklíčku. Na merania sme použili svetelný mikroskop CS 23, trinokulár (Olympus), vybavený kamerou pre-

mietajúcou obraz v reálnom čase do počítača. Sledovali sme nasledovné parametre: dĺžku tela, šírku tela, dĺžku ramena, šírku tela s ramenami, šírku čreva a šírku črevnej steny.

Hodnotu LC_{50} sme vypočítali pomocou dvojdávkovej interpolačnej metódy podľa Rotha (1962) a programu ToxRat Professional (verzia 3.3.0 vydaná 20.10.2018, ToxRat-SOLUTIONS GmbH). Okrem LC_{50} sme stanovili aj hodnoty LC_{20} a LC_{10} v 24-hod časových intervaloch a takisto hodnotu, pri ktorej nebol pozorovaný žiadny účinok (no observed effect concentration, NOEC) a hodnotu, pri ktorej už bol účinok pozorovaný (the lowest observed effect concentration, LOEC).

Získané výsledky boli štatisticky vyhodnotené programom Tox Rat. Pri štatistickom vyhodnotení výsledkov bol použitý Chi2-2x2 test s Bonferroniho korekciou ($p < 0,05$).

VÝSLEDKY

V kontrolnej skupine sme v priebehu 72 hodín testu nezaznamenali žiadny úhyn. Po 96 hodinách sme v kontrolnej vzorke pozorovali letalitu 10 % jedincov. Pre platnosť testu je dôležité, aby letalita kontrolnej skupiny nepresiahla hodnotu 10 %.

V experimentálnych skupinách sme po prvých 24 hodinách nezaznamenali žiadny úhyn. V skupinách s koncentráciou 1 a 10 $mg.l^{-1}$ sme zaznamenali letalitu až po 96 hodinách. Po 48 hodinách sme pozorovali letalitu 2 % v skupine s koncentráciou 0,01 $mg.l^{-1}$ a letalitu 10 % v skupine s koncentráciou 1000 $mg.l^{-1}$. Po 72 hodinách sa letalita v skupine s koncentráciou 1000 $mg.l^{-1}$ štatisticky významne zvýšila ($p < 0,001$) na hodnotu 32 % v porovnaní s kontrolnou skupinou. Letalita v skupine s koncentráciou 0,01 $mg.l^{-1}$ sa po 72 hodinách nezmenila. V skupinách s koncentráciou 0,1 a 100 $mg.l^{-1}$ sme po 72 hodinách zaznamenali letalitu 6 a 4 %. Po 96 hodinách sme pozorovali štatisticky významné zvýšenie letality ($p < 0.001$) v skupine s koncentráciou 1000 $mg.l^{-1}$ na hodnotu 98 % a zároveň sme paradoxne zaznamenali signifikantné zvýšenie letality v skupinách obsahujúcich najnižšie koncentrácie, konkrétne v skupine s koncentráciou 0,01 $mg.l^{-1}$ ($p < 0.05$) na hodnotu 90 % a v skupine s koncentráciou 0,1 $mg.l^{-1}$ ($p < 0.01$) na hodnotu 86 %. V skupine s koncentráciou 100 $mg.l^{-1}$ sme pozorovali zvýšenie úhynu na 16 % a v skupinách s koncentráciami 1 a 10 $mg.l^{-1}$ predstavovala letalita po 96 hodinách hodnoty 24 a 12 %. Toto zvýšenie letality (viď graf 1) v skupinách s koncentráciami 100, 1 a 10 $mg.l^{-1}$ nebolo ani po 96 hodinách štatisticky významné ($p < 0.05$).

V grafe 1 môžeme vidieť po 72 hodinách prudké stúpanie letality v skupinách s koncentráciami 0,01; 0,1 a 1000 $mg.l^{-1}$, pričom v skupine s koncentráciou 0,01 $mg.l^{-1}$ došlo počas nasledujúcich 24 hodín k nárastu letality o 88 %, v skupine s koncentráciou 0,1 $mg.l^{-1}$ o 80 % a v skupine s koncentráciou 1000 $mg.l^{-1}$ o 66 % v porovnaní s kontrolnou skupinou. Mierne zvyšovanie letality v priebehu času vidíme pri skupinách s koncentráciou 1, 10 a 100 $mg.l^{-1}$.

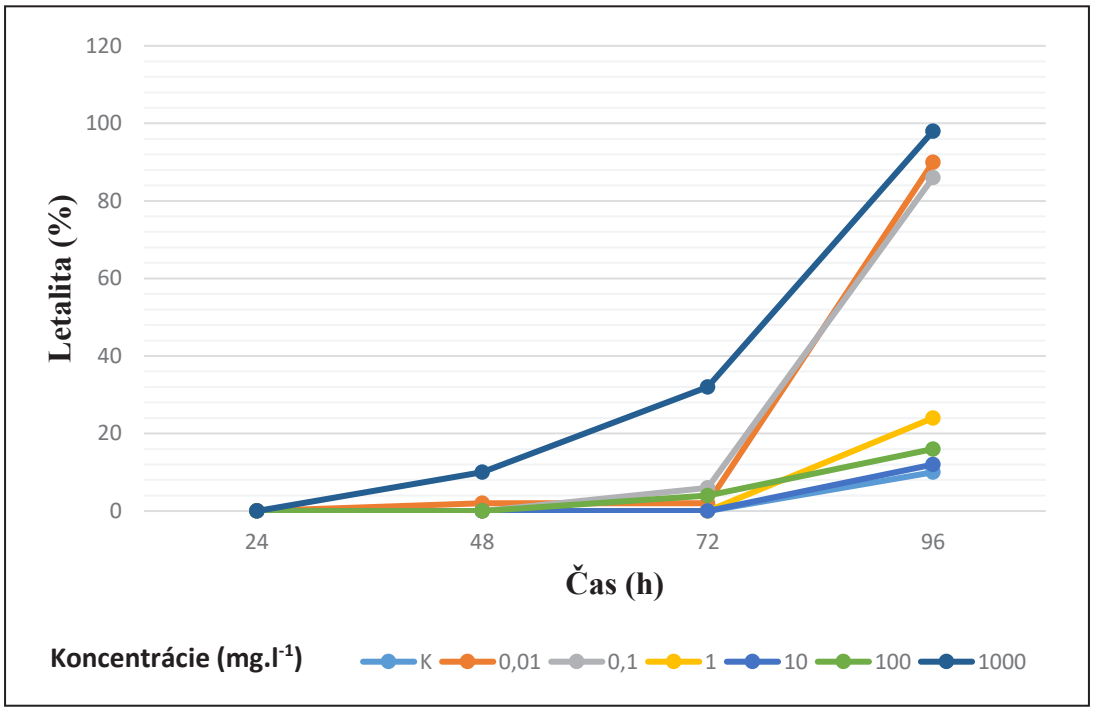
Hodnota LC_{50} po 96 hodinách vypočítaná dvojdávkovou interpolačnou metódou bola 11,33 $mg.l^{-1}$ s intervalom spoľahlivosti 5,3 – 23,98 $mg.l^{-1}$. LC_{50} po 96 hodinách vypočítaná programom ToxRat predstavovala hodnotu 23,178 $mg.l^{-1}$. Táto hodnota sa nachádza v rozmedzí intervalu spoľahlivosti dvojdávkovej interpolačnej metódy. Program popri stanovení LC_{50} po 96 hodinách vypočítal aj hodnoty LC_{10} (47,633 $mg.l^{-1}$) a LC_{20} (1016,92 $mg.l^{-1}$) po 72 hodinách. Hodnoty LOEC a NOEC boli po 48 hodinách 0,1 a 0,01 $mg.l^{-1}$.

Aj keď sme pri pozorovaní letality nezaznamenali žiadny úhyn po 24 hodinách, z výsledkov morfológie a z grafu 2 môžeme usúdiť, že jedince vystavené koncentrácii 1000 $mg.l^{-1}$ boli menšieho vzrastu ako jedince v kontrolnej vzorke. U exponovaných jedincov boli najvýraznejšie zmeny v dĺžke tela a šírke čreva.

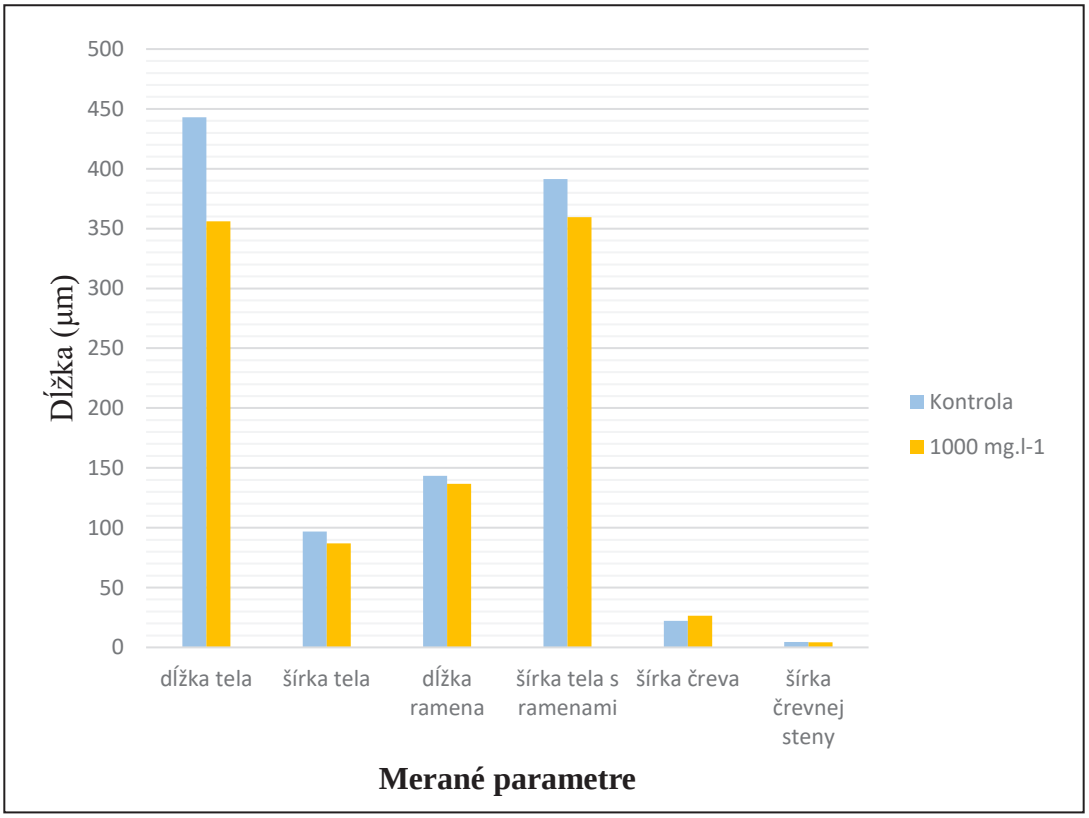
DISKUSIA

Neonikotinoidy sú širokospektrálne systémové insekticídy, predstavujúce celosvetovo najrýchlejšie rastúcu skupinu insekticídov. Environmentálny profil týchto látok naznačuje, že sú perzistentné, vy-

Graf 1: Letalita A. *franciscana* v závislosti od času a koncentrácie thiamethoxamu



Graf 2: Porovnanie sledovaných parametrov skupiny s koncentráciou 1000 mg.l^{-1} a kontrolnej skupiny po 24 hodinách



soko toxické pre širokú škálu bezstavovcov a majú vysoký potenciál pre vyplavovanie alebo odtok vodnými zdrojmi, čo ich robí potenciálne toxickými aj pre ostatné vodné organizmy (Morrissey a kol., 2015; Raby a kol., 2018a). Neonikotinoidy sú aj napriek preukázaným škodlivým účinkom na necieľové organizmy a mnohým reguláciám stále globálne najpoužívanejšou skupinou insekticídov. Jedným z dôvodov je absencia legislatívy týkajúcej sa pesticídov v 35 % krajinách sveta (Klingelhöfer a kol., 2022; Zhang a kol., 2023).

V našej práci sme si ako modelový organizmus zvolili vodného kôrovca *Artemia franciscana*. Tieto bezstavovce sa prirodzene vyskytujú v slaných vodách. Toxikologické štúdie zaoberajúce sa vplyvom neonikotinoidov na letalitu a rast rôznych druhov vodných kôrovcov, ale aj iných druhov vodných organizmov, poukazujú na významné rozdiely v senzibilite medzi jednotlivými rodmi a druhmi.

Mieru toxicity látky pre organizmus určuje hodnota LC_{50}. Čím je hodnota LC_{50} nižšia, tým je daná látka pre organizmus toxickejšia. V našej štúdii sme pomocou dvoch rôznych metód vypočítali dve hodnoty $LC_{50/96}$ (11,33 mg.l^{-1} a 23,178 mg.l^{-1}). V nasledujúcom texte budeme uvádzať nižšiu hodnotu $LC_{50/96}$ (11,33 mg.l^{-1}), resp. budeme počítať s vyššou toxicitou.

Raby a kol. (2018b) sledovali chronickú toxicitu neonikotinoidových insekticídov na druhoch vodných kôrovcov *Ceriodaphnia dubia* a *Daphnia magna*. Thiamethoxam použili len pri druhu *Ceriodaphnia dubia*. Z výsledkov vyhodnotili, že LC_{50} thiamethoxamu po 6 dňoch je pre tento druh väčšia ako najväčšia koncentrácia, ktorú použili (> 80 mg.l^{-1}). Taktiež uviedli maximálne koncentrácie thiamethoxamu hlásené z prieskumov povrchových vôd v Kanade (2,7 µg,l^{-1}) a Spojených štátoch (0,19 µg.l^{-1}). Tieto koncentrácie nepredstavujú pre populácie dafnií žiadne nebezpečenstvo. Aj napriek tomu, že nami stanovená hodnota LC_{50} bola 11,33 mg.l^{-1} a stanovili sme ju po 4 dňoch, môžeme skonštatovať, že uvedené koncentrácie v povrchových vodách rovnako nepredstavujú nebezpečenstvo ani pre druh *Artemia franciscana*.

Bartlett a kol. (2019) sa zaoberali akútnym a chronickým účinkom thiamethoxamu na prežitie a rast sladkovodného kôrovca *Hyalella azteca*. LC_{50} thiamethoxamu predstavovala po 4 dňoch hodnotu 800 µg.l^{-1}, po 7 dňoch 290 µg.l^{-1} a po 28 dňoch 220 µg.l^{-1}. Efekty účinku thiamethoxamu na *H. azteca* porovnali rovnako ako Raby a kol. (2018b) s maximálnou koncentráciou v povrchových vodách v Kanade a Spojených štátoch (1,61 µg.l^{-1}). Tieto výsledky potvrdzujú, že maximálne koncentrácie thiamethoxamu v povrchových vodách spomínaných štátov nepredstavujú nebezpečenstvo pre populácie druhu *H. azteca*. K zníženiu rastu u tohto organizmu došlo v prípade thiamethoxamu pri podobných koncentráciách ako v teste chronickej toxicity.

Morrissey a kol. (2015) skúmali kontamináciu povrchových vôd neonikotinoidmi a ich riziko pre vodné bezstavovce. Vypracovali prehľad koncentrácií neonikotinoidov v povrchových vodách z 29 štúdií v 9 krajinách sveta spolu s publikovanými údajmi o ich akútnej a chronickej toxicite pre 49 druhov vodného hmyzu a kôrovcov z 12 radov bezstavovcov. Detegované koncentráciou thiamethoxamu sa pohybovali v rozmedzí 0,001 až 225 µg.l^{-1}. Koncentrácie thiamethoxamu v zavlažovacej vode pochádzajúcej z oblasti Wisconsinu, kde sa pestujú zemiaky, sa pohybovali v rozmedzí od 0,31 – 0,58 µg.l^{-1}. Pri odbere vzoriek z celého štátu sa zistili koncentrácie thiamethoxamu 0,2 – 3,34 µg.l^{-1}. Najvyššia hlásená koncentrácia (225 µg.l^{-1}) pochádzala z mokradí v štáte Texas. Maximálna koncentrácia thiamethoxamu zistená z mokradí nachádzajúcich sa na kanadských prériách bola 1,5 µg.l^{-1}. Hoci sa kaluže formálne nepovažujú za vodné útvary, maximálne koncentrácie namerané v kaluziach na povrchu kukuričných polí ošetrených neonikotinoidmi v Quebecu predstavovali hodnotu 63,4 µg.l^{-1}. Autori uvádzajú priemery $LC_{50/96}$ odvodených z testov akútnej toxicity neonikotinoidov pre niektoré rady a druhy kôrovcov. *Daphnia magna* – 43 923 µg.l^{-1}, *Cladocera* – 23 690 µg.l^{-1}, *Decapoda* – 1562 µg.l^{-1}, *Isopoda* – 464,8 µg.l^{-1}, *Amphipoda* – 235,8 µg.l^{-1}, *Gammarus pulex* – 258,7 µg.l^{-1}, *Mysida* – 106,2 µg.l^{-1}, *Podocopida* – 73,6 µg.l^{-1}.

Avšak približne polovica štúdií z tohto prehľadu

sa zaoberala koncentráciou imidaklopridu vzhľadom na jeho dlhšiu históriu a rozsah používania. Uvedené výsledky predstavujú priemerné hodnoty pre všetky neonikotinoidy použité v daných štúdiách, nie len pre thiamethoxam. Na základe našich výsledkov ($LC_{50/96}$ thiamethoxamu = 11,33 mg.l^{-1}) a výsledkov týchto autorov môžeme predpokladať, že *A. franciscana* je senzitívnejšia ako *D. magna* (priemerná $LC_{50/96}$ neonikotinoidov = 43,923 mg.l^{-1}) a *Cladocera* (priemerná $LC_{50/96}$ neonikotinoidov = 23,69 mg.l^{-1}).

Údaje zo štúdií, ktoré sa zaoberali koncentráciami thiamethoxamu v povrchových vodách svedčia o tom, že tieto koncentrácie nepredstavujú nebezpečenstvo pre populácie *A. franciscana* a zďaleka sa nepribližujú nami vypočítanej hodnote $LC_{50/96}$ pre tento druh (11,33 mg.l^{-1}). Avšak pre výskumy možného ohrozenia tohto druhu spomínaným insekticídom sú potrebné ďalšie dáta o koncentráciách v povrchových vodách, hlavne v krajinách s povoleným požitím thiamethoxamu a v krajinách, kde dochádza k nadmernému používaniu tohto insekticídu.

Finnegan a kol. (2017) vo svojej štúdii uvádzajú rôznu senzitivitu vodných primárnych producentov, bezstavovcov a rýb na thiamethoxam. Primárni producenti a ryby boli najmenej senzitívne. Hodnoty $LC_{50/96}$ a $EC_{50}/_{96}$ boli pri týchto organizmoch nad 80 mg.l^{-1}. Mäkkýše, červy a vírniky (prvoústovce) boli podobne senzitívne ($EC_{50/96}$ > 100 mg.l^{-1}) až na druh *Lumbriculus* spp. ($EC_{50/48}$ = 7,7 mg.l^{-1}). Vo všeobecnosti bol hmyz najcitlivejšou skupinou, pričom $EC_{50/24}$ predstavovala hodnoty menšie ako 1 mg.l^{-1}. Kôrovce druhu *Asellus aquaticus* a triedy *Ostracoda* však vykazovali podobnú citlivosť ako hmyz ($EC_{50/48}$ < 1 mg.l^{-1}) a larvy pakomárov *Chaoburus* spp. vykazovali relatívne nízku senzitivitu v porovnaní s ostatným hmyzom ($EC_{50/48}$ > 5,5 mg.l^{-1}). Aj keď hodnota EC_{50} nie je to isté čo hodnota LC_{50}, môžeme na základe nami vypočítanej hodnoty $LC_{50/96}$ (11,33 mg.l^{-1}) predpokladať, že druh *A. franciscana* sledovaný v našej štúdii nebude prejavovať podobnú citlivosť na thiamethoxam ako kôrovce druhu *Asellus aquaticus* a triedy *Ostracoda*.

Morfologickým sledovaním sme zistili, že koncentrácia thiamethoxamu 1000 mg.l^{-1} má už v priebehu 24 hodín vplyv na rast druhu *A. franciscana*. Sledované jedince mali kratšie časti tela ako jedince v kontrolnej vzorke. Spomalený rast by mal pravdepodobne vplyv na rýchlosť dospievania, resp. rozmnožovania v populácii. Je ale nepravdepodobné, že jedince tohto druhu budú v terénnych podmienkach exponované takejte koncentrácii.

ZÁVER

V našej štúdii sme si ako modelový organizmus zvolili vodného kôrovca *Artemia franciscana*. Hodnota LC_{50} po 96 hodinách vypočítaná dvojdávkovou interpolačnou metódou bola 11,33 mg.l^{-1}. Hodnoty LOEC a NOEC boli po 48 hodinách 0,1 a 0,01 mg.l^{-1}. Morfologickým sledovaním sme zistili, že koncentrácia thiamethoxamu 1000 mg.l^{-1} má už v priebehu 24 hodín tlmivý vplyv na rast.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola podporená projektom VEGA 1/0166/21.

LITERATÚRA

Anadón, A., Ares, I., Martínez, M., Martínez--Larrañaga, M.-R., Martínez, M.-A.: Neurotoxicity of neonicotinoids. *Advances in Neurotoxicology*, 2020, 4, 167 – 207. Doi:10.1016/BS.ANT.2019.11.005. Accessed January 31, 2023.

Andrés, P.: *EU Court puts end to emergency use of bee-toxic pesticides*, 2023. https://www.euractiv.com/section/agriculture-food/news/eu-high-court--bans-use-of-bee-toxic-pesticides/. Accessed April 8, 2023.

Bartlett, A. J., Hedges, A. M., Intini, K. D., Brown, L. R., Maisonneuve, F. J., Robinson, S. A., Gillis, P. L., de Solla, S. R.: Acute and chronic toxicity of neonicotinoid and butenolide insecticides to the freshwater amphipod, *Hyalella azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 175, 215 – 223. Do-

i:10.1016/J.ECOENV.2019.03.038. Accessed April 10, 2023.

Costas-Ferreira, C., Faro, L. R. F.: Neurotoxic effects of neonicotinoids on mammals: what is there beyond the activation of nicotinic acetylcholine receptors? A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22, 16. Doi:10.3390/IJMS22168413. Accessed April 10, 2023.

Dvořák, P.: Modifikovaný test s *A. salina* pro sledování vlivu interakcí cizorodých látek. [Monitoring of harmful substance effects using the modified test with *A. salina*]. In *Toxicita a biodegradabilita odpadu a látek významných ve vodním prostředí*. Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický a Aquachemie, Milenovice, 1995, 25 – 29.

Finnegan, M., Baxter, L. R., Maul, J. D., Hanson, M. L., Hoekstra, P. F.: Comprehensive characterization of the acute and chronic toxicity of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam to a suite of aquatic primary producers, invertebrates, and fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2017, 36 (10), 2838 – 2848. Doi:10.1002/ETC.3846. Accessed April 10, 2023.

Klingelhöfer, D., Braun, M., Brüggmann, D., Groneberg, D. A.: Neonicotinoids: a critical assessment of the global research landscape of the most extensively used insecticide. *Environmental Research*, 2022, 213, 113 727. Doi:10.1016/J.ENVRES.2022.113727. Accessed April 7, 2023.

Koreň, M.: *Únia smeruje k definitívnemu zákazu neonikotinoidov, ktoré sú toxické pre včely* [The Union is moving towards a definitive ban on neonicotinoids, which are toxic to bees], 2023. https://euractiv.sk/section/ekonomika-a-euro/news/unia-smeruje--k-definitivnemu-zakazu-neonikotinoidov-ktore-su--toxicke-pre-vcely/. [cit. 8. 4. 2023].

Matthews, G. A.: Pesticides: Health, Safety and the Environment: Second Edition. *Pesticides: Health, Safety and the Environment: Second Edition*. 2015, 1 – 277. Doi:10.1002/9781118975923. Accessed January 31, 2023.

Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., Liber, K.: Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 2015, 74, 291 – 303. Doi:10.1016/J.ENVINT.2014.10.024. Accessed April 9, 2023.

Raby, M., Nowierski, M., Perlov, D., Zhao, X., Hao, Ch., Poirier, D. G., Sibley, P. K.: Acute toxicity of 6 neonicotinoid insecticides to freshwater invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2018a, 37, 5, 1430 – 1445. Doi:10.1002/ETC.4088. Accessed April 9, 2023.

Raby, M., Zhao, X., Hao, Ch., Poirier, D. G., Sibley, P. K.: Relative chronic sensitivity of neonicotinoid insecticides to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018b, 163, 238 – 244. Doi:10.1016/J.ECOENV.2018.07.086. Accessed April 9, 2023.

Roth, Z.: *Statistické metody v experimentální medicíně* [Statistical Methods in Experimental Medicine]. Státní zdravotnické nakladatelství, 1962, 589 s.

Zhang, X. a kol.: Environmental occurrence, toxicity concerns, and biodegradation of neonicotinoid insecticides. *Environmental Research*, 2023, 218, 114 953. Doi:10.1016/J.ENVRES.2022.114953.Accessed April 9, 2023.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 4: 65 – 77, 2023

EVALUATION OF THERMOSENSITIVE POLYMERS FOR THE FORMULATION OF ORAL *IN SITU* GEL

Rohaľová, Simona[1,2]; Wolaschka ,Tomáš[1]; Juhasová, Kristína[1]; Paulovičová, Katarína[3]; Tóthová, Jana[4]

[1]Department of Pharmaceutical Technology, Pharmacognosy and Botany
University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice
The Slovak Republic
[2]Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy
Masaryk University, Palackého třída 1946/1, 612 00 Brno
The Czech Republic
[3]Institute of Experimental Physics
Slovak Academy of Sciences, Watsonova 47, 040 01 Košice
The Slovak Republic
[4]Department of Physics, Faculty of Electrical Engineering and Informatics
Technical University of Košice, Park Komenského 2, 042 00 Košice
The Slovak Republic

simona.rohalova@uvlf.sk

ABSTRACT

Oral disease treatment lacks locally administered dosage forms with a longer residence time. Because API is quickly washed out from the application site by saliva turnover and mouth movements, the drug bioavailability decreases. *In situ* gel is a dosage form that presents sol to gel transition ability. Its fluidity before administration allows application to or into any oral tissue where a gel is formed. In this study, we screened thermosensitive polymers for the formulation of an oromucosal *in situ* gel. Poloxamers 407 and 188, methylcellulose, and combinations with transition temperature adjusting additives were tested. We evaluated appearance, pH, critical transition temperature, injectability, gelling capacity, viscosity, and other rheological properties. We put more emphasis on different methods for measuring the transition temperature of sols. Poloxamer 407 (14 %) in combination with methylcellulose (1 %) had the most favorable properties. This sol was transparent and had pH 7.01 ± 0.06. The sol could be ejected through a needle with 0.5 mm diameter. The viscosity increased with temperature from 0.17 Pa·s at 20 °C to 18.60 Pa·s at 37 °C. The transition temperature was 30 °C (test tube method) and 25.7 °C (rheometry).

Key words: critical sol-gel transition temperature; gel evaluation; methylcellulose; poloxamer; rheology; smart polymers

INTRODUCTION

The form and route of administration play a crucial role in the effectiveness of oral disease therapy (Rajeshwari et al., 2019). Although many oral diseases respond to local therapy, the oral environment complicates local drug delivery. Saliva turnover, chewing, swallowing, and speaking shortens the residence time of the dosage form at the application site, which leads to a decrease in its pharmacotherapeutic effectivity (Paderni et al., 2012). Innovative oromucosal dosage forms should resist rapid drug loss at the site of liberation caused by saliva flow and mechanical stress. Conventional semi-solid dosage forms offer close contact with affected tissue and easy application. Mucoadhesive tablets, films, or patches overcome the disadvantages of semisolids; however, they cause other complications (see Tab. 1). Films and patches are more flexible and thinner than tablets, resulting in greater comfort (Patel et al., 2011). The disadvantages of the aforementioned forms are listed in the Tab. 1.

Innovative *in situ* gels could ensure effective local pharmacotherapy. These are stored and administered as viscous fluids and, after application, undergo a transition to gels or solid depots under the influence of the environment (Yadav et al., 2020). The sol-gel transition of ISGs is enabled by the constitutive excipients, smart polymers (SPs). This group includes polymers that alter their physicochemical properties under the influence of one or a combination of stimuli of biological (enzymes, glucose, antigens, and molecularly imprinted polymers), physical (temperature, light, magnetic and electric field, ultrasound, and mechanical forces) and chemical origin (pH level, ionic strength, solvent, and redox processes) (Qureshi et al., 2019). Stimuli cause an observable or otherwise detectable change, such as swelling, a sol-gel transition (Aguilar and Román, 2019); a color change, a conductivity change, magnetism, particle formation, and crosslinking (Hrubý, 2018). Thermosensitive polymers (TSP) are the most widely used SPs in pharmaceutical technology. The formulation based on TSP can react to the difference in temperature between the tissue and room temperature. This temperature difference can be used to deliver drugs or diagnostics in the form of *in situ* gels administered parenterally, perorally, or topically. Temperature-sensitive polymers demonstrate sensitivity at critical transition temperatures. At this temperature, a modification of hydrophilic and hydrophobic interactions between the polymer chains and the solvent occurs. Temperature-sensitive polymers used in drug delivery [e. g. poly(N-isopropylacrylamide) (Qureshi et al., 2019); cellulose derivatives (Ruel-Gariépy and Leroux, 2004)] remain hydrated in an aqueous solvent and become biphasic at increasing temperature when water-water and polymer-polymer interactions begin to

Tab. 1: Disadvantages of conventional dosage forms for oral delivery

Dosage form	Disadvantages
gargles, mouth washes, solutions, drops, sprays	short residence time at the application site, dose variability
creams, gels	short residence time at the application site, dose variability
chewing gums	inhomogeneous drug distribution through saliva, involuntary swallowing of the drug
patches, films	limited to small area of smooth, healthy tissue, hygroscopicity of films
mucoadhesive tablets	uncomfortable, inhomogeneous drug distribution through saliva, risk of swallowing, and adhesion to the esophagus

Source: Patel et al., 2011; Nguyen and Hiorth, 2015

prevail (Qureshi et al., 2019). The other mechanism of temperature responsiveness is the organization of unassociated monomers of amphiphilic copolymers in micelles at critical micelle concentration and further heating over critical micelle temperature, resulting in micelle packing (e. g. poloxamers) (Zahir-Jouzdani et al., 2018). The presence of more than one type of responsive group in the same polymer and a combination of polymers having different sensitivity can promote a complex response to different stimuli (Malikmammadov and Hasirci, 2019). Furthermore, a combination of various smart polymers, such as carbomers, polycarbophil, or methylcellulose, can improve the mucoadhesivity and rigidity of *in situ*-forming gel (Salamat-Miller et al., 2005).

A syringe with a needle or cannula, spray, or other suitable applicator ensures the accuracy of ISG dosage. Their fluidity before administration allows the application to or into any oral tissue, including teeth and periodontal pockets. The mucoadhesivity of many smart polymers prolongs the retention time of the dosage form at the application site, which, combined with sustained or controlled release of the drug, leads to a decrease in the incidence of adverse effects and increased patient adherence (Zahir-Jouzdani et al., 2018). The properties mentioned predetermine ISG for the oromucosal delivery of API and the treatment of conditions such as periodontitis, gingivitis, stomatitis, mucositis, and other oral lesions.

This study aimed to select a polymer with favorable properties for the preparation of oral *in situ* gel. Various polymer concentrations of poloxamer P407 (15 – 22.5 %), poloxamer P188 (22.5 – 45 %), and methylcellulose (1 – 4 %) with different additives were evaluated as part of polymer screening for a further formulation optimization process.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Poloxamer 407 (Lutrol 407, BASF, Germany), Poloxamer 188 (Lutrol 188, BASF, Germany), Methylcellulose Ph. Eur. (Dr. Kulich Pharma, Czech Republic), NaCl (Centralchem, Slovakia), KCl (Dr. Kulich Pharma, Czech Republic), $NaHCO_3$ (Mikrochem, Slovakia), D-sorbitol (Fisher, United Kingdom).

Methods

Sample Preparation

Polymers were dispersed in 250-ml beakers (100 g of sol) or in 600-ml bearkers (200 g of sol). Polymers were sieved using a 0.8 mm sieve to remove powder aggregates. Poloxamers 407 (P407) and 188 (P188) were dispersed in cold water (4 – 5 °C) according to Schmolka (1972) (Schmolka, 1972). The weighted amount of poloxamer was slowly added to the beaker with agitated distilled water at 500 – 600 rpm. The dispersion was stirred for 15 min and then placed in the refrigerator for 4 to 6 h.

Methylcellulose (MC) was dispersed in 2/3 of the total water volume at 80 °C. The weighted amount was slowly added to the beaker with agitated distilled water at 300 – 400 rpm. 1/3 of the total water volume cooled at 4 – 5 °C was added at 100 to 200 rpm. If necessary, homogenization continued in the refrigerator until clear sol was obtained.

In the case of the combination of P407 and MC, P407 was dispersed in 1 % MC solution at 4 – 5 °C in the same way as described above. Sorbitol, NaCl, KCl, and $NaHCO_3$ were dissolved in a 1 % MC solution while stirred by the magnetic stirrer Lavat mm4 (Lavat, CZ).

Appearance, pH of Sols and Gels

Sols and gels were visually evaluated against a black and white background. According to the appearance of the samples, they were assigned the following signs: (+) turbid – turbidity is present; (++) transparent – minimal turbidity or opalescence is present; (+++) glassy – without turbidity or opalescence.

The pH of the ISGs was evaluated using a Seven-Compact S220 pH meter (Mettler Toledo, US) calibrated by standard solutions with pH 4.01; 7.0; and 11.0. Samples were measured in triplicate.

Tab. 2: Different polymer dispersion procedures

Li and Hyun, 2018	P407 was dissolved in eater at 10 °C for 2 days
Bhowik et al., 2011	MC was dispersed in water at 70 °C and continuously stirred, the dispersion was kept in a refrigerator for 48 h to obtain a transparent solution
Boonrat, Tantishaiyakul and Hirun, 2021	MC was dispersed in hot water, the volume was adjusted to produce a 4 % solution and cooled in an ice bath until a transparent solution was obtained
Itoh et al., 2010	weighed quantity of MC was gradually added to half of the required amount of water at 70 – 80 °C and stirred, the rest of the water was added and stirred for 1h at 50 °C and for 1 h at 5 °C with ice cooling

Sol Injectability

The injectability of sols was investigated using a syringe with various needle thicknesses (0.5; 0.6; 0.7; 0.8 mm). 1 ml of sol was expelled from the 5 ml syringe. The sample was described as injectable sol (+), if it was possible to expel it continuously or non-injectable sol, if it was not possible to expel it from the syringe at all or not in a continuous way.

Critical sol-gel transition temperature (test tube method)

The critical sol-gel transition temperature (T_{sg}) was evaluated using an adapted test tube method (TTM) (Bhandwalkar and Avachat, 2013). The test tube with a previously refrigerated sample was placed in a 25 °C tempered water bath and the temperature sensor was placed in the test tube. After reaching 25 °C, the test tube was tilted to observe the mobility of the meniscus. The immobile meniscus was evaluated as a gel; otherwise, the temperature was increased by 1 °C, and the sample was returned to the bath. The test continued until a gel was formed or 60 °C was reached. Samples were tested in triplicate.

Gelling Capacity

500 µl of the sample colored with methylene blue (1 drop/1 g of sample) were added to 1 ml of phosphate buffer with a pH 6.8 tempered at 37 °C ± 1 °C followed by vortex (VELP Scientifica, IT) for 10 s at 500 rpm. The presence of the gel was observed immediately after adding the sol and then 10, 20, 30, and 60 min after the addition of the sol. Each sample was assigned with the following signs: (–) no gelation; (+) forms the gel after a few seconds, quickly disappears; (++) immediate gel formation, disappears in less than 30 min; (+++) immediate gel formation, disappears after more than 30 min. The samples were evaluated in triplicate.

Rheological Tests

The tests were carried out using the MCR 502 rheometer (Anton Paar GmbH, AT). For all tests, the PP25 parallel plate geometry was used. The dependence of dynamic viscosity on temperature was investigated at a constant shear rate (12.5 s^{-1}). The temperature was increased from 10 to 40 °C by increasing 1 °C/min.

T_{sg} was measured in oscillatory mode at an angular velocity of 10 rad/s, a strain deformation of 0.1 % and a temperature increased by 1 °C/min from 10 to 40 °C. The transition temperature was determined as the crossover temperature of the storage and loss moduli, and G′ started to predominate. The viscosity and flow curves were recorded at 20 and 37 °C, and the shear rate was 0.1 to 1000 s^{-1}. The flow behavior of the samples was evaluated on the basis of these curves. The viscosity and flow curve measurements were performed in triplicates.

RESULTS AND DISCUSSION

Appearance, pH of Sols and Gels

All poloxamer sols and gels appeared glassy, and no differences between sol and gel appearances were

Tab. 3: Properties of polymeric sols

Polymers	Concentration % w/w	Appearance	Viscosity Pa·s (20 °C)	pH (± SD n = 3)	injectability 0,5 mm
SOL					
P407	15.47	+++	0.03	6.93 ± 0.03	+
P188	45.00	+++	5.34	7.67 ± 0.05	–
MC + P407	1.00 + 14.00	+++	0.17	7.01 ± 0.06	+
MC + NaCl	1.00 + 7.00	+++	0.12	7.13 ± 0.25	+
MC + KCl	1.00 + 9.00	+++	0.12	7.82 ± 0.18	+

Tab. 4: Properties of polymeric gels

Polymers	Concentration % w/w	Appearance	Viscosity Pa·s (37 °C)	pH (± SD n = 3)	Gelling capacity
GEL					
P407	15.47	+++	10.30	6.92 ± 0.05	++
P188	45.00	+++	109.00	7.68 ± 0.16	++
MC + P407	1.00 + 14.00	+++	18.60	6.98 ± 0.02	+++
MC + NaCl	1.00 + 7.00	+	1.04	6.71 ± 0.23	–
MC + KCl	1.00 + 9.00	+	1.88	6.39 ± 0.23	–

detected. MC sols were glassy and became turbid with increasing concentration. The desired tolerable pH level interval for the oral cavity was chosen to be 6.8 – 7.8 (Loke et al., 2016). The pH levels of P188 increased with concentration and, at 45 %, the pH reached 7.67 ± 0.05. The pH levels of P407 and MC remained similar for various concentrations and were within the desired interval. The pH levels of the MC samples with additives were not within the interval except those of the samples containing P407 (see Tab. 2, Tab. 3).

Sol Injectability

The injectability of sol decreased with increasing concentration of polymers is a result of increased viscosity. P407 sols were continuously expelled through needles with a diameter less than 0.8 mm, except for the highest concentration (22.5 %). P188 at a concentration of 22.5 % was injectable. Higher concentrations examined were non-injectable. MC was injectable when used at concentrations equal to or less than 1 %.

Critical sol-gel transition temperature (T_{sg})

The T_{sg} decreased with increasing concentration in the case of all three polymers (see Fig. 1, 2 and 3). The favorable T_{sg} value should be in the 30 – 37 °C interval. These transition temperatures ensure that a sol does not form a gel when stored at room temperature or when applied. Various methods were used to determine the T_{sg}.

The tube test was selected as an indicative method for a faster decision-making process. P188 reached T_{sg} within the interval at concentrations greater than 40 %. Such high concentrations of constitutive excipients are economically demanding and can complicate the preparation process. Furthermore, P188 sols at these concentrations cannot be injected. A

Fig. 1: T_{sg} dependence of poloxamer 188 on concentration

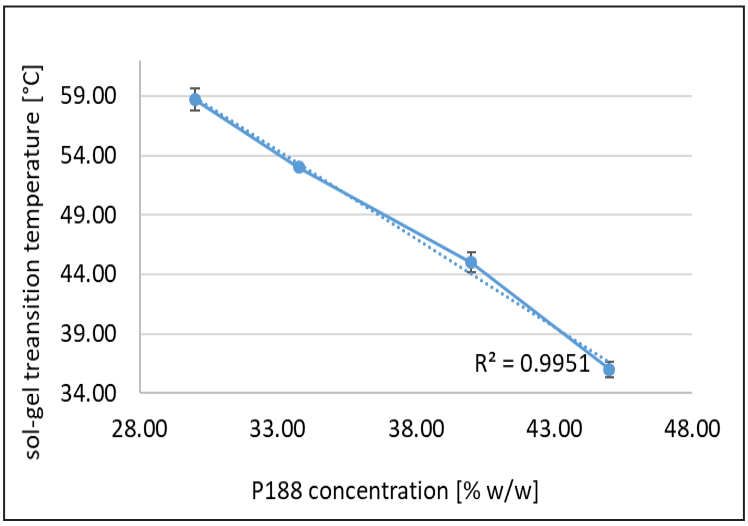


Fig. 2: T_{sg} dependence of poloxamer 407 on concentration

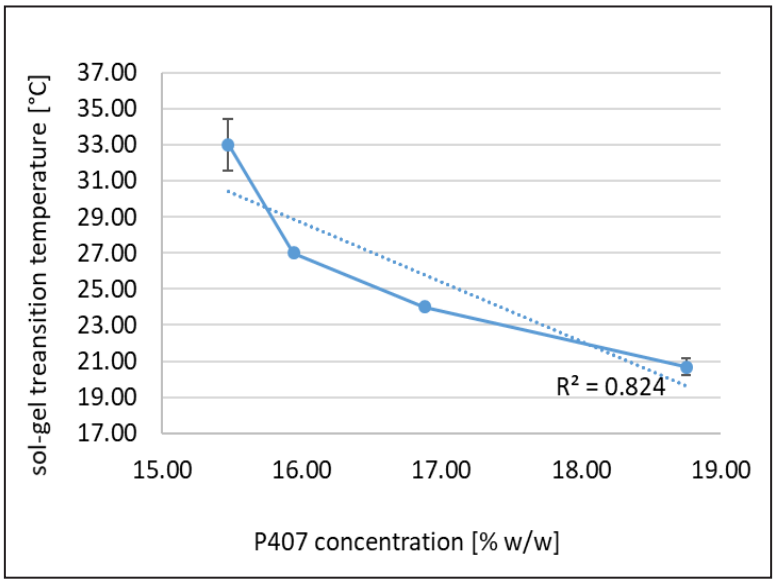
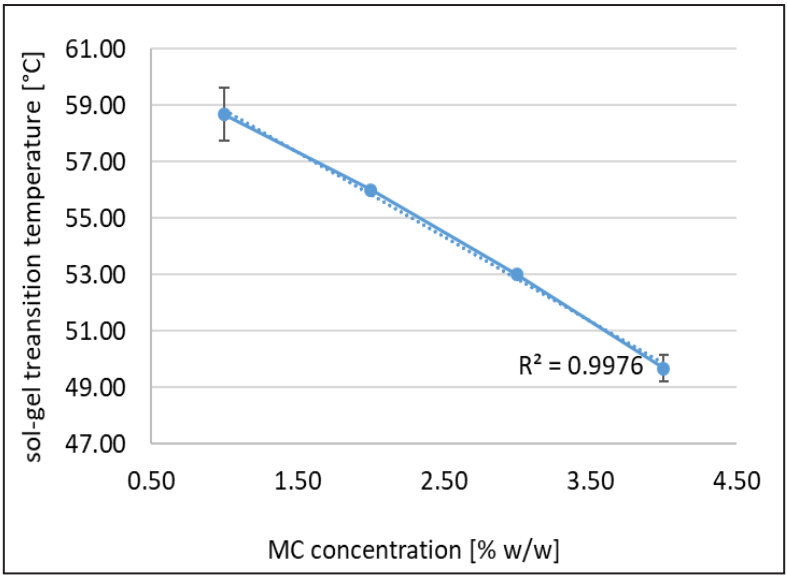


Fig. 3: T_{sg} dependence of methylcellulose on concentration



more suitable alternative is P407. T_{sg} within the desired interval was determined at a concentration of 15 – 16 % polymer. The measured T_{sg} was similar to the temperatures determined by rheological methods by Li et al. (2018), despite the accelerated preparation of sol (Li and Hyun, 2018) (see Tab. 2). For a combination of P407 and P188, it would be beneficial to combine P407 with lower T_{sg} (then desired) and P188, which would increase the temperature and increase the viscosity and gel strength. In combinations of P407-P188, P407 decreases and P188 increases T_{sg} (Soliman et al., 2019).

MC has a suitable pH and injectability at a concentration of 1 %, but T_{sg} was 58.67 ± 0.94 °C. T_{sg} slowly decreased with concentration and at 4 % reached 49.67 ± 0.47 °C. $NaHCO_3$, NaCl, KCl, sorbitol, and P407 were tested to adjust T_{sg}. $NaHCO_3$, NaCl, KCl, and P407 successfully lowered the temperature (see Fig. 7). Except for the combination with $NaHCO_3$, all combinations have showed favorable properties. $NaHCO_3$, KCl, and NaCl reduced T_{sg} after an accelerated preparation procedure, when MC was not allowed to dissolve in the refrigerator for 48 h, as opposed to the work by Bhowmik et al. (2011) (Bhowmik et al., 2011). MC in combination with P407 could act as a suitable constitutive excipient for *in situ* gels with favorable pH levels, injectability, and T_{sg}. It was confirmed that by adjusting the amount of P407 in the combination of MC and P407, it is possible to change T_{sg}. Despite a different sol preparation procedure than in the work by Boonrat et al. (2021), the same effect was observed. T_{sg} decreased with increasing P407 concentration (Boonrat et al., 2022). The addition of D-sorbitol reduced T_{sg} to 42 °C at a concentration of 26 %. Itoh et al. (2010) stated that D-sorbitol (25 %) reduced T_{sg} of 1 % MC to 36.81 °C, while its further increase led to a further decrease in T_{sg} (Itoh et al., 2010).

To determine T_{sg} and compare it with the temperatures obtained by the TTM, the storage G′ and loss G″ moduli were determined in oscillatory mode. Examination of these moduli under the influence of temperature change is a preferred way to determine the T_{sg} of the thermosensitive formulation without destroying the 3D structure of the resulting gel. These moduli determine whether a viscoelastic material behaves as a viscous liquid (G′ < G″) or an elastic solid (G′ > G″) at a certain moment. At temperature, when G′ = G″, a phase transition from sol to gel occurs. Storage and loss moduli examination is also used for the confirmation of the presence of a gel structure. This form needs to be distinguished from a highly viscous liquid, which can show the same results as a gel *in vitro*, however, they perform differently *in vivo* due to the structure difference (Destruel et al., 2017). It is not possible to distinguish a viscous sol from a gel and a gel with low yield point from a sol. A state, when G′ > G″, is considered to confirm the creation of a 3D network, a gel (Li and Hyun, 2018).

A difference was observed between T_{sg} determined by the TTM and rheometry. This phenomenon can be found in other studies using these methods to determine T_{sg} (Bain et al., 2012; Dewan et al., 2015). This difference is probably related to the fact that TTM and rheometry determine T_{sg} representative for different sol-gel phase transition stages. Li et al. (2020) assume that the moment when G′ starts to prevail over G″ determines a temperature when the elastic component is predominant; however, it is not enough to resist the shear induced by the tube tilting. Therefore, the formation of a gel structure resistant to tube tilt is not represented by a temperature when G′ = G″ or an immediate increase of G′ over G″, but a certain higher value of G′ (Li et al., 2020). Results of TTM can be affected by external influences, whereas rheometric measurements eliminate this impact since measurements take place in a closed space with constant conditions. The TTM is considered to be only indicative and serves a purpose mainly in the first stages of research. In the samples P407, P188, and MC + P407 an increase in elasticity and viscosity with temperature was observed. The presence of gel structure was confirmed (see Fig. 4, 5, and 6) and T_{sg} was determined (see Tab. 5). The presence of gel was not confirmed in samples containing salts (temperature-lowering additive). Since dilution of such viscose liquids by

Fig. 4: Sol-gel transition temperature of P407 (15.47 %)

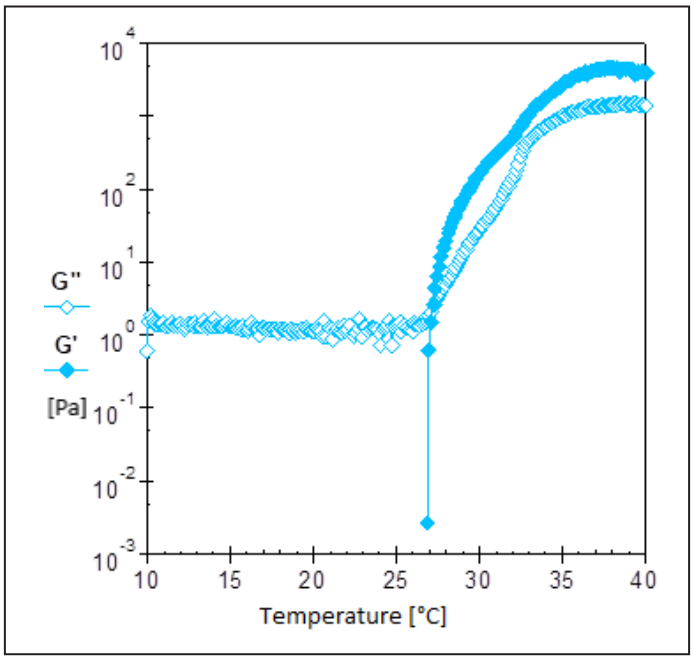
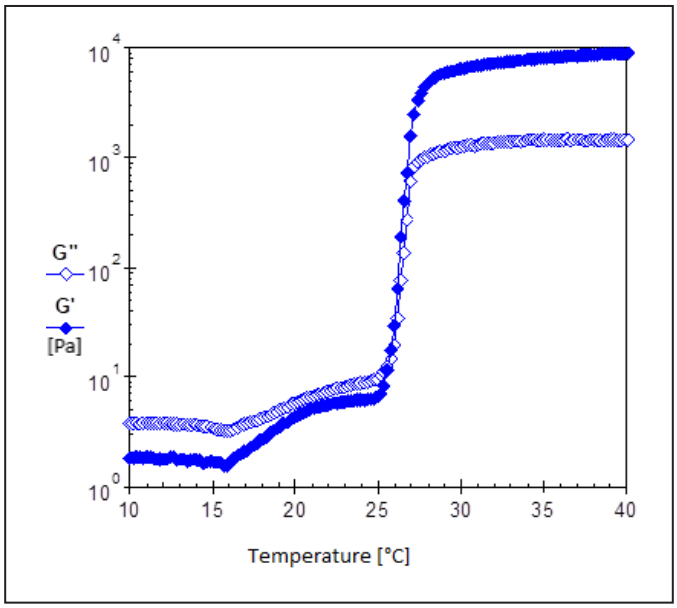


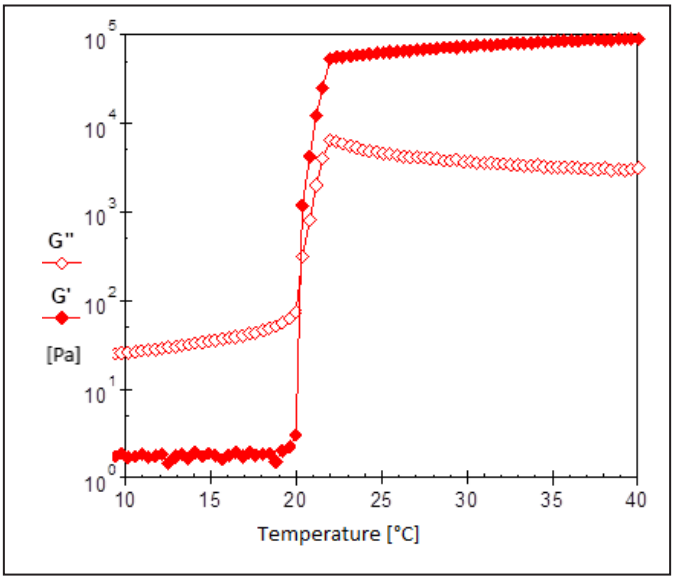
Fig. 5: Sol-gel transition temperature of MC + P407 combination (1 % and 14 %)



body fluids would lead to an early disintegration of the dosage form and separation of the mucoadhesion site, these formulations are not suitable candidates for *in situ*-forming oromucosal gels.

P407, P188, and MC + P407 combination show different phase transition progress. In the case of poloxamer samples, there is a sharp increase in modules after reaching the T_{sg}. A combination of poloxamer and other polymers such as MC causes a gradual increase in moduli (see Fig. 5) in the region of 15 – 25 °C prior to the sharp increase. Poloxamers alone do not show this gradual increase (see Fig. 6).

Fig. 6: Sol-gel transition temperature of P188 (45 %)



Tab. 5: Comparison of T_{sg} determined by the TTM and rheometrically

Polymers	Concentration % w/w	TTM T_{sg} °C (± SD n = 3)	Rheometry T_{sg} °C	Lower T_{gel} °C
P407	15.47	33.00 ± 1.41	27.20	30.80
P188	45.00	36.00 ± 1.63	20.50	21.50
MC + P407	1.00 + 14.00	30.00 ± 0	25.70	26.00
MC + NaCl	1.00 + 7.00	37.00 ± 0	–	–
MC + KCl	1.00 + 9.00	35.00 ± 0	–	–

Fig. 7: Influence of excipients on T_{sg} of 1 % methylcellulose

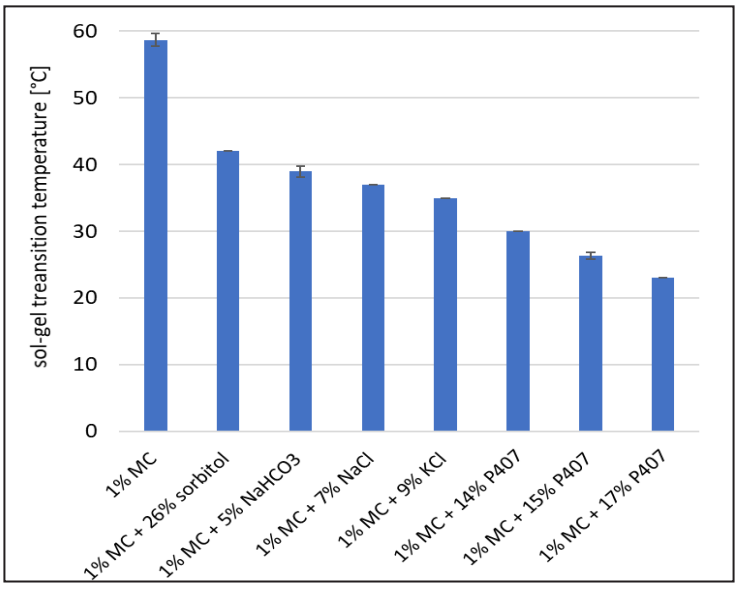


Fig. 8: Viscosity dependence on temperature

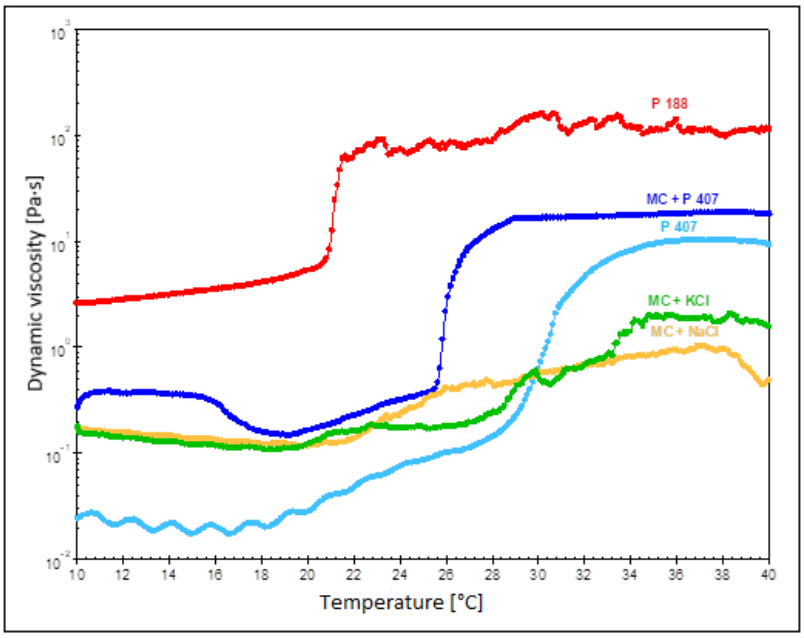
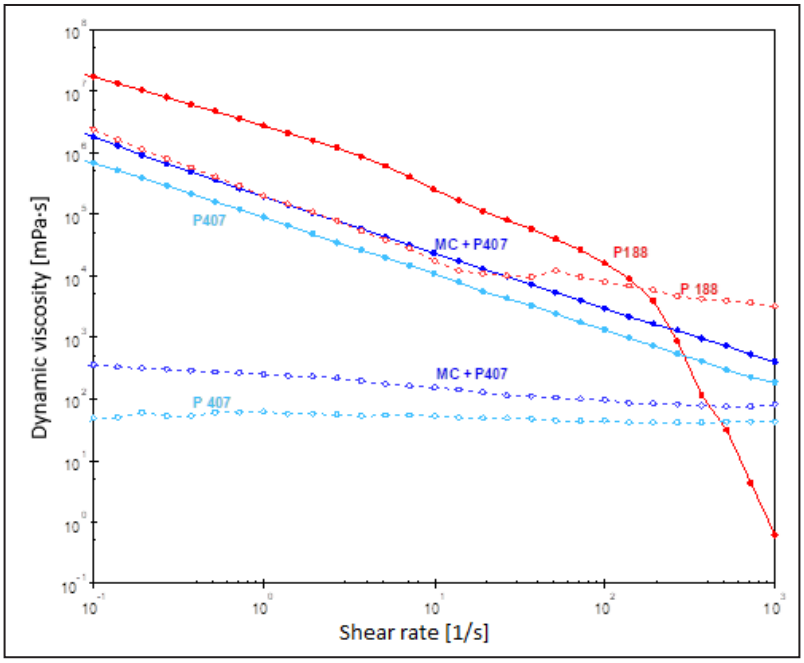


Fig. 9 Viscosity curves at 20 °C (empty dots) and 37 °C (full dots)



The determination of T_{sg} is possible by using viscometry, measuring the lower T_{gel}. It is a temperature close to T_{sg}, at which the viscosity increases sharply (Boonrat et al., 2022). The lower T_{gel} was determined only in samples with rheometrically confirmed gel formation (see Tab. 5). In the case of MC + KCl and MC + NaCl samples, it was not possible to determine this temperature. The higher T_{gel} (temperature

at which the viscosity starts to decrease from the plateau) was not determined in the selected measuring interval. At 40 °C, the viscosity was in the *plateau* zone.

Gelling Capacity

MC + P407 persisted the longest in the simulated saliva. P407 and P188 persisted in a shorter time, only tens of minutes. Gels containing MC and NaCl or KCl salts did not form a gel hard enough to withstand the vortex, despite their T_{sg} being 37 and 35 °C.

Viscosity

The viscosity increased with the increasing temperature. All samples showed an increase in viscosity at 37 °C compared to 20 °C (see Tab. 3, 4; Fig. 8). The viscosity started to increase at around 20 °C, which could cause difficulties for narrower needles during application. However, there are wider cannulas for local oral delivery. The highest viscosity at 37 °C was measured in case of sample P188. However, the increase was relatively small compared to the viscosity increase of P407 and MC + P407. P188 has different molecular weight and ratio of polyethylene oxide (PEO) units to polypropylene oxide (PPO) units, but the difference in viscosity is mainly caused by its high concentration compared to the rest of the samples. The second highest viscosity was measured in the case of P407. MC with salts had the lowest viscosity and the temperature responsiveness was the weakest. The addition of P407 to MC caused a stronger viscosity increasing effect than salts.

Rheology

Flow properties influence the application process and formulation persistence at the application site. According to the flow measurements at different temperatures, we can conclude that at 20 °C, P407 flows similarly to Newtonian fluids and at 37 °C by non-Newtonian flow, as previously stated (Charrueau et al., 2001; Chang et al., 2002). P188, MC + P407, MC + KCl, and MC + NaCl are pseudoplastic at both temperatures. At 20 °C the viscosity of the samples decreases very slightly (P407, MC + P407) with the shear rate (see Fig. 9). These lower viscosity levels (see Tab. 3) are convenient and favorable for drug application, during which the dose is exposed to shear stress. By pressing the piston of the syringe, a shear stress is created that causes a decrease in the viscosity of the pseudoplastic fluids, allowing the ejection of a dose through narrower needles. This behavior is also observed at 37 °C in all samples; however, the viscosity is much higher prior to shearing, suggesting higher strength and resistance to saliva flow or mouth movements. The shear rates that influence viscosity and are relevant for the oral cavity are 60 s^{-1} while swallowing and 160 s^{-1} while speaking (Balmer and Hirsch, 1978).

CONCLUSION

The oral environment significantly decreases the bioavailability and pharmacotherapeutic effectiveness of drugs administered oromucosally. *In situ* gel is a dosage form that provides variability in the route of administration and application site. Therefore, this study investigates polymers for the preparation of oromucosal *in situ* gel, which could withstand the demanding environment of the oral cavity. Poloxamers 407, 188, and methylcellulose sols with temperature-adjusting additives were evaluated. The most favorable properties were observed in the case of P407 and its combination with MC. This combination ensured a suitable T_{sg}, gelling capacity, and increased viscosity at 37 °C while maintaining favorable pH, transparency, and relatively easy handling. Although P407 provides a suitable transition temperature at the corresponding concentrations, the gels formed do not have the required strength. MC, on the other hand, shows a higher gel strength and viscosity, but at very high concentrations. However, P407 in combination with MC showed increased viscosity and gelling capacity suggesting higher strength.

FUNDING

This study was supported by following projects: IGA UVLF 01/2023 "Increasing the effectiveness of the treatment of oral diseases by developing a silver nanoparticle-loaded in situ gel based on smart polymers"; VEGA 1/0353/22; APVV 19-324; and SK-TW Azacai.

REFERENCES

Aguilar, M. R., Román, J. S.: Chapter 1 – Introduction to Smart Polymers and Their Applications. *Smart Polymers and their Applications*, 2nd edn., Elsevier, 2019. 1 – 11.

Bain, M. K., Bhowmick, B., Maity, D., Mondal, D., Mollick, Md M. R., Rana, D., Chattopadhyay, D.: Synergistic effect of salt mixture on the gelation temperature and morphology of methylcellulose hydrogel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 51 (5), 831 – 836. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.07.028.

Balmer, R. T., Hirsch, S. R.: The non-Newtonian behaviour of human saliva. *AIChE Symposium Series on Biorheotogy*, 1978, 74, 125 – 129.

Bhandwalkar, M. J., Avachat, A. M.: Thermoreversible nasal *in situ* gel of venlafaxine hydrochloride: formulation, characterization, and pharmacodynamic evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 2013, 14 (1), 101 – 110. Doi:10.1208/s12249-012-9893-1.

Bhowmik, M., Bain, M. K., Ghosh, L. K., Chattopadhyay, D.: Effect of salts on gelation and drug release profiles of methylcellulose-based ophthalmic thermo-reversible in situ gels. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2011, 16 (4), 385 – 391. Doi:10.3109/10837451003774369.

Boonrat, O., Tantishaiyakul, V., Hirun, N.: Micellization and gelation characteristics of different blends of pluronic F127/methylcellulose and their use as mucoadhesive *in situ* gel for periodontitis. *Polymer Bulletin*, 2022, 79, 4515 – 4534. Doi:10.1007/s00289-021-03722-w.

Chang, J. Y., Oh, Y. K., Choi, H. G., Kim, Y. B., Kim, C. K.: Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 241 (1), 155 – 163. Doi:10.1016/S0378-5173(02)00232-6.

Charrueau, C., Tuleu, C., Astre, V., Grossiord, J. L., Chaumeil, J. C.: Poloxamer 407 as a thermogelling and adhesive polymer for rectal administration of short-chain fatty acids. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2001, 27 (4), 351–357. Doi:10.1081/DDC-100103735.

Destruel, P. L., Zeng, N., Maury, M., Mignet, N., Boudy, V.: *In vitro* and *in vivo* evaluation of in situ gelling systems for sustained topical ophthalmic delivery: state of the art and beyond. *Drug Discovery Today*, 2017, 22 (4), 638 – 651. Doi:10.1016/j.drudis.2016.12.008.

Dewan, M., Bhowmick, B., Sarkar, G., Rana, D., Bain, M. K., Bhowmik, M., Chattopadhyay, D.: Effect of methyl cellulose on gelation behavior and drug release from poloxamer based ophthalmic formulations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 72, 706 – 710. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.09.021.

Hrubý, M.: Samouspořádání v polymerních systémech inspirované živou přírodou [Self-assembly in polymer systems inspired by living nature]. *Chemicke Listy*, 2018, 112 (5), 294 – 300.

Itoh, K., Hatakeyama, T., Kimura, T., Shimoyama, T., Miyazaki, S., D'emanuele, A., Attwood, D.: Effect of D-sorbitol on the thermal gelation of methylcellulose formulations for drug delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2010, 58, 2, 247–249. doi:10.1248/cpb.58.247.

Li, T., Bao, Q., Shen, J., Lalla, R. V., Burgess, D. J.: Mucoadhesive *in situ* forming gel for oral mucositis pain control. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, 580, 119 238. Doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119238.

Li, X., Hyun, K.: Rheological study of the effect of polyethylene oxide (PEO) homopolymer on the gelation of PEO-PPO-PEO triblock copolymer in aqueous solution. *Korea-Australia Rheology Journal*,

2018, 30 (2), 109 – 125. Doi:10.1007/s13367-018-0012-z.

Loke, C., Lee, J., Sander, S., Mei, L., Farella, M.: Factors affecting intra-oral pH – a review. *Journal of oral rehabilitation*, 2016, 43 (10), 778 – 785. Doi:10.1111/joor.12429.

Malikmammadov, E., Hasirci, N.: Chapter 8 – Dual- and multistimuli-responsive polymers for biomedical applications. *Smart Polymers and their Applications*, 2nd edn., Elsevier Ltd., 2019. 255 – 278.

Nguyen, S., Hiorth, M.: Advanced drug delivery systems for local treatment of the oral cavity. *Therapeutic Delivery*, 2015, 6 (5), 197 – 210. Doi:10.4155/tde.15.5.

Paderni, C., Compilato, D:, Giannola, L. I., Campisi, G.: Oral local drug delivery and new perspectives in oral drug formulation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 2012, 114 (3), e25 – e34. Doi:10.1016/j.oooo.2012.02.016.

Patel, V. F., Liu, F., Brown, M. B.: Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2011, 153 (2), 106 – 116. Doi:10.1016/j.jconrel.2011.01.027.

Qureshi, D., Nayak, S. K., Maji, S., Anis, A., Kim, D., Pal, K.: Environment sensitive hydrogels for drug delivery applications. *European Polymer Journal*, 2019, 120, 109 220. Doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.109220.

Rajeshwari, H. R., Dhamecha, D., Jagwani, S., Rao, M., Jadhav, K., Shaikh, S., Puzhankara, L., Jalalpure, S.: Local drug delivery systems in the management of periodontitis: A scientific review. *Journal of Controlled Release*, 2019, 307, 393 – 409. Doi:10.1016/j.jconrel.2019.06.038.

Ruel-Gariépy, E., Leroux, J. C.: *In situ*-forming hydrogels – review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004, 58 (2), 409 – 426. Doi:10.1016/j.ejpb.2004.03.019.

Salamat-Miller, N., Chittchang, M., Johnston, T. P.: The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57 (11), 1666 – 1691. Doi:10.1016/j.addr.2005.07.003.

Schmolka, I. R.: Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1972, 6 (6), 571 – 582. Doi:10.1002/jbm.820060609.

Soliman, K. A., Ullah, K., Shah, A., Jones, D. S., Singh, T. R. R.: Poloxamer-based in situ gelling thermoresponsive systems for ocular drug delivery applications. *Drug Discovery Today*, 2019, 24 (8), 1575 – 1586. Doi:10.1016/j.drudis.2019.05.036.

Yadav, R., Kanwar, I. L., Haider, T., Pandey, V., Gour, V., Soni V.: *In situ* gel drug delivery system for periodontitis: an insight review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 6 (1), 1 – 13. Doi:10.1186/s43094-020-00053-x.

Zahir-Jouzdani, F., Wolf, J. D., Atyabi, F., Bernkop-Schnürch, A.: *In situ* gelling and mucoadhesive polymers: why do they need each other? *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2018, 15 (10), 1007 – 1019. Doi:10.1080/17425247.2018.1517741.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 4: 78 – 86, 2023

OPHIOCORDYCEPS SINENSIS, *CORDYCEPS MILITARIS*: ZDROJ BIOAKTÍVNYCH POLYSACHARIDOV

OPHIOCORDYCEPS SINENSIS, *CORDYCEPS MILITARIS*: A SOURCE OF BIOACTIVE POLYSACCHARIDES

Ungvarská Maľučká, Lucia; Uhrinová, Anna; Lysínová, Patrícia

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

anna.uhrinova@uvlf.sk

ABSTRAKT

V posledných rokoch sa do popredia dostávajú predovšetkým produkty pochádzajúce priamo z prírodného prostredia. Jedná sa o liečivé rastliny, časti týchto liečivých rastlín a ich plody. V neposlednom rade sú to však aj jedlé a liečivé huby. Práve liečivé huby sú známe predovšetkým z tradičnej čínskej medicíny. Huby rodu *Cordyceps* sú pomerne rozšírené parazitické huby, ktoré sa vyskytujú na trávnatých vysokohorských plochách a pasienkoch. U štyroch vzoriek húb sa sledovala antioxidačná, antimykotická a antibakteriálna aktivita. Vzorky húb *Ophiocodyceps sinensis* a *Cordyceps militaris* boli kultivované na dvoch rozdielnych substrátoch *Oryza sativa japonica* a *Oryza sativa indica*. Zo vzoriek, ktoré neboli deproteinizované (1 – 4) vykazovala najvyššiu antioxidačnú aktivitu proti DPPH radikálu vzorka 3 (IC_{50} = 2,85 ± 0,04 mg.ml^{-1}), pestovaná na substráte *Oryza sativa indica, Cordyceps militaris*. Najnižšia antioxidačná aktivita bola zistená u vzorky 2 (IC_{50} = 58,74 ± 0,20 mg.ml^{-1}), pestovanej na substráte *Oryza sativa japonica*, kmeň *Ophiocordyceps sinensis*. Hodnota antioxidačnej aktivity, vyjadrenej ako IC_{50}, po extrakcii a deproteinizácii bola pre vzorku 1d 7,05 ± 0,42 mg.ml^{-1}. Vzorky 2d a 3d nevykazovali antioxidačnú aktivitu. Prostredníctvom NMR spektroskopie a následným porovnaním s literatúrou sa podarilo zistiť, že majoritná chemická zlúčenina v deproteinizovaných extraktoch 1d a 4d bol hydrofilný polyglukán označovaný ako CBHP.

Kľúčové slová: antibakteriálna, antimykotická a antioxidačná aktivita; *Cordyceps militaris*; *Ophiocordyceps sinensis*

ABSTRACT

In recent years, products originating directly from the natural environment have come to the fore. These are medicinal plants, parts of these medicinal plants and their fruits. Last but not least, they are also edible and medicinal mushrooms. Medicinal mushrooms are known primarily from traditional Chinese medicine. *Cordyceps* fungi are relatively widespread parasitic fungi that occur on grassy high mountain areas and pastures. The antioxidant, antifungal and antibacterial activity of four mushroom samples was monitored. Samples of *Ophiocodyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* were cultivated on two different substrates, *Oryza sativa japonica* and *Oryza sativa indica*. Of the samples that were not deproteinized (1 – 4), sample 3 (IC_{50} = 2.85 ± 0.04 mg.ml^{-1}), grown on the substrate of *Oryza sativa indica, Cordyceps militaris,* showed the highest antioxidant activity against the DPPH radical. The lowest antioxidant activity was found in sample 2 (IC_{50} = 58.74 ± 0.20 mg.ml^{-1}), grown on the substrate of *Oryza sativa japonica,* strain *Ophiocordyceps sinensis*. The value of antioxidant activity, expressed as IC_{50}, after extraction and deproteinization was 7.05 ± 0.42 mg.ml^{-1} for sample 1d. Samples 2d and 3d did not show antioxidant activity. Through NMR spectroscopy and subsequent comparison with the literature, it was found that the major chemical compound in the deproteinized extracts 1d and 4d was a hydrophilic polyglucan referred to as CBHP.

Key words: antibacterial, antifungal and antioxidant activity; *Cordyceps militaris*; *Ophiocordyceps sinensis*

ÚVOD

Huby rodu *Cordyceps* sa označujú ako „himalájska viagra“ alebo „himalájske zlato“ kvôli ich širokej klinickej a komerčnej hodnote (Tuli, 2014). Produkty z kultivovaných *Cordyceps militaris* preukázali porovnateľnú farmakologickú účinnosť s prírodnými *Cordyceps militaris* (Luo, 2017).

Obsahové látky húb rodu *Cordyceps* zahŕňajú kordycepín (3‘-deoxyadenozín) a jeho deriváty, ergosterol, polysacharidy, glykoproteíny a peptidy obsahujúce kyselinu α-aminoizomaslovú. *Ophiocordyceps sinensis* a *Cordyceps militaris* sa vyznačujú protinádorovými, antimetastatickými, imunomodulačnými, antioxidačnými, protizápalovými, insekticídnymi, antimikrobiálnymi, hypolipidemickými, hypoglykemickými, neuroprotektívnymi a renoprotektívnymi účinkami (Ng, 2005). V *Cordyceps* sa vyskytuje aj široká škála ďalších zložiek vrátane rôznych druhov esenciálnych aminokyselín (lyzín, kyselina glutámová, prolín, treonín a iné), vitamínov (B_1, B_2, B_{12} a K), stopových prvkov, monosacharidov, oligosacharidov a nenasýtených mastných kyselín (napr. kyselina linolová), ktoré tvoria okolo 70 % celkových mastných kyselín (Tuli, 2014). *Cordyceps* sa už stáročia využívajú pri liečbe respiračných ochorení. Majú rozsiahlu históriu použitia pri terapii chronickej bronchitídy (najmä u starších pacientov), astmy, chronickej obštrukčnej choroby pľúc, tuberkulózy, pľúcneho srdca a ďalších chorôb dýchacieho systému, čo môže súvisieť s ich schopnosťou ovplyvňovať tracheálne a bronchiálne funkcie. Čínski lekári ich vo veľkej miere využívajú v liečbe chronických ochorení, vrátane chronickej nefritídy, chronickej renálnej dysfunkcie alebo zlyhania, chronickej pyelonefritídy a nefrotického syndrómu. Štúdie preukázali, že *Cordyceps* môže zlepšiť funkciu obličiek a brániť ich poškodeniu. Pravidelná konzumácia húb *Cordyceps* je takisto spojená s celkovým zlepšením fyzickej výkonnosti a kvality života ľudí. Pravdepodobne vďaka ich činnosti zameranej na zlepšenie energetického stavu buniek a vychytávanie voľných radikálov kyslíka taktiež znižujú únavu, intoleranciu na chlad a závraty. Kardiovaskulárne prínosy týchto húb zahŕňajú kontrolu väčšiny arytmií s potvrdením elektrokardiogramu (EKG), významné zlepšenie klinických symptómov a EKG u pacientov s ischemickou chorobou srdca alebo chronickým srdcovým zlyhaním, zníženie viskozity krvi a plazmy, zlepšenie krvného obehu životne

dôležitých orgánov ako sú srdce a mozog, zníženie agregácie doštičiek a zabránenie trombóze (Zhu, 1998). Účinky na srdcovocievny systém zahŕňajú aj zníženie vysokého krvného tlaku pomocou priameho dilatačného účinku na cievy alebo sú sprostredkované prostredníctvom M-cholinergických receptorov (Tuli, 2014). V hubách *Ophiocordyceps sinensis* sa nachádza 18 druhov aminokyselín. Najznámejšou aminokyselinou je tryptofán, ktorý je prekurzorom serotonínu (Liu, 2015).

Z húb bolo izolovaných mnoho prírodných polysacharidov a ich komplexov s proteínmi, ktoré boli použité v terapii rôznych ochorení (Yu, 2007). Mycélium húb rodu *Cordyceps* obsahuje niektoré polysacharidy, ktoré sú zodpovedné za jeho biologickú aktivitu. Zároveň predstavujú jednu z najsľubnejších tried antioxidantov na prevenciu oxidačného poškodenia potravín a živých organizmov, kvôli ich širokej dostupnosti a nízkej toxicite (Yan, 2013). Faktory, ako je molekulová hmotnosť, typ monosacharidovej jednotky, ovplyvňujú protinádorovú a imunodulačnú aktivitu extrahovaných polysacharidov z *Cordyceps* (Soltani, 2013).

MATERIÁL A METÓDY

Na extrakciu polysacharidov sa použili dva kmene húb rodu *Cordyceps*: *Ophiocordyceps sinensis*, kultivované na subtráte *Oryza sativa indica* (vzorka **1**) a substráte *Oryza sativa japonica* (vzorka **2**). Huby *Cordyceps militaris* boli kultivované na rovnakých substrátoch, vzorka **3** na substráte *Oryza sativa indica* a vzorka **4** na *Oryza sativa japonica.* Predmetné vzorky húb boli poskytnuté Technickou Univerzitou vo Zvolene.

Rozpúšťadlá a chemické zlúčeniny boli použité v komerčnom stave. 0,9 % vodný roztok NaCl – fyziologický roztok (Mikrochem, Slovensko), D_2O (d_2) – deuterovaná voda (Mikrochem, Slovensko), dietyléter (Mikrochem, Slovensko), DMSO – dimetylsulfoxid (Merck, Millipore), DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylový radikál (Sigma-Aldrich, USA), EtOH – etanol (Mikrochem, Slovensko), $CHCl_3$ – chloroform (Mikrochem, Slovensko), MeOH – metanol (Mikrochem, Slovensko), *n*-BuOH – (Mikrochem, Slovensko).

V štúdii bolo použité nasledujúce prístrojové vybavenie: McFarland Densitometer DEN-1 firmy Biosan, Lotyšsko. NMR spektrometer VNMRS 600 MHz firmy Varian, Palo Alto, Kalifornia, USA. Rotačná vákuová odparka IKA RV 10 digital, Nemecko. Spektrofotometer Biochrom Libra 22, USA. Sušiareň ED, APT Line II, Binder, Nemecko. Vortex V-1 plus firmy Biosan, Lotyšsko.

Príprava extraktov

Bolo navážených 9 g z každej analyzovanej vzorky **1** – **4** a kvantitatívne prenesených do varnej banky. Vzorky **1** – **4** boli refluxované počas troch hodín v 50 ml H_2O. Extrakty boli následne prefiltrované cez fritu a odparené dosucha na rotačnej vákuovej odparke.

Antioxidačná aktivita

Antioxidačná aktivita vzoriek **1** – **4** bola stanovená pomocou 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylového radikálu (DPPH) s koncentráciou 0,2 $mmol.l^{-1}$ v metanole. Absorbancia sa merala pomocou spektrofotometra Libra S12 v 1 cm kyvete pri vlnovej dĺžke 517 nm pri laboratórnej teplote.

Výsledky meraní absorbancie sa následne použili na výpočet antioxidačnej aktivity, ktorá je definovaná ako: $I\ (\%) = (A_{slep} - A_{vz})/A_{slep} \times 100\ \%$. I (%) je percentuálne vyjadrenie inhibície aktivity DPPH radikálu, A_{slep} je absorbancia slepého roztoku DPPH s koncentráciou 0,2 $mmol.l^{-1}$ a A_{vz} je absorbancia vzorky po 30-minútovej inkubácii v tme pri laboratórnej teplote. Namerané výsledky sú uvedené ako stredná inhibičná koncentrácia (IC_{50}), ktorá predstavuje koncentráciu vzorky spôsobujúcu 50 %-nú stratu aktivity DPPH radikálu. Antioxidačná aktivita sa stanovila metodikou podľa literatúry Shekhar (2014) a Wang (2005).

Deproteinizácia polysacharidov extrahovaných z húb Sevagovou metódou

Deproteinizácia je základným krokom pre analýzu

polysacharidov izolovaných z rastlín (Chen, 2012). Do oddeľovacích lievikov sa prenieslo 15 ml vodného roztoku vzorky **1**; 17 ml vodného roztoku vzorky **2**; 45 ml vodného roztoku vzorky **3** a 7 ml vodného roztoku vzorky **4**. Na deproteinizáciu polysacharidov sa do oddeľovacieho lievika pridalo také množstvo zmesi $CHCl_3$/*n*-BuOH (4 : 1), ktoré zodpovedalo trojnásobnému množstvu extraktov **1** – **4**. Po extrakcii sa zmes nechala stáť 15 minút, aby sa dosiahla rovnováha a oddelili sa 2 fázy, čím sa reziduálne proteíny extrahovali do nižších vrstiev (organická fáza). Následne sa odstránili oddelením organickej fázy. Polysacharidy sa vyzrážali z vodnej fázy pridaním trojnásobného množstva etanolu. Vodná fáza sa prefiltrovala a zrazenina sa premyla etanolom a dietyléterom.

Antimykotická aktivita deproteinizovaných extraktov 1 – 4 polysacharidov

Na stanovenie citlivosti referenčného kmeňa kvasiniek *Candida albicans* CCM 8215/ATCC 10231 (Česká sbírka mikroorganizmů, Brno, Česká republika) sa použila štandardná disková difúzna metóda M44-A2 [Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2009] s modifikáciou agaru. Namiesto Mueller-Hinton agaru bol použitý Sabourad dextrose agar.

Z čistej kultúry kvasiniek pomnoženej na Sabouraudovom agare sa odobralo 5 – 10 kolónií, ktoré sa následne resuspendovali fyziologickým roztokom a pomocou denzitometra sa suspenzia inokula upravila na hustotu 0,5 McFarlanda zodpovedajúcu 106 jednotkám tvoriacim kolónie (CFU – colony-forming unit) na 1 ml ($CFU.ml^{-1}$).

Pripravené inokulum sa nanieslo na povrch živného agaru sterilným tampónom a rozotrelo v troch smeroch tak, aby bol inokulovaný celý povrch pôdy. Proces inokulácie sa opakoval 2-krát s 15-minútovým odstupom. Následne sa na povrch inokulovaných platní asepticky poukladali čisté disky (blank), na ktoré sa aplikovali jednotlivé koncentrácie testovaných extraktov vzoriek **1** – **4** v množstve 30 µl. Platne sa inkubovali 24 hodín pri teplote 37 °C a po uplynutí inkubačnej doby sa odmerali veľkosti inhibičných zón.

Antibakteriálna aktivita deproteinizovaných extraktov polysacharidov

Na stanovenie antibakteriálnej aktivity deproteinizovaných extraktov polysacharidov sa navážilo 20 mg z každého deproteinizovaného extraktu polysacharidov. Ako rozpúšťadlo bolo použitých 210 µl dimetylsulfoxidu (DMSO). Antibakteriálna aktivita sa stanovila metodikou podľa literatúry Puupponen-Pimia (2001) a Viskelis (2009). Na testovanie antimikrobiálnej aktivity sa použili nepatogénne mikroorganizmy *Escherichia coli* CCM 3988 a *Staphylococcus aureus* CCM 4223 (Česká sbírka mikroorganizmů, Brno, Česká republika). Baktérie sa kultivovali v bujóne 20 hodín pri 35 ± 2 °C. Nariedené bujónové kultúry dosahovali hodnotu 0,5 stupňa MacFarlandovej stupnice. Ako pozitívna kontrola sa použil gentamycín (25 $\mu g.ml^{-1}$). Platne sa následne inkubovali 24 hodín pri 35 ± 2 °C. Po inkubácii sa zmerali priemery (mm) zón inhibície rastu (IZD – inhibition zone diameter). Na výpočet relatívneho priemeru zóny inhibície v % (RIDZ – relative inhibition zone diameter) sa používa vzorec % RIZD = (IZD_{vzorky} – $IZD_{negatívnej\ kontroly}$) / $IZD_{antibiotické\ štandardy}$ x 100 %, respektíve je výsledok uvedený ako priemer inhibičnej zóny v mm (Rojas, 2006).

NMR spektroskopia

Po prečistení vzoriek **1** – **4** Sevagovou metódou sa získali deproteinizované extrakty označené ako **1d** – **4d**. U vzoriek **1d** – **4d** boli následne namerané 1D a 2D NMR spektrá. Spektrálna analýza sa uskutočnila na spektrometri Varian VNMRS 600 MHz. Vodné extrakty vzoriek **1d** – **4d** (10 mg) sa rozpustili v 0,6 ml deuterovanej vody (D_2O-d_2), resp. v dimetylsulfoxide (DMSO-d_6) v kremenných NMR kyvetách. Určenie štruktúry chemických zlúčenín v extraktoch vzoriek **1d** – **4d** si vyžadovalo analýzu 1D (^1H, ^{13}C) a 2D (COSY, HSQC a HMBC) NMR spektier. Pri spracovaní spektier bol použitý softvér Mnova-MestReNova, verzia 11.0.4-18998, 2017 (Cobas, 2017).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

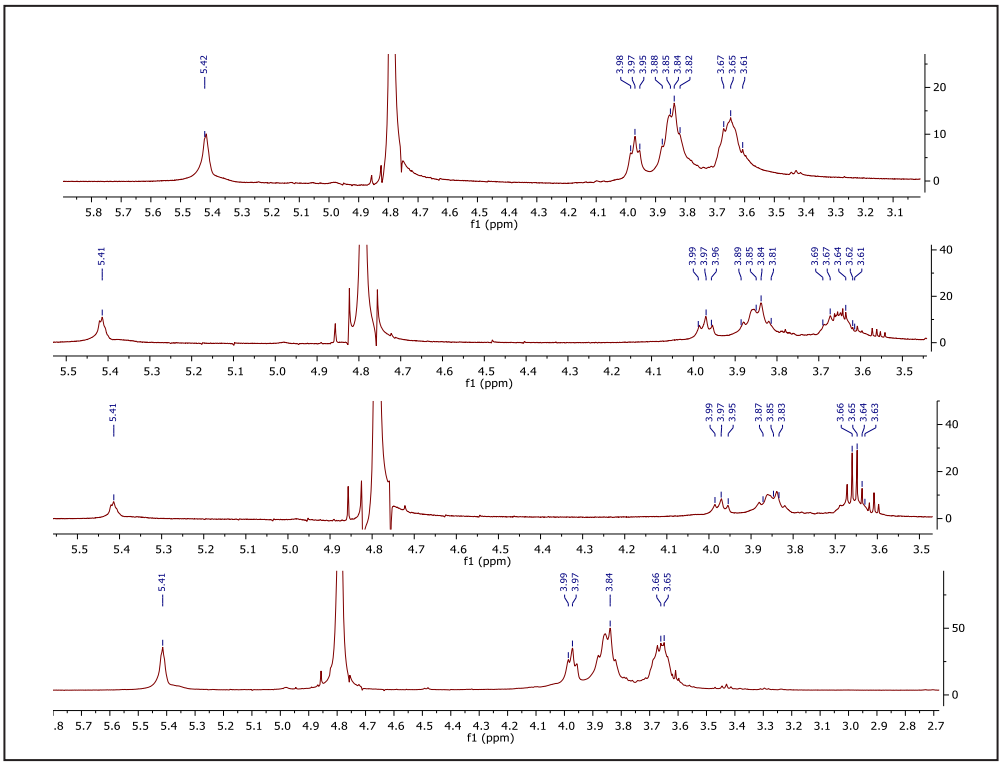
Po extrakcii refluxovaním bola výťažnosť vzorky **1**, pestovanej na substráte *Oryza sativa indica*, kmeň *Ophiocordyceps sinensis* 9,94 %; u vzorky **2**, pestovanej na substráte *Oryza sativa japonica*, kmeň *Ophiocordyceps sinensis* 49,53 %; u vzorky **3** pestovanej na substráte *Oryza sativa indica*, kmeň *Cordyceps militaris* 70,38 % a u vzorky **4** pestovanej na substráte *Oryza sativa japonica*, *Cordyceps militaris* 10,14 %. Na stanovenie antioxidačnej aktivity extraktov sa použil stabilný DPPH radikál. Pre lepšiu interpretáciu nameraných výsledkov sa pre jednotlivé vzorky zostrojili grafy závislosti antioxidačnej aktivity na koncentrácii a z grafov sa vypočítala stredná inhibičná koncentrácia (IC_{50}), teda koncentrácia, ktorá spôsobí 50 %-nú stratu aktivity DPPH radikálu. Z nameraných výsledkov vyplýva, že antioxidačná aktivita jednotlivých extraktov stúpa so zvyšujúcou sa koncentráciou extraktov. Zo vzoriek, ktoré neboli deproteinizované (**1** – **4**) vykazovala najvyššiu antioxidačnú aktivitu proti DPPH radikálu vzorka **3** (2,85 ± 0,04 $mg.ml^{-1}$), pestovaná na substráte *Oryza sativa indica*, *Cordyceps militaris*. Najnižšia antioxidačná aktivita bola zistená u vzorky **2** (58,74 ± 0,20 $mg.ml^{-1}$), pestovanej na substráte *Oryza sativa japonica*, kmeň *Ophiocordyceps sinensis*. Po deproteinizácii extraktov Sevagovou metódou sa testovala antioxidačná aktivita u vzoriek **1d** – **3d**. Hodnota antioxidačnej aktivity, vyjadrenej ako IC_{50}, po extrakcii a deproteinizácii bola pre vzorku **1d** 7,05 ± 0,42 $mg.ml^{-1}$. Vzorky **2d** a **3d** nevykazovali antioxidačnú aktivitu.

Je zrejmé, že deproteinizované vzorky nevykazujú antioxidačnú aktivitu, okrem vzorky **1d**. Rozličná antioxidačná aktivita jednotlivých nedeproteinizovaných extraktov mohla byť spôsobená rozdielnym chemickým zložením, v dôsledku rôznych kmeňov húb a ich pestovania na rozličných substrátoch. Porovnaním získaných výsledkov s literatúrou vyplýva, že antioxidačnú aktivitu vykazujú aj polysacharidy (Yan, 2013). Predovšetkým polysacharidy, ktorých výskyt sa vo vodných extraktoch predpokladal, sa následne potvrdil analýzou NMR spektier. Kyselina kordycepsová, ktorá spolu s polysacharidmi patrí k hlavným zložkám nachádzajúcim sa v hubách rodu *Cordyceps*, má tiež aktivitu proti voľným radikálom (Xiao, 2009; Zhou, 2009). Hlavičkový útvar *Cordyceps militaris*, nazývaný stromatum, obsahuje vysoký pomer esenciálnych aminokyselín, ako napríklad lyzín (101,2 $mg.g^{-1}$) a metionín (62,7 $mg.g^{-1}$). Obsahuje aj aminokyselinu tyrozín (4,7 $mg.g^{-1}$) (Kwan-Won, 2001). Z vedeckých prác (Huang, 2013) vyplýva, že antioxidačné účinky boli zistené aj u zlúčenín typu: tyrozín, metionín, histidín, lyzín a tryptofán.

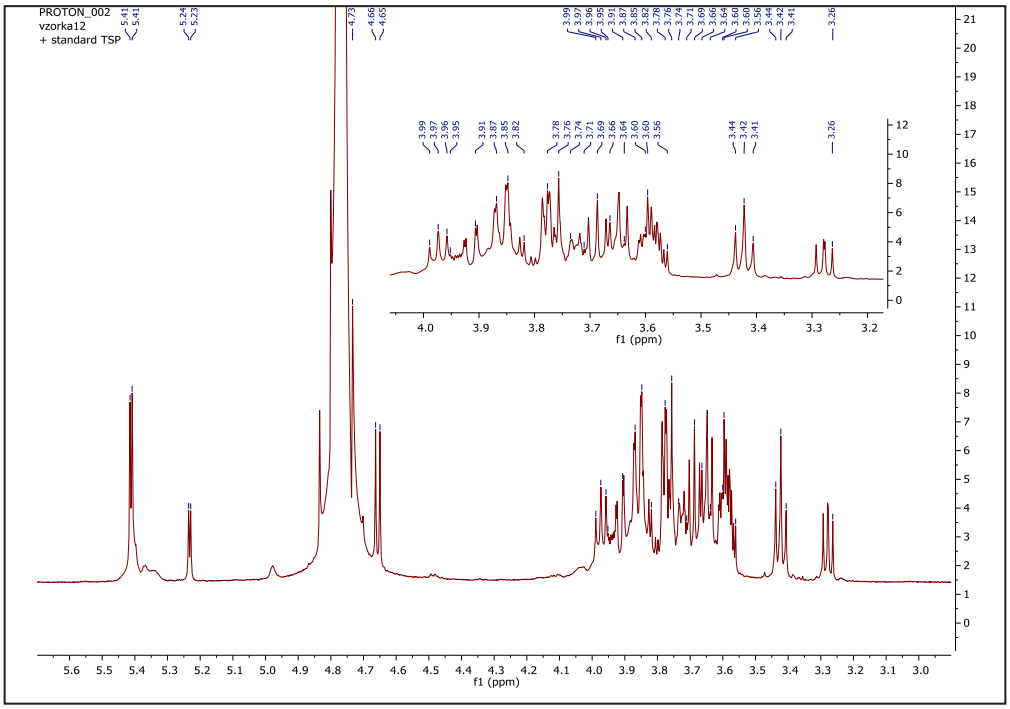
Antimykotická aktivita proti kvasinkám *Candida albicans* sa stanovovala u vodných extraktov polysacharidov (vzorky **1** – **4**). Z meraní priemeru inhibičných zón vyplýva, že extrakty proti kvasinkám *Candida albicans* nevykazujú antimykotickú aktivitu. Porovnaním s literatúrou vyplýva, že antimykotická aktivita proti kvasinkám *Candida albicans* bola pozorovaná u ergosterolu, ktorý patrí medzi obsahové látky húb rodu *Cordyceps* (Zheng, 2013). Pracovná skupina Park a kolektív (2009) skúmala antimykotickú a cytotoxickú aktivitu proteínu izolovaného z *Cordyceps militaris*, označeného ako CMP. Proteín CMP vykazoval silný antimykotický účinok proti hubám *Fusarium oxysporum*, ako aj cytotoxický účinok proti bunkám rakoviny prsníka a močového mechúra (Park, 2009). Uvádza sa, že aj peptid cyklo-(L-Pro-L--Tyr), nachádzajúci sa v *Ophiocordyceps sinensis*, má dobré antimykotické vlastnosti (Joshi, 2017).

Antibakteriálna aktivita sa stanovovala u deproteinizovaných extraktov (vzorky **1d**, **2d** a **3d**). Ani jedna zo vzoriek nevykazovala antibakteriálnu aktivitu. Podľa výsledkov pracovnej skupiny Liu a kolektív (2015), antibakteriálnu aktivitu vykazujú zlúčeniny ako adenozín, kordycepín, mykosterol, ergosterol, nachádzajúce sa aj v hubách rodu *Cordyceps* (Liu, 2015). Z húb rodu *Cordyceps* bola izolovaná atypická aminokyselina myriocín, nazývaná aj termozymocidín (Wang, 2009). U myriocínu boli zistené antibakteriálne účinky a tiež sa zistilo, že myriocín inhibuje syntézu ceramidu, a teda má veľký potenciál na liečenie chorôb charakterizovaných vysokou hladinou ceramidu v postihnutých tkanivách, ako je napríklad

Obr. 1: ^{1}H NMR spektrum extraktov vzoriek 1d – 4d (zhora nadol) merané v D_2O



Obr. 1: ^{1}H NMR spektrum CBHP polysacharidu izolovaného z extraktu vzorky 4d



retinitis pigmentosa (Platania, 2019). Na bakteriálnych kmeňoch *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Vibrio cholerae, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio alginolyticus, Staphylococcus aureus, Vibrio parahaemolyticus* a *Streptococcus pneumoniae* sa testovali frakcie exopolysacharidov (EPS) a intracelulárnych polysacharidov (IPS) húb rodu *Cordyceps*. Maximálne inhibičné zóny EPS a IPS boli pozorované proti *Pseudomonas aeruginosa*. Frakcie EPS a IPS však vykazovali vysokú antimikrobiálnu aktivitu proti všetkým testovaným patogénnym mikrobiálnym kmeňom (Sharma, 2016). Z meraní vyplynulo, že deproteinizované extrakty (vzorky **1d**, **2d** a **3d**) neobsahovali vyššie uvedené chemické zložky.

Na základe kompletnej analýzy 1D a 2D NMR spektier sa zistilo, že extrakt **1d** bol zmesou mastných kyselín, aminokyselín a polysacharidov, pričom po porovnaní s literatúrou sa zistilo, že ako majoritná chemická zlúčenina sa v tomto extrakte nachádzal hydrofilný polyglukán CBHP (Nie, 2011). Po prečistení extrahovaných polysacharidov Sevagovou metódou sa v extraktoch **1d** – **4d** nachádzali rovnaké polysacharidy – polyglukány, ktoré obsahovali α(1→4) glykozidickou väzbou zapojené lineárne glukózové jednotky, čo potvrdzovali aj výsledky v práci od Shi (Shi, 2019). Chemické posuny signálov anomérnych atómov vodíka pri 5,41 ppm sú vo všetkých extraktoch rovnaké. Tento chemický posun naznačuje, že ide o polyglukán – α-glukán, v ktorom sú navzájom α(1→4) glykozidickou väzbou zapojené lineárne glukózové jednotky (viď obr. 1). Rovnako prítomnosť majoritných multipletových signálov pri 3,99 – 3,96 ppm; 3,89 – 3,81 ppm a 3,69 – 3,61 ppm potvrdzuje toto zapojenie glukózových jednotiek (Shi, 2019).

Státím extraktu **4d** v D_2O pri 4 °C počas 14 dní sa v ^{1}H NMR spektre začali objavovať nové signály. Na základe kompletnej 2D analýzy (COSY, HSQC a HMBC) sa zistilo, že aj v extrakte vzorky **4d** je hydrofilný polyglukán označovaný ako CBHP (Nie, 2011). Na obr. 2 sa nachádza ^{1}H NMR spektrum CBHP glukánu.

ZÁVER

Zo štyroch vzoriek húb *Ophiocodyceps sinensis* a *Cordyceps militaris* boli extrahované polysacharidy. Vzorky húb boli kultivované na dvoch rozdielnych substrátoch *Oryza sativa japonica* a *Oryza sativa indica*. Výťažnosť extrahovaných vzoriek **1** – **4** bola po extrakcii refluxom v rozmedzí od 9,94 % až 70,38 %. Na stanovenie antioxidačnej aktivity sa použil stabilný DPPH radikál. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazovala vzorka **3** (IC_{50} = 2,85 ± 0,04 mg. ml^{-1}) *Cordyceps militaris* kultivovaná na médiu *Oryza sativa indica*. Prostredníctvom NMR spektroskopie a porovnaním s literatúrou sa zistilo, že majoritná chemická zlúčenina v deproteinizovaných extraktoch **1d** a **4d** bol hydrofilný polyglukán označovaný ako CBHP. Meranie antimykotickej aktivity extraktov polysacharidov (vzorky **1** – **4**) proti kvasinkám *Candida albicans* ukázalo, že ani jeden z extraktov nevykazoval antimykotickú aktivitu. Rovnako ani testovaním antibakteriálnej aktivity deproteinizovaných extraktov polysacharidov (vzorky **1d** – **3d**) proti baktériám *Escherichia coli* a *Staphylococcus aurerus* sa nepreukázal ich antibakteriálny účinok.

ZOZNAM LITERATÚRY

Cobas, S. et al.: Mnova-MestReNova, version 11.0.4-18998, 2017.

Huang, Q. L., Siu, K. Ch., Wang, W. Q., Cheung, Y. Ch., Wu, J. Y.: Fractionation, characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides from fermentation broth of a Cordyceps sinensis fungus. *Process Biochemistry*, 2013, 48 (2), 380 – 386.

Chen, Y., Xie, M., Li, W., Zhang, H., Nie, S., Wang, Y., Li, Ch.: An effective method for deproteinization of bioactive polysaccharides extracted from lingzhi (*Ganoderma atrum*). *Food Science and Biotechnology*, 2012, 21 (1), 191 – 198.

Joshi, Y. CH., Joshi, M. Ch., Chopra, V., Joshi, R. K., Sharma, R. K., Kumar, V.: Sportsmen's energy package Cordyceps sinensis: Medicinal importance and responsible phytochemical constituents.

American Journal of Essential Oils and Natural Products, 2017, 5 (2), 37 – 51.

Liu, Y., Wang, J., Wang, W., Zhang, H., Zhang, X., Han, CH.: The chemical constituents and pharmacological actions of *Cordyceps sinensis*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. http://dx.doi.org/10.1155/2015/575063. Accessed September 20, 2023.

Luo, X., Duan, Y., Yang, W., Zhang, H., Li, Ch., Zhang, J.: Structural elucidation and immunostimulatory activity of polysaccharide isolated by subcritical water extraction from *Cordyceps militaris*. *Carbohydrates Polymers*, 2017, 157, 794 – 802.

Kwan-Won, Y., Suh, H. J., Bae, S. H., Lee, C. S., Kim, S. H., Yoon, C. S.: Chemical properties and physiological activities of stromata of *Cordyceps militaris*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2001, 11 (2), 266 – 274.

Ng, T. B., Wang, H. X.: Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2005, 57 (12), 1509 – 1519.

Nie, S. P., Cui, S. W., Phillips, A., Xie, M. Y., Phillips, G. O., Assaf, S. A., Zhang, X. L.: Elucidation of the structure of a bioactive hydrophylic polysaccharide from *Cordyceps sinensis* by methylation analysis and NMR spectroscopy. *Carbohydrydrate Polymers*, 2011, 84 (3), 894 – 899.

Park, B. T., Na, K. H., Jung, E. Ch., Park, J. W., Kim, H. H.: Antifungal and anticancer activities of a protein from the mushroom *Cordyceps militaris*. The Korean Journal of Physiology and Pharmacology, 2009, 13 (1), 49 – 54.

Platania, CH. B. M., Cas, M. D., Cianciolo, S., Fidilio, A., Lazzara, F., Paroni, R.: Novel ophthalmic formulation of myriocin: implications in retinitis pigmentosa. *Drug Delivery*, 2019, 26 (1), 237 – 243.

Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K. M.: Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 90 (4), 494 – 507.

Rojas, J. J., Ochoa, V. J., Ocampo, S. A., Munoz, J. F.: Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of nonnosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2006, 6 (2).

Sharma, S. K., Gautam, N., Atri, N. S.: Optimized extraction, composition, antioxidant and antimicrobial activities of exo and intracellular polysaccharides from submerged culture of *Cordyceps cicadae*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 15 (1).

Shekhar, T. CH., Anju, G.: Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *Ageratum conyzoides* Linn. leaves. *American Journal of Ethnomedicine*, 2014, 1 (4), 244 – 249.

Shi, X. D., Li, O. Y, Yin, J. Y., Nie, S. P.: Structure identification of α-glucans from *Dictyophora echinovolvata* by methylation and 1D/2D NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 2019, 271, 338 – 344.

Soltani, M., Kamyab, H., El-Enshasy, H. A.: Molecular weight (Mw) and monosaccharide composition (MC): two major factors affecting the therapeutic action of polysaccharides extracted from *Cordyceps sinensis* – mini review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2013, 7 (3), 1601 – 1613.

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

Viskelis, P., Rubinskiene, M., Jasutiene, I., Šarkina, A., Daubaras, R., Česoniene, L.: Anthocyanins, antioxidative, and antimicrobial properties of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and their press cakes. *Journal of Food Science*, 2009, 74 (2), 157 – 162.

Wang, B., Won, S., Yu, Z., Su, Ch.: Free radical scavenging and apoptotic effects of Cordyceps sinensis fractionated by supercritical carbon dioxide. *Food and Chemical Toxicology*, 2005, 43 (4), 543 – 552.

Wang, S., Yang, F. G., Feng, K., Li, D. G., Zhao, J., Li, S. P.: Simultaneous determination of nucleosides, myriocin, and carbohydrates in *Cordy-*

ceps by HPLC coupled with diode array detection and evaporative light scattering detection. *Journal of Separation Science*, 2009, 32, 23 – 24.

Xiao, J. H., Xiao, D. M., Sun, Z. H., Xiong, Q., Liang, Z. Q., Zhong, J. J.: Chemical compositions and antimicrobial property of three edible and medicinal *Cordyceps* species. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 2009, 7 (3), 91 – 100.

Yan, J. K., Wang, W. Q., Ma, H. L., Wu, J. Y.: Sulfatation and enhanced antioxidant capacity of an exopolysaccharide produced by the medicinal fungus *Cordyceps sinensis*. *Molecules*, 2013, 18 (1), 167 – 177.

Yu, R., Yang, W., Song, L., Yan, Ch., Zhang, Z., Zhao, Z.: Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate Polymers*, 2007, 70 (4), 430 – 436.

Zheng, J., Wang, Y., Wang, J., Liu, P., Li, J., Zhuet, W.: Antimicrobial ergosteroids and pyrrole derivatives from halotolerant *Aspergillus flocculosus* PT05-1 cultured in a hypersaline medium. *Extremophiles*, 2013, 17 (6), 963 – 971.

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

Zhu, J. S., Halpern, G. M., Jones, K.: The scientific rediscovery of a precious ancient Chinese herbal regimen: *Cordyceps sinensis* Part II. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 1998, 4 (3), 289 – 303.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 4: 87 – 95, 2023

HODNOTENIE GENOTOXICKÉHO ÚČINKU KOMBINÁCIE PESTICÍDOV *IN VITRO*

EVALUATION OF THE GENOTOXIC EFFECT OF A COMBINATION OF PESTICIDES *IN VITRO*

Baloďanská, Sabína; Galdíková, Martina

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

martina.galdikova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Pesticídy sú syntetizované látky alebo biologické činidlá, ktoré sú neoddeliteľnou súčasťou poľnohospodárskeho priemyslu. Používanie pesticídov vo vysokej miere spôsobuje prenikanie týchto látok do životného prostredia, čím predstavujú riziko pre rôzne druhy živočíchov vrátane ľudí. Toxicita týchto látok závisí najmä od koncentrácie, doby perzistencie v prostredí a pravidelnosti aplikácie týchto látok. V tejto štúdii sme sledovali potenciálne cytotoxické a genotoxické účinky acetamipridu a tebukonazolu v troch koncentráciách: 5,5 µg.ml^{-1} (koncentrácia 1); 12,5 µg.ml^{-1} (koncentrácia 2); 27,5 µg.ml^{-1} (koncentrácia 3) pomocou metódy chromozómových aberácií počas 24-h a 48-h expozície. Pozorovali sme mierne zvýšenie frekvencie chromatidových a chromozómových aberácií v dávkovej závislosti u oboch donorov po 24-h a 48-h expozícii, pričom zvýšenie nebolo štatisticky významné. Expozícia kombinácii pesticídov mala za následok štatisticky významnú inhibíciu mitotickej aktivity v korelácii s dávkou. Štatisticky významnú inhibíciu mitotickej aktivity sme pozorovali po 24-h expozícii všetkým koncentráciám (P < 0,001).

Kľúčové slová: genotoxicita; chromozómové aberácie; konazoly; neonikotinoidy; yH2AX

ABSTRACT

Pesticides are synthesized substances or biological agents that are an integral part of the agricultural industry. The use of pesticides to a high extent causes the penetration of these substances into the environment, thereby posing a risk to various species of animals, including humans. The

toxicity of these substances depends mainly on the concentration, the persistence time in the environment and the regularity of the application of these substances. In this study, we monitored the potential cytotoxic and genotoxic effects of acetamiprid-based insecticide and tebuconazole-based fungicide in three concentrations (acetamiprid + tebuconazole; 5 + 6, 10 + 15, and 25 + 30 µg.ml^{-1}) using the chromosome aberration method during 24-h and 48-h of exposure. We observed a slight increase in the frequency of chromatid and chromosome aberrations in both donors after 24-h and 48-h of exposure without statistical significance. Exposure to the combination of pesticides resulted in a statistically significant dose-related inhibition of mitotic activity. We observed a statistically significant decrease of mitotic activity after 24 h of exposure to all concentrations ($P < 0.05$; $P < 0.01$ and $P < 0.001$), except the concentration of 10 + 15 µg.ml^{-1} in Donor 2. After 48 h of exposure, we recorded a statistically significant reduction in the mitotic index (MI) at the highest concentration in Donor 1 ($P < 0.01$) and at all tested concentrations in Donor 2 ($P < 0.01$; $P < 0.001$). Our results indicated that combination of acetamiprid and tebuconazole might have potential cytotoxic effects.

Key words: genotoxicity; conazoles; chromosomal aberrations; neonicotinoids; γH2AX

ÚVOD

Pesticídy sú syntetizované látky alebo biologické činidlá používané na prilákanie, ničenie alebo potláčanie škodcu. Používajú sa najmä v poľnohospodárstve na ochranu plodín pred hmyzom, burinou, bakteriálnymi alebo hubovými chorobami počas rastu a na ochranu potravín počas skladovania pred potkanmi, myšami, hmyzom alebo rôznymi biologickými kontaminantmi (Lushchak a kol., 2018).

Používanie pesticídov v poľnohospodárstve je efektívny a ekonomický spôsob ako zabezpečiť pre populáciu potravinovú bezpečnosť a kvôli tomu sa na celom svete spotrebuje približne 2 milióny ton pesticídov. Rozsiahle používanie pesticídov a iných škodlivých chemických látok v konečnom dôsledku predstavuje kontamináciu celého nášho životného prostredia, čím predstavujú hrozbu pre rôzne druhy živočíchov vrátane ľudí (Sharma a kol., 2019). Potenciálne každý môže byť vystavený týmto zlúčeninám, ktoré môžu spôsobiť mnohé ochorenia, ako napríklad metabolický syndróm, podvýživu, aterosklerózu, zápal, nervové poruchy alebo zvyšovanie náchylnosti k infekčným chorobám (Lushchak a kol., 2018).

Neonikotinoidy pôsobia v CNS hmyzu neurotoxicky, a to hlavne kvôli tomu, že sa špecificky viažu na α4β2 podjednotky nAChR (nikotínový acetylcholínový receptor), čo u nich spôsobuje hyperaktivitu nervov a svalov. Tieto špecifické receptory sa primárne nachádzajú v CNS hmyzu, zatiaľ čo u ľudí sú zastúpene len v malom množstve. Po vstupe do organizmu nepretržite súťažia o receptor s prirodzeným telu vlastným acetylcholínom, ktorý je však po uvoľnení metabolizovaný enzýmom acetylcholínesteráza, zatiaľ čo neonikotinoidy sa na receptor viažu ireverzibilne, v dôsledku čoho dochádza k nepretržitej excitácii, paralýze a smrti neurónov (Sánchez-Bayo a Tennekes, 2020; Matsuda, Ihara, Sattelle, 2020).

Triazolové fungicídy sú systematické širokospektrálne fungicídy s jedinečným 1,2,4-triazolovým kruhom (Mazur a Kenneke, 2008). Fungicídny spôsob účinku týchto chemických zlúčenín zahŕňa narušenie bunkových membrán a stien húb mechanizmom inhibície fungálnej lanosterol-14α-demetylázy (cyp51). Cyp51 je evolučne konzervovaný medzi rastlinami, hubami a zvieratami, pričom u zvierat je rozhodujúci pre syntézu cholesterolu, a teda biosyntézu steroidov. Okrem cyp51 triazoly tiež modulujú génovú expresiu a enzýmovú aktivitu viacerých cytochrómov P450 a iných metabolických enzýmov v pečeni cicavcov (Goetz a kol., 2007).

Súčasne používané pesticídy vykazujú potenciál transportu na veľké vzdialenosti a nachádzajú sa vo vzduchu, vode a sedimentoch. Dokonca aj moderné pesticídy s údajne krátkym polčasom rozpadu za určitých podmienok môžu v pôde pretrvávať až niekoľko

rokov, pričom sa stanú zdrojom potenciálneho rizika pre pôdne bezstavovce. Hoci moderné agrochemické spoločnosti sa zaviazali o vývoj bezpečných formulácií, aby sa zabránilo perzistentným a biokumulačným vlastnostiam týchto látok, nemožno poprieť, že je nemožné predvídať a predchádzať všetkým potenciálnym negatívnym účinkom pesticídov na ľudské zdravie a celé ekosystémy (Bonmatin a kol., 2015).

V našej štúdii sme sa zamerali na neonikotinoidové pesticídy a konazolové fungicídy a sledovali sme ich potenciálne synergické genotoxické a cytotoxické účinky pomocou chromozómovej analýzy *in vitro* v bovinných lymfocytoch. Chromozómové aberácie (CA) v lymfocytoch periférnej krvi odrážajú interindividuálnu citlivosť na rôzne endogénne a exogénne látky a môžeme ich využiť ako dôležité biomarkery včasného účinku genotoxických karcinogénov, ako aj markery karcinogénneho rizika (Musak a kol., 2013).

MATERIÁL A METÓDY

Krv od dvoch klinicky zdravých býčkov (vo veku 5 – 6 mesiacov) bola odobratá z *vena jugularis*, za sterilných podmienok do heparinizovaných skúmaviek.

Potenciálne cytotoxické a genotoxické účinky kombinácie acetamipridu a tebukonazolu sme sledovali v troch koncentráciách (acetamiprid + tebuconazol; 5 + 6, 10 + 15, 25 + 30 µg.ml^{-1}) pomocou metódy chromozómových aberácií počas 24-h a 48-h expozície.

Vzorky krvi boli kultivované v 5 ml vhodného kultivačného média počas expozičnej doby 72 h v termostate pri teplote 38 °C. Kultivačné médium pozostávalo z RPMI 1640 (doplneným 25 mM HEPES/L-glutamín) (GE Healthcare HyClone Lab, Utah, USA), z bovinného teľacieho séra (BOFES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), fytohemaglutinínu (PHA-L, 20 µg.ml^{-1}, PAN Biotech, Nemecko) a z antibiotík/antimykotík (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Po 24 a 48-h kultivácii sme pridali do skúmaviek s kultivačným médiom etyl metánsulfonát (EMS, Sigma, St. Louis, MO, USA, 250 µg.ml^{-1}) a mitomycín C (MMC, Sigma, St. Louis, MO, USA, 0,4 µM), ktoré slúžili ako pozitívna kontrola. Pesticídy boli rozpustené v dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, St. Louis, MO, USA) a postupne pridávané ku kultiváciám v troch rôznych koncentráciách na posledných 24 a 48 h inkubácie. 90 min pred koncom kultivácie bol pridaný kolchicín (Merck, Darmstadt, Nemecko) v koncentrácii 5 µg.ml^{-1}.

Sklíčka na analýzu chromozómových aberácií boli pripravené štandardnou cytogenetickou metódou a zafarbené 2 % Giemsovým roztokom (Šiviková a kol., 2018).

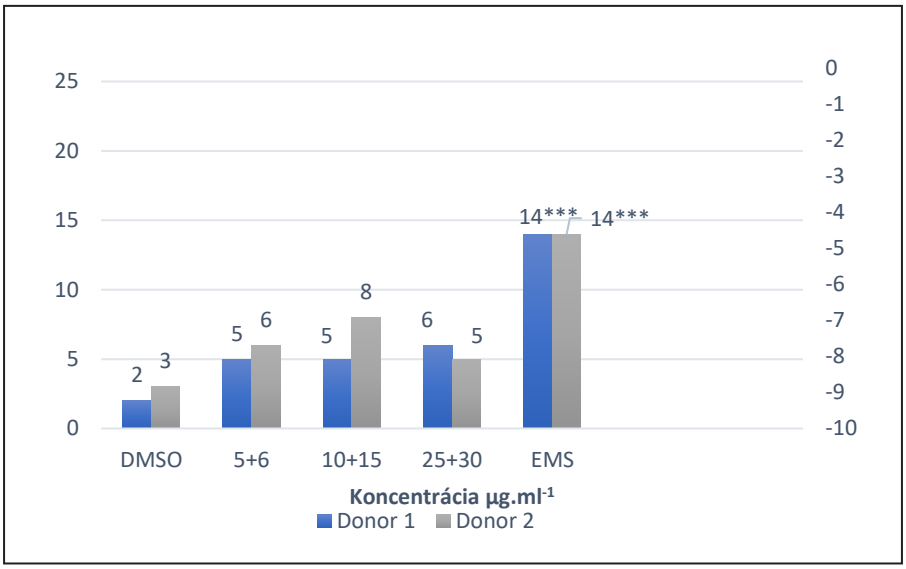
Hodnotenie chromozómových aberácií prebiehalo pomocou svetelného mikroskopu NIKON, ktorý bol vybavený kamerou. Na sledovanie indukcie chromozómových aberácií bolo vyhodnotených 100 metafáz na koncentráciu a donora a 1000 buniek pre sledovanie inhibície mitotického indexu (MI). Výsledky boli štatisticky vyhodnotené $\chi 2$ testom v Graph Pad Prism. Hladina významnosti bola stanovená na $P < 0,05$.

VÝSLEDKY

V našej štúdii sme hodnotili potenciálny genotoxický a cytotoxický účinok kombinácie pesticídov tebukonazolu a acetamipridu na lymfocytoch býčej krvi pri troch rôznych koncentráciách 5 + 6, 10 + 15 a 25 + 30 µg.ml^{-1} a dvoch expozičných časoch (24, 48 h). Medzi najčastejšie typy aberácií, s ktorými sme sa stretávali, boli gapy, ktoré sa z hľadiska hodnotenia nezapočítavajú do štatistického hodnotenia. Mierne zvýšenie frekvencie chromatidových a chromozómových aberácií sme zaznamenali u oboch donorov po 24 h a 48-h expozícii, pričom zvýšenie nebolo štatisticky významné. Chromozómové a chromatidové aberácie vznikajú najmä po pôsobení mutagénnych vplyvov, ale môžu vznikať aj spontánne, čoho dôsledkom sú zaznamenané aberácie aj pri negatívnej kontrole. Tieto aberácie sú zväčša opravené reparačnými mechanizmami, avšak časť z nich ostáva neopravená. Chromozómové výmeny sa nám podarilo zaznamenať len v pozitívnej kontrole EMS. Vzácnejšie sú však izochromatidové výmeny, ktoré sa nám v našom experimente zaznamenať nepodarilo.

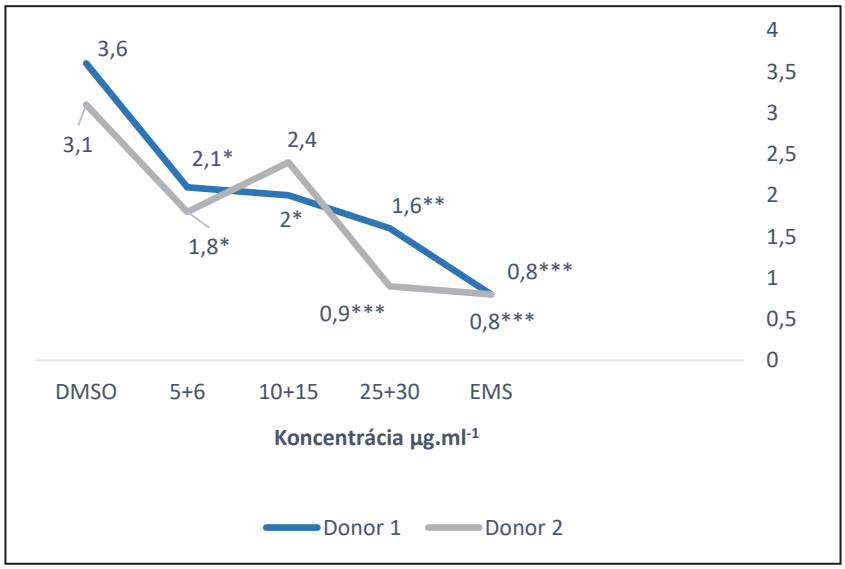
Po 24-h expozícii kombinácii pesticídov sme za-

Obr. 1: Indukcia CA po 24-h expozícii kombinácii pesticídov



DMSO – dimethylsulfoxid (negatívna kontrola); EMS – etylmetylsulfonát (pozitívna kontrola); acetamiprid + tebukonazol 5 + 6, 10 + 15, 25 + 30 µg.ml^{-1}; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001

Obr. 2: Percento MI po 24-h expozícii kombinácii pesticídov

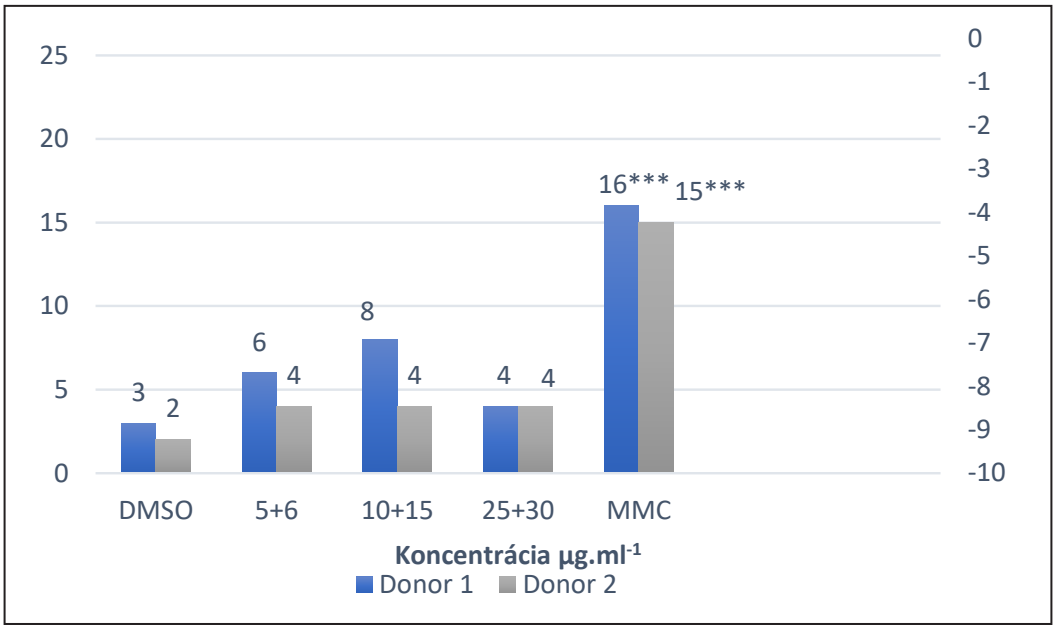


DMSO – dimethylsulfoxid (negatívna kontrola); EMS – etylmetylsulfonát (pozitívna kontrola); acetamiprid + tebukonazol 5 + 6, 10 + 15, 25 + 30 µg.ml^{-1}; *P < 0,05 ; **P < 0,01; ***P < 0,001

znamenali len mierne zvýšenie hladiny chromozómových aberácií u oboch donorov, bez štatistickej významnosti (viď obr. 1). Expozícia kombinácii pesticídov mala za následok štatisticky významnú inhibíciu mitotickej aktivity v korelácii s dávkou (P < 0,05; P < 0,01 a P < 0,001); s výnimkou koncentrácie 10 + 15 µg.ml^{-1} u donora 2 (viď obr. 2).

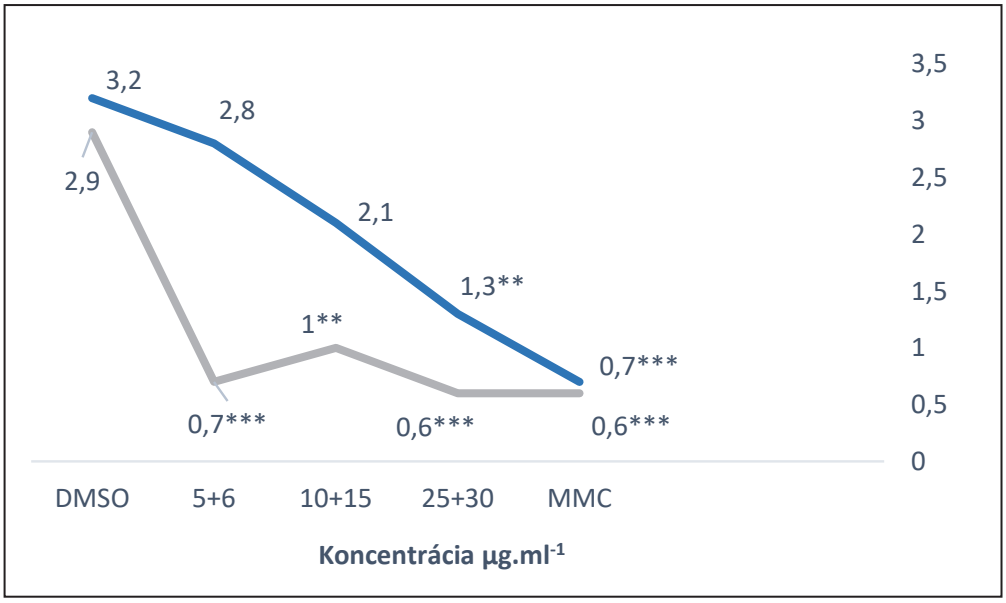
Zmeny vo frekvencii chromozómových aberácií po

Obr. 3: Indukcia CA po 48-h expozícii kombinácii pesticídov



DMSO – dimethylsulfoxid (negatívna kontrola); MMC – mitomycín C (pozitívna kontrola); acetamiprid + tebukonazol 5 + 6, 10 + 15, 25 + 30 µg.ml^{-1}; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001

Obr. 4: Percento MI po 48-h expozícii kombinácii pesticídov



DMSO – dimethylsulfoxid (negatívna kontrola); MMC – mitomycín C (pozitívna kontrola); acetamiprid + tebukonazol 5 + 6, 10 + 15, 25 + 30 µg.ml^{-1}; *P<0,05; **P<0,01; ***P < 0,001

48-h expozícii kombinácii pesticídov sú znázornené na obr. 3. Pri analýze chromozómového poškodenia sme nezaznamenali výrazné zmeny oproti negatívnej kontrole pri oboch donoroch, avšak detegovali sme štatisticky významné zníženie MI pri najvyššej koncentrácii u donora 1 (P < 0,01) a pri všetkých testovaných koncentráciách u donora 2 (P < 0,01; P < 0,001) (viď obr. 4).

DISKUSIA

Neustále zvyšujúci sa dopyt v oblasti poľnohospodárstva nespochybniteľne súvisí aj so vzrastajúcim používaním pesticídov, no ale aj s narastajúcim toxickým vplyvom týchto látok. Dnes už existuje množstvo štúdií, ktoré potvrdzujú nežiaduce vplyvy týchto chemických látok nielen na životné prostredie, necieľové organizmy, ale aj na človeka. Hoci existuje viacero chemických skupín, ktoré pôsobia rôznym mechanizmom, niektoré toxické účinky majú spoločné. Patrí medzi nich najmä indukcia oxidačného stresu v rôznych typoch buniek a zvieracích modeloch. Oxidačný stres vyvolaný pesticídmi je spôsobený reaktívnymi formami kyslíka (ROS) a reaktívnymi formami dusíka (RNS), ktoré sú spojené s niekoľkými ochoreniami vrátane rakoviny, zápalu, kardiovaskulárnych a neurodegeneratívnych ochorení. ROS a RNS môžu aktivovať najmenej päť nezávislých signálnych dráh vrátane mitochondriálne indukovanej apoptózy (Sule, Condon, Gomes, 2022).

Množstvo štúdií skúmalo najmä toxické vplyvy neonikotinoidov na včely medonosné (*Apis mellifera)*. Potvrdilo sa, že neonikotinoidy skutočne dokážu ovplyvniť pamäťové funkcie včiel, ktoré sú potom dezorientované a nevedia sa vrátiť späť do úľa. Okrem toho bola narušená aj imunitná obranyschopnosť včiel, reprodukčná anatómia a fyziológia včelích kráľovien (Brandt a kol., 2016). Iverson a kol. (2019) testovali synergické účinky fungicídov inhibujúcich biosyntézu sterolov (SBI) (difenokonazol, myklobutanil, fenhexamid), neonikotinoidu (tiametoxam) a pyretroidu (bifentrín) na mortalitu čmeliaka obyčajného východného (*Bombus impatiens*). Synergický účinok s bifenitrínom vykazoval difenokonazol aj myklobutanil, zatiaľ čo s tiametoxánom pôsobil synergicky len myklobutanil. U fenhexamidu sa nepotvrdil synergický účinok ani s neonikotinoidom ani s pyretroidom. Výsledky naznačujú, že aj napriek tomu, že niektoré SBI fungicídy majú nízku toxicitu, keď sa vyskytnú samostatne, môžu byť obzvlášť škodlivé na zdravie čmeliakov, keď dôjde k spoločnej expozícii insekticídom (Iverson a kol., 2019).

Spoločná toxicita pesticídnych zmesí zostáva do značnej miery nedostatočne preskúmaná a pri hodnotení ekologických rizík sa zvyčajne prehliada. Wei a kol. (2021) sledovali synergickú toxicitu neonikotinoidného insekticídu (imidakloprid) a strobilurínového fungicídu (azoxystrobín) na *Chironomus dilutus* (rod nehryzúcich pakomárov z kmeňa *Arthropoda*) na rôznych úrovniach účinku (úrovne organizmu, buniek a génov) a v širokom rozsahu koncentrácií. Zistilo sa, že tieto dva pesticídy, jednotlivo aj v kombinácii, vyvolávajú oxidačný stres a spôsobujú letalitu *C. dilutus*. Stredné letálne koncentrácie pre imidakloprid a azoxystrobín boli 3,98 ± 1,17 a 52,9 ± 1,1 $\mu g.ml^{-1}$. Zmesi týchto dvoch pesticídov vykazovali synergické účinky pri environmentálne relevantných koncentráciách, zatiaľ čo pri vysokých koncentráciách už boli zaznamenané skôr antagonistické účinky. Skúmanie expresie 12 génov odhalilo, že tieto dva pesticídy narušili mitochondriálne dýchanie a antioxidačný systém (Wei a kol., 2021).

Mikrojadrový (MN) test patrí medzi cytogenetické testy, ktoré sú štandardne využívané po celom svete na detekciu klastogénnych a aneugénnych agens a zároveň je to povinný test na prijatie chemických látok, resp. pesticídu na trh (Michalová a kol., 2020). Túto metódu vo svojej práci využili aj Muranli a kol. (2015) na *in vitro* sledovanie cytotoxického a genotoxického účinku acetamipridu a propinebu (ditikarbamátový fungicíd) na ľudských periférnych lymfocytoch. Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať toxický účinok týchto látok jednotlivo aj v kombinácii. Lymfocyty boli ošetrené tromi rôznymi koncentráciami pesticídov jednotlivo a v kombinácii (zmes), acetamiprid (0,625; 1,25 a 2,5 $\mu g.ml^{-1}$), propineb (12,5; 25 a 50 $\mu g.ml^{-1}$), zmes acetamipridu a propinebu (0,625 + 12,5; 1,25 + 25 a 2,5 + 50 $\mu g.ml^{-1}$) počas 24 a 48 hodín. Frekvencia MN sa štatisticky významne zvýšila po 48-h expozícii, keď boli lymfocyty vystavené kombinácii pesticídov, zatiaľ čo u jednotlivých prípravkov neboli zaznamenané štatisticky významné frekvencie mikrojadier. Štúdia naznačuje, že tieto pesticídy môžu pôsobiť synergicky a môžu mať potencionálnu genotoxickú aktivitu v kultivovaných

ľudských lymfocytoch. Výsledky tejto práce taktiež poukazujú na cytotoxický účinok týchto látok v kombinácii po 48-h expozícii (Muranli a kol., 2015).

Autori Stupáková a kol. (2019) pomocou konvenčnej cytogenetickej analýzy a metódy fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) testovali rozsah poškodenia genetického materiálu insekticídnym prípravkom Mospilan 20 SP (účinná látka acetamiprid) v koncentráciách 2,5; 5; 25; 50 µg.ml^{-1} pri 24-h expozícii v lymfocytoch periférnej krvi hovädzieho dobytka. Štatisticky významné poškodenie v porovnaní s negatívnou kontrolou zaznamenali počas 24-h expozície pri koncentráciách 25 a 50 µg.ml^{-1}, čo potvrdzuje, že acetamiprid môže predstavovať riziko, aj keď sa vyskytuje v našom prostredí samostatne.

Naše výsledky sme tiež porovnali s výsledkami práce Schwarzbacherovej a kol. (2015), kde testovali triazolový prípravok fungicídneho prípravku Prosaro (účinná látka tebukonazol/protiokonazol), rovnako ako v našom prípade, na bovinných lymfocytoch periférnej krvi. Lymfocyty ošetrené triazolovým fungicídom pri koncentráciách 1,5; 3; 7,5; 15 a 30 µg.ml^{-1} boli testované počas 2, 24 a 48-h expozície kométovou analýzou a mikronukleovým testom. Po 24 a 48-hodinovej expozícii fungicídom nezistili štatisticky významné zvýšenia frekvencií mikronukleí v lymfocytoch hovädzieho dobytka. Kométovou analýzou zaznamenali len mierny nárast poškodenia DNA bez štatistickej významnosti. Expozícia fungicídu v koncentráciách od 3 do 30 µg.ml^{-1} však spôsobila významný pokles hodnôt CBPI (proliferačný index blokovania cytokinézy) ($P < 0,05$; $P < 0,01$ a $P < 0,001$); čo predstavuje podobne ako v našom prípade potencionálne cytotoxické riziko.

Autori Galdíková a kol. (2010) skúmali na bovinných lymfocytoch *in vitro* percento chromozómových aberácií a cytotoxické účinky tebukonazolu pri koncentrácii 3, 6, 15, 30 a 60 µg.ml^{-1} počas 24-h expozície v *in vitro* podmienkach. Autori detegovali štatisticky významné zvýšenie hladiny chromozómových aberácií pri koncentráciách od 6 do 30 µg.ml^{-1} ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$). Najvyššia testovaná koncentrácia (60 µg.ml^{-1}) spôsobila významnú inhibíciu mitotickej aktivity, a preto nebolo možné vyhodnotiť dostatočný počet metafáz. Vo FISH teste bola použitá menej cytotoxická koncentrácia (6 µg.ml^{-1}), kde boli detegované numerické (aneuploídie a polyploídie) a štrukturálne (chromozómové zlomy a chromozómové výmeny) aberácie.

Šiviková a kol. (2013) testovali cytotoxické a genotoxické účinky *in vitro* tebukonazolu na bovinných periférnych lymfocytoch po 24-h a 48-h expozícii pomocou viacerých cytogenetických metód *in vitro.* Kultivované lymfocyty boli vystavené fungicídnej aktivite v koncentráciách 3, 6, 15, 30 a 60 µg.ml^{-1} a sledovali sa chromozómové aberácie (CA), sesterské chromatidové výmeny (SCE), mikrojadrá (MN), mitotický index (MI), proliferačný index (PI), a CBPI. Po 24-h expozícii zaznamenali štatisticky významné CA pri koncentráciách v rozsahu od 6 do 30 µg.ml^{-1}, zatiaľ čo vyššie dávky v porovnaní s kontrolnými hodnotami spôsobili zníženie alebo úplnú inhibíciu poškodenia chromozómov. Vo FISH teste boli použité koncentrácie 6 a 15 µg.ml^{-1}, pričom najčastejšie sa im podarilo detegovať trizómie a monozómie, zatiaľ čo neboli zistené žiadne reciprocné translokácie. Test MN nezaznamenal žiadne štatisticky významné výsledky, ale pozorovalo sa jasné a evidentné zníženie CBPI. Pri najvyšších koncentráciách 15, 30 a 60 µg.ml^{-1} bolo u každého donora po 24-h expozícii pozorované zvýšenie SCE a štatistický významný pokles PI. Po predĺženej 48-h expozícii fungicídny prípravok nevykazoval žiadnu genotoxickú aktivitu. Táto štúdia poukazuje svojimi výsledkami predovšetkým na cytotoxický účinok tebukonazolu a vzhľadom na štatistický významný nárast frekvencií CA a SCE v bovinných lymfocytoch tiež poskytuje údaje o potenciálnych klastogénnych/genotoxických účinkoch komerčného fungicídu.

ZÁVERY

Environmentálnym problémom sa vždy venovala nesmierna pozornosť. Znečistenie toxickými látkami je kritickým problémom vyskytujúcim sa v životnom prostredí, ktorý predstavuje vážne ohrozenie ľudské-

ho zdravia a poľnohospodárskej výroby. Na prvom mieste v zozname toxických látok ohrozujúcich prírodu sú zaradené práve pesticídy (Alengebawy a kol., 2021). Toxicita na necieľové organizmy ako sú včely, bezstavovce a ryby, perzistencia týchto látok vo vode, pôde a ovzduší a predovšetkým preukázané neurotoxické, karcinogénne, mutagénne účinky týchto látok aj na človeka sú alarmujúcim signálom pre ďalšie zváženie používania týchto pesticídnych skupín vo svete. No pre hodnotenie toxického rizika týchto látok na životné prostredie a necieľové živočíchy vrátane ľudí sú potrebné ďalšie štúdie.

Výsledky našej práce naznačujú potenciálny cytotoxický účinok kombinácie komerčných prípravkov na báze acetamipridu a tebukonazolu.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla vďaka podpore grantov MŠ SR VEGA/0166/21 a KEGA 008UVLF-4/2023.

ZOZNAM LITERATÚRY

Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., Wang, M. Q.: Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: ecological risks and human health implications. *Toxics*, 2021, 9 (3), 42.

Bonmatin, J. M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell , E. A. D., Noome, D. A., Simon-Delso, N., Tapparo, A.: Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2015, 22 (1), 35 – 67.

Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., Büchler, R.: The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifer*a L.). *J. Insect Physiol.*, 2016, 86, 40 – 47.

Galdíková, M., Šiviková, K., Holečková, B., Dianovský, J., Mesarč, M.: Identification of chromosomes and aberrations after exposure to pesticide in bovine lymphocytes. *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci. F.*, 2010, 2 (2), 5 – 9.

Goetz, A. K., Ren, H., Schmid, J. E., Blystone, C. R., Thillainadarajah, I., Best, D. S., Nichols, H. P., Strader, L. F., Wolf, D. C., Narotsky, M. G., Rockett, J. C., Dix, D. J.: Disruption of testosterone homeostasis as a mode of action for the reproductive toxicity of triazole fungicides in the male rat. *Toxicol. Sci*., 2017, 95 (1), 227 – 239.

Iverson, A., Hale, C., Richardson, L., Miller, O., McArt, S.: Synergistic effects of three sterol biosynthesis inhibiting fungicides on the toxicity of a pyrethroid and neonicotinoid insecticide to bumble bees. *Apidologie*, 2019, 50, 733 – 744.

Lushchak, V. I., Matviishyn, T. M., Husak, V. V., Storey, J. M., Storey, K. B.: Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *EXCLI J.*, 2018, 17, 1101 – 1136.

Matsuda, K., Ihara, M., Sattelle, D. B.: Neonicotinoid insecticides: molecular targets, resistance, and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2020, 60, 241 – 255.

Mazur, C. S., Kenneke, J. F.: Cross-species comparison of conazole fungicide metabolites using rat and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatic microsomes and purified human CYP 3A4. *Environ. Sci. Technol*., 2008, 42 (3), 947 – 954.

Michalová, V., Galdíková, M., Holečková, B., Koleničová, S., Schwarzbacherová, V.: Micronucleus assay in environmental biomonitoring. *Folia Veterinaria*, 2020, 64 (2), 20 – 28.

Muranli, F. D. G., Rasgele, P. G., Kekecoglu, M., Kanev, M., Ozdemir, K.: Potential genotoxicity of acetamiprid and propineb singly or in combination in cultured human peripheral blood lymphocytes by using MN assay. *Fresen. Environ. Bull*., 2015, 24 (11), 3947 – 3955.

Musak, L., Smerhovsky, Z., Halasova, E., Osina, O., Letkova, L., Vodickova, L., Polakova, V., Buchancova, J., Hemminki, K., Vodicka, P.: Chromosomal damage among medical staff occupationally exposed to volatile anesthetics, antineoplastic drugs, and formaldehyde. *Scand. J. Work. Environ. Health*,

2013, 39, 618 – 630.

Sánchez-Bayo, F., Tennekes, H. A.: Time--cumulative toxicity of neonicotinoids: experimental evidence and implications for environmental risk assessments. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020, 17 (5), 1629.

Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., Kohli, S. K., Yadav, P., Bali, A. S., Parihar, R. D., Dar, O. I., Singh, K., Jasrotia, S., Bakshi, P., Ramakrishnan, M., Kumar, S., Bhardwaj, R., Thukral, A. K.: Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 2019, 1, 1 – 16.

Schwarzbacherová, V., Šiviková, K., Dražovská, M., Dianovský, J.: Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by triazole fungicide in cultured bovine lymphocytes. *Caryologia*, 2015, 68 (3), 233 – 238.

Stupáková, K., Galdíková, M., Schwarzbacherová, V., Holečková, B.: Analysis of chromosomal damage caused by acetamiprid. *Folia Veterinaria*, 2019, 63 (2), 25 – 29.

Sule, R. O., Condon, L., Gomes, A. V.: A common feature of pesticides: oxidative stress – the role of oxidative stress in pesticide-induced toxicity. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2022, 2022, 1 – 31.

Šiviková, K., Dianovský, J., Holečková, B., Galdíková, M., Kolesárová, V.: Assessment of cytogenetic damage in bovine peripheral lymphocytes exposed to *in vitro* tebuconazole-based fungicide. *Chemosphere*, 2013, 92 (5), 555 – 562.

Šiviková, K., Holečková, B., Schwarzbacherová, V., Galdíková, M., Dianovský, J.: Potential chromosome damage, cell-cycle kinetics/and apoptosis induced by epoxiconazole in bovine peripheral lymphocytes in vitro. *Chemosphere*, 2018, 193, 82 – 88.

Wei, F., Wang, D., Li, H., You, J.: Joint toxicity of imidacloprid and azoxystrobin to *Chironomus dilutus* at organism, cell, and gene levels. *Aquat. Toxicol.*, 2021, 233, 105 783.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 4: 96 – 106, 2023

VPLYV EXTRAKČNÝCH ČINIDIEL NA BIOAKTÍVNE OBSAHOVÉ LÁTKY S ANTIOXIDAČNÝM POTENCIÁLOM A TOXICITA EXTRAKTOV TURANCA KANADSKÉHO (*ERIGERON CANADENSIS* L.)

EFFECT OF EXTRACTION REAGENTS ON BIOACTIVE CONTENTS WITH ANTIOXIDANT POTENTIAL AND TOXICITY OF EXTRACTS (*ERIGERON CANADENSIS* L.)

Nociarová, Natália[1]; Eftimová, Jarmila[1]; Petrovič, Vladimír[2]

[1]Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
[2]Katedra farmakológie a toxikológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

jarmila.eftimova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Hlavným cieľom experimentálnej štúdie bolo porovnať vplyv rôznych extrakčných činidiel (voda, acetón, etanol, metanol) a ich kombinácie s 0,1M kyselinou citrónovou na extrahované množstvo bioaktívnych látok z drogy turanca kanadského (*Erigeron canadensis* L.) a ich toxicitu na testovaný organizmus. Rastlina bola zbieraná v lokalitách Beniakovce, Sady nad Torysou, záhrada UVLF-Košice v roku 2022. Z výsledkov analýzy vyplynulo, že najvyšší obsah celkových polyfenolov sme stanovili vo vodnom extrakte turanca kanadského s prídavkom 0,1M kyseliny citrónovej z lokality Beniakovce (22,51 mg GAE.100 g^{-1} sušenej drogy) a UVLF-Košice (21,79 mg GAE.100 g^{-1} sušenej drogy). Najnižšie celkové množstvo polyfenolov (0,006 mg GAE.100 g^{-1} sušenej drogy) sme stanovili v acetónovom extrakte turanca kanadského z lokality Beniakovce. Najvyšší obsah celkových flavonoidov sme stanovili v metanolom extrakte turanca kanadského z lokality Beniakovce (2,21 mg QE.100 g^{-1} sušenej drogy), naopak v acetónovom najnižší (0,21 mg QE.100 g^{-1} sušenej drogy). V metanolovom extrakte turanca kanadského s prídavkom 0,1M kyseliny citrónovej z lokality Beniakovce sme zaznamenali najvyšší obsah fenolických kyselín (8,41 mg CGA.100 g^{-1} sušenej drogy). V acetónovom extrakte drogy z lokality Beniakovce sme stanovili najnižší obsah fenolických kyselín (0,37 mg CGA.100 g^{-1} sušenej drogy). Antioxidačnú aktivitu rôznych extraktov

sme vyjadrili ako ekvivalent Troloxu na 100 g sušenej drogy. Etanolový extrakt turanca kanadského z lokality Sady nad Torysou mal najvyššiu antioxidačnú aktivitu (4,25 mg TEAC.100 g^{-1} sušenej drogy), naopak vodný extrakt iba 0,03 mg TEAC.100 g^{-1}. V druhej časti experimentu sme zisťovali toxicitu vodných extraktov turanca kanadského na sladkovodných dafniách v podmienkach *in vitro*. Extrakt turanca kanadského z lokality Sady nad Torysou sme považovali za najtoxickejší zo všetkých vodných extraktov bez prídavku 0,1M kyseliny citrónovej, pretože spôsobil úhyn 20 % dafnií. Použitie 0,1M kyseliny citrónovej na zvýšenie výťažnosti bioaktívnych obsahových látok turanca kanadského spôsobilo úhyn 100 % dafnií už v 2. hodine experimentu. Na základe týchto výsledkov môžeme konštatovať, že na výťažnosť bioaktívnych obsahových látok a toxicitu turanca kanadského majú vplyv nielen extrakčné činidlá, ale aj miesto zberu a koncentrácia kyseliny citrónovej.

Kľúčové slová: antioxidačná aktivita; extrakčné činidlá; invázna rastlina; polyfenoly; toxicita

ABSTRACT

The main objective of the experimental study was to compare the effect of different extraction reagents (aqua, acetone, ethanol, methanol) and their combination with 0,1M citric acid on the total extracted amount from *Erigeron canadensis* L. and their toxicity on the tested organism – daphnia. The plant was garnered in locations Beniakovce, Sady nad Torysou, garden of UVLF-Košice in 2022. The results of the analysis showed the highest content of the total polyphenols was in aqueous extract with the addition of 0,1M citric acid (22,51 mg GAE.100 g^{-1} dry sample) from Beniakovce and from UVLF-Košice (21,79 mg GAE.100 g^{-1} dry sample). The lowest amount was detected in the acetone extract (0,006 mg GAE.100 g^{-1} dry sample) from Beniakovce. The highest total flavonoids content was found in the methanol extract (2,21 mg QE.100 g^{-1} dry sample) from Beniakovce, on the contrary, the lowest total flavonoids were detected in the acetone extract (0,21 mg QE.100 g^{-1} dry sample) from Beniakovce. In the methanol extract of *Conyza canadensis* L. with the addition of 0,1M citric acid from Beniakovce we detected the highest content of phenolic acids (8,41 mg CGA.100 g^{-1} dry sample) and the lowest value in acetone extract (0,37 mg CGA.100 g^{-1} dry sample) from Beniakovce. The antioxidant activity of each analysed extracts was expressed as Trolox equivalent per 100 g of dried drug. The highest antioxidant activity had the ethanol extract (4,25 mg TEAC.100 g^{-1} dry drug) from Sady nad Torysou. In the second experimnet, we focused on the toxicity of aqueous extracts of *Conyza canadensis* L. on daphnia *in vitro* conditions. We considered the aqueous extract from Sady nad Torysou was the most toxic of all aqueous extracts without the addition of 0,1M citric acid, becaused it caused the death of 20 % of daphnia. The use of 0,1M citric acid caused the mortality of 100 % of daphnia already in the second hour of the experiment. The results of both practical experiments showed that not only the extractive reagents, but also location and citric acid concentration had an effect on the bioactive contents recovery and toxicity of *Conyza canadensis* L.

Key words: antioxidant activity; invasive plant; polyphenol content; toxicity

ÚVOD

K inváznym nepôvodným druhom rastlín (burín), ktoré sa relatívne veľkou rýchlosťou rozšírili na území Slovenska, patrí aj turanec kanadský (*Erigeron canadensis* L.), čeľaď *Asteraceae* (URL 1, 2023). Turanec kanadský ako invázna burina spôsobuje v poľnohospodárstve obrovské straty na úrode a stal sa rezistentným proti herbicídom (glyfosát a flazasulfuron) (Palma-Bautista, 2018). Je to jednoročná

invázna bylina pochádzajúca zo Severnej Ameriky (Wu a kol., 2007). Rastlina má priamu v hornej časti rozkonárenú, ochlpenú, svetlozelenú, husto olistenú, vysokú (15 – 90 až 200 cm) stonku. Vytvára drobné valcovité úbory jazykovitých bielych kvetov, presahujúcich zelené zákrovné listene a mierne zakrývajúce žlté rúrkovité kvety. Rastlina kvitne od VI – X. Plodom je nažka s dlhým paperím (1 000 – 20 000 kusov na rastline), ktoré im zabezpečuje šírenie vetrom. Najčastejšie sa nachádza na poliach, rumoviskách, skládkach, pasienkoch, piesočnatých stráňach, pozdĺž ciest a v blízkosti železničných priecestí. Drogou sú nadzemné časti turanca – *herba conyzae* a *flos conyzae*. Vo výťažnosti obsahových látok sa vyskytujú výrazné rozdiely v závislosti od času zberu rastliny (Janča a Zentrich, 1994; Cabi, 2021; Kato-Noguchi a Kato, 2022).

V turanci kanadskom má najväčšie zastúpenie zo silíc limonén, karyofylén a spathtulenol. Limonén má silný antiflogistický účinok (Nagy a kol., 2015; Aragão, 2019). Karyofylén je bicyklický seskviterpén, ktorý má dokázané protizápalové účinky. Znižuje hladiny mediátorov chronického zápalu TNF-α, IL-1β, IL-6, NF-κB. Väzbou na kanabinoidné receptory CB2 a reakciami s PPAR znižuje riziko rozvoja obezity, nealkoholového stukovatenia pečene, cukrovky. Zároveň karyofylén ako agonista kanabinoidných receptorov v mozgu znížil hladiny lipopolysacharidov indukujúcich dlhodobú depresiu a chronický stres (Hwang a kol., 2020; Scandiffio a kol, 2020).

Okrem silíc obsahuje flavonoidy, karotenoidy, lignány, saponíny, triesloviny, steroly a polyfenoly, z ktorých má kyselina galová najväčšie zastúpenie. Z minerálov má najväčšie zastúpenie vápnik (1010 mg.100 g^{-1} suchej drogy), fosfor (280 mg.100 g^{-1} suchej drogy) a draslík (2610 mg.100 g^{-1} suchej drogy). Práve prítomnosť sekundárnych metabolitov v rastline je zodpovedná za jej široké spektrum pozitívnych účinkov na zdravie (Al-Snafi, 2017). Aj keď je turanec kanadský považovaný za invázny druh, našiel v rôznych častiach sveta uplatnenie v tradičnej medicíne. V Severnej Amerike sa využíval pri liečbe reumatických ochorení a niektorých typov rakoviny. Medzi jeho ďalšie účinky patria antidiaroický, antifungálny, antimikrobiálny, anthelmintický, adstrigentný a mnohé iné (Csupor a Löffler, 2011). Používa sa pri zápalových ochoreniach dýchacích ciest, astmy, kašľa, hnačky, svrabu, dny, kožných problémoch, poruchách zrážania krvi, zápaloch močových ciest a iných (Mlčoch, 2020; Cabi, 2021; Kato a kol., 2022; Wu a kol., 2022).

Hlavným cieľom experimentálnej štúdie bolo porovnať vplyv rôznych extrakčných činidiel na celkový obsah polyfenolov, flavonoidov, fenolických kyselín a ich antioxidačnú aktivitu. Keďže v súčasnosti nie je dostatočné množstvo relevantných štúdií, ktoré by sledovali toxicitu turanca kanadského, zamerali sme sa aj na *in vitro* testovanie toxicity vodných extraktov na sladkovodoných kôrovcoch – dafniách.

METODIKA PRÁCE A METÓDY SKÚMANIA

Rastlinný materiál

V experimentálnej časti štúdie sme použili sušenú drogu *Erigeron canadensis* L. (viď obr. 1) zbieranú v mesiaci júl 2022 v lokalitách Beniakovce, Sady nad Torysou a UVLF Košice.

Príprava extraktov turanca kanadského

Nazbieraný a vysušený rastlinný materiál *Conyza canadensis* L. sme rozomleli elektrickým mlynčekom na jemný prášok. Takto pripravené vzorky sme zhomogenizovali. Na laboratórnych váhach sme v Erlenmeyerových bankách navážili po 1 g vzorky turanca kanadského. Zaliali sme ich 100 ml zvolenými rozpúšťadlami – acetón, etanol, metanol a voda. Na extrakciu bioaktívnych látok z roztokov sme použili ultrazvukový kúpeľ po dobu 60 minút pri laboratórnej teplote. Roztoky sme následne prefiltrovali cez skladaný filtračný papier. Tým sme získali čisté acetónové, etanolové, metanolové a vodné bylinné extrakty s objemom 100 ml.

Rovnaký postup sme použili pri príprave bylinných extraktov s 0,1M kyselinou citrónovou. Ku každej vzorke sme pridali navyše 1,92 g kyseliny citrónovej.

Obr. 1 ***Erigeron canadensis*** **L. v rôznych vegetačných štádiách**

Jej použitím sme sa snažili zvýšiť výťažnosť obsahových látok z etanolových, metanolových a vodných extraktov turanca kanadského.

Stanovenie celkového obsahu polyfenolov

Podstatou stanovenia je oxido-redukčná reakcia v zásaditom prostredí. Súčasne prebieha oxidácia polyfenolov a redukcia molybdénu, ktorý je obsiahnutý vo Folin-Ciocalteuovom činidle. Absorbanciu sme merali spektrofotometrom s prednastavenou vlnovou dĺžkou 700 nm oproti metanolu ako slepému pokusu. Pomocou rovnice kalibračnej priamky kyseliny galovej sme vypočítali celkový obsah polyfenolov a vyjadrili v mg GAE.100 g^{-1} suchej vzorky (Singleton a Rossi, 1965; Nikolaeva a kol., 2022).

Stanovenie celkového obsahu flavonoidov

Princíp metódy je založený na tvorbe farebných stabilných komplexov. Tie vznikajú v kyslom prostredí pri reakcii chloridu hlinitého s C_4-keto a C_3 alebo C_5-hydroxylovou skupinou flavonoidu. Celkový obsah flavonoidov sme vypočítali pomocou rovnice kalibračnej priamky quercetínu (Q) a výsledky vyjadrili v mg QE.100 g^{-1} suchej vzorky (Eftimová, a Kukučková, 2020).

Stanovenie celkového obsahu fenolických kyselín

Podstatou stanovenia je reakcia fenolických kyselín s Arnovou reagenciou, ktorej výsledkom je purpurový komplex. Jeho farebná intenzita zodpovedá priamoúmerne absorbancii. Množstvo celkových fenolických kyselín sme vyjadrili z rovnice kalibračnej priamky kyseliny chlorogénovej (CGA) v mg na 100 g suchej vzorky (Farmakopoea Polska, 2011).

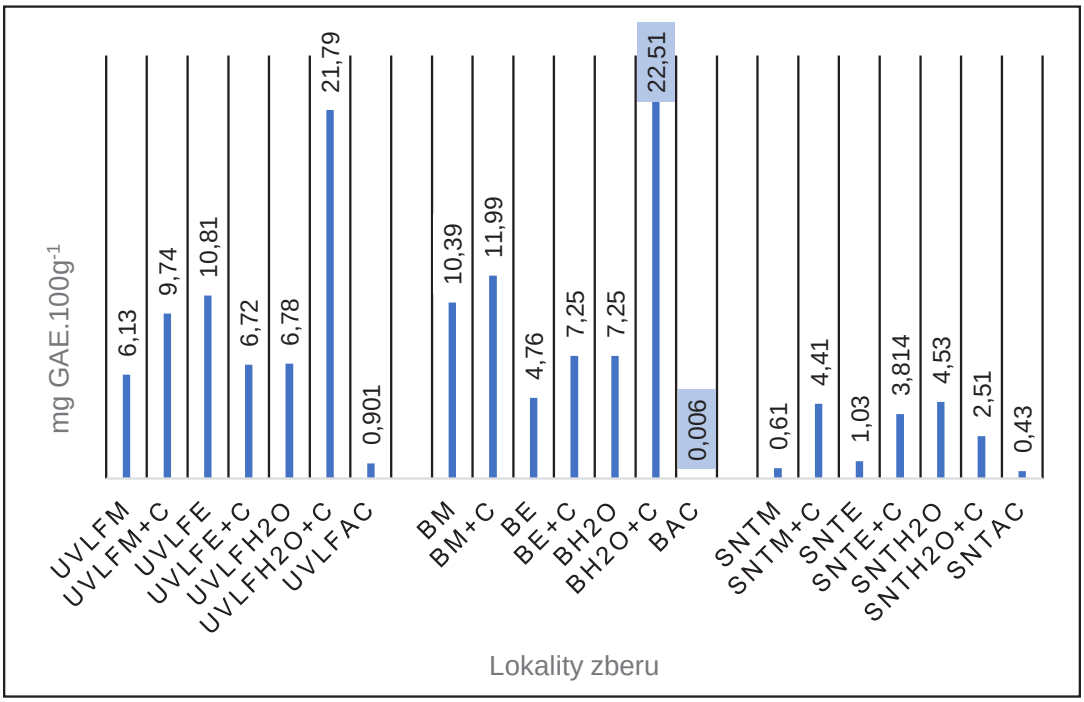
Stanovenie antioxidačnej aktivity

Podstatou metódy je prijatie elektrónu DPPH radikálom (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) z analyzovanej vzorky. Prijatím elektrónu dochádza k jeho redukcii na stabilnejší DPPH-H radikál (difenylpikrylhydrazín), čoho výsledkom je prechod fialového sfarbenia na bledožltý roztok. Pri stanovení antioxidačnej aktivity absorbancia analyzovaných roztokov klesá (Siddartha a kol., 2022). Antioxidačnú aktivitu sme vyjadrili z rovnice kalibračnej priamky štandardu Troloxu a vyjadrili v mg TEAC.100 g^{-1}.

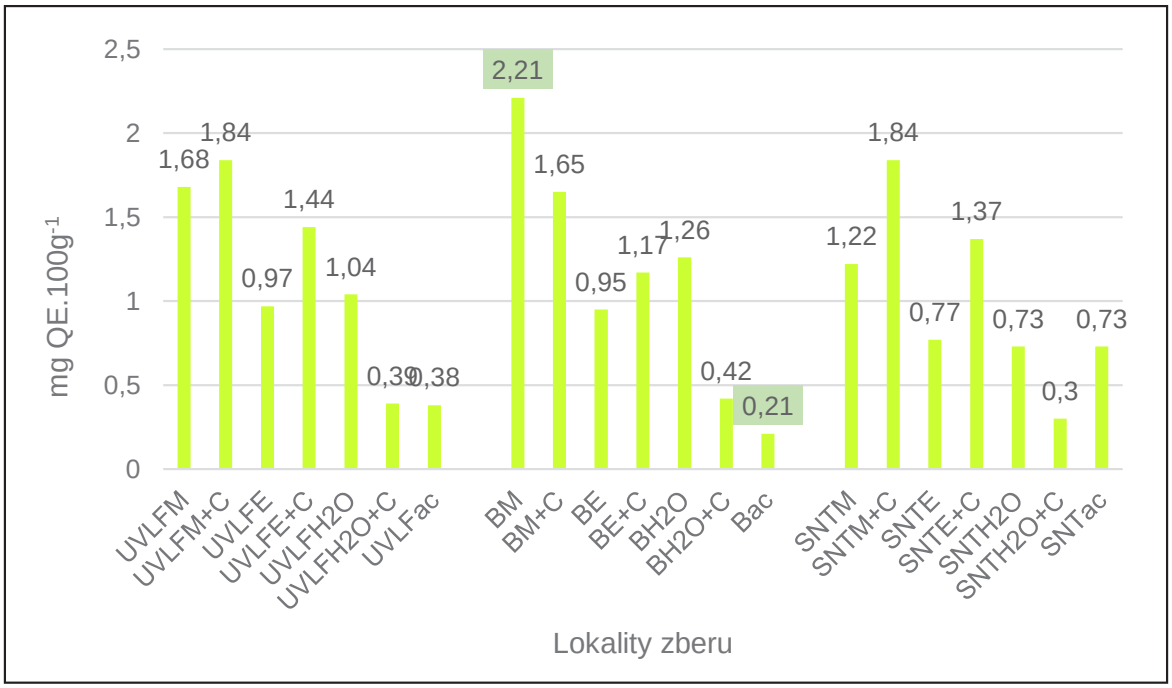
Vplyv rôznych extrakčných činidiel na toxicitu extraktov turanca kanadského

Test akútnej imobilizácie dafnií podľa usmernení OECD 202 (*Daphnia* spp., Acute immobilization test) sa používa na hodnotenie akútnej toxicity na sladkovodných bezstavovcoch počas 48-hodinovej expozície rôznym koncentráciám použitej chemickej látky. V experimente bola použitá voda z prameňa Sv. Jána Nepomuckého (Horný Bankov – Košice). Tento

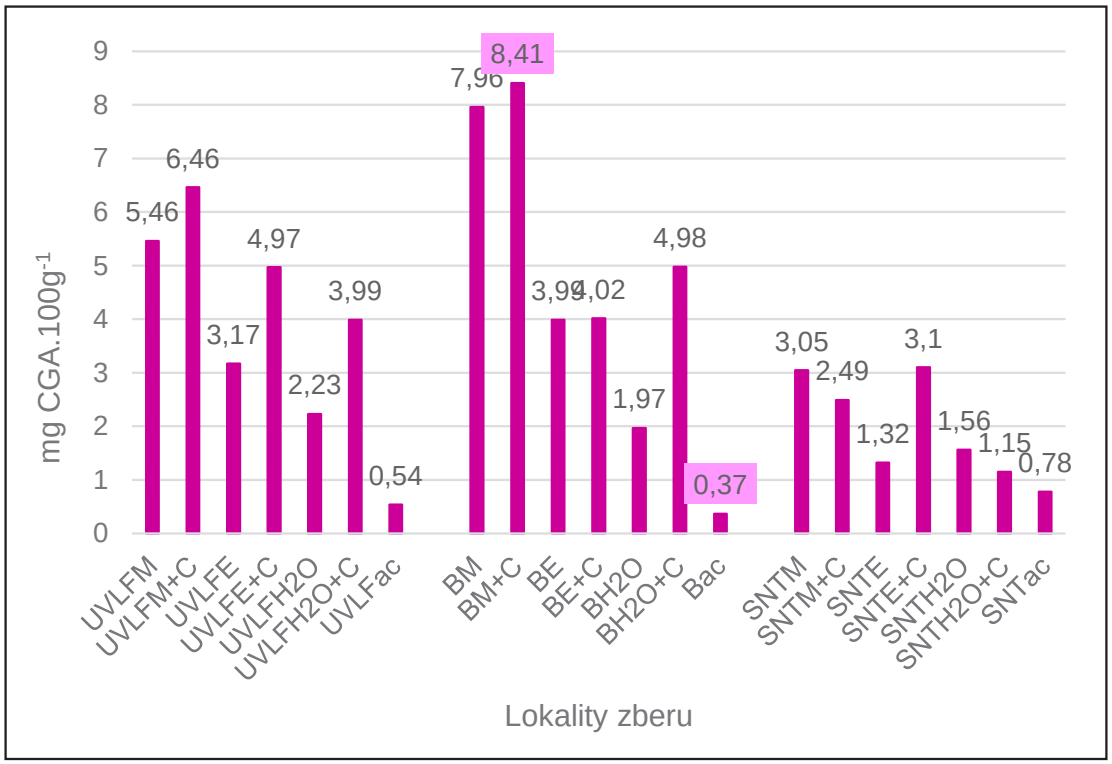
Graf 1: Celkový obsah polyfenolov v extraktoch turanca kanadského



Graf 2: Celkový obsah flavonoidov v extraktoch turanca kanadského



Graf 3: Celkový obsah fenolických kyselín v extraktoch turanca kanadského



prírodný prameň predstavuje prirodzené prostredie pre vodné kôrovce – kriváky, ale zloženie vody vyhovuje aj dafniám.

VÝSLEDKY PRÁCE A DISKUSIA

Výsledky kvantitatívneho stanovenia celkového obsahu polyfenolov

Celkový obsah polyfenolov sme vypočítali z rovnice kalibračnej priamky kyseliny galovej y = 0,1686x + 0,0067 (R^2 = 0,9998) a vyjadrili v mg GAE.100 g^{-1} suchej vzorky. Výsledky uvádzame v grafe (viď graf 1).

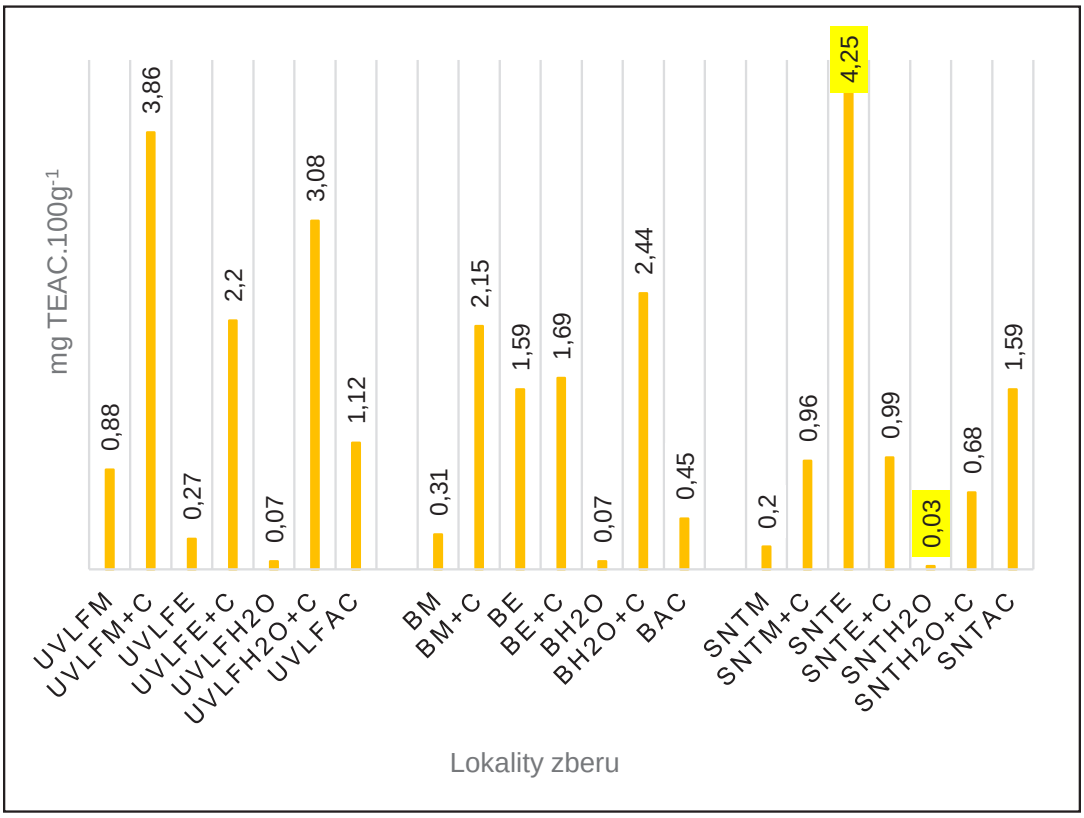
Najvyššie množstvo obsahu celkových polyfenolov sme zaznamenali vo vodnom extrakte s 0,1M kyselinou citrónovou z oblasti zberu Beniakovce (22,51 mg GAE.100 g^{-1}) a vo vodnom extrakte z lokality UVLF Košice [($UVLF_{H2O}$ + C) 21,79 mg GAE.100 g^{-1}]. S použitím acetónu ako extrakčného činidla sme dosiahli najnižšiu výťažnosť polyfenolov z lokality Beniakovce (0,006 mg GAE.100 g^{-1}). Z výsledkov vyplynulo, že kyselina citrónová pozitívne vplývala na výťažnosť polyfenolov vo vode ako extrakčnom činidle (viď graf 1).

Výsledky kvantitatívneho stanovenia celkového obsahu flavonoidov

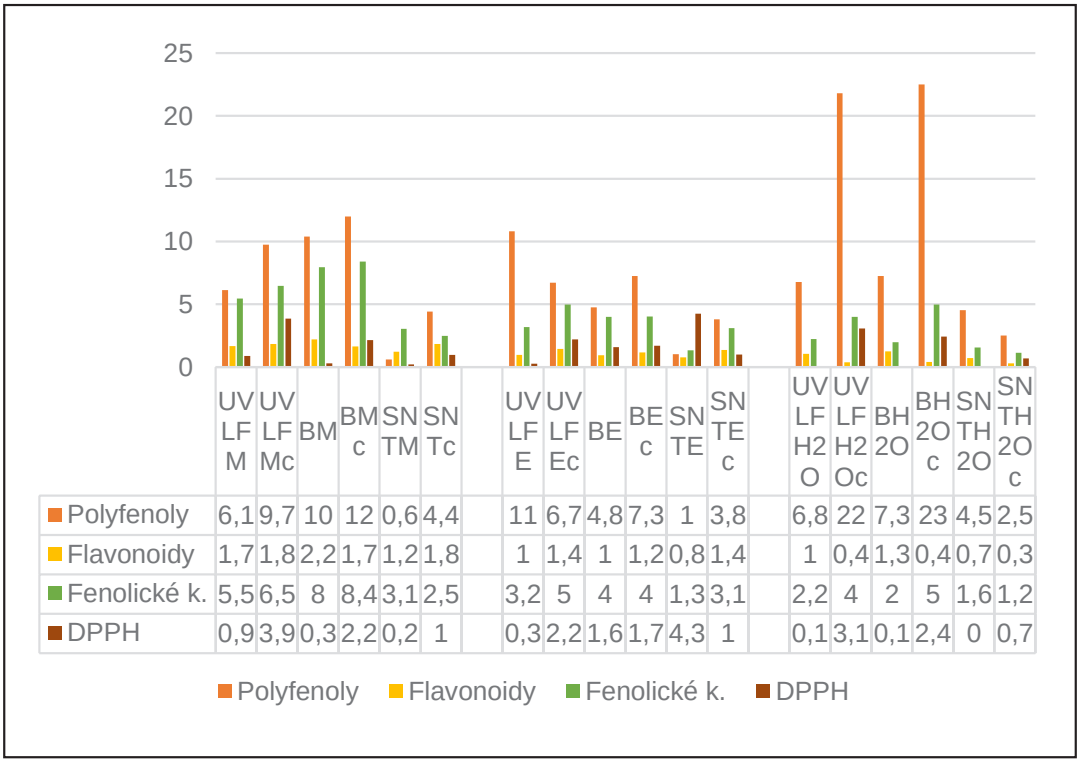
Celkový obsah flavonoidov sme vypočítali z rovnice kalibračnej priamky quercetínu (QE) y = 2,3243x + 0,005 (R^2 = 0,995) a vyjadrili v mg QE.100 g^{-1}suchej vzorky. Výsledky uvádzame v grafe 2 (viď graf 2).

Najvyššiu koncentráciu celkových flavonoidov sme zaznamenali v metanolovom extrakte turanca kanadského zbieraného v lokalite Beniakovce (2,21 mg QE.100 g^{-1}). Vo vzorke extraktu turanca kanadského s extrakčným činidlom acetón z lokality Beniakovce sme stanovili najnižšie množstvo flavonoidov (0,21

Graf 4: Antioxidačná aktivita v mg TEAC.100 g^{-1}



Graf 5: Obsahové látky v rôznych extraktoch z troch lokalít turanca kanadského



	UVLFM	UVLFMc	BM	BMc	SNTM	SNTc		UVLFE	UVLFEc	BE	BEc	SNTE	SNTEc		UVLFH2O	UVLFH2Oc	BH2O	BH2Oc	SNTH2O	SNTH2Oc
Polyfenoly	6,1	9,7	10	12	0,6	4,4		11	6,7	4,8	7,3	1	3,8		6,8	22	7,3	23	4,5	2,5
Flavonoidy	1,7	1,8	2,2	1,7	1,2	1,8		1	1,4	1	1,2	0,8	1,4		1	0,4	1,3	0,4	0,7	0,3
Fenolické k.	5,5	6,5	8	8,4	3,1	2,5		3,2	5	4	4	1,3	3,1		2,2	4	2	5	1,6	1,2
DPPH	0,9	3,9	0,3	2,2	0,2	1		0,3	2,2	1,6	1,7	4,3	1		0,1	3,1	0,1	2,4	0	0,7

mg QE.100 g^{-1}). Vo vodných extraktoch sme s použitím 0,1M kyseliny citrónovej získali nižšie hodnoty celkových flavonoidov oproti vodným extraktom (viď graf 2).

Výsledky kvantitatívneho stanovenia celkového obsahu fenolických kyselín

Celkový obsah fenolických kyselín sme vypočítali z rovnice kalibračnej priamky kyseliny chlorogénovej (CGA) y = 1,1725x + 0,0051 (R2 = 0,996) a vyjadrili v mg CGA.100 g^{-1} suchej vzorky. Výsledky uvádzame v grafe 3 (viď graf 3).

Najvyššie hodnoty fenolických kyselín prepočítané na ekvivalent kyseliny chlorogénovej sme zaznamenali v metanolovom extrakte s 0,1M kyselinou citrónovou z lokality Beniakovce (B_{MC}) 8,41 mg CGA.100 g^{-1}. V poradí druhé najvyššie hodnoty fenolických kyselín sme stanovili v metanolovom extrakte z lokality zberu Beniakovce – 7,96 mg CGA.100 g^{-1}. V acetónovom extrakte z lokality Beniakovce sme získali len minimálne množstvo fenolických kyselín (0,37 mg CGA.100 g^{-1}) (viď graf 3).

Výsledky vyhodnotenia stanovenia antioxidačnej aktivity (TAA) turanca kanadského

Po dosadení hodnôt absorbancií jednotlivých extraktov turanca kanadského do rovnice kalibračnej priamky Troloxu: y = – 0, 2963 + 0, 1232 (R^2 = 0,985) sme vypočítali antioxidačnú aktivitu extraktov vyjadrenú ako ekvivalent Troloxu (TEAC) v mg TEAC.100 g^{-1} suchej vzorky (viď graf 4).

Zo sumárneho grafu 5 vyplýva, že najvyššie hodnoty obsahových látok (polyfenoly, flavonoidy, fenolické kyseliny, TAA_{DPH}) z troch lokalít sme stanovili vo vodnom a metanolovom extrakte turanca kanadského. S použitím acetónu ako extrakčného činidla sme získali najnižšie množstvá celkových bioaktívnych obsahových látok turanca kanadského. Z obrázku vyplýva, že v najvyššom množstve sú v extraktoch zastúpené polyfenoly, ktorým sa pripisuje zodpovednosť za antioxidačnú aktivitu. Podiel flavonoidov a fenolických kyselín v extraktoch bol zastúpený v nižších hodnotách.

Všetky testované extrakty turanca kanadského zo všetkých lokalít zberu preukázali antioxidačné účinky. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu (TAA) sme zaznamenali v etanolovom extrakte turanca kanadského zbieraného v lokalite Sady nad Torysou (4,25 TEAC. 100 g^{-1}). Vodné extrakty z pozorovaných oblastí mali nízke hodnoty antioxidačnej aktivity. Najnižšiu vychytávaciu schopnosť mal acetónový extrakt z lokality Sady nad Torysou (0,03 TEAC.100 g^{-1}). Pri porovnaní čistých extraktov s extraktami s 0,1M kyselinou citrónovou vyplýva, že kyselina citrónová má vplyv na ich antioxidačnú aktivitu. Takmer všetky extrakty s kyselinou citrónovou mali vyššie hodnoty.

Ak porovnávame vplyv metanolu ako extrakčného činidla na množstvo obsahových látok s Polat a kol. (2022), potom zisťujeme, že autori stanovili v metanolovom extrakte turanca kanadského vyšší obsah polyfenolov (98,19 GAE.100 g^{-1}) a rovnako aj vyšší podiel flavonoidov (21,85 mg QE.100 g^{-1}).

Pri použití 0,1M kyseliny citrónovej nemôžeme jednoznačne potvrdiť, že jej prítomnosť v jednotlivých extraktoch podporila výťažnosť obsahových látok turanca kanadského. V ďalšom skúmaní navrhujeme použiť rôzne koncentrácie kyseliny citrónovej.

Vplyv vodných extraktov turanca kanadského na toxicitu

Na hodnotenie akútnej toxicity rôznych extraktov turanca kanadského na dafniách sme použili test akútnej imobilizácie dafnií podľa usmernení OECD 202 (*Daphnia* spp., Acute immobilization test). Počas 48-hodinovej expozície boli dafnie vystavené vplyvu vodných extraktov turanca kanadského z lokality Beniakovce, UVLF, Sady nad Torysou a vplyvu vodných extraktov turanca kanadského s pridaním 0,1M kyseliny citrónovej v koncentráciách 1000 mg.l^{-1} (viď tab. 1, 2 a 3).

Na základe dát z druhej experimentálnej časti (viď tab. 1, 2, 3) môžeme skonštatovať, že skúmané vodné extrakty mali veľmi nízku toxicitu pre sledované vodné bezstavovce – dafnie. Za najtoxickejší vodný extrakt sme považovali extrakt turanca kanadského zbieraného v lokalite Sady nad Torysou, pretože ako

Tab. 1: Vplyv vodných extraktov turanca kanadského z UVLF na prežívateľnosť dafnií v experimentálnych podmienkach

Koncentrácia (mg.l^{-1})	1000				
Interval	**2 hod**		**12 hod**	**24 hod**	**48 hod**
pohyblivé (%)	**100**	0*	**100**	**100**	**100**
nepohyblivé živé (%)	0	0*	0	0	0
nepohyblivé mŕtve (%)	0	**100***	0	0	0
* vodný výluh s prídavkom kyseliny citrónovej					

Tab. 2: Vplyv vodných extraktov turanca kanadského z Beniakoviec na prežívateľnosť dafnií v experimentálnych podmienkach

Koncentrácia (mg.l^{-1})	1000				
Interval	**2 hod**		**12 hod**	**24 hod**	**48 hod**
pohyblivé (%)	**100**	0*	**100**	**100**	**100**
nepohyblivé živé (%)	0	10*	0	0	0
nepohyblivé mŕtve (%)	0	**90***	0	0	0
* vodný výluh s prídavkom kyseliny citrónovej					

Tab. 3: Vplyv vodného extraktu turanca kanadského zo Sadov nad Torysou na prežívateľnosť dafnií v experimentálnych podmienkach

Koncentrácia (mg.l^{-1})	1000				
Interval	**2 hod**		**12 hod**	**24 hod**	**48 hod**
pohyblivé (%)	**100**	0*	**100**	**100**	**100**
nepohyblivé živé (%)	0	10*	0	0	0
nepohyblivé mŕtve (%)	0	**100***	0	0	**20**
* vodný výluh s prídavkom kyseliny citrónovej					

jediný spôsobil v 48. hodine experimentu úhyn 20 % dafnií (viď tab. 3). Použitie kyseliny citrónovej viedlo k enormnému zvýšeniu toxicity všetkých vodných roztokov už v 2. hodine experimentu. Dôvodom bolo zníženie pH pod hodnoty, ktoré sú dafnie ešte schopné tolerovať. Výsledkom bola 100 % prítomnosť mŕtvych dafnií.

V dostupnej literatúre neboli zmienky o štúdiách zameraných na sledovanie toxicity rôznych extraktov turanca kanadského na vodné bezstavovce, preto náš výskum môže poslúžiť iba ako podklad pre ďalšie experimenty.

Vplyv na výťažnosť uvedených sekundárnych metabolitov má okrem extrakčných činidiel aj lokalita a čas zberu, čím sme potvrdili iných autorov (Janča a Zentrich, 1994; Cabi, 2021; Kato-Noguchi a Kato, 2022).

Všetky testované extrakty (acetónové, etanolové, metanolové, vodné) preukázali schopnosť redukovať DPPH radikál, čím preukázali schopnosť chrániť bunky a tkanivá pred negatívnymi vplyvmi oxidačného stresu a voľných radikálov.

ZÁVER

Zo získaných výsledkov môžeme potvrdiť, že turanec kanadský je bohatý na bioaktívne obsahové látky ako sú polyfenoly, fenolické kyseliny a flavonoidy. Najvyšší obsah celkových polyfenolov sme zistili vo vodnom extrakte turanca kanadského s prídavkom 0,1M kyseliny citrónovej z lokality Beniakovce (22,51 mg GAE.100 g^{-1}) a vo vodnom extrakte turanca kanadského (21,79 mg GAE.100 g^{-1}) s prídavkom 0,1M kyseliny citrónovej z oblasti UVLF Košice. Najvyšší obsah celkových flavonoidov sme stanovili v metanolovom extrakte turanca kanadského z lokality Beniakovce (2,21 mg QE.100 g^{-1}). Z vodných extraktov turanca kanadského s prídavkom kyseliny citrónovej sme získali nižšie obsahové množstvá flavonoidov. Najvyšší obsah fenolických kyselín sme zistili v metanolovom extrakte turanca kanadského s prídavkom kyseliny citrónovej z lokality Beniakovce (8,41 mg CGA.100 g^{-1}). Z acetónových extraktov turanca kanadského sme získali najnižšie množstvá obsahových látok. Najvyššiu aktivitu vychytávať DPPH radikál preukázal etanolový extrakt turanca kanadského z lokality Sady nad Torysou (4,25 TEAC.100 g^{-1}). Najnižšiu antioxidačnú aktivitu sme namerali vo vodnom extrakte z lokality Sady nad Torysou (0,03 TEAC.100 g^{-1}). Súčasťou štúdie bolo sledovanie toxicity vodných extraktov turanca kanadského z jednotlivých oblastí zberu na sladkovodné bezstavovce – dafnie. Zistili sme, že všetky vodné extrakty nemajú zásadný vplyv na mobilitu dafnií počas 48-hodinovej expozície. Za najtoxickejší extrakt sme označili extrakt turanca kanadského z lokality Sady nad Torysou, ktorý v 48. hodine spôsobil úhyn 20 % dafnií. Vodné roztoky s prídavkom 0,1M kyseliny citrónovej predstavovali pre dafnie neprijateľné životné prostriedky, pretože už v 2. hodine experimentu spôsobili 100 % úhyn dafnií. Kyselina citrónová posúva pH na stranu silnej acidity, čím vytvára neprijateľné životné podmienky pre tieto sladkovodné bezstavovce. Na základe našich zistení môžeme skonštatovať, že je potrebný ďalší výskum zameraný na hodnotenie toxicity rôznych extraktov turanca kanadského, pretože doposiaľ neboli publikované relevantné štúdie. Je dôležité mať na pamäti, že samotné extrakčné činidlo, extrakčná metóda, čas zberu a miesto zberu majú zásadný vplyv na výťažnosť obsahových látok z danej drogy. Naše výsledky môžu slúžiť ako podklad pre ďalší rozsiahlejší výskum tejto buriny.

ZOZNAM LITERATÚRY

Al-Snafi, A. E.: Pharmacological and therapeutic importance of *Erigeron canadensis* (syn. *Conyza canadensis*). *Indo American Journal of Pharmaceutical sciences*, 2017, 4 (2), 248 – 256. Doi: 10.5281/zenodo.344930.

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

Cabi Compendium. Conyza Canadensis (Canadian fleabane). Cabi International. CABI Digital Library, 2022. https://doi.org/10.1079/cabicompendium.11344. Accessed October 15, 2022.

Csupor-Löffler, B., Hajdú, Z., Zupkó, I., Molnár, J., Forgo, P., Vasas, A., Kele, Z., Hohmannet, J.: Antoproliferative constituens of the roots of *Conyza canadensis*. *Planta Medica*, 2016, 77 (11), 1183 – 1188. Doi: 10.1055/s-0030-1270714.

Farmakopea polska V. The Polish Farmaceutical Society, 1999. 5th edn. Warszawa: Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, 2000, 664 p. <https://www.ptfarm.pl/?pid=%201&language=en>. Accessed October 17, 2022.

Kukučková, D., Eftimová, J.: Antioxidačné vlastnosti plodov a stopiek *Prunus avium* L. [Antioxidant properties of fruits and stems of *Prunus avium* L.] *Folia Pharmaceutica Cassoviensia*, 2020, 2 (1), 70 – 77. https://www.uvlf.sk/document/folia-pharmaceutica-cassoviensia-volume-2-issue-1-2020.pdf. Accessed October 15, 2022.

Kato-Noguchi, H., Kato, M.: Allelopathy and allelochemicals of *Solidago canadensis* L. and *S. al-*

tissima L. Their naturalization. *Plants*, 2022, 11 (23), 235. https://doi.org/10.3390/plants11233235. Accessed April 10, 2023.

Mlčoch, Z.: Turanka Kanadská – účinky na zdraví, co léčí, použití, užívaní, využití. [*Conyza canadensis* - health effects, what it cures, use, use, uses]. 2020. <https://www.bylinkyprovsechny.cz/byliny--kere-stromy/byliny/213-turanka-ucinky-na-zdravi--co-leci-pouziti-uzivani-vyuziti>. Accessed October 15, 2022.

Nikolaeva, T. N., Lapshin, P. V., Zagoskina, N. V.: Method for determinig the total content of phenolic compounds in plant extracts with Folin-Denis reagent anf Folin-Ciocalteu reagent: modification and comparison. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2022, 48, 1519 – 1525.

Organisation For Economic Co-Operation And Development (OECD). *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*, 2004, 12. https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264069947-en.pdf?expires=1647363758&id=id&accname =guest&checksum=77D50A2F77624456A68C0344F29F8337. Accessed March 15, 2023.

Palma-Bautista, C., Gherekhloo, J., Domínguez-Martínez. P. A., Domínguez-Valenzuela, J. A., Cruz-Hipolito, H. E., Alcántara-de la Cruz, R., Rojano-Delgado A., De Prado, R.: Characterization of three glyphosate resistant *Parthenium hysterophorus* populations collected in citrus groves from Mexico. *Pestic Biochem Physiol*., 2019,155, 1 –7. Doi: 10.1016/j.pestbp.2018.11.002.

Polat, D. Ç., İlgün, S., Karatoprak, G. Ş., Akkol, E. K., Capasso, R.: Phytochemical profiles, antioxidant, cytotoxic, and anti-inflammatory activities of traditional medicinal plants: *Centauria pichleri* subsp. *pichleri, Conyza canadensis,* and *Jasminum fructicans. Molecules*, 2022, 27, 23. https://doi.org/10.3390/molecules27238249. Accessed April 15, 2023.

Singleton, V. L., Rossi, J. A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965, 16 (3), 144 – 158. Doi: 10.5344/ajev.1965.16.3.144.

Siddartha, B., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., Chang, Ch.--M.: Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, 2022, 27 (4), 1326. http://dx.doi.org/10.3390/molecules27041326. Accessed April 17, 2023.

Wu, H., S. Walker, M. J., Rollin, D,. Tan K. Y., Robinson, G., Werth, J.: Germination, persistence, and emergence of flaxleaf fleabane (C*onyza bonariensis* [L.] Cronquist). *Weed Biology and Management*, 2007, 7 (3), 192 – 199. https://doi.org/10.1111/j.1445--6664.2007.00256.x. Accessed April 17, 2023.

URL 1, 2023. *WFO: Erigeron canadensis L.* http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000015917. Accessed August 13, 2023.

POKYNY PRE AUTOROV

ZAMERANIE ČASOPISU

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

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

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

Za uverejnenie článku v časopise sa nevyžadujú žiadne poplatky.

VŠEOBECNÉ ZÁSADY

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

Kompletný text rukopisu vrátane fotografií, obrázkov, tabuliek a grafov sa zasiela v elektronickej forme na nasledovnú adresu: **folia.pharma@uvlf.sk** alebo **zuzana.holeckova@uvlf.sk**. Ak rukopis nespĺňa pokyny pre autorov, redakčná rada si vyhradzuje právo vrátiť rukopis autorom pred jeho posúdením recenzentmi.

Pri písaní príspevku (včítane grafov, tabuliek a pod.) je potrebné zachovávať jednotný štýl a formát práce (**Times New Roman**, veľkosť písma 12 bodov, riadkovanie 1,5, okraje 2,5 cm, zarovnanie podľa okrajov).

Pri zasielaní rukopisu autori pripájajú prehlásenie, že ich článok je pôvodný, nebol publikovaný ani zaslaný na publikáciu inde.

Ak štúdia hodnotí farmaceutický produkt, lekárske alebo vedecké zariadenie/pomôcku, alebo iný komerčný výrobok, autori informujú vydavateľa dôverným listom o akomkoľvek finančnom zainteresovaní, ktoré existuje v rámci spoločnosti, ktorá takýto produkt vyrába, alebo prípadnej konkurenčnej spoločnosti.

Používanie jednotiek. V texte sa zásadne používa medzinárodný systém jednotiek (SI). Iné jednotky je nevyhnutné vysvetliť a definovať.

Skratky a symboly. Pri voľbe fyzikálnych alebo fyzikálno-chemických symbolov je záväzný IUPAC Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units (Pergamon Press, Oxford, 1993). Používajú sa len štandardné skratky. Odporúča sa vyhýbať sa skratkám v názve a v abstrakte. Skratky by sa mali používať len pri ich častom opakovaní. Pri prvom použití skratky v texte sa pripojí jej vysvetlenie v zátvorke, pokiaľ sa nejedná o štandardnú jednotku merania.

Názvoslovie a terminológia. V texte je potrebné používať štandardné slovenské názvoslovie v zmysle platných odporúčaní IUPAC. Detailné inštrukcie pre

anglicky písaný text sa nachádzajú v publikáciách IUPAC *Brief Guide to the Nomenclature of Inorganic Chemistry IUPAC 2015, Pure App. Chem. 87, 1039-1049,* © IUPAC & De Gruyter 2015 and *Nomenclature of Organic Chemistry, IUPAC Recommendations and Preferred Names 2013,* Royal Society of Chemistry, Cambridge 2014. Je vhodné vyhnúť sa novým triviálnym názvom. Nové zlúčeniny musia byť pomenované systémovým názvoslovím podľa IUPAC.

Pri uvádzaní látok izolovaných z prírodných zdrojov sa latinsky uvedie názov zdroja (napr. rodový a druhový názov rastliny) a príslušná čeľaď. Liečivá sa uvádzajú INN názvom v slovenskej, českej, resp. v anglickej mutácii a to podľa jazyka, v ktorom je rukopis napísaný. Ak je známy liekopisný názov, tak sa uprednostní, resp. prípustné sú obidva.

Príklady: paracetamol (nie acetaminofén), bisfosfonát (nie bifosfonát), adrenalín/liekopis (nie epinefrín/INN), hydroxykarbamin (nie hydroxyurea), kromoglykán (nie chromoglykán), cholestyramín (nie colestyramín, kolestyramín), lítium (lithium), manitol (nie mannitol).
Latinské termíny sa píšu kurzívou.

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

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

Fotografie, obrázky, grafy. Aby sa vyhlo prípadným nepresnostiam či chybám, odporúčame zaslať fotografie, obrázky a grafy zvlášť v osobitnej prílohe (aj v prípade, že ich už autori majú v texte) a uviesť zdrojový program, v ktorom boli vypracované (napr. tabuľka – MS Word, graf – MS Excel). V texte sa uvádza odkaz na príslušnú fotografiu, obrázok a graf, napr. (viď obr. 1). Odkaz sa uvedie aj vtedy, keď autor zašle fotografie, obrázky a grafy iba v prílohe, aby bolo jasne označené miesto, kde sa má príslušná fotografia, obrázok alebo graf v texte nachádzať. Fotografie majú mať minimálne rozlíšenie na úrovni 300 dpi a musia byť jasné a ostré. Vzhľadom na technické komplikácie, ku ktorým môže dôjsť pri konvertovaní farebných obrázkov pre potreby čiernobielej tlače sa odporúča zaslať obrázky a ilustrácie vo verzii vhodnej pre takúto tlač. V časopise môžu mať obrázky a ilustrácie šírku len 8,5 cm a nachádzať sa na strane širokej 17,5 cm, preto by veľkosť písmen v legende mala zodpovedať týmto rozmerom (Times New Roman 10). Obrázky, fotografie a grafy majú byť orámované, priebežne očíslované a má k nim byť pripojený príslušný text týkajúci sa obsahu a prípadne aj zdroja. Číslo a text nemá byť súčasťou fotografie/obrázku/grafu. Číslo a názov obrázku, fotografie a grafu sa má umiestniť nad a príslušný text týkajúci sa obsahu a prípadne aj zdroja (legenda) sa má umiestniť pod nimi. Pri mikrofotografiách text obsahuje aj údaje o mierke a technike farbenia. Hlavné objekty, zmeny a zistenia sa v mikrofotografiách označujú šípkou alebo iným symbolom, ktorý je vysvetlený v legende.

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

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

Etické aspekty. Pri popise experimentov vykonávaných na zvieratách sa uvádza, či boli schválené etickou komisiou a či boli dodržané príslušné aktuálne legislatívne opatrenia, ktoré sa vzťahujú na túto oblasť ako aj číslo povolenia Štátnej veterinárnej a potravinovej správy SR. Pri klinických štúdiách sa uvádza, či boli schválené príslušnou etickou komisiou.

Štatistika. Pri opise použitých štatistických metód sa uvádzajú informácie potrebné na to, aby si informovaný čitateľ mohol na základe pôvodných výsledkov overiť ich správnosť.

ŠTRUKTÚRA PRÍSPEVKOV

Každý príspevok má byť tematicky kompletný. Odporúčaný rozsah pre odborný článok (pôvodnú štúdiu) je 12 strán, pre prehľadový článok 15 strán a pre kazuistiku 7 strán.

Hlavný text príspevku sa začína názvom príspevku v slovenskom alebo v českom jazyku a následne sa uvedie názov v jazyku anglickom, ktorý má byť stručný a výstižný (veľké tučné písmená, veľkosť písma 14, zarovnanie na stred). Pod názvom sa uvádzajú celé mená autorov (priezvisko, krstné meno/mená), pod nimi pracovné zaradenie autorov (inštitúcia) a štát a nakoniec e-mailová adresa prvého/korešpondujúceho autora (všetko zarovnané na stred). Pri empiricky orientovaných štúdiách je potrebné dodržať usporiadanie rukopisu do nasledovných častí: **ABSTRAKT, ÚVOD, MATERIÁL A METÓDY, VÝSLEDKY, DISKUSIA, ZÁVERY, (POĎAKOVANIE), ZOZNAM LITERATÚRY**.

Každý nadpis sa uvádza na osobitnom riadku (veľké tučné písmo, veľkosť 12). Nad ním a pod ním sa vynechá voľný riadok. Každý odsek začína zarážkou

ABSTRAKT

Vyžaduje sa abstrakt v angličtine (tučné písmo, veľkosť 12). Jeho dĺžka by nemala presiahnuť 250 slov. Abstrakt stručne prezentuje cieľ a relevantnosť štúdie, základné postupy, hlavné zistenia a vyvodené závery. Zdôrazňuje nové a dôležité aspekty štúdie a pozorovaní.

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

ÚVOD

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

MATERIÁL A METÓDY

Prezentuje sa podrobný popis a charakteristika objektov pozorovania/experimentov, vrátane kontrol. Identifikujú sa použité metódy, prístroje (meno a adresa výrobcu v zátvorke) a postupy s dostatočnými podrobnosťami na to, aby ich bolo možné reprodukovať. Citujú sa zavedené metódy a ich zdroje a stručne sa opisujú metódy, ktoré boli publikované, ale nie sú veľmi známe. Poskytuje sa kompletný opis nových alebo podstatne modifikovaných metód, dôvody ich použitia a ich prípadné obmedzenia. Presne sa identifikujú všetky použité liečivá a chemikálie vrátane ich generického názvu, dávky a spôsobu podávania.

Poskytujú sa kompletné informácie o štatistických metódach a opatreniach použitých vo výskume.

VÝSLEDKY

Pri uvádzaní výsledkov sa používa medzinárodný systém jednotiek (SI).

Prezentácia výsledkov má byť výstižná, s logickou nadväznosťou a využívaním tabuliek a názorných grafov. V tabuľkách a grafoch je potrebné vyhnúť sa duplicite prezentovaných výsledkov. V texte sa zdôrazňujú a sumarizujú len dôležité pozorovania. Tam, kde je to vhodné/potrebné, tabuľky majú obsahovať výsledky štatistickej analýzy (hladiny významnosti

DISKUSIA

Zdôrazňujú sa nové a dôležité aspekty štúdie, ktoré vedú ku konečným záverom. Je potrebné sa vyhnúť podrobnému opakovaniu údajov už spomenutých v častiach Úvod a Výsledky. Diskusia má obsahovať zhrnutie prezentovaných zistení,

relevantné obmedzenia a význam týchto zistení pre ďalší výskum. Výsledky štúdie sú porovnávané s publikovanými výsledkami iných autorov.

ZÁVERY

Dávajú sa do súvislosti závery s cieľom štúdie. Je potrebné sa vyhnúť nekvalifikovaným vyhláseniam a záverom, ktoré nie sú plne podporované získanými údajmi. Tam, kde je to vhodné, môžu sa uvádzať odporúčania.

POĎAKOVANIE

(Kurzívou) Ak je to potrebné, uvádza sa poďakovanie (grant, špeciálne analýzy, technická podpora...).

ZOZNAM LITERATÚRY

Všetky zdroje uvedené v zozname musia byť citované v texte.

Použité zdroje sa v zozname uvádzajú v abecednom poradí (podľa priezviska prvého autora), a každý z nich sa začína písať na nový riadok s odsadením. Zdroje musia obsahovať priezviská a iniciály všetkých autorov. Neodporúča sa použiť nadmerný počet citácií na podporu jedného vyhlásenia.

Od autorov sa vyžaduje použitie iba overiteľných a recenzovaných zdrojov z celosvetovo akceptovaných vedeckých databáz.

V texte sa cituje/ú autor/i priezviskom a rok publikovania. V slovenskom a českom jazyku sa používajú spojky „a“ a „a kol.“, ak je rukopis v anglickom jazyku spojky „and“ a „et al.“. Viacnásobné citácie sa uvádzajú v chronologickom poradí (od najstaršej po najnovšiu).

Pri písaní zdrojov štýl a interpunkcia má zodpovedať príkladom uvedeným nižšie:

Časopis (vedecký/odborný): Priezvisko/á a iniciála/y autora /ov. Celý názov článku, názov časopisu (kurzívou), rok publikácie, ročník a príslušné strany. Číslo časopisu sa uvedie (v zátvorke) len vtedy, keď sa v časopise neuvádza ročník. Možno uviesť skrátený názov časopisu, ak sa takýto nachádza v štandardnom ISO zozname skrátených názvov časopisov. ISSN číslo sa nevyžaduje:

Bagirova, V. L., Miťkina, L. I.: Determination of Tartrazine in drugs. *Pharm. Chem. J.* 2003, 37, 558 – 559.

Vetulani, J.: Drug addiction, part II. Neurobiology of addiction. *Pol. J. Pharmacol.*, 2001, 53 (4), 303 – 317.

Pri zdrojoch v slovenskom alebo českom jazyku je potrebné do hranatej zátvorky uviesť názov článku/ knihy a i.

Zummerová, A., Kolesárová, M.: Adherencia pacientov k liečbe reumatoidnej artritídy [Adherence of patients to the therapy of rheumatoid arthritis]. *Folia Pharmaceutica Cassoviensia*, 2020, 2 (3), 69 – 78.

Kniha (editovaná, needitovaná):

Mená a iniciály autorov citovanej časti knihy, autori/editori knihy, názov knihy (kurzívou), miesto vydania, vydavateľ, rok vydania, celkový počet strán alebo citované strany (ISBN sa nevyžaduje):

Choi, C. K., Dong, M. W.: Chapter 5 – Sample preparation for HPLC analysis of drug products. In Ahuja, S., Dong, M. W. (Eds.). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. United Kingdom: Elsevier, 2005. 123–144.

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

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

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

Online časopis:

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

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

Pri zdroji v slovenskom/českom jazyku sa uvádza [cit. 2021-01-30].

Online website:

King, M. W.: *The Medical Biochemistry Page*. http://themedicalbiochemistrypage.org. Updated July 14, 2009. Accessed July 14, 2009.

PREHĽADOVÉ ČLÁNKY

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

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

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

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

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

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

ZÁVER – Zodpovedanie otázok pre výskum, položených v úvode.

ZOZNAM LITERATÚRY – Potvrdzuje práce iných vedcov – zabraňuje obvineniam z plagiátorstva. Neodporúča sa použiť viac ako 100 literárnych zdrojov.

KAZUISTIKY

Publikujú sa aj články, ktoré prezentujú správy o výnimočnom prípade určitého liečiva, resp. substancie či zmesi a jej neobvyklého účinku alebo opis zaujímavého klinického prípadu, choroby a pod. Odporúčaná štruktúra kazuistík je nasledovná:

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

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

ÚVOD – vysvetľuje dôvody, pre ktoré bol daný prípad opísaný

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

DISKUSIA – zdôrazňujú sa zaujímavé aspekty prípadu

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

ZOZNAM LITERATÚRY

RECENZIA

Publikujú sa aj kritické rozbory odborného diela (napr. knihy, článku), ktoré obsahujú odôvodnené hodnotenie. Odporúčaná štruktúra recenzie je nasledovná:

ZÁKLADNÉ INFORMÁCIE – uvádza sa názov knihy (článku, časopisu), mená autorov (priezvisko, iniciály), miesto vydania a názov vydavateľstva, rok vydania, počet strán, odporúčaná cena, ISBN

OBSAH KNIHY (ČLÁNKU, ČASOPISU) – opisujú sa dôležité informácie, napr. čím kniha (článok, časopis) recenzenta zaujala/sklamala.

VÝZNAM KNIHY (ČLÁNKU, ČASOPISU) – uvádza sa jej využitie pre odbornú verejnosť.

Redakčná rada