FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis
UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609
ISSN 2729-790X

2

III • 2021

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: *Jana Mojžišová*
Výkonná redaktorka/Deputy/Managing Editor: *Zita Faixová*
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. (Bratislava, 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. (Košice, Slovak Republic), Pistl, J. (Košice, Slovak 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.

Máj 2021

FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

VYDÁVA
UNIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE V KOŠICIACH
SLOVAKIA

FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA
III., 2, 2021

PUBLISHED BY
THE UNIVERSITY OF VETERINARY MEDICINE AND PHARMACY IN KOŠICE
2021

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 2, 2021

O B S A H

Wood, Jana; Yasmin-Karim, Sayeda; Müeller, Romy; Bih, Noella; Tkáčiková, Ľudmila; Ngwa, Wilfred:
MODULÁCIA ABSKOPÁLNEHO EFEKTU A HODNOTENIE JEHO IMUNITNEJ ODPOVEDE V *IN VIVO* MODELI RAKOVINY KRČKA MATERNICE
MODULATION OF ABSCOPAL EFFECT AND ASSESSMENT OF ITS IMMUNE RESPONSE IN *IN VIVO* CERVICAL CANCER MODEL 5

Angelovičová, Mária; Čonková, Eva; Perečinský, Slavomír:
SÚČASNÉ TRENDY FARMAKOTERAPIE ASTMY
CURRENT TRENDS OF ASTHMA PHARMACOTHERAPY 11

Šuleková, Monika; Lipka, Radislav:
RIZIKÁ POUŽÍVANIA VYBRANÝCH FARBÍV A ICH STANOVENIE METÓDOU KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE V RÔZNYCH LIEKOVÝCH FORMÁCH
RISK OF USING SELECTED DYES AND THEIR DETERMINATION BY LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD IN VARIOUS DOSAGE FORMS 22

Lörinc, Viera; Schwarzbacherová, Viera; Galdíková, Martina; Holečková, Beáta:
HODNOTENIE GENOTOXICITY A CYTOTOXICITY INSEKTICÍDU MOSPILAN® 20 SP V *IN VITRO* KULTÚRACH BOVINNÝCH LYMFOCYTOV
EVALUATION OF INSECTICIDE MOSPILAN® 20 SP GENOTOXICITY AND CYTOTOXICITY IN BOVINE LYMPHOCYTE CULTURES *IN VITRO* 29

Jurčacková, Zuzana; Ciglanová, Denisa; Mačák Kubašková, Terézia; Hrčková, Gabriela:
KONCENTRAČNE ZÁVISLÝ ÚČINOK ASTAXANTÍNU A JEHO ESTEROV NA METABOLICKÚ AKTIVITU IMUNITNÝCH BUNIEK ZDRAVÝCH MYŠÍ *IN VITRO*
CONCENTRATION-DEPENDENT EFFECT OF ASTAXANTHIN AND ITS ESTHERS ON METABOLIC ACTIVITY OF IMMUNE CELLS IN HEALTHY MICE *IN VITRO* 37

Tkáčová, Katarína; Harvanová, Jarmila:
STANOVENIE ANTIOXIDAČNEJ AKTIVITY FLAVONOIDOV ZÍSKANÝCH ZO SEMIEN VINIČA HROZNORODÉHO
DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FLAVONOIDS OBTAINED FROM GRAPE VINES 48

Polláková, Magdaléna; Petrilla, Vladimír; Andrejčáková, Zuzana; Petrovová, Eva:
VPLYV HADIEHO JEDU JEDINCOV DRUHU *BITIS ARIETANS* ODLIŠNÝCH LOKALÍT NA VÝVINOVÉ ŠTÁDIUM KURACÍCH EMBRYÍ
MONITORING OF DEVELOPMENTAL TOXICITY AFTER APPLICATION OF *BITIS ARIETANS* VENOM FROM DIFFERENT LOCATIONS 57

Kľoc, Dominik; Fedorová, Monika; Suchovič, Radoslav:
DISPENZÁCIA VETERINÁRNYCH LIEKOV ZO SKUPINY NESTEROIDNÝCH ANTIFLOGISTÍK
DISPENSING OF VETERINARY MEDICINES FROM THE CLASS OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS 67

Eftimová, Jarmila; Galeštoková, Mária:
OBSAH CELKOVÝCH POLYFENOLOV, FLAVONOIDOV A ANTIRADIKÁLOVÁ AKTIVITA PLODOV, LISTOV A KÔRY *HIPPOPHAE RHAMNOIDES* L.
CONTENTS OF TOTAL POLYPHENOLS, FLAVONOIDS AND ANTIRADICAL ACTIVITY OF FRUIT, LEAF AND BARK OF *HIPPOPHAE RHAMNOIDES* L. 78

Rozman Antoliková, Natália:
ANALÝZA PRESKRIPCIE LIEKOV INDIKOVANÝCH NA TERAPIU ALERGICKEJ RINITÍDY
ANALYSIS OF THE PRESCRIPTION OF MEDICINAL PRODUCTS INDICATED IN ALLERGIC RHINITIS THERAPY 88

Pokyny pre autorov 99

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 2: 5 – 10, 2021

MODULÁCIA ABSKOPÁLNEHO EFEKTU A HODNOTENIE JEHO IMUNITNEJ ODPOVEDE V *IN VIVO* MODELI RAKOVINY KRČKA MATERNICE

MODULATION OF ABSCOPAL EFFECT AND ASSESSMENT OF ITS IMMUNE RESPONSE IN *IN VIVO* CERVICAL CANCER MODEL

Wood, Jana[1, 2]; Yasmin-Karim, Sayeda[1]; Müeller, Romy[1]; Bih, Noella[1]; Tkáčiková, Ľudmila[2]; Ngwa, Wilfred[1]

[1]Department of Radiation Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Brigham and Women's Hospital
Harvard Medical School
450 Brookline Ave, Boston MA, 022 15
United States of America
[2]Katedra mikrobiológie a imunológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

Jana_Wood@dfci.harvard.edu

ABSTRACT

Metastatická rakovina krčka maternice je globálnym problémom u žien, pričom skoro 90 % úmrtí pripadá na krajiny s malým až stredným príjmom (LMIC). V tejto štúdii prezentujeme potenciálnu liečbu postavenú na indukcii zriedkavého abskopálneho efektu, kde ožiarením (RT) jedného nádoru a následným lokálnym podaním agonistickej monoklonovej protilátky anti-CD40 iniciujeme systémovú imunitnú odpoveď, ktorá vedie k eliminácii liečeného nádoru i distálnych metastáz. Zamerali sme sa na optimalizáciu parametrov liečby, t. j. radiačnú dávku a dávkovanie anti-CD40, ktoré by viedli k abskopálnemu efektu, a následne na imunologickú analýzu nádorov po liečbe. Metastatické štádium rakoviny sme napodobnili subkutánnou inokuláciou myšacej bunkovej línie rakoviny krčka maternice (TC-1) na oba dorzolaterálne boky, kde jeden nádor bol liečený a druhý sme pozorovali na vznik abskopálnej odpovede. Výsledky poukázali na to, že kombináciou jednej dávky RT (6 Gy) s následnou jedinou intratumorálnou injekciou anti-CD40 (20 µg/nádor/myš), sme boli schopní indukovať silný abskopálny efekt, ktorý sa manifestoval zmenšením až úplnou eliminácou liečených i neliečených nádorov s výrazne dlhším prežívaním, pričom nádory v ostatných

skupinách rástli ďalej. Úplne vyliečené myši s históriou abskopálneho efektu po opätovnej inokulácii TC-1 buniek už nevyvinuli nádory; vzniklo iba vitiligo v mieste vpichu, čo potvrdilo vznik imunitnej pamäte. Analýza imunitných buniek prítomných v reagujúcich nádoroch odhalila, že abskopálny efekt je sprostredkovaný posilnenou prezentáciou antigénov vďaka zvýšenej prítomnosti konvenčných dentritových buniek cDC1, ktoré iniciovali rapídny prílev cytotoxických CD8+ T-buniek a NK buniek. Táto liečba môže byť užitočná v LMIC, vďaka zredukovaniu RT dávok, zlepšeniu dostupnosti liečby a hlavne v predĺžení životov pacientok.

Kľúčové slová: abskopálny efekt; anti-CD40; imunoterapia; myš; rádioterapia; rakovina krčka maternice

ABSTRACT

Metastatic cervical cancer is a global problem in women, with an almost 90 % mortality rate in low-to-middle-income countries (LMICs). We present a potential treatment based on the abscopal effect by irradiating (RT) a single tumor followed by the local administration of the agonistic monoclonal antibody anti-CD40, which initiates a systemic immune response that eliminates the treated tumor and distal metastases. We focused on optimizing treatment parameters to induce the abscopal effect, e. g. radiation dose and anti-CD40 dosing, and subsequently on the immunological analysis. We mimicked the metastatic cancer stage by subcutaneously inoculating a murine cervical cancer cell line (TC-1) onto both dorsolateral flanks, where one tumor was treated and the other was observed for an abscopal response. The results indicated that combining a single RT dose (6 Gy) followed by a single intratumoral injection of anti-CD40 (20 µg/tumor/mouse) induced a strong abscopal effect manifested by a reduction or complete elimination of both treated and untreated tumors ensuring significantly longer survival. Tumors in the remaining groups developed further. After re-inoculation with TC-1 cells, the mice cured through the abscopal effect no longer developed tumors. Only vitiligo formed at the injection site, confirming the development of immune memory. Analysis of responding tumors revealed that the abscopal effect is mediated by enhanced antigen presentation due to the increased presence of conventional cDC1 dendritic cells, which initiated a rapid influx of cytotoxic CD8+ T cells and NK cells. This treatment in LMIC could reduce RT doses, improve treatment accessibility, and prolong patients' lives.

Key words: abscopal effect; anti-CD40; immunotherapy; mouse; radiotherapy; cervical cancer

ÚVOD

Rakovina krčka maternice je vo vyspelých krajinách pomaly eliminovaná vďaka komplexnému systému zahrňujúcemu prevenciu, včasnú diagnostiku, efektívne skríningové metódy a liečebné programy. V rozvojových krajinách sú však pacientky z dôvodov nedostatočného skríningu alebo zlého socio-ekonomického postavenia často diagnostikované až v neskorých štádiách rakoviny, ktorých liečba je limitovaná na rádioterapiu a chemoterapiu. Súčasný onkologický výskum hľadá nové liečebné metódy ako nahradiť chemoterapiu, použitie ktorej je spojené so závažnými vedľajšími účinkami zhoršujúcimi kvalitu života pacientov. Naopak, lokálna rádioterapia je efektívna, má miernejšie vedľajšie účinky a predstavuje viac ako 50 % onkologickej liečby.

Rádioterapia môže za určitých podmienok navodiť zriedkavý fenomén v metastatickej rakovine, tzv. abskopálny efekt, pri ktorom bolo pozorované, že lokálnym ožiarením primárneho nádoru možno docieliť zmenšenie nielen liečených, ale aj vzdialených metastatických lézií mimo

radiačného poľa (Mole, 1953). Pri melanóme sa tento účinok zosilní, ak sa k rádioterapii pridajú inhibítory imunitných kontrolných bodov (ICI), ako sú napríklad anti-CTLA-4 alebo anti-PD-1/anti-PD-L1 protilátky (Filippi a kol., 2016). Pozornosť púta aj imunoadjuvans anti-CD40, ktorý sa podieľa na posilnení aktivácie antigén prezentujúcich buniek (APCs). Mechanizmus abskopálneho efektu nebol ešte doposiaľ objasnený, no predpokladá sa, že imunitný systém sa na tomto efekte významne podieľa.

Cieľom tejto štúdie bola optimalizácia jednotlivých parametrov liečby, t. j. optimalizácia radiačnej dávky a dávkovania imunoadjuvansu antiCD40, ktorá by viedla k indukcii abskopálneho efektu. Následne sme chceli tento efekt objasniť analyzovaním imunitnej odpovede v primárnych a metastatických nádoroch rakoviny krčka maternice u myší na optimalizovanú liečbu a tak priblížiť potenciálny mechanizmus abskopálneho efektu.

MATERIÁL A METÓDY

Na *in vivo* modeláciu rakoviny krčka maternice sme použili zdravé 8 až 10-týždňové samičky C57BL/6N myší s nekompromitovanou imunitou (Taconic Biosciences, USA). Myšiam sme subkutánne inokulovali 50 µl TC-1 bunkovej suspenzie (v koncentrácii 1 x 10^5 buniek/nádor) do oboch bokov každej myši, s cieľom imitovania metastatického štádia rakoviny. Keď myši dosiahli veľkosť nádorov v priemere 3 až 4 mm, náhodne sme ich rozdelili do skupín a liečili podľa dizajnov štúdií uvedených v tabuľke 1. Liečba bola postavená na ožiarení len jedného z dvoch nádorov, ktorý sme následne po RT lokálne liečili intratumorálnou injekciou anti-CD40. Druhý (neliečený) metastatický nádor sme pozorovali na vznik abskopálneho efektu. Úplne neliečené myši boli len v kontrolnej skupine. Vo všetkých štúdiách sme najmenej dvakrát týždenne zaznamenávali veľkosť nádorov, telesnú hmotnosť a dĺžku prežívania na sledovanie účinnosti liečby.

Na rádioterapiu sme využili malú výskumnú platformu na ožarovanie zvierat (SARRP, Xtrahl, Inc.) pri výkone 220 kVp a prúde 13 mA s využitím 10 x 10 mm kolimátora a 0,15 mm hrubého medeného filtra. Pri titrácii RT dávok sme jednému nádoru aplikovali externým lúčom jednu frakciu RT 6 Gy, 10 Gy alebo 15 Gy, s následnou intratumorálnou injekciou anti-CD40 (klon FGK4.5/FGK45, potkaní izotyp IgG2a; BioXcell) (20 µg/nádor/myš). Optimalizovanú RT dávku sme ďalej využili pri stanovení vhodného dávkovania anti-CD40 podaného v jednej alebo troch dávkach v týždenných intervaloch v kombinácii s RT, alebo bez (viď tab. 1). Dva týždne po liečbe sme zaznamenali stav nádorov aj s CT snímkami. Myšiam, u ktorých sa vyvinul abskopálny efekt s úplným odstránením nádorov, sme 100 dní po liečbe znova subkutánne inokulovali s TC-1 (1 x 10^5 buniek) na pozorovanie vzniku imunitnej pamäte.

Optimalizovanú liečbu (viď tab. 1) sme zopakovali na novej skupine myší kvôli imunologickej analýze nádorov, ktoré sme zozbierali na 14. deň po liečbe. Nádory sme spracovali a vybrané populácie imunitných buniek sme identifikovali pomocou monoklonových protilátok konjugovaných s fluorofórmi (L/D Violet, Invitrogen; a od BioLegend CD45-FITC, CD4-PerCP/Cy5.5, CD8a-PE/Cy7, CD335-AF647, XCR1-PE) podľa známeho protokolu (Yale School of Medicine, 2019), ktoré sme analyzovali na prietokovom cytometri BD LSR Fortessa. Údaje z cytometrie sme analyzovali v programe FCS Express 6 (DeNovo), CT snímky v Preclinical Imalytics Software a objemy nádorov v štatistickom programe GraphPad Prism verzia 7.

Na štatistickú analýzu dát objemov nádorov a populácií buniek z cytometrie sme využili nepárový dvojstranný t-test a na analýzu dĺžky prežívania myší Mantel-Cox test (log-rank test).

Všetky procedúry na zvieratách sme uskutočnili v súlade s interným protokolom schváleným Inštitútom pre starostlivosť o zvieratá a ich používanie (IACUC) v Dana-Farber Cancer Institute DFCI (protokol 15-040 schválený 5. januára 2016).

Tab. 1.: Dizajn jednotlivých štúdií

Skupiny	Titrácia radiačnej dávky (RT) (n = 5)	Určenie dávkovania anti-CD40 (mAb)[2] (n = 5)	Imunologická štúdia (n = 3)
1	Kontrola	Kontrola	Kontrola
2	–	RT (6 Gy)	RT (6 Gy)
3	–	mAb (1x)	mAb (1x)
4	–	mAb (3x[4])	–
5	RT (6 Gy[1]) + mAb (1x[3])	RT (6 Gy) + mAb (1x)	RT (6 Gy) + mAb (1x)
6	–	RT (6 Gy) + mAb (3x)	–
7	RT (10 Gy) + mAb (1x)	–	–
8	RT (15 Gy) + mAb (1x)	–	–

[1]Gy = Gray, [2]mAb = anti-CD40, [3]dávka 20 µg/ nádor/ myš, [4]dávka 6,7 µg/ nádor/ myš

VÝSLEDKY

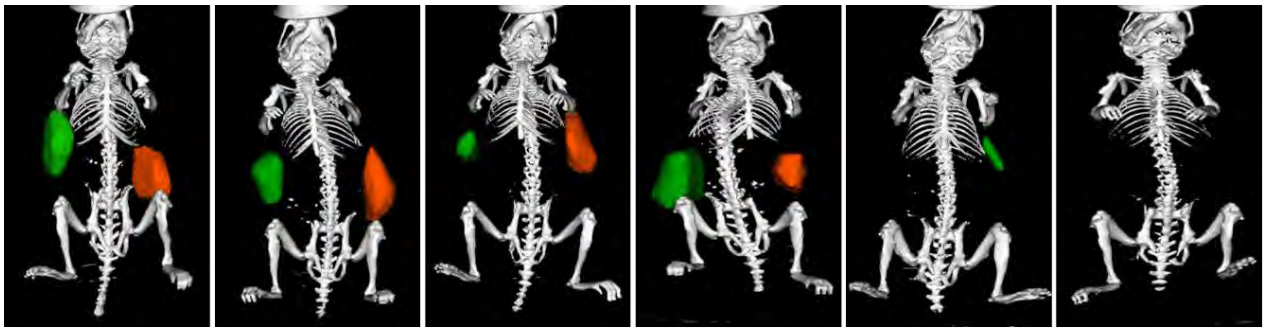
Výsledky tejto štúdie naznačujú, že kombináciou jednej frakcie externého lúča RT (6 Gy) a jedinej lokálnej dávky agonistickej monoklonovej protilátky anti-CD40 (20 µg/nádor/ myš) v jednom nádore, možno indukovať silný abskopálny efekt aj na neliečených distálnych metastázach vedúci k zmenšeniu až úplnému odstráneniu nádorov s výrazným predĺžením životov jedincov (viď obr. 1 a 2). Liečebná kombinácia s nižšou RT dávkou (6 Gy) vykazovala lepšie výsledky v aktivovaní abskopálneho efektu (2/5 myší) v porovnaní s vyššími dávkami (10 alebo 15 Gy) (0/5 myší). Pri optimalizovaní dávkovania anti-CD40 sme zistili, že jedna lokálna väčšia dávka (20 µg/dávka) dokáže lepšie utlmovať rast nádorov v porovnaní s tromi menšími dávkami v týždennom intervale (6,7 µg/dávka). Radikálna zmena nastala v kombinácii s RT, kde skupina RT + anti-CD40 (1 x) vykazovala abskopálny efekt v 80 % v skupine, pričom 60 % myší úplne eliminovalo všetky nádory s výrazne dlhým prežívaním (viď obr. 1). Tieto myši po opätovnej inokulácii TC-1 buniek už nevytvorili nádory; iba vitiligo v mieste vpichu, čo potvrdzuje vznik imunitnej pamäte.

Analýza imunitných buniek prítomných v nádoroch v skupine liečenej s RT a anti-CD40 (1 x) ukázala (viď obr. 2), že abskopálny efekt sa spája so zvýšenou prezentáciou neoantigénu vďaka vyššej infiltrácii konvenčných dendritových buniek cDC1 (XCR1+), ktorá výrazne zvýšila influx cytotoxických CD8+ T-buniek a NK buniek (CD335+) v liečených i neliečených nádoroch (viď obr. 3). CD8+ T-bunky tvorili viac ako 70 % všetkých hematopoetických buniek (CD45+), čo zvýrazňuje ich efektorovú úlohu v abskopálnej odpovedi.

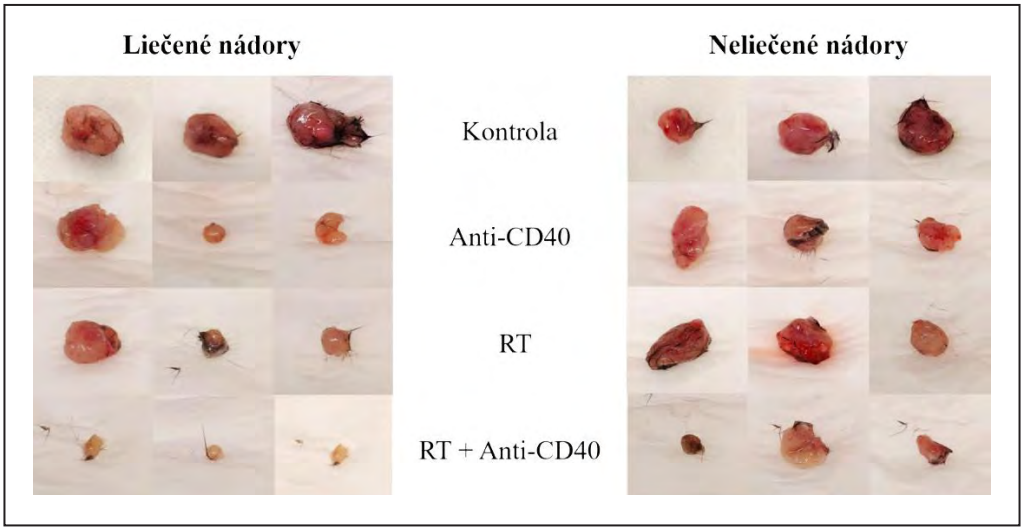
DISKUSIA

Výskyt abskopálneho efektu závisí od správneho dávkovania rádioterapie ako aj imunoadjuvansu. Príliš vysoká RT dávka vedie k poškodeniu imunostimulačných buniek, a naopak, suboptimálne dávkovanie vedie k podpore imunosupresie nádoru zvýšením infiltrácie regulačných T-buniek a s tumorom asociovaných M2 makrofágov (Seidel, Otsuka, Kabashima, 2018). Nakoľko každý typ nádorov vyžaduje osobitné stanovenie liečebných parametrov, pre náš predklinický model rakoviny

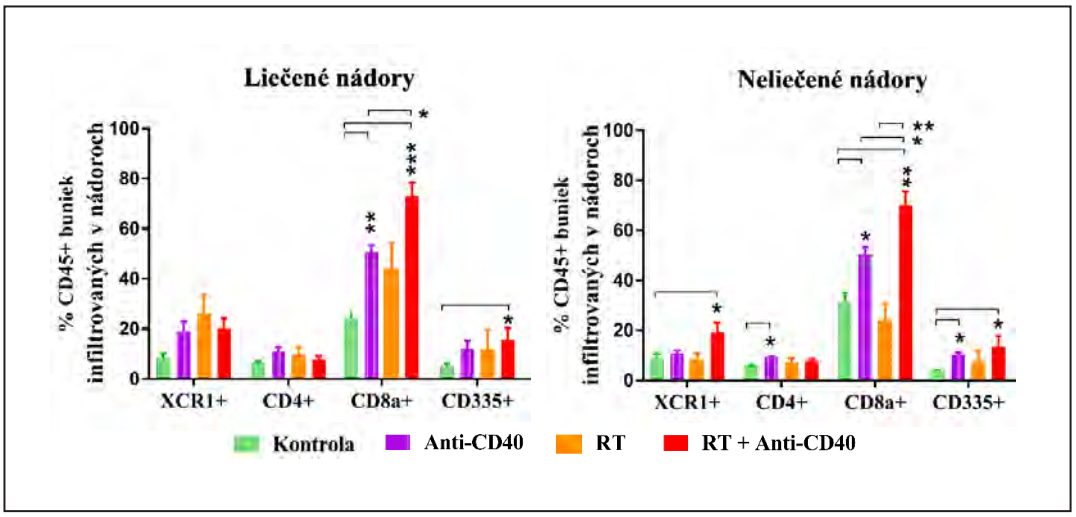
Obr. 1.: Analyzované reprezentatívne CT snímky každej experimentálnej skupiny v štúdii optimalizujúcej dávkovanie anti-CD40. Oranžová farba zodpovedá liečeným nádorom a zelená farba neliečeným nádorom



Obr. 2.: Reálne zábery zozbieraných nádorov ilustrujúce efektívnosť liečebných skupín 14 dní po liečbe



Obr. 3.: Zhrnutie analyzovaných bunkových populácií infiltrovaných v (A) liečených a (B) neliečených abskopálnych nádoroch



krčka maternice bola optimálna jedna frakcia RT (6 Gy) s jednou lokálnou dávkou anti-CD40, čo nie je v zhode so zaužívaným týždenným dávkovaním imunoadjuvansov. Naše výsledky sa zhodujú s pozorovaniami Yasmin-Karim a kol. (2018) v tom, že abskopálny efekt bol sprostredkovaný imunitným systémom, ktorý nielen odstránil prítomné nádorové lézie, ale zabezpečil aj imunitnú pamäť voči danej rakovine. V LMIC by bola liečba na základe abskopálneho efektu obzvlášť dôležitá, lebo znížením počtu RT frakcií možno navodiť abskopálny efekt a ošetriť tak viac pacientov za nižšiu cenu (Irabor a kol., 2020). Štúdie zamerané na výskum imunitných bunkových populácií v iných časových intervaloch po liečbe a ďalších populácií môžu ešte viac objasniť mechanizmus abskopálneho efektu, čo následne pomôže pri optimalizácii liečby, aby ešte viac pacientov benefitovalo z tejto liečby.

ZÁVERY

V tejto štúdii sme prezentovali predklinické výsledky inovatívnej liečby na *in vivo* modeli metastatickej rakoviny krčka maternice založenej na abskopálnom efekte. Optimalizovaná liečba kombinujúca jednu frakciu RT dávky (6 Gy) s jednou aplikáciou anti-CD40 v ožiarenom nádore viedla k abskopálnej odpovedi, t. j. inhibícii až úplnej eliminácii nielen liečeného nádoru, ale aj distálnych neliečených metastáz s výrazným predĺžením života jedincov. Systémová odpoveď sprostredkovala nielen elimináciu nádorov, ale aj imunitnú pamäť na prekonanú rakovinu. Ďalší výskum zameraný na optimalizáciu a lepšie chápanie mechanizmu abskopálneho efektu môže viesť k inováciám v terapii rakoviny krčka maternice, obzvlášť dôležitej pre LMIC, kde je globálne najvyššia úmrtnosť na túto chorobu.

ZOZNAM LITERATÚRY

Filippi, A. C., Fava, P., Badellino, S., Astrua, C., Ricardi, U., Quaglino, P.: Radiotherapy and immune checkpoints inhibitors for advanced melanoma. *Radiotherapy and Oncology*, 2016, 120 (1), 1 – 12. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27345592/. Accessed September 1, 2020.

Irabor, O. C., Swanson, W., Shaukat, F., Wirtz, J., Mallum, A., Ngoma, T., Elzawawy, A., Nguyen, P., Incrocci, L., Ngwa, W.: Can the adoption of hypofractionation guidelines expand global radiotherapy access? An analysis for breast and prostate radiotherapy. *JCO Global Oncology,* 2020, 6, 667 – 678. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32343628/. Accessed September 4, 2020.

Mole, R. H.: Whole body irradiation – radiobiology or medicine? *The British Journal of Radiology*, 1953, 26 (305), 234 – 241. https://www.birpublications.org/doi/abs/10.1259/0007-1285-26-305-234. Accessed September 3, 2020.

Seidel, J. A., Otsuka, A., Kabashima, K.: Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanism of action, efficacy, and limitations. Review Article. *Frontiers in Oncology*, 2018, 8, 86. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5883082/. Accessed September 2, 2020.

Yale School of Medicine. *Flow cytometry (FACS) staining protocol (Cell surface staining)*. https://medicine.yale.edu/immuno/flowcore/protocols/analysis/. Updated September 24, 2019. Accessed September 1, 2020.

Yasmin-Karim, S., Bruck, P. T., Moreau, M., Kunjachan, S., Chen, G. Z., Kumar, R., Grabow, S., Dougan, S., Ngwa, W.: Radiation and local anti-CD40 generate an effective in situ vaccine in preclinical models of pancreatic cancer. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9, 2030. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30245691/. Accessed July 1, 2020.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 2: 11 – 21, 2021

SÚČASNÉ TRENDY FARMAKOTERAPIE ASTMY

CURRENT TRENDS OF ASTHMA PHARMACOTHERAPY

Angelovičová, Mária[1]; Čonková, Eva[1]; Perečinský, Slavomír[2]

[1]Katedra farmakológie a toxikológie,
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
[2]Klinika pracovného lekárstva a klinickej toxikológie
Lekárska fakulta UPJŠ a UN L. Pasteura, Rastislavova 43, 041 90 Košice
Slovenská republika

eva.conkova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Astma bronchiale (priedušková astma) je chronická zápalová choroba dolných dýchacích ciest s komplexnou a veľmi individuálnou patogenézou. O úspechu liečby každej choroby rozhoduje správna diagnóza a správne zvolená liečba. Cieľom našej štúdie bola analýza farmakoterapie prieduškovej astmy na základe preskripcie a troch kazuistík. Retrospektívnym vyhodnotením lekárskych predpisov sme zistili, že z liečiv boli pacientom predpisované najmä xantínové deriváty a antihistaminiká (23,5 %); avšak z hľadiska farmakoterapie významnejšie sú kombinácie β2-adrenergických liečiv a inhalačné kortikoidy, ktoré v preskripcii predstavovali 22 % a lekárňou boli expedované najmä vo forme tabliet (48,5 %) alebo inhalačného prášku (20,1 %). V spolupráci s lekárom z Kliniky pracovného lekárstva a klinickej toxikológie v Košiciach boli spracované 3 kazuistiky, zamerané na pacientov s prejavmi bronchiálnej astmy. U prvého pacienta sa preukázal profesionálny pôvod ochorenia, ktorý sa riešil nasadením nazálneho kortikoidu v kombinácii s antihistaminikom. V druhom prípade bola primárne diagnostikovaná alergická rinitída s následným vývojom bronchiálnej astmy. Na liečbu bola použitá kombinácia salmeterol + flutikazón a fenoterol + ipratrópium bromid. U tretej pacientky sa astma nepotvrdila, išlo o pľúcnu embolizáciu. Pacientke bola nasadená antikoagulačná liečba. Z predloženej štúdie vyplýva, že na dosiahnutie kvality života správne liečeného, kontrolovaného a stabilizovaného astmatika je dôležitá compliance pacienta k zvolenej liečbe. Z tohto pohľadu môžu byť prezentované kazuistiky v mnohých prípadoch prínosom.

Kľúčové slová: Bronchiálna astma; farmakoterapia; manažment

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory disease of the lower respiratory tract with complex and very individual pathogenesis. The success of the treatment of each disease is determined by the correct diagnosis and the right treatment. The aim of the study was to analyse prescriptions with a diagnosis of bronchial asthma and to evaluate the case reports. Through a retrospective evaluation of the prescriptions, we found that among the drugs prescribed to patients, mainly xanthine derivatives and antihistamines (23,5 %) or inhalable powder (20,1 %) were used. In collaboration with a doctor from the Department of Occupational Medicine and Clinical Toxicology in Košice, we selected 3 case reports, based on medical documentation, aimed at patients with manifestations of bronchial asthma. The first patient showed a professional origin of the disease, which was solved by using a nasal corticoid in combination with an antihistamine. In the latter case, allergic rhinitis was primarily diagnosed with a subsequent transition to bronchial asthma. In therapy, therapy with a combination of salmeterol + fluticasone and phenoterol + ipratropium bromide was indicated. In the third patient, not asthma, but pulmonary embolization was confirmed. The patient was given anticoagulant therapy. The presented study suggests that cooperation and adherence of the patient to the selected treatment are important in achieving a quality of life of a properly treated, controlled, and stabilized asthma. From this point of view, case reports can also be beneficial in many cases.

Key words: Bronchial asthma; drug therapy; management

ÚVOD

Bronchiálna astma (*asthma bronchiale*) patrí medzi jedno z najčastejšie sa vyskytujúcich civilizačných ochorení. Prvýkrát bola definovaná už v r. 1892 Williamom Oslerom, ktorý sa zmieňuje o zápalovej podstate ochorenia (Braman, 2006). V súčasnosti je astma charakterizovaná ako chronická zápalová porucha dýchacích ciest, v ktorej zohrávajú úlohu mnohé bunky a bunkové elementy. Chronický zápal vedie k zvýšenej hyperreaktivite dýchacích ciest, čo sa prejavuje opakujúcimi sa záchvatovými epizódami piskotov v hrudníku, sťaženým dýchaním, zvieraním v hrudníku a kašľom, najmä v noci alebo v skorých ranných hodinách. Tieto epizódy sú zvyčajne spojené s rozšírenou, ale premenlivou obštrukciou pľúcnej ventilácie, ktorá je zvyčajne reverzibilná a zanikne spontánne alebo v dôsledku liečby (Ober, 2011).

Epizódy progresívneho zhoršenia dýchavice, kašľa, pískania alebo tiesne na hrudníku alebo ich kombinácia sa označujú pojmom exacerbácia (Hrubiško a kol., 2010). Príčinou exacerbácie astmy môže byť viacero vonkajších faktorov, nazývaných tiež spúšťače, ako sú napr. alergény, vírusové infekcie, škodliviny z prostredia a lieky. Zníženie expozície niektorým z týchto rizikových faktorov zlepšuje kontrolu astmy a znižuje potrebu liečby (Global Initiative for Asthma, 2018). Pri poklese expiračného prietoku exacerbáciu možno stanoviť meraním pľúcnych funkcií (PEF – peak expiratory flow, maximálny dosiahnutý expiračný prietok) a FEV1 (forced expiratory volume – vzduch vydýchnutý v prvej sekunde po maximálnom nádychu) (Hrubiško, 2011).

Elimináciou alergénov v domácom prostredí, zlepšením edukácie pacienta cez štruktúrované vzdelávanie, znížením počtu astmatických záchvatov vylepšením kvality života, spojeným s aktívnou pohybovou aktivitou, fyzioterapiou a psychosociálnou liečbou, sa dá docieliť nefarmakologická liečba astmy. To vedie k zníženiu štatistických ukazovateľov morbidity. Astme sa dá predísť aj odvykaním

od fajčenia. Avšak na zvládnutie astmy nie je komplementárna a alternatívna liečba postačujúca. Preto sa pristupuje ku farmakologickej forme liečby astmy, na dosiahnutie jej efektívnej kontroly (Ukena a kol., 2008).

V liečbe astmy rozlišujeme prípravky označované ako kontrolóry a uvoľňovače.

Kontrolóry sú lieky určené na kontinuálne dlhodobé užívanie. Ich hlavnou úlohou je udržať astmu klinicky stabilizovanú prostredníctvom protizápalového pôsobenia. K tejto skupine liečiv patria inhalačné a systémové glukokortikosteroidy (GCS), modifikátory leukotriénov, dlhodobo účinkujúce inhalačné β2-mimetiká v kombinácii s inhalačnými GCS, teofylín s riadeným uvoľňovaním, kromóny, anti-IgE liečba a ďalšie modality redukujúce potrebu steroidov. Uvoľňovače sú lieky používané podľa potreby pri ťažkostiach. Účinkujú rýchlo a dokážu zvrátiť bronchokonstrikciu, čím sa zabezpečí úľava. Patria sem rýchlo účinkujúce inhalačné β2-mimetiká, inhalačné anticholinergiká, krátkodobo účinkujúci teofylín a krátkodobo účinkujúce perorálne β2-mimetiká (Hrubiško a kol., 2010). S nárastom poznatkov o patogenéze astmy sa rozšírili možnosti jej biologickej liečby (Lotvall a kol., 2011). Biologické liečivá sa odporúčajú len v prípade chronickej astmy či astmy, pri ktorej pacient nereaguje dostatočne na klasickú liečbu (Albers a kol., 2017).

Predmetom tejto štúdie bolo vyhodnotiť súčasné možnosti farmakoterapie bronchiálnej astmy na základe analýzy lekárskych predpisov a troch kazuistík zameraných na pacientov s prejavmi bronchiálnej astmy.

MATERIÁL A METÓDY

Retrospektívne, za obdobie jedného roka, sme vykonali analýzu 955 lekárskych predpisov, z ktorých sme získali informácie o spotrebe liečiv indikovaných pri bronchiálnej astme, ako aj o najčastejšie predpisovaných liekových formách. Lekárske predpisy s diagnózou J45 – Bronchiálna astma (MKCH 10) boli vyselektované pomocou počítačového programu Apower.

V spolupráci s lekárom z Kliniky pracovného lekárstva a klinickej toxikológie v Košiciach sme na základe zdravotnej dokumentácie vybrali 3 kazuistiky zamerané na pacientov s prejavmi bronchiálnej astmy. Pri popise kazuistík uvádzame všeobecné informácie o pacientovi, jeho zdravotnom stave, chronológiu ochorenia a priebeh liečby.

Pri získavaní a spracovaní údajov z lekárskych predpisov a zo zdravotnej dokumentácie pacientov sme postupovali v zmysle zákona o ochrane osobných údajov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Frekvenciu preskripcie liečiv z jednotlivých farmakoterapeutických skupín predpisovaných pri diagnóze J45 – *Asthma bronchiale* dokumentuje tabuľka 1.

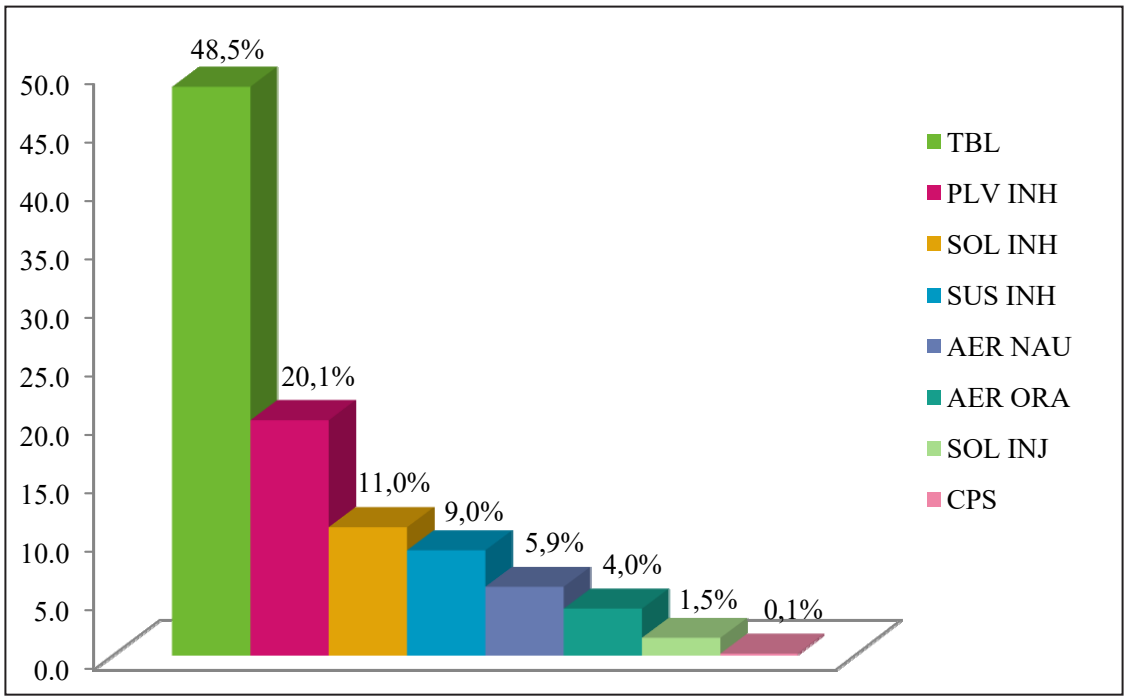
Lekárňou boli najčastejšie expedované xantínové deriváty a antihistaminiká (23,5 %); z ktorých sa v lekárskych predpisoch vyskytovali hlavne teofylín (22 %) a levocetirizín (7,5 %). Teofylín sa už niekoľko desaťročí používa na liečenie astmy aj napriek vývoju novších liekov, najmä inhalačných steroidov. Už pri nízkych plazmatických koncentráciách inhibuje neskorú astmatickú reakciu po stimulácii alergénom. Je odporúčaný v kombinácii s iným protizápalovým liečivom na dlhodobú liečbu miernej až stredne ťažkej astmy (Barnes a Pauwels, 1994). Levocetirizín je moderné a vysoko selektívne H_1-antihistaminikum používané ako doplnkové liečivo pri alergickej astme. Z hľadiska užívania je bezpečný so zanedbateľným sedatívnym účinkom a vynikajúcou znášanlivosťou. Pri jeho dlhodobom užívaní sa zlepšuje priebeh ochorenia (Horak a kol., 2005).

Pomerne často boli predpisované aj kombinácie β2-adrenergických liekov LABA a inhalačných kortikoidov ICS (22 %), najmä kombinácia formoterol + beklometazón (6,3 %). Inhalačná forma β2-adrenergného agonistu s kortikosteroidmi sa považu-

Tab. 1: Spotreba liečiv pri diagnóze J45.0 podľa farmakoterapeutických skupín

Skupina/liečivo	n/%	Spolu n/%
Inhalačné kortikosteroidy (ICS)		
Ciklezonid	20/2,1	**148/15,5**
Budezonid	7/0,7	
Flutikazón	49/5,1	
Mometazón	34/3,6	
Beklometazón	38/4,0	
Selektívne agonistyβ2-adrenergných receptorov (LABA)		
Formoterol	18/1,9	**70/7,3**
Salmeterol	2/0,2	
Salbutamol	40/4,2	
Indakaterol	10/1,0	
Kombinácia LABA+ICS		
Formoterol+flutikazón	34/3,6	**210/22,0**
Salmeterol+flutikazón	28/2,9	
Formoterol+beklometazón	60/6,3	
Formoterol+budezonid	51/5,3	
Vilanterol+flutikazón	37/3,9	
Antileukotriény		
Montelukast	29/3	**29/3**
Xantínové deriváty		
Teofylín	210/22,0	**224/23,5**
Aminofylín	14/1,5	
Anticholinergiká (uvoľňovače bronchospazmu)		
Ipratrópiumbromid	13/1,4	**41/4,3**
Tiotrópiumbromid	10/1,0	
Glykopyroniumbromid	18/1,9	
Kombinácia LABA+anticholínergiká		
Indakaterol+glykopyrón	8/0,8	**8/0,8**
Antialergiká		
Kromoglykán	1/0,1	**1/0,1**
Antihistaminiká		
Cetirizín	40/4,2	**224/23,5**
Levocetirizín	72/7,5	
Desloratadín	62/6,5	
Fexofenadín	50/5,2	

Graf 1: Percentuálne zastúpenie liekových foriem u pacientov s astmou



TBL – tablety, PLV INH – inhalačný prášok, SOL INH – inhalačný roztok, SUS INH – inhalačná suspenzia, AER NAU – nosová aerodisperzia, AER ORA – orálna aerodisperzia, SOL INJ – infúzny roztok, CPS – kapsuly

je za zlatý štandard v liečbe astmy. Ich vzájomný synergismus zvyšuje translokáciu glukokortikoidného receptora a tým sa zlepšuje citlivosť na ICS. V tejto kombinácii pôsobia bronchodilatačne a protizápalovo (Walsh, 2019).

ICS sa považujú za liečivá prvej voľby a ich dávka sa mení v závislosti od klinického stavu pacienta (Cordina, 2019). Frekvencia preskripcie inhalačných kortikosteroidov samotných dosahovala 15,5 %; pričom najčastejšie boli expedované lieky na báze flutikazónu (5,1 %). Podľa najnovších odporúčaní (GINA, 2018) je pri bronchiálnej astme indikovaná liečba kortikosteroidmi, podávanými inhalačne v nízkych dávkach. Kortikoidy sa odporúčajú na zmiernenie príznakov astmy, zvyšujú funkciu pľúc, zlepšujú kvalitu života a znižujú riziko exacerbácií súvisiacich s astmou (Jenkins a kol., 2017).

β2-adrenergné sympatomimetiká predstavovali v lekárskych predpisoch 7,3 %. Pacientom boli predpisované najmä lieky s obsahom salbutamolu (4,2 %). GINA (Globálna iniciatíva pre astmu) a NHLBI (Americký Národný ústav pre srdce, pľúca a krv) považujú dlhodobo pôsobiace β2-adrenergné agonisty za dôležitú skupinu, používanú na liečbu pacientov s perzistujúcou astmou (Premer, 2008).

V menšej miere bola evidovaná spotreba liekov obsahujúcich liečivá patriace do skupín uvoľňovače/anticholinergiká (4,3 %) a antileukotriény (3 %). Liečivá patriace do skupiny anticholinergiká a antialergiká sa v preskripcii vyskytovali najmenej (0,8 % a 0,1 %). Výskyt ostatných liečiv v preskripcii bol sporadický (3 % – 0,1 %); (viď tab. 1).

Liečivé látky boli expedované najmä vo forme tabliet (48,5 %) a inhalačného prášku (20,1 %). Menšie zastúpenie v preskripcii mali lieky vo forme inhalačného roztoku (11,0 %); inhalačnej suspenzie (9,0 %); nosovej suspenznej aerodisperzie (5,9 %) a orálnej aerodisperzie (4,0 %). Preskripcia liečiv vo forme infúzneho roztoku predstavovala iba 1,5 % a vo forme kapsúl 0,1 % (viď graf 1). Výhodou

Tab. 2: Lieková anamnéza Pacienta 1

Názov lieku	Lieková forma	Účinná látka	Dávkovanie
Nasonex	AER NAU	Mometazónfuroát	2 x 1
Zenaro	TBL	Levocetirizín	1 x 5 mg ráno
Ozzion	TBL	Pantoprazol	1 x 20 mg ráno

Tab. 3: Fyziologický profil Pacienta 1

Parameter	Referenčná hodnota	Stanovená hodnota
Eo	0 – 5,0 %	5,09 %
Mo	2 – 12 %	13,78 %
FW	10/25	22/40

Eo – eouzinofily, Mo – monocyty, FW – sedimentácia erytrocytov

najviac odporúčanej inhalačnej liečby je, že liečivá sa dostávajú do dýchacích ciest priamo, čím dochádza k ich vyššej koncentrácii pri signifikantne nižšom riziku systémových vedľajších účinkov (Hrubiško a kol., 2010).

Kazuistika 1

Pacient 1 je 29 ročný muž, povolaním kuchár. Od roku 2013 uvádzal symptómy alergickej rinitídy, ktoré mu sťažovali podmienky pri práci v reštaurácii. V rámci imunoalergologického vyšetrenia boli realizované kožné testy, ktoré boli negatívne. Pacient sa sťažoval na pocit nazálnej kongescie, s výrazným seróznym výtokom z nosa a častým kýchaním pri kontakte s múkou. Popisoval tiež alergické príznaky ako svrbenie, slzenie a začervenanie očí. Pri dlhších pracovných zmenách sa objavovali dráždivý kašeľ s prímesou bieleho spúta a pískanie v hrudníku počas spánku. Informácie o liečbe pacienta po imunoalergologickom vyšetrení sú zhrnuté v tabuľke 2.

Na základe vyšetrenia mu imunoalergológ naordinoval prípravok NASONEX (nosová suspenzná aerodisperzia), ktorý obsahuje lokálny glukokortikoid mometazónfuroát. Zo skupiny antialergík mu bol predpísaný liek na báze levocetirizínu (ZENARO tbl.). Kvôli dlhšie pretrvávajúcim gastrointestinálnym problémom je pacient v dispenzarizácii gastroenterológa. Užíva OZZION tbl., liek, ktorý obsahuje inhibítor protónovej pumpy (PPI), pantoprazol.

Vzhľadom na pretrvávajúce ťažkosti boli v roku 2016 opätovne vykonané kožné testy, vrátane citlivosti na múku, ktoré preukázali zvýšenú senzibilitu na pšeničnú a ražnú múku. Výsledky testovania na ďalšie potravinové alergény boli negatívne. Imunológ odporučil pacienta kvôli perzistujúcim respiračným symptómom na odborné vyšetrenie do nemocnice, na Kliniku pracovného lekárstva a klinickej toxikológie v Košiciach, za účelom prešetrenia, preliečenia a posúdenia profesionálnej súvislosti ochorenia.

Výsledky vyšetrení a pomocné vyšetrenia na Klinike pracovného lekárstva a klinickej toxikológie v Košiciach:

Pacient pri prijatí vykazoval vezikulárne dýchanie, bez spastických fenoménov. Rinomanometrickým vyšetrením bola zistená silná obturácia nazálnych priechodov. Funkčné vyšetrenie pľúc bolo v norme. Hodnoty PEF sa počas 24-hodinového monitorovania

Tab. 4: Lieková anamnéza Pacientky 2 stanovená imunoalergológom

Názov lieku	Lieková forma	Účinná látka	Dávkovanie
Formoterol	PLV INH	Formoterol	2 x 1 vdych
Cezera	TBL	Levocetirizín	1 x ráno
Mucosolvan	TBL	Ambroxol	1 x ráno

Tab. 5: Lieková anamnéza Pacientky 2 po prvej hospitalizácii

Názov lieku	Lieková forma	Účinná látka	Dávkovanie
Formoterol	PLV INH	Formoterol	2 x 1 vdych
Broncho-Vaxom	CPS	Lysatum bacteriale mixtum	1 x denne
Ciprofloxacin	TBL	Ciprofloxacín	à 12 h x 500 mg

pohybovali na dolnej hranici normy (78 %) bez diurnálnej variability. Bronchoprovokačný test metacholínom nepotvrdil bronchiálnu hyperreaktivitu.

V priebehu špecifického nazálneho provokačného testu pšeničnou múkou však došlo k nazálnej obturácii objektivizovanej rinomanometricky, masívnej nazálnej sekrécii spojenej s výrazným slzením a zápalom spojoviek. Konziliárnym ORL vyšetrením bola potvrdená chronická hypertrofická rinitída s odporúčaním pokračovať v nastavenej liečbe. Oftalmológom bola zistená akútna obojstranná konjuktivitída a následne bola indikovaná liečba olopatadínom (OPATANOL gtt.), 2x denne. V krvnom obraze pacienta boli zistené mierne zvýšené hodnoty eozinofilov a monocytov (viď tab. 3). Zaznamenaná bola aj zrýchlená sedimentácia erytrocytov.

Počas hospitalizácie bol pacientovi aplikovaný parenterálne kortikoid (HYDROCORTISON plv inj.) a perorálne antihistaminikum (DESLORATADIN tbl.).

Pacient bol v stabilizovanom stave prepustený do ambulantnej starostlivosti. Lekárom z Kliniky pracovného lekárstva a klinickej toxikológie, na základe vykonaných vyšetrení a po objasnení profesionálnej súvislosti ochorenia, bola pacientovi odporúčaná eliminácia rizikového pracovného prostredia a pokračovanie v doterajšej liečbe (viď tab. 2), ako aj následná dispenzarizácia imunoalergológom a gastroenterológom.

Choroby z povolania sú ochorenia, ktoré vznikajú ako patologická adaptácia pracovníka na pracovné prostredie. Niektoré klinické štúdie uvádzajú, že až 75 % pacientov považuje pracovné prostredie za rizikový faktor chorôb z povolania. 17 % respondentov sa domnieva, že ich ochorenie súvisí s ich prácou, avšak iba u 10 % pacientov sa takýto súvis aj potvrdil (Martyny a kol., 2002). V inej štúdii sa však súvis ochorenia s prácou potvrdil až u 15,9 % pacientov vyšetrených priamo v ambulancii praktického lekára. V blízkej budúcnosti sa predpokladá vzostup chorôb z povolania (Weevers a kol., 2005).

Kazuistika 2

Pacient 2 je 65 ročná žena, ktorej bola diagnostikovaná alergická rinitída v 45. roku života. V imunoalergologickej ambulancii bol ako príčina ochorenia diagnostikovaný peľ. Lieková anamnéza pacientky je uvedená v tabuľke 4.

Posledných 5 rokov pacientka pociťuje zhoršenie

Tab. 6: Lieková anamnéza Pacientky 2 po druhej hospitalizácii

Názov lieku	Lieková forma	Účinná látka	Dávkovanie
Augmentin	TBL	Amoxicilín a kys. klavulánová	à 12 h x 1g
Erdomed	CPS	Erdosteín	2 x 1
Airflusal	PLV INH	Salmeterol + flutikazón	2 x 1 vdych
Berodual N	SOL INH	Fenoterol a ipratrópium bromid	p. p.

Tab.7: Lieková anamnéza Pacientky 3

Názov lieku	Lieková forma	Účinná látka	Dávkovanie
Zodac	TBL	Cetirizín	1 x 10 mg večer
Nasonex	AER NAU	Mometazónfuroát	1 x ráno
Airflusal	SUS INH	Salbutamol	p. p.

stavu s prejavmi dýchavice, najmä pri námahe, a piskoty v hrudníku. Sťažuje sa na ranné i večerné zahlienenie s tvorbou hustého spúta a urputné večerné kýchanie. Uvádza tiež búšenie srdca pri námahe a pálčivé bolesti v hrudníku, ustupujúce po podaní NITROGLYCERÍNU tbl.

Kliniku pracovného lekárstva a klinickej toxikológie v Košiciach prvýkrát navštívila v marci 2018 kvôli výraznému zhoršeniu zdravotného stavu po prekonaní infekcie dolných dýchacích ciest. U pacientky bola naplánovaná hospitalizácia za účelom prešetrenia, preliečenia a nastavenia liečby.

Výsledky vyšetrení a pomocné vyšetrenia na Klinike pracovného lekárstva a klinickej toxikológie v Košiciach:

Pacientka bola hospitalizovaná v marci 2018. Pri príjme uvádzala subjektívne namáhavé dyspnoe, zahlienenosť a produktívny kašeľ. Klinický nález bol manifestovaný vezikulárnym dýchaním, s predlženým expíriom, bez vedľajších dýchacích fenoménov. Funkčné vyšetrenie pľúc bolo v norme. Bronchodilatačný test salbutamolom bol signifikantne pozitívny (vzostup FEV_1 o 15 % v porovnaní s bazálnou hodnotou). Hodnoty PEF sa počas 24-hodinového monitorovania pohybovali nad hornou hranicou normy (101 %), bez signifikantne diurnálnej variability. Stav pacientky bol uzatvorený ako intermitentná bronchiálna astma.

Počas hospitalizácie jej boli aplikované: parenterálne bronchodilatans (SYNTOPHYLLIN sol inj.) a kortikoid (HYDROCORTISON plv inj.), a mukolytikum (ACC injekt sol inj.) s účinnou látkou acetylcysteín. Nočný záchvat kašľa bol zvládnutý perorálnym antitusikom (KORYLAN tbl.), kombinácia paracetamolu a kodeínu. EKG obraz bol v norme. Zo spúta boli izolované *Klebsiela* spp. a *Candida albicans*. Detegovaná bola taktiež prítomnosť eozinofilov v spúte.

Po prepustení do ambulantnej starostlivosti bolo pacientke odporúčané naďalej užívať prípravok na báze formoterolu (selektívny agonista β2-adrenergných receptorov). Ako podporná imunoterapia bol do liečby zaradený BRONCHO-VAXOM cps. Vzhľadom na kultivačný nález (*Klebsiella* spp.) v spúte bola pacientke indikovaná antibiotická liečba ciprofloxacínom po dobu 5 dní (viď tab. 5).

V decembri 2018 sa zdravotný stav pacientky náhle zhoršil. Sťažovala sa na neustupujúce bolesti hrdla so sťaženým dýchaním, najmä vo večerných hodinách. Zvýraznila sa zahlienenosť, kašeľ a vy-

Tab. 8: Fyziologický profil Pacientky 3

Parameter	Referenčná hodnota	Stanovená hodnota
Ba	0 – 1 %	0,99 %
Urea	2,8 – 8,0 mmol.l^{-1}	6,01 mmol.l^{-1}
Kreatinín	62 – 106 µmol.l^{-1}	99,6 µmol.l^{-1}
AST	0,17 – 0,85 µkat.l^{-1}	0,41 µkat.l^{-1}
ALT	0,20 – 0,80 µkat.l^{-1}	0,34 µkat.l^{-1}

kašliavanie bieleho spúta. Kultiváciou bola detegovaná prítomnosť *Escherichia coli*. Funkčné vyšetrenie pľúc naznačovalo ľahkú obštrukčnú ventilačnú poruchu. Stav pacientky bol uzatvorený ako akútna laryngotracheobronchitída a akútna exacerbácia astmy s nutnosťou zmeny doterajšej inhalačnej farmakoterapie. Počas hospitalizácie jej bola aplikovaná infúzia: 0,9 % NaCl inf. 100 ml + hydrokortizón + syntofylín.

Na liečbu (viď tab. 6) v domácom prostredí bolo pacientke predpísané perorálne antibiotikum AUGMENTIN tbl. po dobu 7 dní a mukolytikum (ERDOMED cps.). Pacientka v posledných mesiacoch uvádza častejšie symptómy astmy, na základe čoho bola jej diagnóza preklasifikovaná na ľahkú perzistujúcu nekontrolovanú bronchiálnu astmu.

Literárne zdroje uvádzajú, že bronchiálna astma často súvisí s rinitídou, nakoľko rozhodujúcu úlohu v patogenéze astmy a rinitídy zohráva zápal sliznice dýchacích ciest.

Karjalainen a kol. (2003) vo svojej štúdii popisujú, že 11,6 % pacientov s profesionálnou rinitídou trpí bronchiálnou astmou. Pacientke 2 bola následne modifikovaná terapia s vysadením FORMOTEROLU plv inh. a do liečby bol pridaný kombinovaný preparát AIRFLUSAL plv inh. obsahujúci bronchodilatans salmeterol a flutikazón na zmiernenie edému a zápalu pľúc. Preventívne, v prípade potreby, pri stavoch s prechodnou bronchokonstrikciou jej bol predpísaný BERODUAL N sol inh. s účinnou látkou fenoterol a ipratrópium bromid. Pri kontrolnom vyšetrení, po zmenenej terapii, pacientka deklaruje ústup ťažkostí.

Kazuistika 3

Pacientka 3 je žena vo veku 58 rokov, zamestnaná ako manažérka v banke. Na Kliniku pracovného lekárstva a klinickej toxikológie v Košiciach bola prijatá za účelom realizácie bronchoprovokačného testu kvôli diferenciálnej diagnostike dyspnoe.

Pacientka bola v minulosti vyšetrená alergológom s nasledujúcim záverom: Dyspnoe dif. dg., *Rhinoconjunctivitis persistens* stredne ťažká, s alergickou a vazomotorickou zložkou, hypersenzitivita I. typu podľa Coombsa a Gela na palinu, orechy a lieková hypersenzitivita na tetracyklín. Od roku 2003 je pacientka liečená na artériovú hypertenziu. Okrem toho bola u nej diagnostikovaná chronická benígna hyperbilirubinémia a steatóza pečene. Je v dispenzárnej starostlivosti kardiológa s diagnózou stopovej mitrálnej a trikuspidálnej regurgitácie.

Alergológom jej bolo naordinované užívanie perorálneho antihistaminika ZODAC tbl. na zmiernenie alergických príznakov, nosová suspenzná aerodisperzia NASONEX (mometazónfuroát) a VENTOLIN INHALER N (salbutamol), rýchlo pôsobiace bronchodilatans (viď tab. 7).

Výsledky vyšetrení a pomocné vyšetrenia na Klinike pracovného lekárstva a klinickej toxikológie v Košiciach:

Pri vstupnom vyšetrení na kliniku pracovného lekárstva a klinickej toxikológie pacientka uviedla progredujúce námahové dyspnoe bez kašľa, pretrvávajúce asi 2 – 3 roky. Uvádza tiež sporadické búšenie srdca, bez piskotu v hrudníku. Popisuje sťažené dýchanie nosom, vodnatý rinotok, pálenie

a slzenie očí, najmä pri kontakte s alergénmi a dráždivými látkami. V detstve a mladosti bola často liečená na zápal priedušiek, recidivujúcu rinitídu, sinusitídu a angínu. Má intoleranciu na mliečne výrobky. Nefajčí už 15 rokov, predtým bola aktívnou fajčiarkou. Je v menopauze od 52. roku života.

Auskultačným vyšetrením bolo zistené vezikulárne dýchanie, bez prítomnosti spastických fenoménov. V krvnom obraze bola zaznamenaná hraničná bazofília (viď tab. 8). Hemokoagulačné parametre a D-dimér boli v norme. Biochemické vyšetrenie krvi vykazovalo hraničnú retenciu dusíkatých látok a eleváciu hepatálnych transamináz. Na RTG snímku boli prínosové dutiny vzdušné a transparentné. Spirometrické vyšetrenie nepreukázalo ventilačnú poruchu. Rovnako rhinomanometrické vyšetrenie nepoukazovalo na obturáciu nazálnych priechodov. Vykonaným bronchoprovokačným testom metacholínom sa nepotvrdila bronchiálna hyperreaktivita.

Na konci hospitalizácie boli vyšetrenia doplnené o záťažovú spirometriu, pri ktorej nebola zistená námahou indukovaná bronchokonstrikcia. Hodnoty PEF monitoringu sa pohybovali nad pásmom normy (105 %), bez signifikantnej diurnárnej variability. Konziliárny lekár, otorinolaryngológ, diagnostikoval alergickú rinitídu. Vykonané vyšetrenia nepotvrdili bronchiálnu astmu ako príčinu dyspnoe.

Štúdia vykonaná na súbore 85 osôb ukázala, že až 25 % prípadov dýchavičnosti nemá respiračný pôvod (Pratter a kol., 1989). Tento fakt poukazuje na skutočnosť, že primárne fyzikálne vyšetrenie pacienta je zvyčajne nepostačujúce na definitívne určenie diagnózy astmy. Presné stanovenie diagnózy si vyžaduje vykonanie viacerých vyšetrení v súlade so špecifickými diagnostickými postupmi (Karmani a kol., 2005). Keďže pacientka uviedla, že v minulosti prekonala postraumatickú imobilizáciu pravej dolnej končatiny, bol u nej naplánovaný ventilačno-perfúzny scan pľúc, za účelom diferenciálnej diagnostiky pľúcnej embólie.

Ventilačno-perfúzny scan pľúc potvrdil suponovanú embolizáciu pľúc. Pacientke bola nasadená antikoagulačná liečba nízkomolekulárnym heparínom FRAXIPARINE a následne antikoagulans WARFARIN tbl. V rámci vylúčenia sekundárnych príčin pľúcnej embólie bolo odporúčané ambulantné USG vyšetrenie ciev dolných končatín, hematologické vyšetrenie a onkologický skríning. Pacientka bola po absolvovaných vyšetreniach a nastavenej terapii prepustená v stabilizovanom stave do ambulantnej starostlivosti.

ZÁVER

Astma je chronická zápalová choroba dolných dýchacích ciest s komplexnou a veľmi individuálnou patogenézou. Napriek tomu, že znižuje kvalitu života pacienta, komplexný manažment a moderná farmakoterapia umožňujú vo väčšine prípadov astmatikom žiť plnohodnotný život. Liekom prvej voľby je inhalačne podávaná protizápalová liečba (kortikoid), ktorú je vhodné kombinovať s liekmi s bronchodilatačným účinkom, aby sa udržala astma pod kontrolou. Prelomom vo farmakoterapii astmy bolo zavedenie biologickej liečby, ktorá je dnes považovaná za trend v medicíne a veľkou výzvou do budúcnosti. Dôraz však treba klásť aj na compliance pacienta, aby nastavená liečba priniesla očakávané výsledky.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

Albers, F. C., Mullerová, H., Gunsoy, N. B., Shin, J., Nelson, L. M., Bradfold, E. S., Cockle, S. M., Suruki, R. Y.: Biologic treatment eligibility for real-world patients with severe asthma: The IDEAL study. *Journal of Asthma*, 2017, 55 (2), 152 – 160.

Barnes, P. J., Pauwels, R. A.: Theophylline in the management of asthma: time for reappraisal? *European Respiratory Journal*, 1994, 7 (3), 579 – 591.

Braman, S.: The global burden of asthma. *Chest*, 2006, 130, 4S – 12S.

Cordina, M.: Pharmaceutical care in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Springer*

International Publishing, 2019, 311 – 331.

https://www.researchgate.net/publication/327730421_Pharmaceutical_Care_in_Asthma_and_C hronic_Obstructive_Pulmonary_Disease. Accessed December 02, 2019.

Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. *GINA*, 2018, 160 p. https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2018/04/wms-GINA-2018report-tracked_v1.3.pdf. Accessed March 27, 2019.

Horak, F., Zieglmayer, P. U., Zieglmayer, R., Kavina, A., Lemell, P.: Levocetirizine has a longer duration of action on improving total nasal symptoms score than fexofenadine after single administration. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2005, 60, 1, 24 – 31.

Hrubiško, M., Čižnár, P.: *Asthma bronchiale. Národné smernice pre terapiu*. Bratislava: Bonus, 2010. 96 s.

Hrubiško, M..: Vieme dobre liečiť astmu? (Prečo astmatici exacerbujú) [Do we treat asthma optimally? (Why do asthmatics exacerbate)]. *Via practica*, 2011, 3, 114 – 118.

Jenkins, C. R., Eriksson, G., Bateman, E. R., Reddel, H. K., Sears, M. R., Lindberg, M., O'Byrne, P. M.: Efficacy of budesonide/formoterol maintenance and reliever therapy compared with higher-dose budesonide as step-up from low-dose inhaled corticosteroid treatment. *BMC Pulmonary Medicine*, 2017, 17 (1), 65.

Karjalainen, A., Martikainen, R., Klaukka, T., Saarinen, K., Uitti, J.: Risk of asthma among Finnish patients with occupational rhinitis. *Chest*, 2003, 123 (1), 283 – 288.

Karmani, N. G., Reisfield, G. M., Wilson, G. R.: Evaluation of chronic dyspnea. *American Family Physician*, 2005, 71 (8), 1529 – 1537.

Lotvall, J., Akdis, C., Bacharier, L. B., Bjermer, L., Casale, T. B., Custovic, A., Lemanske, R. F., Wardlaw, A. J., Wenzel, S. E., Greenberger, P. A.: Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *Allergy Clin. Immunol.*, 2011, 127, 355 – 360.

Martyny, J., Glazer, C. S., Newman, L. S.: Respiratory protection. *The new England journal of medicine*, 2002, 347, 824 – 830.

Ober, C.: The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunological Reviews*, 2011, 242, 10 – 30.

Pratter, F., Curley, J., Dubois, J., Irwin, S.: Cause and evaluation of chronic dyspnea in a pulmonary disease clinic. *Archives of Internal Medicine*, 1989, 149, 2277 – 2282.

Premer, B. M.: Úloha dlhodobo pôsobiacich b2-adrenergných agonistov v liečbe astmy na základe aktuálnych odporúčaní [Role of long-acting β2-adrenergic agonists in treatment of asthma based on current recommendations]. *Current opinion in pulmonary medicine*, 2008, 14, 57 – 63.

Ukena, D., Fishman, L., Niebling, W. B.: Bronchial asthma: diagnosis and long-term treatment in adults. *Deutsches Ärzteblatt International*, 2008, 105 (21), 385 – 394.

Walsh, B. K.: Neonatal and Pediatric Respiratory Care. 5th edn., *Canada: Elsevier Health Sciences*, 2018, 736 p.

Weevers, H. J., Beek, A. J., Anema, J. R.: Work-related disease in general practice: a systematic review. *Family Practice-an international journal*, 2005, 22, 197 – 204.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 2: 22 – 28, 2021

RIZIKÁ POUŽÍVANIA VYBRANÝCH FARBÍV A ICH STANOVENIE METÓDOU KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE V RÔZNYCH LIEKOVÝCH FORMÁCH

RISK OF USING SELECTED DYES AND THEIR DETERMINATION BY LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD IN VARIOUS DOSAGE FORMS

Šuleková, Monika; Lipka, Radislav

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

monika.sulekova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Na základe smerníc EU sa musí vo farmaceutických produktoch neustále sledovať obsah farbív. Môžeme povedať, že farbivá sú kozmetika farmaceutických prípravkov, nakoľko estetický vzhľad liekových foriem môže byť zvýšený použitím vhodných farbív. Farebné odlíšenie jednotlivých druhov liekov má svoj praktický, ako aj psychologický význam a často pomáha pacientom orientovať sa medzi jednotlivými druhmi liekov. Výrobcovia nie vždy informujú o charaktere farbív, ktoré boli použité a taktiež o tom, aké množstvo farbív pripadá na jednu farmaceutickú jednotku výrobku. Táto informácia môže byť dôležitá najmä pre ľudí s oslabeným imunitným systémom alebo rôznymi zdravotnými problémami. Preto cieľom tejto štúdie bolo stanoviť obsah farbív v 18 farmaceutických vzorkách rôznych liekových foriem. Táto štúdia sa zaoberá výberom vhodného chromatografického systému pre stanovenie farbív, ktoré sa najčastejšie využívajú vo farmaceutickom priemysle, ako aj ich analýzou vo farmaceutických vzorkách. Farebné aditíva boli stanovené metódou RP-UHPLC v izokratickom móde. Separácia sa uskutočnila na kolóne Polaris C18-A (250 x 4,6 mm, 5 µm). Mobilná fáza bola zložená zo zmesi CH_3CN a (CH_3COONa + CH_3OH). Výsledky štúdie podávajú prehľad o obsahu farbív v analyzovaných vzorkách farmaceutických výrobkov. Po zhodnotení výsledkov HPLC analýz 18 farmaceutických vzoriek môžeme konštatovať, že ani v jednej vzorke nebolo zistené prekročenie hodnoty ADI pri maximálnej terapeutickej dennej dávke lieku.

Kľúčové slová: izokratický mód; reverzná fáza; syntetické farbivá, ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

ABSTRACT

According to EU directives, the dye content must be constantly monitored in pharmaceutical products. We can say that dyes are cosmetics of pharmaceutical preparations, since the aesthetic appearance of the dosage forms can be enhanced by using suitable dyes. Color differentiation of different types of drugs has both practical and psychological significance and often helps patients navigate between different types of drugs. Producers do not always report on the nature of the dyes used and also on the amount of dyes per pharmaceutical formulation of the product. This information can be important especially for people with weakened immune systems or various health problems. Therefore, the aim of this study was to examine the content of dyes in 18 pharmaceutical samples of different dosage forms. This study deals with the selection of a suitable chromatographic system for the determination of dyes most commonly used in the pharmaceutical industry, as well as their analysis in pharmaceutical samples. Color additives were determined by the RP-UHPLC method in isocratic mode. The process of separation was performed on a Polaris C18-A column (250 x 4.6 mm, 5 µm). The mobile phase was consisted of a mixture of CH_3CN and (CH_3COONa + CH_3OH). The results of this study give a perspective of the content of dyes in samples that were analyzed as pharmaceutical products. In conclusion, after interpreting the results of the HPLC analyzes of the 18 pharmaceutical samples, it can be stated that no sample outstepped the ADI at the maximum therapeutic daily dose.

Key words: isocratic mode; reverse phase; synthetic dyes; ultra-high-performance liquid chromatography

ÚVOD

Produkcia liečiv v posledných rokoch neustále stúpa. Farmaceutické firmy ponúkajú široké spektrum liečivých prípravkov a doplnkov stravy. Z hľadiska používaných pomocných látok na výrobu rôznych liekových foriem je dôležité zamerať sa na obsah syntetických farbív. V posledných rokoch vzrástlo množstvo používaných farbív, čo predstavuje jeden z možných faktorov zvýšeného výskytu civilizačných chorôb. Za rizikové sa považujú najmä syntetické farbivá, nakoľko sa v prírode nevyskytujú a pre ľudský organizmus nie sú známe. Ohrozené sú predovšetkým malé deti, pretože veľké množstvo farbív môžeme nájsť v detských prípravkoch, ako sú napr. detské sirupy, kvapky, pastilky na cmúľanie a pod. Bolo zistené, že niektoré farbivá môžu priamo spôsobiť nedostatok pozornosti a hyperaktivitu u detí. Farebné aditíva sa používajú vo farmaceutickom priemysle aj napriek ich negatívam v detských prípravkoch ako pomocné látky, ktoré im dodávajú preferovanú farbu a zodpovedajú chuti prípravku, ako napr. červená alebo ružová farba pre jahodovú alebo malinovú príchuť, zelená farba pre mätovú príchuť a pod. Aj keď zahrnutie farieb nie je nevyhnutným predpokladom pre všetky farmaceutické vzorky, prípravky určené pre deti sú zvyčajne farebné (Materiienko, 2015; McCann, 2007).

Farbivá používané vo farmaceutických prípravkoch, či už v kvapalných liekových formách (roztoky, sirupy, kvapky) alebo tuhých liekových formách (kapsule, tablety, pastilky na cmúľanie, prášky) môžu byť prírodné alebo syntetické. Prírodné farbivá sú nahrádzané syntetickými z dôvodu ich väčšej farebnosti, stability a uniformity. Je však známe, že syntetické farbivá predstavujú riziko pre zdravie človeka (Rastogi, 2014).

Vynechanie, resp. neúplnosť informácií pri označovaní liekov o farmaceutických pomocných látkach môže vystaviť citlivých jedincov nežiaducim reakciám spôsobeným aditívnymi látkami. Potenciálne nepriaznivé účinky na zdravie človeka v dôsledku vystavenia syntetickým farbivám v rôz-

nych liekových formách sa hodnotia analýzou rizík. V polovici osemdesiatych rokov medzi spotrebiteľmi narastali obavy z možných nepriaznivých účinkov prídavných látok, predovšetkým farbív. Boli to napr. údaje o vzťahu medzi tartrazínom a hyperaktivitou u detí. Uvažovalo sa o možnej spojitosti medzi požitím liekov obsahujúcich syntetické potravinárske farbivá a prítomnosťou hyperaktívneho správania u detí (Silveira Balbani a kol., 2006).

Zvýšené zdravotné riziko spôsobené používaním farbív, predovšetkým syntetických, viedlo regulačné orgány k zvýšeniu ich kontroly a obmedzeniu ich selektívneho používania. Prieskum literatúry odhaľuje rôzne analytické techniky využívané pri identifikácii a kvantifikácii farbív využívaných vo farmaceutickom priemysle, pričom chromatografické metódy zohrávajú významnú úlohu vo farmaceutickej analýze. V predloženej štúdii pre stanovenie farbív v reálnych farmaceutických vzorkách bola použitá metóda ultra-vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie na reverzných fázach RP-UHPLC s DAD detektorom, ktorá vyniká celou radou výhod, ako je vysoká separačná účinnosť, reprodukovateľnosť, nízka hodnota detekčného limitu. V štúdii bola použitá izokratická elúcia, pri ktorej zloženie mobilnej fázy počas separácie bolo konštantné. Cieľom experimentálnej časti štúdie bolo teda vybrať vhodný chromatografický systém pre stanovenie ôsmich farebných aditív, ako aj zvolenou UHPLC metódou identifikovať a kvantifikovať najviac zastúpené farbivá v 18 vybraných farmaceutických produktoch komerčne dostupných v Slovenskej republike, v ktorých bol výskyt farbív buď potvrdený alebo vyvrátený.

MATERIÁL A METÓDY

Na prípravu roztokov bola použitá ultračistá voda získaná reverznou osmózou, ktorej dodávateľom bola Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach. Pre chromatografickú analýzu bolo použitých osem štandardov farbív s označením E 102, E 104, E 110, E 120, E 122, E 124, E 131 a E 133, získaných z Inštitútu pre inžinierstvo polymérnych materiálov a farbív (Institute for Engineering of Polymeric Materials and Dyes, Poľsko). Ďalšie používané chemikálie boli: trihydrát octanu sodného p. a. (Lach-Ner, Česká republika), metanol pre HPLC Gradient grade, (Fisher Scientific, UK), acetonitril pre HPLC Gradient grade *Chromasolv*®, ≥ 99,9 %; (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). HPLC analýza sa uskutočnila na kvapalinovom chromatografe UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Nemecko) za použitia detektora diódového poľa (DAD) a chromatografickej kolóny Polaris C18-A, 250 x 4,6 mm; 5,0 µm (Agilent, Holandsko). Ovládanie systému DAD-UHPLC a vyhodnocovanie nameraných údajov sa uskutočnilo pomocou chromatografického programu Chromeleon (Chromeleon Chromatography Data System). Bolo analyzovaných osem štandardov vo vode rozpustných farbív, pričom každý štandard bol odvážený na analytických váhach s presnosťou na štyri desatinné miesta. 0,05 g z každého štandardu bolo rozpustených v ultračistej vode, kvantitatívne prenesených do odmernej banky s objemom 50 ml a doplnených po rysku ultračistou vodou. Takto pripravený základný roztok každého štandardu mal koncentráciu 1 $\mu g.m^{-1}$. Pracovné roztoky ($c = 0,05\ mg.ml^{-1}$) jednotlivých farbív boli pripravené dvadsaťnásobným riedením základného roztoku. Kalibračné štandardy jednotlivých vo vode rozpustných farbív boli pripravované riedením z pracovného roztoku na koncentrácie, ktoré boli očakávané vo farmaceutických vzorkách.

Pre analýzu farbív boli zvolené lieky, v ktorých výrobca deklaruje prítomnosť farbív, na ktoré bolo k dispozícií osem štandardov. Jednalo sa o vzorky vo forme voľne predajných liečivých prípravkov, resp. na lekársky predpis. Celkovo bolo analyzovaných 18 farmaceutických vzoriek v rôznych liekových formách od rôznych firiem. Špecifický HPLC DAD detektor ako jeden z typov spektrofotometrických detektorov bol použitý pre detekciu liečiv, ako aj na získanie spektrálnych profilov zo zmesí látok, ktoré sú oddelené chromatografickou separáciou. Na chromatografickú analýzu ôsmich farbív v rôznych

farmaceutických vzorkách bol použitý HPLC systém UltiMate 3000 RS. Automatický dávkovač obsahoval zásobník s vialkami uzavretými septami. Vialky s objemom 1,5 ml s pripravenými vzorkami boli umiestnené do zásobníka vzoriek (tzv. karusel) pri laboratórnej teplote. Následne cez septum vialky bol injekčnou mikrostriekačkou dávkovača dávkovaný objem 20 µl priamo na chromatografickú kolónu termostatovanú na 40 °C, na ktorej došlo k separácii analytov. Separácia prebiehala na kolóne od firmy Agilent Polaris C18-A (250 x 4,6 mm; 5,0 µm). Pre stanovenie farbív v 18 farmaceutických výrobkoch bola vypracovaná metóda ultravysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie na reverzných fázach RP-UHPLC s DAD detektorom. Prietok mobilnej fázy bol 1,2 $ml.min^{-1}$ pre červeno a modro sfarbené farbivá a 1,0 $ml.min^{-1}$ pre žlto sfarbené farbivá. Kolóna Polaris C18-A poskytovala veľmi dobré výsledky pri použití mobilnej fázy o zložení CH_3CN– (A) : (CH_3COONa + CH_3OH) (B), 20 : 80 (v/v) pre červeno a modro sfarbené farbivá a o zložení A : B = 10 : 90 (v/v) pre žlto sfarbené farbivá. Chromatogramy pre jednotlivé farbivá sa snímali pri nasledovných vlnových dĺžkach: 429 nm (E102), 419 nm (E104), 485 nm (E110), 516 nm (E120), 519 nm (E122), 510 nm (E124), 636 nm (E131) a 630 nm (E133). Celkový čas analýzy bol 10 min.

VÝSLEDKY

Východiskové podmienky pre vývoj RP-UHPLC metódy stanovenia farbív E 102, E 104, E 110, E 120, E 122, E 124, E 131 a E 133 vyplynuli z experimentálnych meraní uskutočnených pri vypracovaní mojej diplomovej práce. Táto práca bola zameraná na stanovenie syntetického farbiva brilantnej modrej E 133 vo farmaceutickej vzorke. Vychádzali sme aj z údajov uvedených v odbornej literatúre (Šuleková a kol., 2016).

Identifikácia analyzovaných ôsmich farbív (kvalitatívna analýza) bola uskutočnená čiastočne na základe porovnania absorpčných spektier štandardov farbív a vzorky, ako aj porovnaním retenčných časov kalibračných roztokov štandardov s retenčným časom analyzovanej vzorky. Aby mohlo byť detekované množstvo jednotlivých farbív vo vzorkách, bolo nevyhnutné zostrojiť kalibračné priamky každého farbiva. Linearita bola overená formou kalibračných závislostí pre každé farbivo. Dôležitým prvkom pri určovaní linearity je korelačný koeficient R^2, ktorý dosahoval hodnoty minimálne 0,9990 v prípade všetkých kalibračných priamok a tieto hodnoty boli pre nás hlavným ukazovateľom, a teda môžeme povedať, že linearita bola potvrdená. Taktiež bol stanovený detekčný limit (LOD), ako aj kvantifikačný limit (LOQ). V tabuľke 1 sú vyčíslené parametre regresných priamok pre konkrétny analyt a v tabuľke 2 parametre pre kvalitatívnu (retenčný čas, t_R), ako aj kvantitatívnu analýzu (plocha píku). Po analyzovaní vzoriek boli pomocou zostrojených kalibračných závislostí prepočítané množstvá analyzovaných farbív. Nakoľko bolo analyzovaných až 18 farmaceutických vzoriek, v ktorých sa nachádzalo jedno, resp. súčasne dve farbivá z ôsmich uvedených farebných aditív, nebolo možné tu uviesť všetky chromatografické záznamy, ako aj kalibračné priamky. Z tohto dôvodu sme vybrali jeden ukážkový chromatografický záznam štandardu E 110, ako aj jeho kalibračnú priamku (viď obr. 1).

DISKUSIA

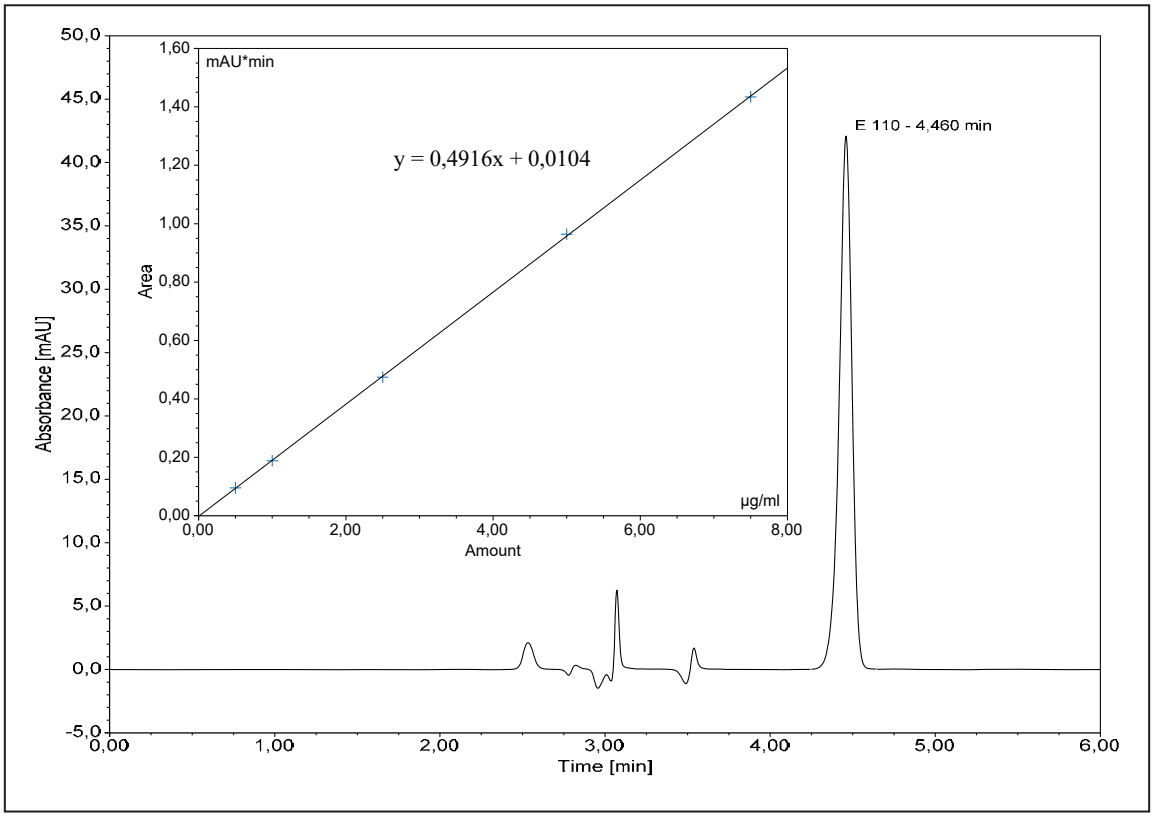
Štúdia sa zaoberá analýzou vo vode rozpustných farbív v 18 farmaceutických vzorkách. Monitorovanie obsahu syntetických farbív vo farmaceutických vzorkách má význam pre bezpečnosť ľudí, pretože tieto farbivá sa vyskytujú aj v potravinárskych výrobkoch, a tak môže dôjsť k ich kumulácii. Najväčším problémom u senzitívnych ľudí môže byť kombinácia farebných aditív v jednom výrobku. Dnešný farmaceutický trh ponúka širokú škálu rôznych liekov, či už na lekársky predpis, alebo voľne predajných, ktoré obsahujú častokrát viac ako jeden druh aditívnych látok. Čím je rôznorodosť syntetických farbív v danom farmaceutickom výrobku vyššia, tým viac sa môže prejaviť aditívny

Tab. 1: Parametre kalibračných priamok pre stanovované analyty farbív

Farbivo (označenie)	Vlnová dĺžka [nm]	Rovnica priamky	LOD [µg.ml^{-1}]	LOQ [µg.ml^{-1}]	R^2 (n = 5)
Tartrazín (E 102)	429	y = 0,0137x – 0,0006	0,0211	0,0693	0,99923
Chinolínová žltá (E 104)	419	y = 0,01919x – 0,0022	0,3537	0,7074	0,99997
Oranžová žltá (E 110)	485	y = 0,4916x + 0,0104	0,1321	0,4359	0,99994
Karmín (E 120)	515	y = 85,9319x – 0,0249	0,6969	2,3001	0,99931
Azorubín (E 122)	519	y = 0,5613x – 0,0198	0,0643	0,2124	0,99999
Ponceau (R 124)	510	y = 0,4388x – 0,0715	0,0897	0,2961	0,99998
Patentná modrá (E 131)	636	y = 0,0311x – 0,0054	0,2377	0,7845	0,99943
Brilantná modrá (E 133)	630	y = 0,0235x – 0,0046	0,1117	0,3687	0,99941

LOD – detekčný limit, LOQ – kvantifikačný limit, R^2 – korelačný koeficient

Obr. 1.: Chromatogram (štandard E 110, c = 7,5 µg.ml^{-1}) a kalibračná závislosť analytu E 110



efekt týchto látok, čo môže mať za následok rôzne alergické reakcie. Pri analýze farbív metódou RP-UHPLC sa nám podarilo dospieť k nastaveniu a kombinácii vhodných chromatografických podmienok. Na základe polohy maxím na nameraných absorpčných spektrách a s ohľadom na zdroje z literárnej rešerše boli ako optimálne vlnové dĺžky detekcie zvolené nasledovné hodnoty pre jednotlivé farbivá: 429 nm (E 102), 419 nm (E 104), 485 nm (E 110), 516 nm (E 120), 519 nm (E 122), 510 nm (E 124), 636 nm (E 131) a 630 nm (E 133). Navrhnuté podmienky separácie a detekcie

Tab. 2: Parametre HPLC analýzy jednotlivých farmaceutických vzoriek

Vzorka	Analyt	t_R [min]	Koncentrácia analytu [µg.ml^{-1}]	Plocha píku [mAU.min]	Max. denná dávka analytu [mg/deň]	Max. denná dávka analytu [mg/kg/deň]
Brufen	E 110	4,517	8,7994	5,0979	1,7598	0,0879 (dieťa)
Stopangin	E 124	3,547	6,4926	2,8856	1,9478	0,0974 (dieťa)
Triefed	E 110	4,657	2,6650	1,5237	0,3997	0,0199 (dieťa)
Triefed® expectorant	E 110 E 133	4,623 7,730	0,5163 0,7102	0,2833 0,8421	0,0774 0,1065	0,0038 (dieťa) 0,0053
Glimbax	E 124	3,520	5,1395	2,3016	1,5418	0,0771 (dieťa)
Wobenzym	E 124 E 110	3,530 4,390	0,6453 7,7276	0,3621 3,8845	0,1936 2,3182	0,0027 (dosp.) 0,0331
Ginkoprim	E 104 E 131	5,013	0,1974 < LOQ	0,0359	0,0118	0,0059 (dosp.)
Algifen Neo	E 110	4,470	0,4357	0,2247	0,0233	0,0006 (dieťa)
Endiex (telo) ***Endiex (viečko)***	E 110 E 110 E 104	4,390 4,383 4,907	2,7395 0,8313 29,353	1,3681 0,4553 5,6275	0,0822 0,0249 0,8806	0,0041 (dieťa) 0,0012 0,0440
Rivotril	E 133	7,750	18,093	1,5371	0,0145	0,0007 (dieťa)
Tantum verde® 0,15 %	E 104 E 131	4,930 8,330	1,2120 0,3402	0,2305 0,052	0,3636 0,0103	0,0182 (dieťa) 0,0005
Tantum verde eukal.	E 104	4,987	2,0491	0,3911	0,1229	0,0061 (dieťa)
Coldrex lesné plody	E 122 E 110	5,363 4,480	16,585 0,8859	9,7315 0,4330	6,6342 0,3543	0,0947 (dosp.) 0,0051
Coldrex citrón	E 104	5,020	7,4141	1,4201	2,9656	0,0423 (dosp.)
Lomac viečko ***Lomac telo***	E 133 E 122 E 102 E 110	7,753 5,287 2,450 4,423	32,990 22,316 20,324 0,1573	2,8122 3,4697 12,0559 0,075	1,6495 1,1158 1,0162 0,0078	0,0824 (dieťa) 0,0558 0,0508 0,0004
Pikovit	E 124*	–	–	–	–	–
Theraflu	E 110 E 104	4,583 4,971	0,9985 0,1130	0,4898 0,3100	0,3994 0,0452	0,0057 (dosp.) 0,0006
Tukožrútky	E 133 E 102	7,770	33,4421 < LOQ	2,8509	1,6721	0,0238 (dosp.)

* Neidentifikovaný analyt
dieťa – prepočítaná hodnota na 20 kg telesnej hmotnosti dieťaťa
dosp. – prepočítaná hodnota na 70 kg telesnej hmotnosti dospelého človeka

pre zvolenú skupinu farbív boli použité na analýzu farmaceutických vzoriek. Z chromatografických záznamov analyzovaných vzoriek sa na základe porovnania retenčných charakteristík a porovnania absorpčných spektier potvrdilo, že v analyzovaných farmaceutických formách sa nachádzajú farbivá až na jednu výnimku (vzorka Pikovit). Význam týchto zistení je dôležitý pre ďalší výskum a bolo by veľmi zaujímavé sa tejto problematike venovať, prípadne by to mohlo byť aj náplňou ďalšej diplomovej práce. Obsah jednotlivých farbív bol kvantifikovaný v uvedených farmaceutických formách metódou

kalibračnej priamky a výsledky stanovenia boli porovnané s ADI hodnotami, ktoré predstavujú množstvo farbiva, ktoré môže človek prijímať v potrave bez negatívneho vplyvu na svoje zdravie.

ZÁVER

Cieľom tejto štúdie bolo nájsť vhodnú metodiku na stanovenie vo vode rozpustných farbív metódou RP-UHPLC a aplikovať ju na vybrané farmaceutické vzorky. Predkladaná štúdia sumarizuje najdôležitejšie informácie o súčasnom stave jednej zo skupín aditívnych látok, ktoré sú častokrát pridávané v procese výroby rôznych farmaceutických výrobkov, či už v kvapalnom alebo tuhom skupenstve. Štúdia sa zaoberá analýzou vo vode rozpustných farbív v 18 farmaceutických vzorkách. Vzhľadom k rozpustnosti syntetických farbív vo vode bola zvolená metóda kvapalinovej chromatografie na reverznej fáze. Cieľom štúdie bolo analyzovať farmaceutické vzorky s obsahom farbív metódou ultra-vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie UHPLC. Pri analýze farbív metódou RP-UHPLC sa nám podarilo dospieť k nastaveniu a kombinácii vhodných chromatografických podmienok. Prvým krokom analýzy bolo vybrať vhodné chromatografické podmienky, t. j. stacionárnu fázu, mobilnú fázu, spôsob detekcie, ako aj určiť retenčné charakteristiky. Na analýzu celej skupiny farbív sa testoval systém s reverznou fázou, a to kolóny typu C18 od firmy Agilent Polaris C18-A (250 x 4,6 mm; 5,0 µm) s izokratickou elúciou a mobilnou fázou CH_3CN : (CH_3COONa + CH_3OH) v pomere 10 : 90 (v/v), resp. 20 : 80 (v/v). Ako najvhodnejšia detekcia sa zvolila spektrofotometrická detekčná metóda, keďže skúmané látky absorbujú vo viditeľnej oblasti spektra. Celkový čas analýzy bol 10 min. Výsledky jednotlivých analýz boli vyhodnotené programom Chromeleon Chromatography Data System, 7.2. V závere po zhodnotení výsledkov HPLC analýz 18 farmaceutických vzoriek môžeme konštatovať, že ani v jednej vzorke nebolo zistené prekročenie hodnoty ADI pri maximálnej terapeutickej dennej dávke.

ZOZNAM LITERATÚRY

Materiienko, S., Grudko, V. A., Georgiyants, V. A.: The study of physical and chemical interactions of food dyes with medicinal substances. Topical issues of new drugs development. In *Abstracts of International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Student*, Ukraine, April 23, 2015, 141 p.

McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, P., Sonuga-Barke, E., Warner, J. O., Stevenson, J.: Food additives and hyperactive behaviour in 3-yearold and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 370 (9598), 2007, 1560 – 1567.

Rastogi, S. D., Dixit, S., Tripathi, A.: Simultaneous determination of acetaminophen and synthetic color(s) by derivative spectroscopy in syrup formulations and validation by HPLC: Exposure risk of colors to children. *AAPS PharmSciTech.*, 2014. DOI: 10.1208/s12249-014-0228-2.

Silveira Balbani, P., Bardella Stelzer, L., Cortez Montovani, J.: Pharmaceutical excipients and the information on drug labels. *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, 2006, 72 (3), 400 – 406.

Šuleková, M., Hudák, A., Smrčová, M.: The determination of food dyes in vitamins by RP–HPLC. *Molecules*, 2016, 21, 1368.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 2: 29 – 36, 2021

HODNOTENIE GENOTOXICITY A CYTOTOXICITY INSEKTICÍDU MOSPILAN® 20 SP V *IN VITRO* KULTÚRACH BOVINNÝCH LYMFOCYTOV

EVALUATION OF INSECTICIDE MOSPILAN® 20 SP GENOTOXICITY AND CYTOTOXICITY IN BOVINE LYMPHOCYTE CULTURES *IN VITRO*

Lörinc, Viera; Schwarzbacherová, Viera; Galdíková, Martina; Holečková, Beáta

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

vierka.kolesarova@gmail.com

ABSTRAKT

Neonikotinoidy sa používajú v poľnohospodárstve na ochranu rastlín pred škodlivým hmyzom, ale môžu mať negatívny účinok aj na necieľové organizmy. Tieto insekticídy pôsobia ako agonisti nikotínových cholinergných receptorov hmyzu, t. j. predlžujú depolarizáciu neurónov hmyzu a nadmerne stimulujú ich CNS, čo nakoniec vedie k ich smrti. Zástupcom neonikotinoidov je acetamiprid obsiahnutý v prípravku Mospilan® 20 SP (20,2 % acetamipridu), ktorého účinok sme sledovali v kultivovaných lymfocytoch perifernej krvi hovädzieho dobytka pomocou mikrojadrového testu blokovanej cytokinézy (CBMN) rozšíreného na tzv. cytómový test a TUNEL test. Lymfocyty boli exponované vplyvu Mospilanu® 20 SP v koncentráciách 5, 10, 25, 50 a 100 µg.ml^{-1} na 24 a 48 h. Naše výsledky poukazujú na to, že insekticíd Mospilan® 20 SP pôsobí genotoxicky na lymfocyty hovädzieho dobytka vzhľadom na pozorovanú zvýšenú frekvenciu mikrojadier ako biomarkera DNA poškodenia. Pri analýze frekvencií jadrových púčikov a nukleoplazmatických mostíkov sme nezaznamenali žiadne významné zmeny, avšak zistili sme, že Mospilan® 20 SP pôsobí cytostaticky prostredníctvom poklesu proliferačného indexu blokovanej cytokinézy (CBPI) u oboch donorov v oboch expozičných časoch. Hodnoty frekvencie apoptických a nekrotických buniek sa zvyšovali v dávkovej závislosti so štatistickou významnosťou u oboch donorov a pre obe doby expozície,

čo potvrdzuje cytotoxické účinky Mospilanu® 20 SP. Naďalej je potrebné skúmať potenciálne nežiadu-ce účinky pesticídov *in vitro* aj *ex vivo* pre budúce modelovanie a prognózovanie ich genotoxických a cytotoxických účinkov na človeka *in vivo*.

Kľúčové slová: acetamiprid; apoptóza; cytotoxicita; genotoxicita; lymfocyty hovädzieho dobytka; mikrojadro

ABSTRACT

Neonicotinoids are used in agriculture to protect plants against harmful insects, but they can also have a negative impact on non-target organisms. These iseciticides act as agonists of insect nicotinic cholinergic receptors; they prolong the depolarization of insect neurons and overstimulate their CNS, which ultimately leads to their death. A representative of neonicotinoids is acetamiprid in its formulation Mospilan® 20 SP (20.2% acetamiprid), which effect was assessed in cultured bovine peripheral blood lymphocytes using a cytokinesis-blocked micronucleus assay (CBMN) extended to the so-called cytome assay and TUNEL assay. Lymphocytes were exposed to Mospilan® 20 SP at concentrations of 5, 10, 25, 50 and 100 µg.ml^{-1} for 24 and 48 h. Our results indicate that the insecticide Mospilan® has a genotoxic effect on bovine lymphocytes due to the observed increased frequency of micronuclei as biomarkers of DNA damage. We did not observe any significant changes in the analysis of the frequencies of the nuclear buds and nucleoplasmic bridges. We further found that Mospilan® 20 SP acts cytostatically through a decrease in cytokinesis-blocked proliferation index (CBPI) in both donors at both exposure times. The frequency of apoptotic and necrotic cells increased with statistical significance in dose dependence in both donors for both exposure times, confirming the cytotoxic effects of Mospilan® 20 SP. Therefore, there is still a need to investigate the potential side effects of pesticides *in vitro* and *ex vivo* for future modeling and prediction of *in vivo* genotoxic and cytotoxic effects in humans.

Key words: acetamiprid; apoptosis; cytotoxicity; genotoxicity; bovine lymphocytes; micronucleus

ÚVOD

Pesticídy sú definované ako xenobiotiká používané prevažne v poľnohospodárstve na prevenciu, ničenie a odpudzovanie škodcov. Najbežnejšia klasifikácia pesticídov sa opiera o cieľové druhy škodcov, proti ktorým pôsobia, t. j. insekticídy, herbicídy, fungicídy a rodenticídy, pričom existujú aj ďalšie minoritnejšie skupiny ako sú akaricídy, moluskocídy, larvicídy, pedikulocídy, vírusicídy a baktericídy.

Neonikotinoidy sú novou generáciou široko používaných insekticídov. Pôsobia na postsynaptické nikotínové acetyl-cholinergné receptory (nAChR) hmyzu ako agonisti týchto receptorov, ktoré sa výhradne nachádzajú v CNS, vedú k opakujúcim sa spazmom a následnej paralýze hmyzu vzhľadom na úplné blokovanie šírenia vzruchov (Simon-Delso a kol., 2015). Neonikotinoidy sa vyznačujú vyššou afinitou k receptorom hmyzu ako u cicavcov, vysokou účinnosťou a jednoduchosťou aplikácie. Zástupcom tejto skupiny insekticídov je acetamiprid v insekticídnom prípravku Mospilan® 20 SP, ktorý bol použitý v našich experimentoch.

Hodnotenie potenciálneho cytotoxického a genotoxického účinku Mospilanu® 20 SP sme v našej štúdii testovali na lymfocytoch periférnej krvi hovädzieho dobytka po 24 a 48-hodinovej expozícii i pomocou *in vitro* cytómového mikrojadrového testu, a na identifikáciu a kvantifikáciu apoptických a nekrotických buniek sme použili TUNEL test. Ako modelové zviera sme si vybrali hovädzí dobytok, pretože prežúvavce predstavujú vhodný model pre hodnotenie potenciálneho rizika vzhľadom na to, že

ich primárnym zdrojom potravy sú zelené rastliny, ktoré môžu byť vystavené pôsobeniu pesticídov (Pistl a kol., 2003; Rhind, 2005). Následne môže konzumácia živočíšnych produktov, v ktorých sa tieto látky kumulujú, viesť ku expozícii ľudí.

Mikrojadrový test blokovanej cytokinézy (CBMN) je v súčasnosti preferovaná *in vivo* a *in vitro* metóda detekcie mikrojadier (MN) v rôznych bunkových líniách ako sú lymfocyty, bunky kostnej drene, periférne erytrocyty, bunky epitelu bukálnej sliznice a pľúc. Z hľadiska cytómového prístupu sa okrem MN identifikujú aj nukleoplazmatické mostíky (NPB), jadrové púčiky (NBUD), nekrotické (NB) a apoptotické bunky (AB), a tiež sa hodnotí bunková proliferácia. CBMN cytómový test je označovaný ako komplexný systém na hodnotenie poškodenia DNA, cytostázy a cytotoxicity, životaschopnosti skúmaných buniek, ich mitotického stavu a stavu chromozómov alebo ich nestability a poskytuje príležitosť na harmonizovaný prístup ku komplexnému štúdiu genotoxicity a cytotoxicity *in vitro* aj *ex vivo* (Fenech a kol., 2003).

TUNEL test je vhodný pre *in situ* detekciu DNA fragmentácie spôsobenej apoptózou. Používa sa na identifikáciu a kvantifikáciu AB. Je to presná, rýchla a jednoduchá nerádioaktívna technika a môže sa používať v rôznych testovacích systémoch ako sú zmrazené a formalínom fixované tkanivové rezy, a tiež sa využíva na stanovenie citlivosti malígnych buniek na liekmi indukovanú apoptózu pri výskume rakoviny. TUNEL test prednostne označuje bunky v štádiu apoptózy v porovnaní s bunkami v štádiu nekrózy, čím sa dá jednoznačne odlíšiť apoptóza od nekrózy a tak identifikovať zlomy primárnych vlákien DNA vyvolaných protinádorovými liekmi alebo ožarovaním (Roche Diagnostics, 2016).

Cieľom našej štúdie bolo detegovať možné genotoxické, cytostatické a cytotoxické vplyvy komerčného insekticídu Mospilan® 20 SP na lymfocyty hovädzieho dobytka *in vitro*.

MATERIÁL A METÓDY

Pre účely našej štúdie boli sterilne odobrané vzorky krvi z *vena jugularis* od dvoch zdravých býčkov (6 mesiacov, krížence Holštajnského dobytka, ŠPP Zemplínska Teplica). Následne boli vzorky krvi kultivované a spracované postupmi stanovenými pre *in vitro* CBMN test a pre *in situ* detekciu bunkovej smrti (TUNEL test).

Testovali sme účinok insekticídneho prípravku Mospilan® 20 SP, ktorý obsahoval účinnú látku acetamiprid v koncentrácii 200 $g.kg^{-1}$. Mospilan® 20 SP (Nippon Soda, Tokio, Japonsko) bol rozpustený v destilovanej vode a aplikovaný do bunkových kultúr v koncentráciách 5, 10, 25, 50 a 100 $\mu g.ml^{-1}$. Ako negatívna kontrola slúžila v bunkových kontrolách destilovaná voda vo finálnej koncentrácii 1 % z celkového objemu kultivácie.

Kultivácia bunkových kultúr a expozícia Mospilanu® 20 SP

Lymfocyty boli izolované z celej krvi pomocou Histopaque®-1077, a to navrstvením zriedenej krvi vo fosfátovom tlmivom roztoku (PBS) na Histopaque® v pomere 1 : 1, centrifugovaním (30 min, 4500 ot/min) a odsatím prstenca, ktorý obsahoval vyizolované bunky. Izolované lymfocyty, ktoré sme najprv dvakrát premyli v predhriatom PBS, sme následne pridali do pripraveného kultivačného média v množstve 0,4 x 106 buniek/ml média a kultivovali podľa Schwarzbacherová a kol. (2017). Lymfocyty boli vystavené vplyvu Mospilanu® 20 SP po dobu 24 a 48 h; pre blokovanie cytokinézy bol použitý cytochalazín-B (Sigma, USA) v koncentrácii 6 $\mu g.ml^{-1}$, ktorý bol pridaný do kultivačného média 44 h po začatí kultivácie buniek. Ako pozitívne kontroly boli použité etylmetylsulfonát (24 h expozícia, 250 $\mu g.ml^{-1}$) a mitomycín (48 h expozícia; 0,4 $\mu mol.ml^{-1}$).

CBMN test a vyhodnotenie preparátov

Spracovanie bunkových kultúr a príprava preparátov bola uskutočnená podľa Schwarzbacherová a kol. (2017).

V preparátoch boli vyhodnotené nasledujúce parametre: počet MN, NPB, NBUD, ďalej CBPI, AB a NB, a to na 1000 dvojjadrových (BN) buniek (lymfocytov) od každého donora a pri každej koncentrácii insekticídu podľa kritérií od Fenech a kol. (2003). Proliferačný index bol vypočítaný podľa Surrallés a kol. (1995), kedy sa vyhodnotilo najmenej 500 buniek v rade za sebou minimálne trikrát pre každú testovanú koncentráciu a donora s použitím vzorca:

$$CBPI = \frac{(m_1+2.m_2+3.(m_3+ m_4)}{n}$$

kde m_{1-4} reprezentujú počet buniek s 1, 2, 3 alebo 4 jadrami a n je celkový počet hodnotených buniek. Pri hodnotení AB a NB sme tiež hodnotili najmenej 500 buniek v rade za sebou minimálne trikrát pre každú testovanú koncentráciu a donora.

TUNEL test

Exponované bunkové kultúry sme dvakrát premyli roztokom fosfátového tlmivého roztoku (PBS), fixovali (60 min pri 24 ºC), následne premyli v PBS a permeabilizovali (0,1 % Triton X-100 v 0,1 % roztoku citrátu sodného, 2 min, 2 – 8 ºC) (Roche Diagnostics, 2016).

Príprava TUNEL reakčnej zmesi a značenie buniek prebehli podľa návodu od výrobcu.

Vyhodnotenie TUNEL testu sme urobili fluorescenčným mikroskopom Nikon Eclipse Ni-U (Nikon Instruments, NY, USA) a pomocou programu LUCIA FISH® (Laboratory Imaging, Praha, Česká republika). Hodnotili sme najmenej 100 buniek v rade za sebou minimálne trikrát pre každú testovanú koncentráciu a donora.

Štatistická analýza

Pre štatistickú analýzu dát MN, NPB a NBUD sme použili chí-kvadrát (χ^2) test a štatistickú analýzu dát CBPI, AB, NB a TUNEL pozitívnych buniek sme vykonali jednocestnou analýzou variancie (ANOVA) s Dunnettovým aposteriórnym testom v programe GraphPadPrism® s hladinami významnosti $p < 0,05$, $p < 0,01$ a $p < 0,001$.

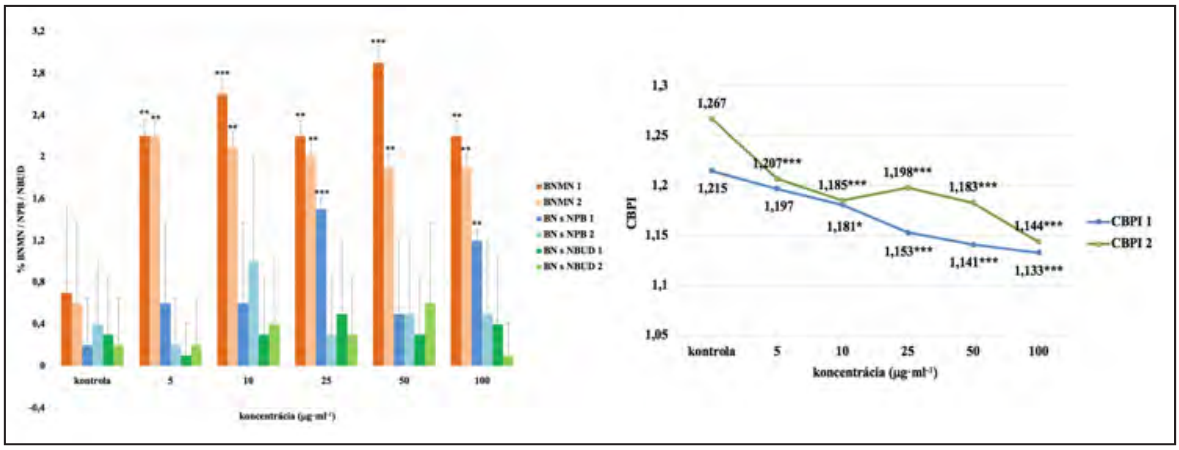
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cytómový CBMN test sa používa na hodnotenie klastogénnych a aneugénnych účinkov chemických látok ako ukazovateľ miery genotoxicity, cytostázy a cytotoxicity v rôznych bunkových líniách. S využitím cytómového CBMN testu sme skúmali potenciálne genotoxické a cytotoxické účinky komerčne dostupného insekticídu Mospilan® 20 SP (20,2 % acetamiprid) na lymfocytoch hovädzieho dobytka. Výsledky CBMN testu sú zobrazené na obrázku 1 po 24 h a 2 po 48 h expozícii dávke Mospilanu® 20 SP.

Zistili sme zvýšené frekvencie MN po 24 h expozícii pri všetkých koncentráciách pri oboch donoroch. Po 48 h expozícii insekticídom boli hodnoty MN zvýšené len pri koncentrácii 100 $\mu g.ml^{-1}$ u donora 1 a pri koncentrácii 50 $\mu g.ml^{-1}$ u donora 2. Zmeny frekvencie NPB v BN bunkách nevykazovali dávkovú závislosť u oboch donorov pri oboch expozičných časoch, avšak signifikantne zvýšené hodnoty boli pozorované pri donorovi 1 (24 h expozícia) pri koncentráciách 25 a 100 $\mu g.ml^{-1}$ ($p < 0,001$ a $p < 0,01$) a pri donorovi 2 (48 h expozícia) pri koncentrácii 50 $\mu g.ml^{-1}$ ($p > 0,05$). Pri analýze frekvencií NBUD sme nezaznamenali žiadne významné zmeny v porovnaní s kontrolou pri 24 h expozícii pri oboch donoroch a pri 48 h expozícii len u donora 1 pri koncentrácii 100 $\mu g.ml^{-1}$ ($p > 0,05$). Predpokladáme, že insekticíd Mospilan® 20 SP pôsobí genotoxicky na lymfocyty hovädzieho dobytka vzhľadom na pozorovanú zvýšenú frekvenciu MN ako biomarkera DNA poškodenia.

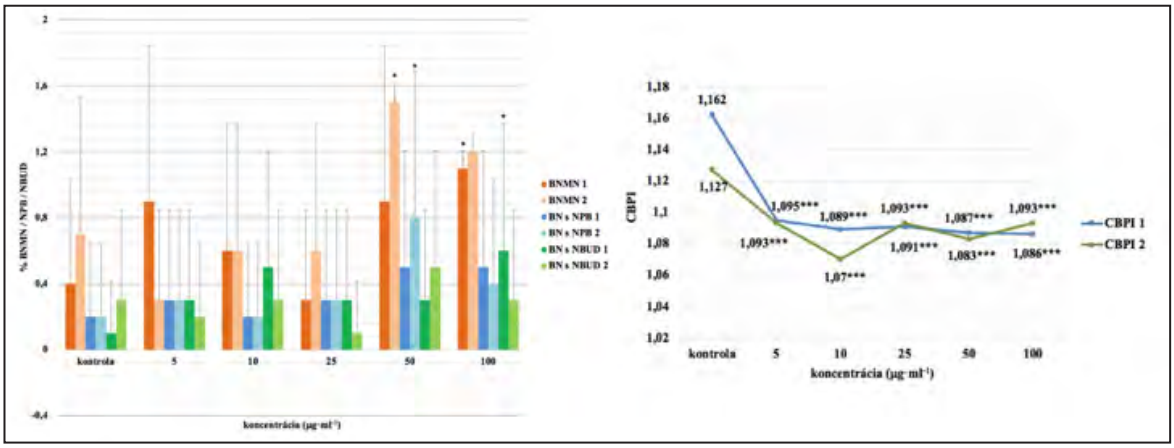
Z dostupných štúdií hodnotiacich cytotoxické a genotoxické účinky čistého acetamipridu sa tento efekt prejavil v humánnych črevných CaCo-2 bunkách (Cavas a kol., 2012), v lymfocytoch periférnej krvi (Kocaman aTopaktas, 2007; Gokalp a kol., 2015) a aj v pľúcnych fibroblastoch (Cavas a kol., 2014). V CBMN teste *in vitro* bola sledovaná zvýšená frekvencia MN oproti negatívnej kontrole pri koncentráciách od 50 do 300 $\mu mol.l^{-1}$, čo je v súlade s výsledkami štúdie Cavas a kol. (2012).

Obr. 1: Hodnotenie frekvencie BNMN, NPB, NBUD a CBPI po 24 h expozícii



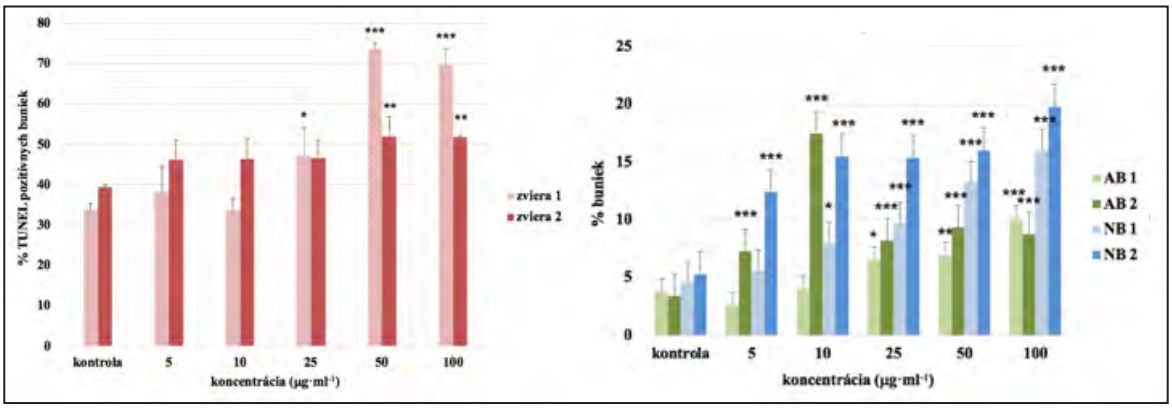
Štatistická významnosť pre (χ^2) test a ANOVA + Dunnettov aposteriórny test: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ a *** – $p < 0,001$.

Obr. 2: Hodnotenie frekvencie BNMN, NPB, NBUD a CBPI po 48 h expozícii



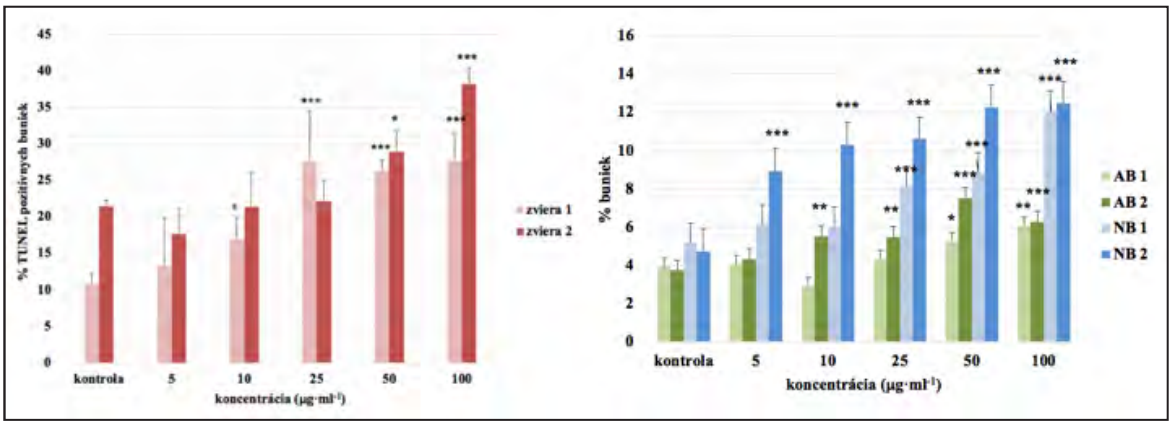
Štatistická významnosť (χ^2) test a ANOVA + Dunnettov aposteriórny test: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$.

Obr. 3: Hodnotenie frekvencií % TUNEL pozitívnych buniek a AB a NB po 24 h expozícii



Štatistická významnosť ANOVA + Dunnettov aposteriórny test: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ a *** – $p < 0,001$.

Obr. 4: Hodnotenie frekvencií % TUNEL pozitívnych buniek a AB a NB po 48 h expozícii



Štatistická významnosť ANOVA + Dunnettov aposteriórny test: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ a *** – $p < 0,001$.

Kocaman a Topaktas (2007) ako prví popísali genotoxický účinok komerčne dostupnej formulácie Mosetam® 20 SP (20 % acetamiprid) v ľudských lymfocytoch perifernej krvi *in vitro*. Acetamiprid indukoval sesterské chromatídové výmeny a chromozómové aberácie pri všetkých testovaných koncentráciách a časoch expozície a frekvencia MN bola signifikantne zvýšená pri koncentráciách 30, 35 a 40 µg.ml^{-1} v porovnaní s negatívnou vzorkou. Pozorované boli tiež znížené hodnoty CBPI pri koncentráciách 35 a 40 µg.ml^{-1} po 24 h expozícii acetamipridu a pri koncentrácii 40 µg.ml^{-1} po 48 h expozícii acetamipridu, čím sa potvrdili zistenia o cytostatickom pôsobení Mospilanu® 20 SP prostredníctvom zisteného poklesu CBPI v oboch expozičných časoch.

Subchronické podávanie acetamipridu potkanom po dobu 90 dní v dávke 110 mg.kg^{-1} telesnej hmotnosti významne znížilo proliferáciu lymfocytov a na funkciu makrofágov pôsobil acetamiprid imunotoxicky (ShakthiDevan, Prabu, Panchapakesan, 2014).

Apoptóza je vysoko regulovaný a kontrolovaný bunkový proces, pri ktorom aktivácia špecifických signálnych dráh bunkovej smrti vedie k delécii buniek z tkaniva. Charakteristickými morfologickými znakmi apoptózy sú zmršťovanie buniek, kondenzácia chromatínu a tvorba apoptotických teliesok, ktoré sú fagocytované makrofágmi bez akejkoľvek zápalovej reakcie (Jayakiran, 2015). Výsledky hodnotenia AB a NB cytómovým CBMN testom a TUNEL testom sú na obrázkoch 3 po 24 h a 4 po 48 h expozícii.

TUNEL-ovým testom sme zistili signifikantne zvýšené hodnoty % TUNEL pozitívnych (AB) buniek po 24 h expozícii u donora 1 od koncentrácie 25 µg.ml^{-1} a u donora 2 od koncentrácie 50 µg.ml^{-1}. Tieto výsledky sú podobné so zistenými zvýšenými frekvenciami AB v cytómovom CBMN teste po 24 h expozícii od koncentrácie 25 µg.ml^{-1} u donora 1 a pre všetky koncentrácie u donora 2. Podobne je tomu aj pri hodnotení frekvencie NB, kedy sme pri donorovi 1 pozorovali signifikantne zvýšené hodnoty % NB od koncentrácie 10 µg.ml^{-1} a u donora 2 pri všetkých koncentráciách. Po 48 h expozícii sme pozorovali signifikantne zvýšené hodnoty % TUNEL pozitívnych AB u oboch dono-rov už od koncentrácie 10 µg.ml^{-1} u donora 1 a u donora 2 od 50 µg.ml^{-1}, pričom zvyšujúce sa hodnoty frekvencie TUNEL pozitívnych buniek sú dávkovo závislé u donora 1 s výnimkou koncentrácie 25 µg.ml^{-1}, avšak u donora 2 túto dávkovú závislosť nepozorujeme. Ďalej pri hodnotení cytómového CBMN testu sme pozorovali štatisticky významne

zvýšené frekvencie AB u donora 1 od koncentrácie 50 µg.ml^{-1} a u donora 2 už od koncentrácie 10 µg.ml^{-1} po 48 h expozícii. Pri hodnotení frekvencie NB pozorujeme signifikantne zvýšené hodnoty v dávkovej závislosti od koncentrácie 25 µg.ml^{-1} u donora 1 a pri všetkých koncentráciách u donora 2. Všetky tieto zistenia naznačujú cytotoxické pôsobenie acetamipridu na lymfocyty hovädzieho dobytka.

Babeľová a kol. (2017) hodnotili potenciálnu toxicitu (embryotoxicitu) neonikotinoidov (tiakloprid, acetamiprid, tiametoxam a klotianidín) a ich komerčných produktov: Calypso® 480 SC (zmes tiaklopridu), Mospilan® 20 SP (zmes acetamipridu) a Agita® 10 WG (zmes tiametoxamu) na vývoj a preimplantáciu embryí myší a králikov v podmienkach *in vitro* a *in vivo* a na blastocysty. Všetky skúmané neonikotinoidy významne znížili (takmer o 50 %) schopnosť embryí dosiahnuť štádium blastocysty. Acetamiprid pri koncentrácii 10 µmol. ml^{-1} bol tiež schopný významne redukovať počet buniek a zvýšiť incidenciu bunkovej smrti v myších blastocystách. Tento účinok sa však nepotvrdil, keď sa použil Mospilan® 20 SP obsahujúci jeho ekvivalentnú koncentráciu. Zmeny vyvolané neonikotinoidmi počas preimplantačného obdobia vývoja sa môžu považovať za potenciálny rizikový faktor pri reprodukcii cicavcov.

V štúdii de Almeida Rossi a kol. (2013) bol hodnotený účinok chronickej expozície subletálnym dávkam neonikotinoidu imidaklopridu (IMI) na mozog afrikanizovaných včiel (*Apis mellifera*) po dobu 1, 3, 5, 7 a 10 dní, a to prostredníctvom morfologickej, histochemickej a imunocytochemickej analýzy. Bunková smrť bola potvrdená imunocytochemickou analýzou optických lalokov TUNEL testom. Vo všetkých skupinách včiel ošetrených IMI a vo všetkých expozičných časoch sa našli pozitívne jadrá, ktoré prechádzali bunkovou smrťou. Autori dospeli k záveru, že subletálne dávky IMI majú cytotoxické účinky na včelie mozgy a že optické laloky sú citlivejšie na insekticíd ako iné oblasti mozgu. Aj keď biologická aktivita pesticídov závisí hlavne od ich účinnej látky, ktorú obsahujú, komerčne dostupné formulácie pesticídov na trhu často pozostávajú z čistej účinnej látky a rôznych pomocných látok, ktoré sa zvyčajne používajú na zlepšenie vlastností chemikálie pri manipulácii, skladovaní a aplikácii (Knowles, 1998). V mnohých prípadoch sú tieto zložky chránené patentmi, čo sťažuje úplnú a dôslednú analýzu výsledkov získaných zo štúdií komerčne dostupných pesticídov.

ZÁVERY

S využitím cytómového testu a TUNEL testu sme získali informácie o možnom genotoxickom, cytotoxickom a cytostatickom účinku prípravku Mospilan® 20 SP na lymfocyty periférnej krvi hovädzieho dobytka. Po skrátenej (24 h) aj predĺženej expozičnej dobe (48 h) sme zistili zvýšené frekvencie mikrojadier, biomarkera genotoxicity chemickej látky. Ďalej sme detegovali významný pokles proliferácie lymfocytov (cytostatický účinok) a dávkovo závislý nárast výskytu apoptických a nekrotických buniek (cytotoxický účinok). Na základe získaných výsledkov je potrebné poukázať na potrebu ďalšieho skúmania cytotoxických a genotoxických účinkov pesticídov *in vitro* aj *ex vivo* pre prognózovanie *in vivo* účinkov na človeka.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia vznikla vďaka podpore grantov MŠ SR VEGA 1/0242/19 a 1/0166/2021.

ZOZNAM LITERATÚRY

Babeľová, J., Šefčíková, Z., Čikoš, Š., Špirková, A., Kovaříková, V., Koppel, J., Makarevich, A. V., Chrenek, P., Fabian, D.: Exposure to neonicotinoid insecticides induces embryotoxicity in mice and rabbits. *Toxicology*, 2017, 392, 7180.

Cavas, T., Cinkilic, A. N., Vatan, O., Yılmaz, D., Coşkun, M.: *In vitro* genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and γH2AX foci assays. *Pestic. Biochem.*

Physiol., 2012, 104, 212 – 217.

Çavaş, T., Çinkılıç, A. N., Vatan, Ö., Yılmaz, D.: Effects of fullerenol nanoparticles on acetamiprid induced cytoxicity and genotoxicity in cultured human lung fibroblasts. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2014, 114, 17.

de Almeida Rossi, C., Roat, T. C., Tavares, D. A., Cintra-Socolowski, P., Malaspina, O.: Brain morphophysiology of Africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2013, 65 (2), 234 243.

Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E.: HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*, 2003, 534 (1 – 2), 6575.

Gökalp, F., Rasgele, P., Kekecoglu, M., Kanev, M., Ozdemir Y. K.: Potential genotoxicity of acetamiprid and propineb singly or in combination in cultured human peripheral blood lymphocytes by using MN assay. *Fresenius Environ. Bull.*, 2015, 24, 39 473 955.

Jayakiran, M.: Apoptosis-biochemistry: A mini review. *Exp. Pathol.*, 2015, 5, 14.

Knowles, D. A.: Chapter – Formulation of agrochemicals. In Knowles, D. A. (ed.) *Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations*. Dordrecht: Springer Science + Business Media, 1998. p. 440.

Kocaman, A. Y., Topaktaş, M.: *In vitro* evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2007, 48 (6), 483 490.

Pistl, J., Kovalkovičová, N., Holovská, V., Legáth, J., Mikula, I.: Determination of the immunotoxic potential of pesticides on functional activity of sheep leukocytes *in vitro*. *Toxicology*, 2003, 188 (1), 7381.

Rhind, S. M.: Are endocrine disrupting compounds a threat to farm animal health, welfare and productivity? *Reprod. Domest. Anim.*, 2005, 40 (4), 282 290.

Roche Diagnostics GmbH. Bulletin: In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red. Version 12. 2016. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/12156792910bul.pdf>. Accessed March 29, 2020.

Schwarzbacherová, V., Wnuk, M., Lewinska, A., Potocki, L., Zebrowski, J., Koziorowski, M., Holečková, B., Šiviková, K., Dianovský, J.: Evaluation of cytotoxic and genotoxic activity of fungicide formulation Tango® Super in bovine lymphocytes. *Environ. Pollut.*, 2017, 220 (Part A), 255 – 263.

Shakthi Devan, R. K., Prabu, P. C., Panchapakesan, S.: Immunotoxicity assessment of sub-chronic oral administration of acetamiprid in Wistar rats. *Drug Chem. Toxicol.*, 2015, 38 (3), 328 336.

Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D. W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C. H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E. A. D., Morrissey, C. A., Noome, D. A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J. D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J. P., Whitehorn, P. R., Wiemers, M.: Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2015, 22 (1), 5 – 34.

Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalán, J., Norppa, H., Marcos, R.: Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*, 1995, 341 (3), 169 – 184.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 2: 37 – 47, 2021

KONCENTRAČNE ZÁVISLÝ ÚČINOK ASTAXANTÍNU A JEHO ESTEROV NA METABOLICKÚ AKTIVITU IMUNITNÝCH BUNIEK ZDRAVÝCH MYŠÍ *IN VITRO*

CONCENTRATION-DEPENDENT EFFECT OF ASTAXANTHIN AND ITS ESTHERS ON METABOLIC ACTIVITY OF IMMUNE CELLS IN HEALTHY MICE *IN VITRO*

Jurčacková, Zuzana; Ciglanová, Denisa; Mačák Kubašková, Terézia; Hrčková, Gabriela

Parazitologický ústav, Slovenská Akadémia Vied, Hlinkova 3, 040 01 Košice
Slovenská republika

jurcackova@saske.sk

ABSTRAKT

Astaxantín je xantofylový karotenoid s významnými antioxidačnými vlastnosťami. Cieľom predloženej štúdie bolo porovnať účinky nižších dávok (2,5; 5; 10 µg.ml^{-1}) a vyšších dávok (20 a 40 µg.ml^{-1}) extraktu astaxantínu (AXT) a jeho monoesterov (ME) a diesterov (DE) na fyziologický stav lymfocytov izolovaných zo sleziny zdravých Balb/c myší. Hodnotením životaschopnosti buniek testom viability s trypánovou modrou, ako aj sledovaním metabolickej aktivity MTT testom sa nám podarilo zistiť, že koncentrácie astaxantínu a jeho monoesterov a diesterov do 10 µg.ml^{-1} nevykazovali významnú cytotoxickú aktivitu na imunitné bunky. Testom absorpcie neutrálnej červenej, ktorá závisí od schopnosti živých buniek aktívne transportovať neutrálnu červenú cez membrány a od schopnosti udržiavať pH gradient v bunke prostredníctvom produkcie ATP sa nám podarilo potvrdiť, že nižšie koncentrácie účinných látok (2,5; 5 a 10 µg.ml^{-1}AXT, ME, DE) nie sú pre bunky toxické. Sledovaním morfologických zmien buniek po zafarbení farbivom May Grünwald – Giemsa sme zistili, že vysoké koncentrácie astaxantínu a jeho esterov (20 a 40 µg.ml^{-1} AXT, ME, DE) vedú k fragmentácii jadra a pravdepodobne až k apoptóze. Z výsledkov vyplýva, že zatiaľ čo monoestery majú najvýznamnejšie cytotoxické účinky pri vysokých koncentráciách, diestery potláčajú základné fyziologické procesy v bunkách pri nízkych koncentráciách. Účinky astaxantínového extraktu sú pravdepodobne výsledkom kombinovaného pôsobenia monoesterov a diesterov. Nízke koncentrácie extraktu pôsobili na imunitné bunky stimulačne a cytoprotektívne.

Kľúčové slová: astaxantínový extrakt; diestery; fyziologické procesy; monoestery; myš; splenocyty.

ABSTRACT

Astaxanthin is a xantophyll carotenoid with significant antioxidant properties. The aim of the presented study was to compare effects of lower doses (2,5; 5; 10 µg.ml^{-1}) and higher doses (20 and 40 µg.ml^{-1}) of astaxanthin (AXT) and its monoesters (ME) and diesters (DE) on physiological fitness of lymphocytes isolated from the spleens of healthy Balb/c mice. Evaluation of cell viability by trypan blue assay as well as monitoring the metabolic activity by MTT showed that concentrations of astaxanthin and its monoesters and diesters up to 10 µg.ml^{-1} did not possess significant cytotoxic activity on immune cells. Using of neutral red uptake assay which depends on the ability of living cells to actively transport neutral red dye across membrane and the cell's capacity to maintain pH gradients through the production of ATP we confirmed that lower concentrations of active compounds (2,5; 5 a 10 µg.ml^{-1} AXT, ME, DE) are not toxic to the cells. Based on the observation of morphological changes of the cells after May Grünwald – Giemsa staining we found that high concentrations of astaxanthin and its esters (20 a 40 µg.ml^{-1} AXT, ME, DE) lead to nuclear fragmentation and possibly to apoptosis. The results show that while monoesters have the most significant cytotoxic effects at high concentrations, diesters suppress basic physiological processes in the cells at low concentrations. The effects of astaxanthin extract are probably the result of the combined action of its monoesters and diesters. Low concentrations of the extract had a stimulatory and cytoprotective effect on the immune cells.

Key words: astaxanthin extract; diesters; monoesters; mouse; physiological processes; spleen.

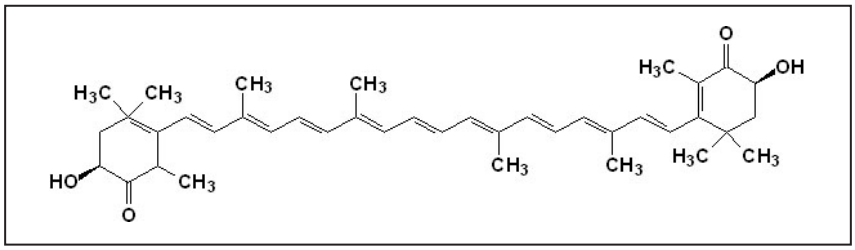
ÚVOD

Mechanizmy účinku prírodných látok závisia od ich chemickej štruktúry. Počas narušeného fyziologického stavu organizmu pri ochoreniach je ich pôsobenie nasmerované k úprave, resp. obnoveniu homeostázy. Výskum imunomodulačného potenciálu látok izolovaných z vyšších a nižších rastlín, húb, rias a lišajníkov viedol k objaveniu a následnej syntéze veľmi účinných látok s komerčnou aplikáciou v humánnej a veterinárnej medicíne. Príkladom takejto látky naturálneho pôvodu je avermektín izolovaný z baktérie *Streptomyces avermitilis*, z ktorého bol odvodený antiparazitický liek ivermektín (Siddique a kol., 2014).

Neliečené infekcie a traumy však vedú k zápalovým reakciám a následne k produkcii cytotoxických látok, ktoré sú uvoľňované v ohnisku poranenia. Tieto látky zahŕňajú vysoko reaktívne formy kyslíka (ROS) a dusíka (RNS), ktoré majú deštruktívne účinky nie len pre patogén, ale aj pre hostiteľa (O'Connor a O'Brien, 1998). V boji proti ROS a oxidačnému poškodeniu sa organizmy spoliehajú na pomerne zložitý antioxidačný systém zložený z endogénne produkovaných zlúčenín, vrátane nízkomolekulových antioxidantov a enzýmov. Organizmy sú schopné produkovať množstvo endogénnych antioxidantov, ktoré vychytávajú škodlivé voľné radikály a zabraňujú nerovnováhe medzi prozápalovým a protizápalovým stavom. V prípade značného oxidačného stresu je schopnosť antioxidantov eliminovať voľné radikály prekročená, a preto sú potrebné ďalšie zdroje antioxidantov prijaté zo stravy (Chew a Park, 2004). Patria sem najmä vitamín E (tokoferol), vitamín C (askorbát), polyfenolové antioxidanty a karotenoidy. Priaznivé účinky karotenoidov boli pripisované najmä β-karoténu a vitamínu A a antioxidačné účinky boli zistené aj u astaxantínu.

Astaxantín (3,3'-dihydroxy-β, β'-karotén-4,4'-dión) (viď obr. 1) patrí do skupiny xantofylových karotenoidov (Olaizola, 2000). V prírode je syntetizovaný len malým množstvom organizmov, ako mikroorganizmy – *Brevibacterium, Mycobac-*

Obr. 1: Chemická štruktúra astaxantínu (3S, 3'S)



terium lacticola, Agrobacterium auratim, zelené riasy – *Haematococcus pluvialis, Chlorella zofingiensis, Chlorococcum* a kvasinky – *Phaffia rhodozyma*. Táto prírodná látka bola Úradom pre kontrolu potravín a liečiv v USA schválená ako potravinárske farbivo v krmive pre zvieratá. Používa sa aj ako zdroj pigmentu v krmive pre niektoré druhy morských rýb a kôrovcov a je významnou nutraceutickou zložkou pre človeka (Higuera-Ciapara a kol., 2006). Účinky astaxantínu vychádzajú z jeho jedinečnej molekulárnej štruktúry, ktorú tvoria dve karbonylové skupiny, dve hydroxylové skupiny a 11 konjugovaných dvojitých etylénových väzieb (viď obr. 1). Práve vďaka hydroxylovým (OH) a keto- (C=O) zvyškom na každom iónovom kruhu môže byť esterifikovaný a z jeho štruktúry vyplývajú aj antioxidačné vlastnosti. Astaxantín je donorom elektrónov reagujúcich s ROS, ktoré ukončia reťazovú reakciu a premenia reaktívne molekuly na stabilnejšie, pre organizmus neškodlivé produkty (Miki, 1991).

Štúdie účinkov astaxantínu dokázali, že je silnejší antioxidant ako β-karotén, účinnejšie inhibuje peroxidáciu lipidov ako kataxantín, β-karotén a zeaxantín (Miki, 1991), a na rozdiel od lykopénu, β-karoténu a luteínu nemá prooxidačný účinok (McNulty a kol., 2007). Zistilo sa, že astaxantín má aj tlmiaci efekt na singletový kyslík, vychytáva superoxidy, peroxidy vodíka a hydroxylové radikály a inhibuje peroxidáciu lipidov (Miki,1991; Palozza a Krinsky, 1992). V súčasnosti táto látka vzbudzuje značný záujem pre svoj potenciál pri zmierňovaní chorôb súvisiacich s vekom (Park a kol., 2010). Potenciál tejto prírodnej látky bol dokázaný aj pri ochrane ľudského organizmu proti širokému spektru chorôb, vrátane zápalu, žalúdočných lézií, kardiovaskulárnym ochoreniam ako aj ochoreniam pečene, cukrovke, rakovine, oxidačnému poškodeniu spôsobenému UV žiarením a neurodegeneratívnym chorobám (Ambati a kol., 2014). Je známe, že dietetický astaxantín stimuluje proliferáciu lymfocytov indukovanú mitogénmi a zvyšuje cytotoxicitu NK buniek a počet T a B lymfocytov v periférnej krvi (Park a kol., 2010).

Doposiaľ bol výskum astaxantínu zameraný najmä na jeho biologické a antioxidačné vlastnosti. Je len málo štúdií, ktoré by podrobne popísali jeho vplyv na imunitné bunky a nie je známe, ako sa na tomto účinku podieľajú jeho zložky ako monoestery a diestery. V našej štúdii sme sledovali vplyv AXT a jeho esterov na základné fyziologické funkcie nestimulovaných lymfocytov sleziny zdravých myší v koncentračnej závislosti. Zamerali sme sa na cytotoxické pôsobenie týchto látok, ktoré sme sledovali na základe účinkov na metabolickú aktivitu, prijímanie základných živín cez bunkovú membránu, viabilitu a morfologické zmeny v bunkách v *in vitro* podmienkach.

MATERIÁL A METÓDY

Izolácia splenocytov zo slezín samcov zdravých Balb/c myší

V experimente boli použité samce zdravých Balb/c myší (VELAZ, Česká republika) vo veku

8 – 10 týždňov (n = 8), z ktorých boli sterilne izolované sleziny a suspenzie buniek sleziny boli resuspendované v RPMI 1640 médiu (Biochrom-Merck, Nemecko), obsahujúcom 10 % inaktivovaného bovinného fetalného séra (Biochrom-Merck, Nemecko), 100 $U.ml^{-1}$ penicilínu, 100 $\mu g.ml^{-1}$ streptomycínu, 10 $\mu g.ml^{-1}$ gentamicínu a 2,5 $\mu g.ml^{-1}$ amfotericínu B (Sigma-Aldrich, USA). Červené krvinky boli odstránené inkubáciou suspenzie s lyzačným roztokom (8,02 % NH_4Cl; 0,85 % $NaHCO_3$ a 0,37 % EDTA). Splenocyty boli premyté v tlmivom roztoku PBS (pH = 7,3), filtrované cez 40 µm nylonové filtre (BD Biosciences, Darmstadt, Nemecko), centrifugované pri 239 g počas 5 min pri 20 °C a následne resuspendované v médiu. Izolované bunky boli spočítané a ich viabilita bola hodnotená na základe absorpcie 0,05 % trypánovej modrej (Biochrom-Merck, Nemecko). Po nariedení vhodnej koncentrácie buniek boli použité v ďalších testoch.

Príprava astaxantínového extraktu, monoesterov a diesterov

Astaxantín bol izolovaný z riasy červenozrnko dažďové (*Haematococcus pluvialis*) použitím vysoko výkonnej protiprúdovej chromatografie (HPCCC) v Centre Algatech, Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i. – vedecké pracovisko Třeboň, Česká republika (Fábryová a kol., 2020). V *H. pluvialis* je astaxantín prítomný najmä vo forme monoesterov (70 %) a diesterov (25 %). Zvyšných 5 % z celkového množstva izolovaného astaxantínu zodpovedá neesterifikovanej forme voľného astaxantínu. Zo zásobných roztokov astaxantínového extraktu (zmes monoesterov a diesterov; AXT), monoesterov (ME) a diesterov (DE) s koncentráciou 50 $mg.ml^{-1}$ v DMSO boli pripravené pracovné roztoky zriedením v RPMI médiu zodpovedajúce koncentráciám 2,5; 5; 10; 20 a 40 $\mu g.ml^{-1}$.

Test viability splenocytov

Suspenzia splenocytov nariedená na koncentráciu 1 x 10^6 buniek/ml bola pridaná v triplikátoch pre každú koncentráciu a látku do 24-jamkovej platničky (Corning, USA). Do každej jamky bolo pridané vypočítané množstvo pracovných roztokov EXT, ME a DE s koncentráciami 2,5; 5; 10; 20 a 40 $\mu g.ml^{-1}$/jamka, ako kontrola boli použité neošetrené splenocyty. Cytototoxický účinok bol hodnotený po 24-hodinovej kultivácii splenocytov s účinnými látkami pri teplote 37 °C a 5 % CO_2 atmosfére stanovením počtu živých a mŕtvych buniek po inkubácii v trypánovej modrej v riedení 1 : 5 s PBS. Viabilita bola overovaná v dvoch nezávislých *in vitro* experimentoch.

Test metabolickej aktivity splenocytov – MTT test

Splenocyty (1 x 10^6/ml) boli kultivované v 24-jamkových platničkách po dobu 24 hodín s jednotlivými koncentráciami AXT, ME a DE ako je opísané vyššie a následne boli použité na hodnotenie metabolickej aktivity pomocou MTT testu. Zásobný roztok MTT bol pripravený rozpustením 5 mg v 1 ml PBS, filtrovaný a pridaný 4 hodiny pred ukončením kultivácie v objeme 50 µl/jamka. Neadherentná populácia buniek bola prenesená do skúmaviek a centrifugovaná pri 956 g/10 min, supernatant bol odstránený a do skúmaviek bol pridaný DMSO v objeme 100 µl. Po rozpustení kryštálov formazánu boli lyzáty prenesené do 96-jamkovej platničky. Adherentné bunky boli premyté PBS a do každej jamky bol pridaný 100 µl DMSO. Po lýze boli extrakty buniek prenesené do 96-jamkovej platničky a následne bola zmeraná absorbancia) v oboch frakciách buniek pri vlnovej dĺžke 550 nm (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). *In vitro* experiment bol zopakovaný trikrát.

Test absorpcie farbiva neutrálna červená splenocytmi

Absorpcia neutrálnej červenej slúži na kvantitatívne stanovenie životaschopnosti buniek a sledovanie toxických účinkov látok *in vitro*. Príjem neutrálnej červenej závisí od schopnosti bunky udržiavať pH gradient v bunke prostredníctvom produkcie ATP (Repetto a kol., 2008). Táto metóda bola použitá na hodnotenie cytotoxických účinkov uvedených látok

na splenocyty na základe iného mechanizmu ako je pri MTT teste. Bunky (1 x 10^6/ml) boli kultivované 24 hodín v termostate pri teplote 37 °C a 5 % CO_2 atmosfére s vyššie uvedenými koncentráciami EXT, ME a DE v triplikátoch. Neutrálna červená (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemecko) bola rozpustená v PBS a pridaná (10 µg/jamka) hodinu pre ukončením kultivácie. Neadherentné bunky boli z platničky prenesené do skúmaviek, centrifugované 5 min pri 239 g, supernatant bol odstránený a do každej skúmavky bol pridaný extrakčný pufer so zložením: 1 % ľadová kyselina octová, 50 % etanol a 49 % destilovaná voda. Adherentné bunky boli premyté s 200 µl PBS a po jeho odstránení bol pridaný extrakčný pufer. Neadherentná a adherentná populácia buniek z každej kultivačnej jamky bola spojená a prenesená do 96-jamkovej platničky. Absorbancia extraktov neutrálnej červenej z buniek bola odčítaná pri vlnovej dĺžke 550 nm (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). *In vitro* experiment bol realizovaný trikrát.

Morfologické zmeny buniek po zafarbení farbivami May Grünwald – Giemsa

Splenocyty s AXT, ME a DE v koncentrácii 2,5; 5; 10; 20 a 40 µg.ml^{-1} boli inkubované 24 hodín v termostate rovnako, ako bolo popísané v predchádzajúcich experimentoch. Po kultivácii boli bunky prenesené na podložné sklíčko a fixované 70 % metanolom v PBS 3 minúty. Na riedenie farbív boli použité Sörensenove pufre, ktoré tvorila zložka A: KH_2PO_4, pH= 4,8 a zložka B: Na_2HPO_4 x 12 H_2O, pH = 8,7. Bunky boli 10 minút farbené 10 % May Grünwald roztokom (pH 6,5) a premyté pufrovacím roztokom pripraveným zo Sörensenových pufrov v zmiešavacom pomere zložiek A (70 ml) a B (30 ml) s výsledným pH 6,48. Následne boli farbené 5 minút v 5 % Giemsa-Romanowski roztoku a opláchnuté v destilovanej vode. Po vysušení boli preparáty analyzované pomocou svetelného mikroskopu (Olympus, Praha, Česká republika) pri 1000 x zväčšení a fotografované.

Štatistická analýza

Výsledky boli analyzované použitím jednosmerného ANOVA testu a post-hoc Tukey testu. Údaje boli vyhodnotené pomocou GraphPad Prism (verzia 7) (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Štatisticky významný rozdiel v porovnaní s kontrolnou skupinou bol zaznamenaný na hladine významnosti * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; a *** $p < 0,001$.

VÝSLEDKY

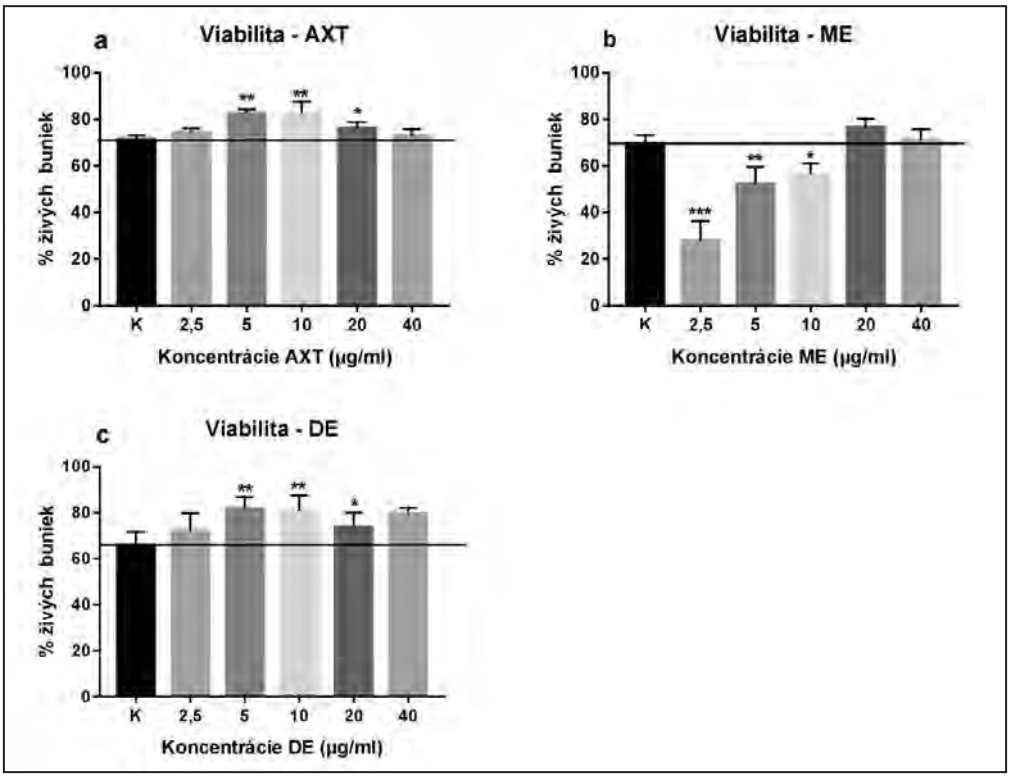
Účinky AXT, ME a DE na viabilitu splenocytov

Cytotoxická aktivita AXT, ME a DE na splenocyty bola hodnotená počítaním živých buniek v suspenzii po zafarbení 0,05 % trypánovou modrou a výpočtom podielu živých buniek z celkového počtu buniek. Ako je uvedené na obr. 2a, c, viabilita buniek kultivovaných s AXT a DE sa signifikantne zvýšila v porovnaní s nestimulovanými bunkami v kontrole pri koncentrácii 5, 10 a 20 µg.ml^{-1}. Cytotoxický účinok na viabilitu buniek nebol zaznamenaný ani pri koncentráciách 2,5 a 40 µg.ml^{-1}, kedy došlo len k minimálnemu zvýšeniu viability splenocytov v porovnaní s kontrolou. V prípade kultivácie buniek s ME bol pozorovaný opačný trend ako pri AXT a DE, kedy bol zaznamenaný výrazný cytotoxický účinok pri koncentráciách do 10 µg.ml^{-1} v porovnaní s neošetrenými bunkami v kontrole (viď obr. 2b). Vyššie koncentrácie ME naopak preukázali mierne stimulačný účinok na prežívanie buniek.

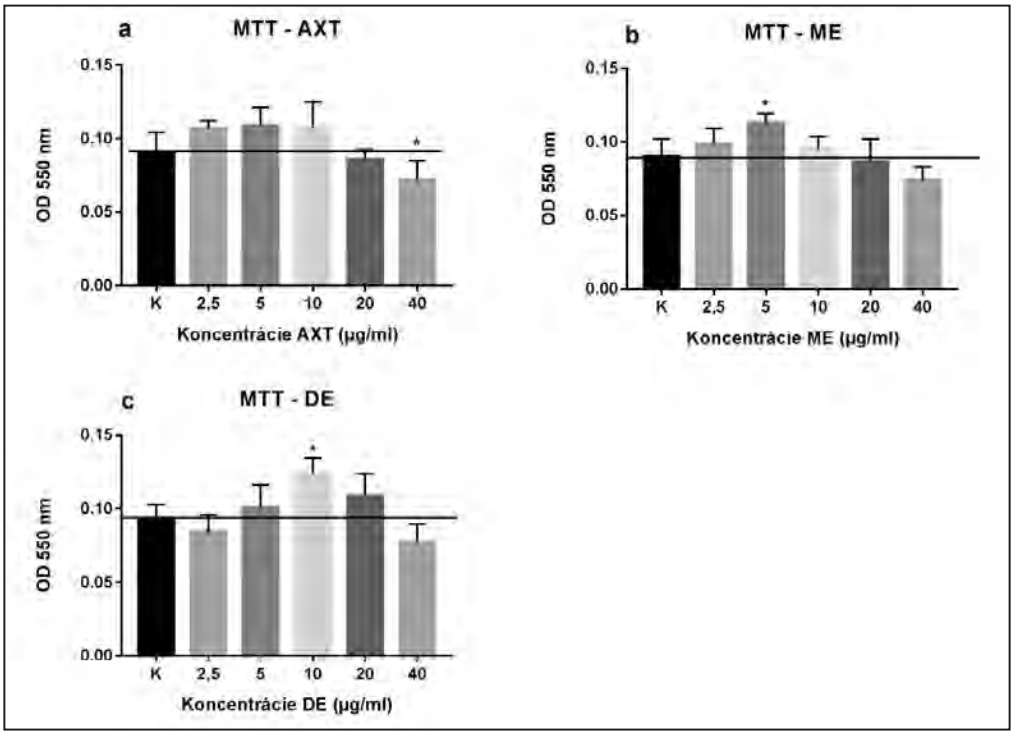
Účinky AXT, ME a DE na metabolickú aktivitu splenocytov vyhodnotené MTT testom

MTT test je kolorimetrický test, ktorý sa využíva primárne na hodnotenie metabolickej aktivity buniek, ktorá je úmerná životnosti buniek. Enzýmy oxidoreduktázy závislé od NAD(P)H redukujú tetrazoliové farbivo 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazóliumbromid na nerozpustné kryštály formazánu. Pomocou tohto testu sme sledovali koncentračne závislý účinok AXT, ME a DE na zmeny v metabolickej aktivite splenocytov. Ako vidieť na obr. 3a, b, AXT a ME mali stimulačný účinok na

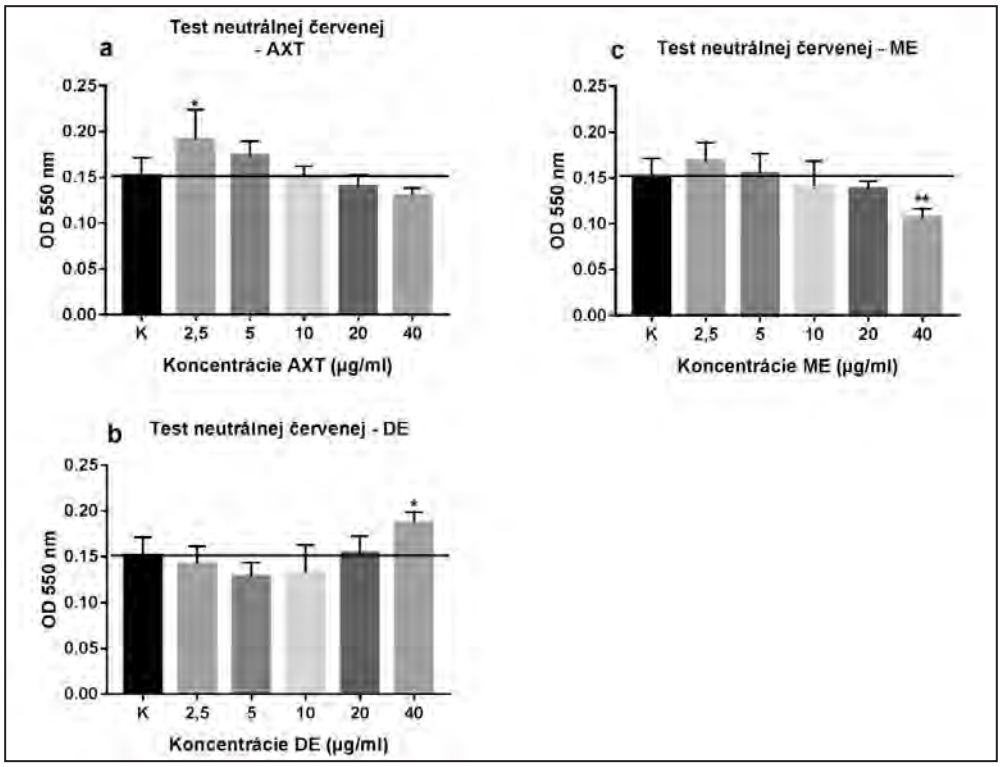
Obr. 2: Viabilita splenocytov *in vitro* na základe absorpcie trypánovej modrej po 24- hodinovej kultivácii v termostate pri teplote 37 °C a 5 % CO_2 atmosfére: (a) extrakt (AXT), (b) monoestery (ME), (c) diestery (DE). Signifikantne odlišné hodnoty v porovnaní s kontrolou: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.



Obr. 3: Koncentračne závislý účinok astaxantínového extraktu (AXT; a), monoesterov (ME; b) a diesterov (DE; c) na metabolickú aktivitu splenocytov po 24-hod inkubácii (MTT test). Signifikantne odlišné hodnoty v porovnaní s kontrolou boli označené ako * p < 0,05.



Obr. 4: Koncentračne závislý cytotoxický účinok astaxantínového extraktu (AXT; a), monoesterov (ME; b) a diesterov (DE; c) na splenocyty po 24-hod inkubácii sledovaný na základe absorpcie neutrálnej červenej. Signifikantne rozdielne hodnoty v porovnaní s kontrolou boli označené ako * p < 0,05; ** p < 0,01.

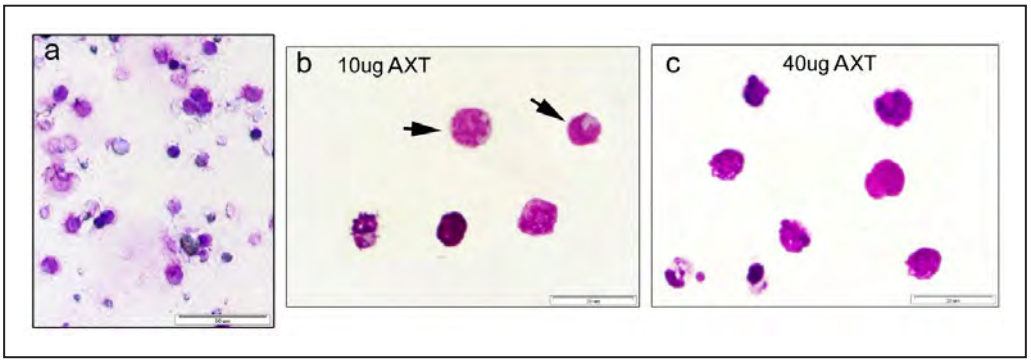


metabolickú aktivitu splenocytov pri koncentráciách ≤ 10 µg.ml^{-1} ($p < 0,05$ pre ME). DE stimulovali metabolickú aktivitu pri vyšších koncentráciách od 5 do 20 µg.ml^{-1} (viď obr. 3c). V porovnaní s kontrolnou skupinou bola inhibícia metabolickej aktivity zaznamenaná v prípade všetkých troch látok pri koncentrácii 40 µg.ml^{-1}, najviac v prípade AXT ($p < 0,05$).

Cytotoxické účinky AXT, ME a DE na splenocyty sledované na základe absorpcie farbiva neutrálna červená

Účinky AXT, ME a DE boli hodnotené aj na základe schopnosti živých buniek aktívne transportovať neutrálnu červenú cez membrány a následne ju inkorporovať do lyzozómov, v dôsledku čoho živé bunky získali červené sfarbenie. Z výsledkov na obr. 4a, b vyplýva, že AXT a ME nepôsobili cytotoxicky na splenocyty po 24-hodinovej kultivácii s koncentráciami ≤ 10 µg.ml^{-1} ($p < 0,05$ pre 2,5 µg.ml^{-1} AXT). Vyššie koncentrácie oboch látok (20 a 40 µg.ml^{-1}) boli pre bunky mierne toxické a najvýznamnejší inhibičný účinok na absorpciu farbiva bol zaznamenaný pri koncentrácii 40 µg.ml^{-1} v prípade kultivácie buniek s ME (viď obr. 4b), čo koreluje s výsledkami z testu metabolickej aktivity prostredníctvom MTT testu. Ako vidieť na obr. 4c, DE ovplyvnili absorpciu, a teda viabilitu buniek rozdielnym spôsobom. Kým nižšie koncentrácie ≤ 10 pôsobili mierne cytotoxicky, vyššie koncentrácie od 20 µg.ml^{-1} mali stimulačný efekt na aktívny transport farbiva a teda ich životnosť. Predpokladáme, že tieto rozdielne účinky DE v porovnaní s MTT testom boli spôsobené inými mechanizmami.

Obr. 5: Morfológia zdravých splenocytov (a) a splenocytov po 24-hod inkubácii s extraktom astaxantínu (AXT) v koncentrácii b) 10 µg.ml^{-1} a c) 40 µg.ml^{-1}. Lymfocyty s fyziologickým tvarom sú znázornené šípkami.



Účinky AXT, ME a DE na morfologické zmeny buniek

Na náteroch buniek po inkubácii s AXT, ME a DE sme sledovali, či výsledky predchádzajúcich testov korelujú s výskytom morfologicky zmenených buniek v porovnaní s neovplyvnenými bunkami a bunkami bez kultivácie. Vo všetkých skupinách, teda aj v kontrole po inkubácii v uvedených podmienkach došlo k miernym zmenám a afinite ku kyslým farbivám, čo sa prejavilo purpurovým sfarbením jadier. Po *in vitro* inkubácii buniek s AXT, ME a DE do 10 µg.ml^{-1} dochádzalo len k miernemu nárastu počtu buniek, u ktorých boli detegované morfologické zmeny jadra oproti bunkám v kontrole a prevažovali lymfocyty s normálnym okrúhlym tvarom, i keď jadrá nemali typický okrúhly tvar (viď obr. 5a). Najvyšší počet buniek s poškodenou morfológiou, fragmentovaným jadrom, pravdepodobne v stave apoptózy, sme zistili pri koncentráciách 40 µg.ml^{-1}, pričom najvýraznejšie účinky boli pozorované v prípade ME (viď obr. 5b, c).

DISKUSIA

Astaxantín je tmavočervený karotenoid prítomný prevažne v mikroorganizmoch a morských živočíchoch. Dosiaľ na svetovom trhu dominovala jeho synteticky pripravovaná forma, avšak v súčasnosti je zvýšený záujem hlavne o prírodný AXT izolovaný zo zelených rias *H. pluvialis* a kvasiniek *P. rhodozyma*. Táto prírodná látka je využívaná najmä na prevenciu a liečbu mnohých ochorení, vrátane tých, ktoré sú spôsobené oxidačným stresom (Higuera-Ciapara a kol., 2006). Výhodou je, že u AXT neboli potvrdené žiadne vedľajšie účinky *in vitro* a *in vivo*, avšak štúdie týkajúce sa priamo vplyvu tejto látky a jej esterifikovaných foriem na imunitné bunky zatiaľ nie sú známe.

V našej štúdii sme sa zamerali na porovnanie účinkov nižších dávok (2,5; 5; 10 µg.ml^{-1}) a vyšších dávok (20 a 40 µg.ml^{-1}) astaxantínu a jeho esterov na T-lymfocyty izolované zo sleziny zdravých Balb/c myší. V prvej časti sme sledovali koncentračne závislý účinok AXT a jeho esterov na viabilitu buniek. Z výsledkov vyplýva, že koncentrácie do 10 µg.ml^{-1} mali v prípade kultivácie s AXT a DE stimulačný účinok. Rovnaký trend sa nám v prípade ME nepodarilo dokázať, naopak, po 24-hodinovej kultivácii nízke koncentrácie tejto látky vykazovali vysokú mieru cytotoxicity na bunky. Predpokladáme, že ME môžu byť toxickejšie, avšak je možné, že tieto výsledky boli ovplyvnené aj inými mechanizmami v bunke, ktoré vznikli v dôsledku kultivácie, prípadne nepresnosťou samotnej metódy. Lin a kol. (2015) sledovali imunomodulačné účinky astaxantínu na produkciu cytokínov lymfocytov v

in vivo aj *ex vitro* podmienkach. Zistili, že vysoké dávky astaxantínu (70 – 300 nM) neboli pre bunky cytotoxické, avšak proliferácia lymfocytov bola stimulovaná lipopolysacharidom (LPS, 100 $g.ml^{-1}$) a konkanavalínom A (Con A, 10 $g.ml^{-1}$). Metabolizmus buniek stimulovaných LPS a Con A sa odlišuje od bazálneho metabolizmu nestimulovanej bunky. Najvýznamnejšou metabolickou zmenou po aktivácii naivných T-lymfocytov je zvýšenie metabolizmu glukózy a aeróbna glykolýza, ktorá je špecifickou metabolickou adaptáciou známou ako Warburgov efekt. Okrem metabolizmu glukózy sú však počas prechodu z pokojového stavu do aktivovaného ovplyvňované aj ďalšie katabolické a anabolické bunkové dráhy. Viaceré štúdie dokázali, že dôležitú úlohu má aj metabolizmus mastných kyselín. Indukcia biosyntézy lipidov je významnou súčasťou aktivačného procesu T-lymfocytov, ktorá priamo spája metabolizmus glukózy s *de novo* syntézou mastných kyselín (Wang a kol., 2011; Kidani a kol., 2013; Berod a kol., 2014). Stimulované imunitné bunky majú vyššie energetické nároky, a preto ani vyššie koncentrácie astaxantínu, ktoré testovali Lin a kol. (2015), neboli pre bunky cytotoxické. V našej štúdii sme viabilitu buniek ďalej overili aj prostredníctvom stanovenia účinkov sledovaných látok na metabolickú aktivitu pomocou MTT testu. Naše výsledky potvrdili, že AXT, ME a DE majú pri koncentráciách 5 a 10 $\mu g.ml^{-1}$ stimulačný účinok na metabolizmus imunitných buniek, avšak vyššie dávky pôsobili na bunky mierne cytotoxicky. Predpokladá sa, že redukcia MTT, ale aj iných tetrazoliových farbív závisí od metabolickej aktivity bunky v dôsledku toku NAD(P)H (Berridge a Tan, 1993). Bunky s nízkym metabolizmom, ako sú splenocyty, ale aj tymocyty, sú schopné redukovať menšie množstvá MTT. Naopak, rýchlo sa deliace bunky vykazujú vysokú mieru redukcie MTT. Angius a Floris (2015) zistili, že k redukcii MTT môže dochádzať aj spontánne v lipidových štruktúrach, a to bez enzymatickej katalýzy, čo môže ovplyvniť výsledky hodnotenia metabolickej aktivity týmto testom. Účinky sledovaných látok na životnosť splenocytov sme hodnotili aj na základe aktívneho transportu molekúl cez cytoplazmatickú membránu na základe prijímania neutrálnej červenej. Týmto testom sa nám podarilo potvrdiť, že najpriaznivejší vplyv na aktivitu buniek mali nízke koncentrácie účinných látok. Tieto výsledky boli v zhode s výsledkami z testu viability a metabolickej aktivity MTT testom, kde vyššie koncentrácie AXT, ME a DE pôsobili inhibične. Nízke koncentrácie DE sa však ukázali ako mierne nepriaznivé na aktívny transport molekúl. Odchýlky zaznamenané v našich výsledkoch v prípade testu viability, ale aj aktívneho transportu farbiva po kultivácii s esterifikovanými formami astaxantínu môžu byť spôsobené mechanizmom inkorporácie farbiva do bunky, ale aj ich chemickou štruktúrou. Giuffrida a kol. (2010) skúmali esterifikáciu skupiny karotenoidov – xantofylov, ktoré sa v prírode vyskytujú v neesterifikovanej forme, alebo v stabilnejšej esterifikovanej forme mastnými kyselinami ako monoestery a polyhydroxylované xantofyly. Vo svojej štúdii zistili, že esterifikácia nemení chromoforové vlastnosti molekuly karotenoidov, ale upravuje ich štruktúru, a preto môže ovplyvňovať aj chemické vlastnosti v závislosti od druhu mastnej kyseliny naviazanej na molekulu karotenoidu. Navyše dokázali, že esterifikácia zvyšuje rozpustnosť karotenoidov v lipidoch, s ktorými sú v prírode spojené, čím sa zvýši ich biologická dostupnosť. Na základe týchto výsledkov predpokladáme, že nižšie dávky ME a DE, ktoré pôsobili mierne cytotoxicky, boli rozpustené v membránových a bunkových lipidoch, a z toho dôvodu aj dostupnejšie pre spracovanie metabolizmom bunky. Vysoká antioxidačná aktivita astaxantínu tiež mohla zapríčiniť vychytanie všetkých ROS vzniknutých počas bazálneho metabolizmu bunky, alebo v dôsledku stresu vzniknutého kultiváciou a narušiť homeostázu. Početné výskumy dokázali, že reaktívne formy kyslíka fungujú ako dôležité fyziologické regulátory intracelulárnych dráh (D'Autréaux a Toledano, 2007; Finkel, 2011; Zhang a kol., 2016). Zistilo sa, že redoxná rovnováha je kľúčová pre fyziologické,

ale aj patologické procesy v bunkách v dôsledku schopnosti ROS aktivovať alebo deaktivovať rôzne receptory, proteíny, ióny a ďalšie signálne molekuly. V prípade, že je táto rovnováha narušená nadmernou akumuláciou, alebo naopak nedostatkom ROS, dochádza k ovplyvneniu veľkého počtu signálnych dráh, ktoré následne vedú k dysfunkcii bunky a k rozvoju patologických stavov. V poslednej časti nášho experimentu sme sledovali koncentračne závislé účinky AXT, ME a DE na morfologické zmeny buniek a ich jadier. Viaceré štúdie potvrdili, že nestimulované lymfocyty sleziny sú citlivejšie na pôsobenie rôznych chemických látok, ktoré vyústia do poškodenia membrány jadra a môžu následne viesť k bunkovej smrti. Pomer morfologicky zmenených buniek koreloval s výsledkami predchádzajúcich testov.

ZÁVER

Štúdiom účinkov astaxantínu a jeho esterov na nestimulované lymfocyty izolované zo sleziny zdravých myší sme zistili, že dávky účinných látok do 10 $\mu g.ml^{-1}$ mali stimulačný efekt na fyziologické funkcie imunitných buniek, naopak vyššie dávky – 20 a 40 $\mu g.ml^{-1}$ pôsobili cytotoxicky. ME sa ukázali ako cytotoxickejšie pri vysokých koncentráciách v porovnaní s DE, ktorých vyššie dávky mali skôr stimulačný účinok na metabolizmus buniek. Tieto výsledky potvrdili aj morfologické zmeny jadier, ku ktorým dochádzalo po kultivácii s vysokými koncentráciami sledovaných látok. Výsledky testov preukázali, že pri pôsobení astaxantínového extraktu dochádza pravdepodobne k vyrovnaniu antagonistických účinkov ME a DE na základné fyziologické procesy v bunkách pozorovaných pri vysokých a nízkych koncentráciách týchto látok.

POĎAKOVANIE

Za poskytnutie účinnej látky astaxantínu a jeho esterov použitých v tejto štúdii ďakujeme Mgr. Tereze Fábryovej z Farmateutickej fakulty Karlovej Univerzity, Hradec Králové, Česká republika. Poďakovanie patrí aj Centru Algatech, Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i. – vedecké pracovisko Třeboň, Česká republika, v ktorom boli látky izolované. Výsledky prezentované v tejto štúdii boli získané v rámci riešenia projektu APVV 17-0410, a tiež bilaterálneho projektu SAV-AV ČR No. 18–24.

ZOZNAM LITERATÚRY

Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S., Aswathanarayana, R. G.: Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications – a review. *Marine drugs*, 2014, 12 (1), 128 – 152.

Angius, F., Floris, A.: Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair. *Toxicol. In Vitro*, 2015, 29, 314 – 319.

Berod, L., Friedrich, C., Nandan, A., Freitag, J., Hagemann, S., Harmrolfs, K., Sandouk, A., Hesse, C., Castro, C. N., Bähre, H., Tschirner, S. K., Gorinski, N., Gohmert, M., Mayer, C. T., Huehn, J., Ponimaskin, E., Abraham, W. R., Müller, R., Lochner, M., Sparwasser, T.: *De novo* fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. *Nat. Med.*, 2014, 20 (11), 1327 – 1333.

Berridge, M. V., Tan, A. S.: Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, 303 (2), 474 – 482.

Chew, B. P., Park, J. S.: Carotenoid action on the immune response. *J. Nutr.*, 2004, 134 (1), 257S – 261S.

D'Autréaux, B., Toledano, M.: ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2007, 8 (10), 813 – 824.

Fábryová, T., Tůmová, L., Correia da Silva, D., Pereira, D. M., Andrade, P. B., Valentão,

P., Hrouzeka, P., Kopecky, J., Cheela, J.: Isolation of astaxanthin monoesters from the microalgae *Haematococcus pluvialis* by high performance countercurrent chromatography (HPCCC) combined with high performance liquid chromatography (HPLC). *Algal. Research.,* 2020, 49, 101 947.

Finkel, T.: Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell. Biol.*, 2011, 194 (1), 7 – 15.

Giuffrida, D., Dugo, P., Salvo, A., Saitta, M., Dugo, G.: Free carotenoid and carotenoid ester composition in native orange juices of different varieties. *Fruits*, 2010, 65 (5), 277 – 284.

Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea, F. M.: Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 2006, 46 (2), 185 – 196.

Kidani, Y., Elsaesser, H., Hock, M. B., Vergnes, L., Williams, K. J., Argus, J. P., Marbois, B. N., Komisopoulou, E., Wilson, E. B., Osborne, T. F., Graeber, T. G., Reue, K., Brooks, D. G., Bensinger, S. J.: Sterol regulatory element-binding proteins are essential for the metabolic programming of effector T cells and adaptive immunity. *Nat. Immunol.,* 2013, 14 (5), 489 – 499.

Lin, K. H., Lin, K. C., Lu, W. J., Thomas, P. A., Jayakumar, T., Sheu, J. R.: Astaxanthin, a carotenoid, stimulates immune responses by enhancing IFN-γ and IL-2 secretion in primary cultured lymphocytes *in vitro* and *ex vivo*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 17 (1), 44.

McNulty, H. P., Byun, J., Lockwood, S. F., Jacob, R. F., Mason, R. P.: Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2007, 1768 (1), 167 – 174.

Miki, W.: Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.,* 1991, 63 (1), 141 – 146.

O'Connor, I., O'Brien, N.: Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.*, 1998, 16 (3), 226 – 230.

Olaizola, M.: Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *J. Appl. Phycol.,* 2000, 12, 499 – 506.

Palozza, P, Krinsky, N. I.: Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, 297 (2), 291 – 295.

Park, J. S., Chyun, J. H., Kim, Y. K., Line, L. L., Chew, B. P.: Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutr. Metab.,* 2010, 7, 18 – 27.

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J. L.: Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.*, 2008, 3 (7), 1125 – 1131.

Siddique, S., Syed, Q., Adnan, A., Qureshi, F. A.: Isolation, characterization and selection of avermectin-producing *Streptomyces avermitilis* strains from soil samples. *Jundishapur. J. Microbiol.,* 2014, 7 (6), e10366.

Wang, R., Dillon, C. P., Shi, L. Z., Milasta, S., Carter, R., Finkelstein, D., McCormick, L. L., Fitzgerald, P., Chi, H., Munger, J., Green, D. R.: The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*, 2011, 35 (6), 871 – 882.

Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., Dong, W.: ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.,* 2016, 2016, 4 350 965.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 2: 48 – 56, 2021

STANOVENIE ANTIOXIDAČNEJ AKTIVITY FLAVONOIDOV ZÍSKANÝCH ZO SEMIEN VINIČA HROZNORODÉHO

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FLAVONOIDS OBTAINED FROM GRAPE VINES

Tkáčová, Katarína; Harvanová, Jarmila

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

jarmila.harvanova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Extrakty z viniča hroznorodého (*Vitis vinifera*) majú viacero pozitívnych účinkov na ľudské zdravie, ako napríklad antioxidačné, antimikrobiálne, protizápalové účinky, pôsobia tiež priaznivo na kardiovaskulárny systém. Najdôležitejšiu skupinu bioaktívnych látok predstavujú polyfenolové zlúčeniny, ktoré disponujú silnou antioxidačnou aktivitou. Štúdia sa zaoberá stanovením antioxidačnej aktivity flavonoidov získaných zo semien viniča hroznorodého. Na izoláciu polyfenolových látok sa použilo viacero extrakčných metód, pre samotné stanovenie antioxidačnej aktivity boli použité extrakty získané maceráciou. Spolu sa testovali 4 vzorky semien hrozna, dve pochádzajúce z vlastného zdroja z okolia Trebišova (vzorky H1 – odroda Furmint a H2 – odroda Tramín červený) a dve vzorky zo semien boli zakúpené ako výživový doplnok (HM – múka z hroznových semien, HJ – mleté hroznové semená). Antioxidačná aktivita sa stanovila pomocou metódy DPPH, ktorá je založená na prenose elektrónov voľných radikálov a využíva sledovanie zmeny zafarbenia DPPH radikálu spektrofotometricky. Na kvalitatívne stanovenie obsahových látok extraktov bola použitá NMR spektroskopická analýza (1D NMR). Antimikrobiálna aktivita vzoriek sa testovala na kmene baktérií *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Pozoroval sa význam polarity použitého rozpúšťadla, nakoľko flavonoidy sú látky polárne. Najlepšia antioxidačná aktivita bola pozorovaná u vzorky H1 s hodnotou IC_{50} 1,1271 mg.ml^{-1} získanej extrakciou pomocou etanolu. Najmenšia nameraná antioxidačná aktivita bola u vzorky HM 4,1399 mg.ml^{-1} získanej extrakciou pomocou hexánu. Prostredníctvom ^{1}H NMR metódy sa u vzoriek potvrdila prítomnosť polyfenolových zlúčenín,

ktoré sú zodpovedné za antioxidačnú aktivitu. Najvyššiu antimikrobiálnu účinnosť mala vzorka H2 s hodnotou RIZD 150,00 % na *E. coli* a 223,16% na *S. aureus*.

Kľúčové slová: antioxidačná aktivita; extrakty z hroznových semien; polyfenolické zlúčeniny

ABSTRACT

Extracts of grapevine (*Vitis vinifera*) have several positive effects on human health, such as antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory. They also have beneficial effect on the cardiovascular system. The most important group of bioactive substances are polyphenolic compounds, which have strong antioxidant activity. The study determinates the antioxidant activity of flavonoids obtained from grape seeds. Several extraction methods were used to isolate the polyphenols. Measurement results were revised using maceration. A total of 4 samples were tested. Two coming from village nearby Trebišov (samples H1 – variety Furmint and H2 – variety Tramin červeny) and two were purchased as a nutritional supplement (HM – grape seed flour, HJ – ground grape seed). Antioxidant activity was determined by the DPPH method, which is based on electron transfer of free radicals and in which colour changes of DPPH radical are observed spectrophotometrically. NMR spectroscopic analysis (1D NMR) was used for the qualitative determination of the contents of the extracts. The antimicrobial activity of the samples was tested on strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The importance of polarity of the solvent was also observed, as flavonoids are polar substances. The best sample with antioxidant effects appeared to be sample H1 with an IC_{50} value of 1.1271 $mg.ml^{-1}$, obtained by extraction with ethanol. Compared to that, the smallest measured antioxidant effect had sample HM with value 4.1399 $mg.ml^{-1}$ after extraction with hexane. The presence of polyphenolic compounds responsible for antioxidant activity was detected in every sample by ^{1}H NMR method. The highest antimicrobial value was in the H2 sample with a RIZD value of 150.00% for *E. coli* and 223.16% for *S. aureus*.

Key words: antioxidant activity; grape seed extracts; polyphenolic compounds

ÚVOD

Vinič hroznorodý (*Vitis vinifera* L.) patrí starým kultúram odrôd viniča a pestuje sa pre produkciu hrozna a vína na rozsiahlych plochách vo svete. Pri výrobe vína vzniká približne 25 % hmotnosti hrozna ako vedľajší produkt/odpad (nazývaný ako „výlisky," ktorý sa skladá zo šupiek a semien) (Dwyer, 2014). Semená obsahujú vysoké množstvo fenolových zlúčenín, čo má pozitívny účinok pre ľudské zdravie. Polyfenoly, a najmä proantokyanidíny, predstavujú najdôležitejšiu skupinu bioaktívnych zložiek v semenách hrozna, ktoré majú silnú antioxidačnú aktivitu (Calvo, 2017). Fenoly predstavujú tretiu najpočetnejšiu obsahovú látku v hrozne a víne po uhľohydrátoch a ovocných kyselinách. Najmenej extrahovateľných fenolov (10 %) bolo nameraných v dužine, potom v šupke (25 – 28 %) a najviac (60 – 70 %) v semene. Najčastejšie sa vyskytujúcimi fenolmi izolovanými z hroznových semien sú katechíny (katechín, epikatechín a procyanidíny) a ich polyméry. Zloženie fenolov červeného hrozna sa líši od zloženia bieleho hrozna. Antokyány sú hlavnými farbivami červeného hrozna (Shi, 2003). Stilbény patria medzi významné obsahové látky vyskytujúce sa vo viniči, najznámejší zástupca je resveratrol. Resveratrol prispieva k odolnosti voči chorobám viniča (plesňové infekcie), jeho konzumácia je vysoko prospešná pre ľudské zdravie so svojimi antirakovinovými, antioxidačnými účinkami, tiež je významný v redukcii kardiovaskulárnych chorôb (Shi, 2014). Extrakt zo semien hrozna obsahuje nenasýtené mastné kyse-

liny. Najviac prítomná je kyselina linolová, nasleduje kyselina olejová, palmitová, stearová a kyselina palmitolejová (Da Porto, 2013). Olej z hroznových semien sa predáva ako potravinový a kozmetický výrobok, pretože obsahuje nenasýtené mastné kyseliny a antioxidanty. Extrakty z hrozna majú vo všeobecnosti viacero pozitívnych účinkov na ľudské zdravie, vrátane antioxidačného, protizápalového, antimikrobiálneho, antikarcinogénneho účinku, priaznivo pôsobia na kardiovaskulárnu aktivitu a majú mnoho iných priaznivých efektov. Preto rastie záujem spoločnosti o využitie potenciálu tohto rastlinného druhu a produktov z neho v potravinárskom, farmaceutickom a kozmetickom priemysle. V prípade hrozna *Vitis vinifera* L. sa ukázalo, že výťažky sú využiteľné v potravinárskom priemysle (konzervácia potravinových výrobkov), ako aj v prípade nutraceutík alebo doplnkov pre zdravie, a to z dôvodu ich širokého spektra farmakologických účinkov (Calvo, 2017).

MATERIÁL A METÓDY

Prístrojové vybavenie

Spektrofotometer (Agilent Technologies Cary 60 UV-VIS, USA), rotačná vákuová odparka (IKA RV 10 digital, Nemecko), NMR spektrometer VNMRS 600 MHz (Varian, Palo Alto, Kalifornia, USA)

Chemikálie

DMSO – dimetylsulfoxid (Merck Millipore, Nemecko), DMSO-*d6* (Merck Millipore, Nemecko), etanol, hexán, acetón (Sigma-Aldrich, Bratislava, SR), destilovaná H2O – destilovaná voda (Merck Millipore, Bratislava, SR), DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylový radikál (Sigma-Aldrich, Bratislava, SR)

Vzorky

Vzorka č. 1 – H1:

Vysušené hroznové semená z vlastného zdroja 1

Vzorka č. 2 – H2:

Vysušené hroznové semená z vlastného zdroja 2

Vzorka č. 3 – HM:

Múka z hroznových semien

Vzorka č. 4 – HJ:

Mleté hroznové semená

Vzorky H1 a H2 boli získané z vlastných zdrojov z vinice od lokálnych pestovateľov v okolí Trebišova ako odpad pri výrobe vína. Konkrétne pri vzorke H1 ide o odrodu Furmint a pri vzorke H2 o odrodu Tramín červený. Semená boli odizolované a uchovávané v mrazničke. Vzorky HM a HJ boli zakúpené od internetového predajcu bio produktov. Adresa výrobcu je v západnej oblasti Slovenska v obci Jelka pri Sládkovičove. Cieľom tejto kúpy a následným zisťovaním antioxidačnej aktivity bolo porovnať tieto priemyselné výrobky s hroznovými semenami získanými prirodzeným spôsobom – pestovaním.

Extrakcia

V štúdii bola použitá extrakcia podľa Soxhleta a macerácia. Na extrakciu podľa Soxhleta sa použila aparatúra, ktorá pozostávala z: varnej banky (s varnými kamienkami), Soxhletovho nástavca, spätného chladiča (prívod vody zospodu), ohrevu (elektrického hniezda). 5 g vzorky sa vložilo do patróny (obalu), ktorá sa vyrobila z filtračného papiera a umiestnila sa v nástavci. Počas extrakcie sa kontroloval počet prepadov rozpúšťadla a charakter extraktu. Vzorky sa nechali extrahovať tak dlho, aby sa dosiahlo celkovo 5 prepadov rozpúšťadla. Na extrakciu boli použité rozpúšťadlá: etanol, acetón a hexán. 5 g pomletých semien bolo zmiešaných so 100 ml extrakčného činidla. Zmes bola premiešaná a nechala sa odstáť na 24 hodín. Rozpúšťadlo z filtrátu bolo odparené dvoma spôsobmi, a to pomocou vákuovej odparky a v sušiarni. Na sériovú extrakciu bola použitá voda, následne hexán a etanol. Následne sa u takto pripravených extraktov stanovila antioxidačná, antimikrobiálna aktivita, a na kvalitatívne stanovenie chemických zlúčenín sa využila NMR spektroskopia.

Antioxidačná aktivita

Antioxidačná aktivita sa stanovila pomocou metódy využívajúcej radikál DPPH. Princíp tejto

metódy je založený na prenose elektrónov voľných radikálov a využíva sledovanie zmeny zafarbenia DPPH radikálu spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 517 nm. V prítomnosti antioxidačných molekúl (extraktov) je DPPH (stabilný voľný radikál s tmavofialovým zafarbením) schopný prijať elektrón alebo atóm vodíka, kedy vzniká ešte viac stabilná molekula DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Redukovaná forma DPPH-H je svetlo-žltá. Čím väčšia je vychytávacia schopnosť voľných radikálov antioxidantmi, tým je väčšia schopnosť redukcie DPPH a dochádza k odfarbovaniu fialovej farby vo vzorke (Carmona-Jimenez, 2014). Antioxidačná aktivita sa vyjadrila ako hodnota IC_{50}, ktorá sa ukázala ako koncentrácia vzorky, pri ktorej bolo vychytaných 50 % radikálov DPPH (Indis, 2016). Pripravilo sa 5 skúmaviek pre každú zo štyroch vzoriek. Do prvých skúmaviek sa pridalo 2 mg vzorky a 2 ml metanolu (C_2H_5OH). Vzorky sa riedili pomerom 1:1. Získalo sa 5 koncentrácií: 10 $mg.ml^{-1}$; 5 $mg.ml^{-1}$; 2,5 $mg.ml^{-1}$; 1,25 $mg.ml^{-1}$; 0,625 $mg.ml^{-1}$. Do každej nariedenej skúmavky sa pridal 1 ml roztoku DPPH (metanolový roztok 0,2 $mmol.l^{-1}$ = 7,8 mg DPPH v 100 ml metanolu). Takto pripravené roztoky sa nechali v tme pri teplote 25 °C po dobu 30 minút. Pri vlnovej dĺžke 517 nm sa na spektrofotometri merali absorbancie každej vzorky. Ako referenčný roztok sa použili 2 ml metanolu a ako slepá vzorka bol použitý roztok pripravený zmiešaním 1 ml roztoku DPPH s 1 ml metanolu a bola odmeraná absorbancia. Následne sa odmeriavali absorbancie všetkých vzoriek trikrát a výsledná hodnota sa spriemerovala. Podľa vzorca:

$$\frac{A_{(DPPH)} - Avz}{A_{(DPPH)}} \times 100\ \%$$

sa vypočítal I (%) – inhibícia aktivity DPPH radikálu, teda antioxidačná aktivita, kde ADPPH je absorbancia DPPH roztoku, Avz je absorbancia vzorky. Pre výpočet hodnoty IC_{50} sa pre každú jednu vzorku zostrojil graf závislosti antioxidačnej aktivity od koncentrácie vzorky a pomocou trendovej priamky a jej rovnice sa získala daná hodnota.

Antimikrobiálna aktivita

Pre stanovenie antimikrobiálnej aktivity extraktov sa použila platňová agarová difúzna metóda podľa Rojasa a kol. (2006). Baktérie určené na testovanie – *Staphylococus aureus* (SA) a *Escherichia coli* (EC), získané z Českej zbierky mikroorganizmov v Brne, boli kultivované v bujóne BHI (Brain Heart Infusion broth, Oxoid) po dobu 20 hodín pri teplote 37 °C. Baktérie boli následne po kultivácii nariedené na koncentráciu 0,5 – 1,0 McFarlandovej zákalovej stupnice vo fosfátovom fyziologickom roztoku. Takto pripravené inokulum bolo nanesené na povrch živného agaru sterilným tampónom a rozotreté v troch smeroch tak, aby bol inokulovaný celý povrch pôdy. Proces inokulácie sa opakuje dvakrát s 15-minútovým odstupom. Do Petriho misiek s priemerom 9 cm sa vylialo 20 ml agaru a po stuhnutí do neho boli vyrezané jamky s priemerom 0,5 cm, kde sa následne aplikovali jednotlivé koncentrácie testovaných látok v množstve 30 µl. Platne boli inkubované 24 hodín pri teplote 37 °C a po uplynutí inkubačnej doby bola odmeraná veľkosť inhibičných zón. Ako pozitívna kontrola bol použitý vodný roztok 25 $\mu g.ml^{-1}$ gentamycín-sulfátu a ako negatívna kontrola DMSO (dimetylsulfoxid). Antibakteriálny účinok extraktov je vypočítaný podľa vzorca:

$$\frac{RIZD = (IZD\ (vzorka) - IZD\ (negatívna\ kontrola)}{(IZD\ (pozitívna\ kontrola)} \times 100\ \%$$

kde RIZD je uvádzaný v percentách priemernej relatívnej inhibičnej zóny a IZD je priemer inhibičnej zóny v mm. IZD vzoriek aj kontrol sme určili pomocou softvéru ImageJ.

Kvalitatívna analýza

Spektrálna analýza sa uskutočnila na spektrometri Varian VNMRS 600 MHz. Extrakty vzoriek H1, H2, HM, HJ (30 mg) sa rozpustili v 0,6 ml deuterovaného dimetylsulfoxidu (DMSO-*d6*) v kremenných NMR kyvetách. Určenie štruktúry chemických zlúčenín v extraktoch vzoriek si vyžadovalo analýzu 1D NMR spektier (^1H NMR). Pri spracovaní spektier bol

Tab. 1: Priemerné inhibičné koncentrácie pre vzorky po priamej extrakcii hexánom

VZORKA	IC_{50} (mg.ml^{-1})
H1	3,0489
H2	3,2393
HM	4,1399
HJ	3,8665

– rozpúšťadlo bolo odparené v laboratórnej sušiarni pri teplote do 35°C

Tab. 2: Priemerná inhibičná koncentrácia vzoriek po priamej extrakcii acetónom

VZORKA	IC_{50} (mg.ml^{-1})
H1	2,0127
H2	2,1199
HM	2,5644
HJ	2,1278

– rozpúšťadlo bolo odparené v laboratórnej sušiarni pri teplote do 35°C

Tab. 3: Priemerná inhibičná koncentrácia vzoriek po priamej extrakcii etanolom

VZORKA	IC_{50} (mg.ml^{-1})
H1	1,1271
H2	1,2952
HM	1,5371
HJ	1,2903

– rozpúšťadlo bolo odparené v laboratórnej sušiarni pri teplote do 35°C

Tab. 4: Priemerná inhibičná koncentrácia vzoriek po sériovej extrakcii s konečným rozpúšťadlom – etanolom

VZORKA	IC_{50} (mg.ml^{-1})
H1	1,5616
H2	1,6934
HM	1,9824
HJ	1,8586

– rozpúšťadlo bolo odparené v laboratórnej sušiarni pri teplote do 35°C

použitý softvér Mnova-MestReNova, verzia 11.0.4-18998, 2017 (Aboutanios, 2017).

VÝSLEDKY

Extrakcia a antioxidačná aktivita

V extrakcii podľa Soxhleta bola získaná najvyššia kvantita získaných látok hexánom (10 %), následne acetónom (7 %) a potom etanolom (4 %). V procese sériovej extrakcie podľa maceračnej metódy boli výťažnosti nižšie v porovnaní s priamou. extrakciou Pri extrakcii maceračnou metódou sa získali menšie výťažnosti v porovnaní s extrakciou podľa Soxhleta. Najväčšia výťažnosť sa získala u vzorky HM pri priamej extrakcii s acetónom, a to 6,3 %; a najnižšia u vzorky HJ pri sériovej extrakcii s etanolom (2,4 %). Pri stanovení antioxidačnej aktivity boli použité vzorky extraktov po macerácii a odparení rozpúšťadiel (hexán, acetón, etanol) v laboratórnej sušiarni pri teplote do 35 °C, nakoľko extrakty získané extrakciou podľa Soxhleta a odparením rozpúšťadla vo vákuovej odparke nevykazovali relevantné antioxidačné hodnoty. Najvyššiu IC_{50} hodnotu mala vzorka H1 (1,1271 mg.ml^{-1}) pri extrakcii etanolom a najnižšiu mala vzorka HM (4,1399 mg.ml^{-1}) pri extrakcii hexánom.

Antimikrobiálna aktivita

Antimikrobiálnu aktivitu na baktérie *S. aureus* a *E. coli* vykazovali všetky vzorky. Vypočítané hodnoty RIZD sú uvedené v tabuľke 5.

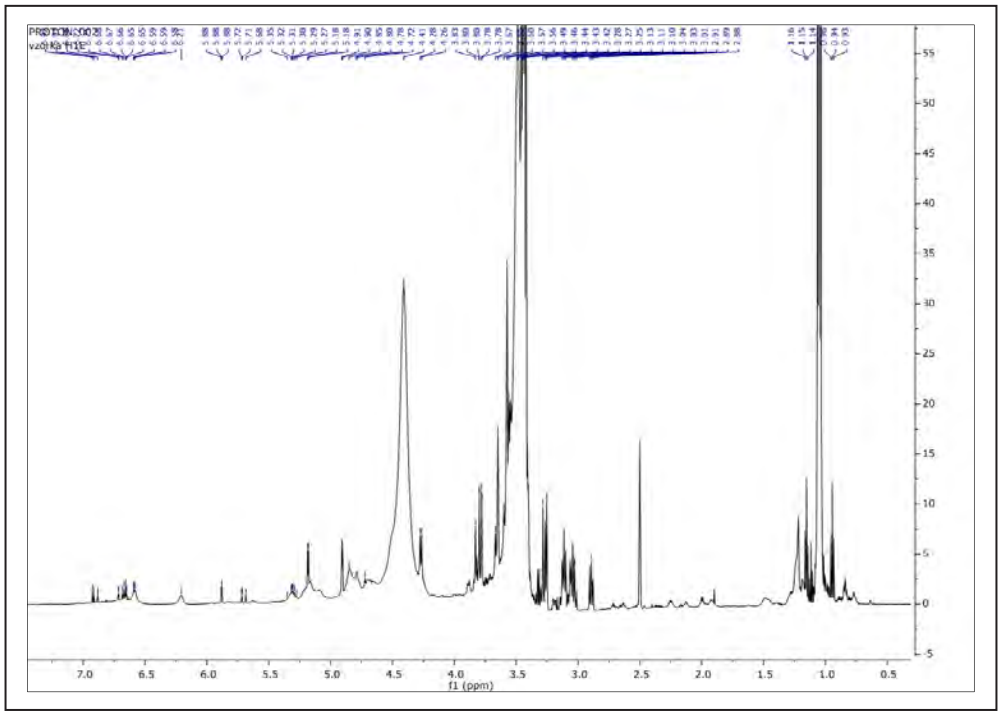
Kvalitatívna analýza

Pomocou ^{1}H NMR spektroskopie, porovnaním signálov s NMR databázou chemických zlúčenín a pomocou dostupnej literatúry, v spektrách našich vzoriek boli nájdené zmesi polysacharidov a aromatických zlúčenín. Signály protónov polysacharidov ležia v oblasti 3,0 – 5,0 ppm. Ich prítomnosť potvrdzuje znova poloha dubletových signálov vodíkov viazaných na anomérny atóm uhlíka pri 5,18 ppm; 4,91 ppm a 4,28 ppm. Zaujímavá je aromatická oblasť od 6,5 – 7,0 ppm, kde sa nachádza

Tab. 1: Priemerné inhibičné koncentrácie pre vzorky po priamej extrakcii hexánom

Vz.	Označenie na platničke	Množstvo vzorky (µl)	Množstvo DMSO (µl)	SA aktivita	RIZD (%)	EC aktivita	RIZD (%)
H1	3	30	160	áno	163,16	áno	141,41
H2	1	30	160	áno	223,16	áno	150,00
HM	4	30	160	áno	68,42	áno	77,34
HJ	2	30	160	áno	123,16	áno	67,97

Obr. 1: ^{1}H NMR spektrum extraktu vzorky H1 merané v DMSO



množstvo aromatických protónov viazaných na *sp*^{2} hybridizovanom atóme uhlíka. Vzhľadom na pôvod extraktov môžeme očakávať, že ide o antokyány. De La Cruz a kol. vo svojom výskume pri identifikovaní antokyánov z *Vitis vinifea* použitím NMR metódy uviedli, že ide o zlúčeniny monoglukozidové (glu) a diglukozidové (diglu) deriváty 5 antokyanidínov: delfinidín (DEL), cyanidín (CYA), petunidín (PET), peonidín (PEO) a malvidín (MAL) (De La Cruz, 2012). Vo vzorkách HM a HJ bola naviac zistená prítomnosť nenasýtených MK (mastných kyselín).

DISKUSIA

Extrakcia vzoriek:

Pracovalo sa s extraktmi štyroch vzoriek viniča hroznorodého. Vzorky H1 a H2 sú vysušené hroznové jadierka pochádzajúce z vlastného zdroja, vzorky HM a HJ sú zakúpené výživové doplnky (hroznová múka zo semien, mleté hroznové semená). V štúdii bola použitá extrakcia podľa Soxhleta a macerácia. Boli použité rozpúšťadla polárne (acetón, etanol) a nepolárne (hexán) pre priamu maceráciu, a pre sériovú s extrakčnými činidlami vodou, hexánom a

konečným rozpúšťadlom – etanolom. Zistilo sa, že teplota extrakcie sa javí ako dôležitý parameter. S teplotou rastie výťažnosť, ale klesá antioxidačná aktivita u látok s antioxidačnými vlastnosťami nachádzajúcimi sa v hroznových semenách. Pri extrakcii za vyššej teploty sa niektoré látky zodpovedné za antioxidačnú aktivity hroznových semien zrejme rozkladajú. Vyššia teplota môže viesť k strate antioxidačne aktívnych zlúčenín. Prvá vykonaná extrakcia vzoriek s použitím extrakcie podľa Soxhleta, pri ktorej je dosahovaná vysoká teplota, nevykazovala antioxidačnú aktivitu, pretože hlavné obsahové látky u hroznových semien, antokyány, sú pri vysokých teplotách nestabilné a rozkladajú sa (Songsermsakul, 2013). Preto pre ďalšie merania sa použili extrakty získané priamou a sériovou maceráciou. Pri odparovaní vo vákuovej odparke vzorky nevykazovali potrebné hodnoty pre antioxidačnú aktivitu. Kvôli zvýšenej citlivosti látok s antioxidačnými vlastnosťami získaných maceráciou pomletých hroznových semien sa odparovali použité rozpúšťadlá v laboratórnej sušiarni pri teplote do 35 ^{o}C. Rozdiely vo výťažnosti môžu byť spôsobené typom extrakcie alebo charakterom použitého rozpúšťadla, prípadne odlišným kvantitatívnym aj kvalitatívnym zložením obsahových látok v jednotlivých vzorkách. Získané hexánové, acetónové a etanolové extrakty boli použité na analýzu ich antioxidačnej a antimikrobiálnej aktivity a bolo analyzované ich kvalitatívne zloženie.

Antioxidačná aktivita:

Pre stanovenie antioxidačnej aktivity bola použitá metóda hodnotiaca elimináciu syntetického radikálu – DPPH. Pozostáva zo spektrofotometrického stanovenia absorbancie a z výpočtu strednej inhibičnej koncentrácie extraktov (IC_{50}). Rozdiely vo výsledkoch IC_{50} sa pozorovali pri použití rôznych typov rozpúšťadiel, konkrétne v rozdielnosti ich polarity. Riedenia sa používali 5; 2,5; 1,25 a 0,625 mg.ml^{-1}. Antioxidačná aktivita I (%) klesala priamoúmerne so znižujúcou sa koncentráciou. Najvyššia antioxidačná aktivita bola nameraná u vzorky H2 pri priamej extrakcii etanolom. Dôvodom môže byť povaha rozpúšťadla, keďže etanol je polárne rozpúšťadlo a obsahovým látkam s polárnymi vlastnosťami vo viniči hroznorodom sú pripisované antioxidačné účinky. Taktiež sa pri týchto extraktoch zaznamenala najnižšiu hodnotu IC_{50}, konkrétne u vzorky H1, a to 1,1271 mg.ml^{-1}. Čím je inhibičná koncentrácia u extraktu nižšia, tým má lepšie antioxidačné vlastnosti, teda menej množstva extraktu je potrebného na inhibíciu 50 % radikálu DPPH. Najnižšiu antioxidačnú aktivitu pri najnižšom riedení 5 mg.ml^{-1} sme zaznamenali pri vzorke HM (57,1 %) pri priamej extrakcii hexánom. Taktiež pri tomto extrakte vyšla aj najvyššia hodnota IC_{50} – 4,1399 mg.ml^{-1}, teda najnižšia antioxidačná účinnosť. Hexán je nepolárne rozpúšťadlo, a to je aj dôvod nízkej antioxidačnej schopnosti, keďže nepolárne obsahové látky viniča hroznorodého sú minimálne zodpovedné za antioxidačnú účinnosť. Pri použití priamej extrakcie acetónom vyšli hodnoty IC_{50} nižšie ako pri extrakcii hexánom, ale vyššie ako pri priamej a sériovej extrakcii etanolom. Z toho vyplýva, že antioxidačná účinnosť je vyššia pri priamej extrakcii acetónom ako pri extrakcii hexánom, ale nižšia ako pri priamej a sériovej extrakcii etanolom. Acetón prepúšťa látky polárne aj nepolárne, čo môže mať za následok vznik týchto hodnôt. Pri sériovej extrakcii s konečným rozpúšťadlom – etanolom boli hodnoty IC_{50} o niečo vyššie ako pri priamej extrakcii etanolom a nižšie ako pri extrakcii acetónom. Nižšie hodnoty antioxidačnej účinnosti sériovej extrakcie v porovnaní s priamou extrakciou etanolom sú výsledkom toho, že každá látka v sériovej extrakcii extrahuje aj časť látok, ktorú by extrahoval len samotný etanol. Pretože pri priamej extrakcii ide o extrakciu len jednou látkou, pri sériovej extrakcii sa začínala extrakcia vodou, ktorá odstraňuje polysacharidy, následne hexánom, ktorý odstraňuje nepolárne látky a nakoniec extrakcia etanolom, ktorý extrahuje antokyány s antioxidačnými vlastnosťami.

Antioxidačná aktivita v hroznových semenách je pripisovaná hlavne vysoko polárnym oligomerickým proantokyanidínom. *In vivo* štúdie ukázali, že

extrakt proantokyanidínu z hroznových semien je lepší vychytávač radikálov než alfa-tokoferol alebo beta-karotén (Songsermsakul, 2013). Hroznové semená prioritne obsahujú z väčšej časti monomerické fenolické zlúčeniny ako sú (+)-katechíny, (-)-epikatechíny a (-)-epikatechín-3-*O*-galát, ďalej dimerické, trimerické a tetrametrické prokyanidíny. Poznaním benefitov pre ľudské zdravie katechínov a prokyanidínov extraktov z hroznových semien viedlo k ich užívaniu ako výživových doplnkov (Jayaprakasha, 2003).

V štúdii Felhi a kol. boli testované extrakty z hroznových semien. V porovnaní celkového obsahu fenolov bolo najväčšie množstvo zaznamenané v etanolovom extrakte, acetónovom; o polovicu nižšie hodnoty predstavoval hexánový extrakt, čo sa dá vysvetliť polaritou rozpúšťadla. Antioxidačná aktivita bola meraná pomocou DPPH a vyjadrená v IC_{50}; v porovnaní s ostatnými extraktmi mal etanolový extrakt najnižšie namerané hodnoty, čo značí vysokú antioxidačnú účinnosť, čo môže byť vysvetlené vysokou hodnotou celkového obsahu fenolov (Felhi, 2016).

^{1}H NMR:

Pomocou zobrazovacej metódy ^{1}H NMR sme zistili, ktoré obsahové látky obsahujú naše jednotlivé vzorky. Vzorky HM a HJ obsahujú zmes nenasýtených MK (mastných kyselín) – ide najmä o kyselinu linolovú, ktorá sa vyskytuje buď ako voľná alebo viazaná vo forme esteru s glycerolom. V HM na rozdiel od HJ prevažuje kyselina linolová viazaná na glycerol, o čom svedčia signály –CH=CH–, ktoré ležia pri 5,19 ppm; pričom pri voľnej kyseline linolovej tieto signály ležia v nižšom poli (5,32 ppm). Vo vzorke HJ je zaujímavá prítomnosť diacylglycerolu kyseliny linolovej, konštatujeme to na základe integrovanej intenzity protónov glycerolu 4,10 ppm; 2H, I = 0.22 a integrovanej intenzity tripletového signálu kyseliny linolovej pri 2,63 ppm; 2H, I = 0.41. Vo vzorkách H1 a H2 bola okrem zmesi polysacharidov a nenasýtených MK pozorovaná aj prítomnosť aromatických zlúčenín, o čom svedčí rozsiahla aromatická oblasť 6,5 – 7,0 ppm. Podľa pôvodu vzoriek konštatujeme, že ide o antokyány.

Antimikrobiálna aktivita

Antimikrobiálnu aktivitu na *S. aureus* vykazovali všetky vzorky. Výraznejšia aktivita bola u vzorky H2, pri ktorej bola výpočtom zistená hodnota priemernej relatívnej inhibičnej zóny (RIZD) 223,16 %. U vzoriek H1 a HJ boli namerané približne rovnaké hodnoty (163,16 % a 123,16 %). Najmenšia vypočítaná hodnota RIZD bola u vzorky HM, a to 68,42 %.

Antimikrobiálnu aktivitu na *E. coli* vykazovali taktiež všetky vzorky. Najvyššia hodnota RIZD bola vypočítaná u vzorky H2 (150,00 %), približne rovnakú hodnotu mala vzorka H1 (141,41 %). HM a HJ mali RIZD 77,34 % a 67,97 %.

Extrakty z hroznových semien získali značnú pozornosť ako antimikrobiálne pôsobiace látky v dôsledku prítomnosti zlúčenín 3,4,5--trihydroxyfenylových skupín látok nájdených v epigalokatechíne, epigalokatechín-3-O-galáte, prodelfinidíne a kastalagíne (Felhi, 2016).

ZÁVER

V štúdii sa skúmali a porovnávali antioxidačné hodnoty extraktov zo semien viniča hroznorodého z vlastného zdroja a zakúpených doplnkov výživy. Zníženie teploty pri samotnej extrakcii alebo odparovaní rozpúšťadla viedlo k zlepšeniu antioxidačnej aktivity extraktov. Keďže obsahové látky viniča polyfenolového pôvodu, ktoré sa vyznačujú samotnými antioxidačnými vlastnosťami sú polárneho charakteru, zvolené polárne rozpúšťadlá sa javia ako lepšia a prínosnejšia voľba pre lepšie antioxidačné vlastnosti koncového produktu.

Vypočítaním hodnoty IC_{50} sa ako najlepšia vzorka s antioxidačnými vlastnosťami javila vzorka H1 s hodnotou 1,1271 $mg.ml^{-1}$ získaná maceráciou etanolom. Porovnaním vzoriek extraktov z vlastných zdrojov a zakúpených produktov zo semien hrozna (hroznová múka a sušené hroznové semená)

sa výsledky inhibičných koncentrácií líšili len minimálnymi rozdielmi.

Pomocou ^{1}H NMR metódy sme u vzoriek zistili prítomnosť aromatických zlúčenín – polyfenolov, nenasýtených MK a polysacharidov.

Extrakty zo semien viniča hroznorodého boli významným zdrojom polyfenolových látok. Prírodné zdroje oproti zdrojom zakúpeným mali vyššie RIZD hodnoty. Najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu na *E. coli* mala vzorka H2 – 150,00 %, najnižšiu vzorka HJ – 67,97 %. Vzorka H2 bola taktiež najúčinnejšia aj proti *S. aureus* s hodnotou RIZD 223,16 %; najmenej účinná bola vzorka HM.

ZOZNAM LITERATÚRY

Aboutanios, E., Thomas, D. S., Hook, J. M., Cobas, C.: LocMAP: A new localization method for the parametric processing of high resolution NMR data. *Journal of Magnetic Resonance*, 2017, 282, 62 – 70.

Calvo, A., Morante, J., Plánder, S., Székely, E.: Fractionation of biologically active components of grape seed (*Vitis vinifera*) by supercritical fluid extraction. *Acta Alimentaria*, 2017, 46 (1), 27 – 34.

Carmona-Jiménez, Y., García-Moreno, M. V., Igartuburu, J. M., Garcia-Barroso, C.: Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food chemistry*, 2014, 165, 198 – 204.

Da Porto, C., Porretto, E., Decorti, D.: Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics sonochemistry*, 2013, 20 (4), 1076 – 1080.

De La Cruz, A. A., Hilbert, G., Rivière, C., Mengin, V., Ollat, N., Bordenave, L., Decroocq, S., Delaunay, J.-C., Delrot, S., Mérillon, J.-M., Monti, J.-P., Gomès, E., Richard, T.: Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* spp. accessions by using LC–MS and LC–NMR. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 732, 145 – 152.

Dwyer, K., Hosseinian, F., Rod, M. R.: The market potential of grape waste alternatives. *Journal of Food Research*, 2014, 3 (2), 91 – 91.

Felhi, S., Baccouch, N., Salah, H. B., Smaoui, S., Allouche, N., Gharsallah, N., Kadri, A.: Nutritional constituents, phytochemical profiles, *in vitro* antioxidant and antimicrobial properties, and gas chromatography–mass spectrometry analysis of various solvent extracts from grape seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food science and biotechnology*, 2016, 25 (6), 1537 – 1544.

Indis, N. A., Kurniawan, F.: Determination of free radical scavenging activity from aqueous extract of *Curcuma mangga* by DPPH method. *J. Physics: Conf. Ser.*, 2016, 710 (1), p. 12 043.

Jayaprakasha, G. K., Selvi, T., Sakariah, K. K.: Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food research international*, 2003, 36 (2), 117 – 122.

Rojas, J. J., Ochoa, J. V., Ocampo, S. A., Muñoz, J. F.: Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC complementary and alternative medicine*, 2006, 6:2, 1 – 6 (2).

Shi, J., He, M., Cao, J., Wang, H., Ding, J., Jiao, Y., Li, R., He, J., Wang, D., Wang, Y.: The comparative analysis of the potential relationship between resveratrol and stilbene synthase gene family in the development stages of grapes (*Vitis quinquangularis* and *Vitis vinifera*). *Plant Physiology and biochemistry*, 2014, 74, 24 – 32.

Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E., Kakuda, Y.: Polyphenolics in grape seeds – biochemistry and functionality. *Journal of medicinal food*, 2003, 6 (4), 291 – 299.

Songsermsakul, P., Pornphairin, E., Porasuphatana, S.: Comparison of antioxidant activity of grape seed extract and fruits containing high β-carotene, vitamin C, and E. *International journal of food properties*, 2013, 16 (3), 643 – 648.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 2: 57 – 66, 2021

VPLYV HADIEHO JEDU JEDINCOV DRUHU *BITIS ARIETANS* ODLIŠNÝCH LOKALÍT NA VÝVINOVÉ ŠTÁDIUM KURACÍCH EMBRYÍ

MONITORING OF DEVELOPMENTAL TOXICITY AFTER APPLICATION OF *BITIS ARIETANS* VENOM FROM DIFFERENT LOCATIONS

Polláková, Magdaléna[1]; Petrilla, Vladimír[1]; Andrejčáková, Zuzana[1]; Petrovová, Eva[2]

[1] Katedra biológie a fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
[2] Katedra morfologických disciplín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

magdalena.pollakova@student.uvlf.sk

ABSTRAKT

Africký druh hada *Bitis arietans* predstavuje jeden z najjedovatejších druhov rodu Bitis. Predpokladá sa, že prevažná väčšina závažných uhryznutí jedovatými hadmi v Afrike je zapríčinená práve jedincami druhu *B. arietans*. Embryotoxický účinok a vazoaktívny efekt jedu hadov druhu *B. arietans* pôvodom z dvoch rozličných afrických lokalít Cape Town, Južná Afrika a Lake Nakuru, Keňa sme sledovali a hodnotili na modeli kuracieho embrya použitím dvoch testov – CHEST (Chick Embryotoxicity Screening Test) a HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane). Cieľom štúdie bolo sledovať vplyv jedov na hmotnosť kuracích embryí, embryonálnych sŕdc a pečení, posúdiť morfologické zmeny, stanoviť mortalitu, hodnoty LD_{50} a iritačný potenciál po jednorazovej expozícii testovaným hadím jedom. Na základe výsledkov CHEST testu bola po aplikácii jedu hadov druhu *B. arietans* lokality Cape Town stanovená hodnota LD50 12,61 µl/embryo a po aplikácii jedu jedincov z oblasti Lake Nakuru LD_{50} 7,966 µl/embryo. Aplikácia jedov na povrch chorioalantoickej membrány vyvolala hemorágie a vznik zrazenín. So znižujúcou sa koncentráciou jedov klesal aj ich iritačný potenciál zo silného na mierny. S cieľom porovnať adekvátnosť metód používaných za účelom spracovania a skladovania hadích jedov bol stanovený bielkovinový profil a celkový obsah bielkovín vo vzorkách čerstvého, mrazeného a sušeného jedu hadov druhu *B. arietans* z nešpecifikovanej lokality Juhoafrickej republiky. Kvalita jedov bola rozličnými formami skladovania ovplyvnená iba

nepatrne. Z výsledkov vyplýva, že na uskladnenie jedov pre potreby neskorších analýz je vhodné použitie oboch testovaných spôsobov uchovávania hadieho jedu.

Kľúčové slová: embryotoxicita; hadí jed; LD_{50}

ABSTRACT

African snake species *Bitis arietans* is one of the most venomous species of the genus *Bitis*. The vast majority of severe venomous snake bites in Africa are believed to be caused by *B. arietans*. The embryotoxic and vasoactive effects of snake venom obtained from *B. arietans* originating from two different African localities: Cape Town, South Africa and Lake Nakuru, Kenya were studied and evaluated on a chicken embryo model by using two tests – Chick Embryotoxicity Screening Test (CHEST) and Hen's Egg Test (HET-CAM) (Chorioallantoic Membrane). The aim of the study was to monitor the effects of venoms on chick embryo weight, embryonic hearts and livers, to evaluate the morphological changes, to determine mortality, LD_{50} values and irritation potential after a single exposure to the tested snake venoms. Based on the CHEST test results, the LD_{50} of 12.61 µl/embryo was determined after administration of venom from *B. arietans* of Cape Town locality, and the LD_{50} of 7.966 µl/embryo after administration of venom from *B. arietans* of Lake Nakuru locality. The application of venoms to the surface of the chorioallantoic membrane induced haemorrhages and formation of clots. As the concentration of venoms decreased, their irritation potential changed from strong to moderate. In order to compare the adequacy of the methods used to process and store snake venoms, the protein profile and total protein content of fresh, frozen and dried venom samples of *B. arietans* snake species from an unspecified locality in South Africa were determined. The quality of the venoms was only slightly affected by the different forms of storage. The results showed that both tested methods of snake venom storage are suitable for later analyses in order to maintain snake venom.

Key words: embryotoxicity; LD_{50}; snake venom

ÚVOD

Symbol hada púta ľudskú pozornosť už od nepamäti. V príbehoch gréckej mytológie sprevádzal boha lekárstva Asklépia a omotaný okolo Asklépiovej palice dodnes pomyselne bdie nad osudom medicíny. Náboženský kontext starého zákona vníma hada ako pokušiteľa nabádajúceho k neposlušnosti a hriechu. Odhliadnuc od kultúrneho vplyvu a symboliky, strach z hadov zakorenený v hlbinách ľudského podvedomia bol evolučne podmienený najmä smrteľnými komplikáciami, ktoré odpradávna sprevádzali väčšinu uhryznutí jedovatými hadmi.

V priebehu posledných dekád pokrok v oblasti technológií a analytických metód umožnil nebývalý výskum hadov a hadích jedov. Vývoj a produkcia antivenínov stáli na počiatku efektívnej a úspešnej terapie mnohých hadích uhryznutí. Vedecký záujem a nové poznatky o možnostiach využitia zootoxínov potláčajú stáročný strach z potenciálneho nebezpečenstva. Živočíšne jedy sú dnes považované za cenný zdroj medicínsky významných látok.

Z chemického hľadiska predstavuje hadí jed zložitú a rôznorodú zmes farmakologicky aktívnych proteínov, polypeptidov a menších neproteínových zložiek. Každý proteín sa vyznačuje vlastnou biologickou aktivitou, enzymatickou alebo neenzymatickou. Na základe chemickej podstaty sú proteíny hadích jedov tradične delené na toxíny a enzýmy. Toxíny sú zložené z peptidov, polypeptidov a proteínov, pričom nevykazujú enzýmovú aktivitu. Enzýmy sú látky proteínovej povahy. Miera ich účinku je závislá na koncentrácii a čase pôsobenia, pričom niektoré enzýmy sa vyznačujú toxickým vplyvom na cieľové štruktúry.

Pre zastúpenie a charakter jednotlivých zložiek

Tab. 1: Koncentrácie testovaných jedov (CHEST)

Hadí jed	Hmotnosť 170 µl jedu (mg)	Koncentrácia (µg.µl^{-1})			
		E-2	E-3	E-4	E-5
B. arietans (Cape Town)	172	10,1	1,01	0,101	0,0101
B. arietans (Lake Nakuru)	205	12,1	1,21	0,121	0,0121

Tab. 2.: Koncentrácie testovaných jedov (HET-CAM test)

Hadí jed	Hmotnosť 170 µl jedu (mg)	Koncentrácia (µg.µl^{-1})		
		E-1	E-2	E-3
B. arietans (CT)	182	107	10,7	1,07
B. arietans (LN)	184	108	10,8	1,08

jedu je typická vnútrodruhová, ako aj medzidruhová variabilita. Vo všeobecnosti platí, že čím užší je fylogenetický vzťah medzi hadmi, tým podobnejšie sú vlastnosti a zloženie ich jedov. Rozdiely môžu byť podmienené stupňom ontogenetického vývinu, geografickou lokalitou ako aj vplyvom sezónnych zmien. Množstvo a zloženie hadieho jedu odráža celkový stav každého jedinca. Jed hadov druhu *Bitis arietans* sa vyznačuje výrazným účinkom na kardiovaskulárny systém a hemoreguláciu. Geografické rozšírenie naprieč celou Subsaharskou Afrikou až po Arabský polostrov môže predstavovať významný faktor podmieňujúci variabilitu jedu v rámci daného druhu.

Cieľom štúdie bolo sledovať a porovnať embryotoxický efekt a vazoaktívny účinok jedu hadov druhu *Bitis arietans* pôvodom z dvoch rozličných lokalít Afriky (Cape Town, Južná Afrika a Lake Nakuru, Keňa) na experimentálnom modeli kuracieho embrya. Zároveň bol stanovený a porovnaný profil bielkovín a celkové množstvá bielkovín v troch rozlične skladovaných vzorkách jedu (čerstvý, mrazený a sušený) hadov druhu *Bitis arietans* z nešpecifikovanej lokality JAR.

MATERIÁL A METÓDY

Aplikácia hadieho jedu a sledovanie jeho účinkov na kuracie embryo

Oplodnené kuracie vajcia, znesené v približne rovnakom čase, boli dovezené z liaharenského podniku Párovské háje (Nitra). Dovoz bol realizovaný pri teplote 15 °C a táto teplota bola dodržaná aj pri skladovaní vajec pred inkubáciou. Pred naložením do inkubátora boli vajcia očistené 70 % etanolom a následne poukladané tupým pólom nahor. Inkubácia prebiehala pri teplote 37,5 °C a vlhkosti 60 %. Automatický inkubátor zabezpečoval otáčanie vajec v pravidelných 3-hodinových intervaloch, čím sa zabránilo prilepeniu kuracích embryí na vaječné membrány. Metodický postup oboch použitých metodík je na základe fáz embryonálneho vývinu rozdelený na niekoľko častí. Deň naloženia vajec do inkubátora predstavuje nultý embryonálny deň (0. ED).

Hmotnosť jedu pre experimentálne účely tejto štúdie bola stanovená ako rozdiel medzi hmotnosťou prázdnej skúmavky a hmotnosťou tej istej skúmavky naplnenej 170 µl 100 % natívneho jedu. Tento východiskový objem sa ďalej riedil sterilným fy-

ziologickým roztokom (E-1 = 1530 µl) na príslušné testovacie koncentrácie (viď tab. 1 a 2).

Embryotoxicita (CHEST)

Embryotoxický účinok jedu je možné sledovať a stanoviť použitím CHEST testu. Aplikácia jedu prebieha na 4. ED. Pred začiatkom aplikácie je potrebné dezinfikovať pracovný priestor. Po vybratí vajec z inkubátora boli tupé póly znovu očistené 70 % etanolom a následne prelepené bielou lepiacou páskou. Dezinfikovanými nožnicami boli vystrihnuté otvory, čo umožnilo aplikáciu jedu metódou „window technique". Pri práci je nevyhnutné postupovať opatrne, aby sa čo najmenej škrupinových úlomkov dostalo do vnútra vajec a aby nedošlo k narušeniu druhého embryonálneho obalu. Vo vnútri oplodnených vajec možno pozorovať cievnu sieť, prípadne bijúce srdce. Neoplodnené vajcia boli v tejto fáze z pokusu vyradené. Počas aplikácie jedu (100 µl/vajce) je nutné dbať na to, aby špička pipety neprišla do kontaktu s obalom alebo škrupinou. Po ukončení aplikácie boli otvory na vajciach hermeticky uzatvorené priesvitnou lepiacou páskou. Každé vajce bolo označené príslušnou koncentráciou použitého jedu, čím sa predišlo prípadným zámenám. Následne boli vajcia uložené naspäť do inkubátora tak, aby uzatvorený otvor smeroval nahor a aby sa zabránilo otáčaniu. Dostatočná vlhkosť prostredia v inkubátore bola zabezpečená adekvátnym množstvom destilovanej vody (Davies a Freeman, 1995). Na 9. ED prebiehal odber vzoriek. Lepiaca páska bola z vajec odstránená a jednotlivé otvory zväčšené, aby ich veľkosť umožnila opatrné vytiahnutie embryí. Živé embryá (nad 650 mg) boli jednotlivo odvážené a pripravené na pitvu. Jemným nastrihnutím brušnej dutiny dochádza k odhaleniu vnútorných orgánov, čo umožnilo chirurgickú excíziu pečeňového a srdcového tkaniva. Vyňaté orgány boli odvážené a zistené hmotnosti zaznamenané pre potreby ďalšieho štatistického spracovania. Toxicita pre špecifické cieľové orgány môže slúžiť ako indikátor kardiotoxických účinkov jedu. Zmeny na úrovni pečeňového tkaniva môžu signalizovať zmeny metabolizmu v dôsledku prebiehajúcej detoxikácie (Petrovová a kol., 2009).

Pomocou štatistickej analýzy boli z hmotností kuracích embryí, embryonálnych sŕdc a pečení vypočítané priemerné hodnoty a stanovená štandardná chyba priemeru (SEM). Všetky hodnoty uvedené v tabuľkách sú priemerné hodnoty získané z každej skupiny embryí. Na porovnanie zistených hmotností kuracích embryí, embryonálnych sŕdc a pečení bol použitý nepárový Studentov t-test (GraphPad Prism 5.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Štatisticky významné rozdiely v sledovaných skupinách oproti kontrole boli označené hviezdičkou (*) a sú považované za signifikantné na hladinách * = $p < 0{,}05$; ** = $p < 0{,}01$; *** = $p < 0{,}001$.

Vazoaktivita (HET-CAM test)

Na 3. ED sa ostrými nožnicami vytvorí malý otvor na ostrom konci každého vajca, čo umožní odber bielka (2 ml) použitím sterilnej ihly a striekačky. Následne sú otvory uzatvorené pomocou tekutého parafínu a vajcia sa uložia späť do inkubátora tak, aby ostrý koniec s uzatvoreným otvorom smeroval vždy nadol (Knight a kol., 2019).

Aplikácia jedu prebieha na 9. ED. Vajcia boli postupne vyberané z inkubátora a za pomoci nožníc sa z každého vajca odstránila škrupina vrchnej časti tupého pólu v takej miere, aby vzniknutý otvor umožňoval aplikáciu jedu na chorioalantoickú membránu (CAM) a sledovanie jeho účinkov. Neoplodnené vajcia boli v tejto fáze vyradené. Vhodnou pinzetou bola z vrchnej časti CAM odstránená papierová blana (*membrana papyracea*), čím sa odhalili cievy. Jed bol aplikovaný v množstve 50 µl/vajce priamo na cievy CAM. V kontrolnej skupine bol namiesto jedu aplikovaný fyziologický roztok (50 µl/vajce). Princíp HET-CAM testu spočíva v sledovaní výskytu zmien (hyperémia, hemorágie a zrážanie) bezprostredne po aplikácii testovanej látky na CAM. Každá zmena je bodovo hodnotená na základe času, ktorý uplynul od aplikácie látky na CAM do objavenia sa vazoaktívneho efektu. Na základe stanoveného kumulatívneho skóre mož-

Tab. 3: Bodovací systém pre hodnotenie iritačného potenciálu podľa Luepkeho

Čas potrebný na prejavenie dráždivého účinku	Body		
	Hyperémia	**Hemorágie**	**Zrážanie**
< 0,5 min	5	7	9
0,5 – 2 min	3	5	7
2 – 5 min	1	3	5

Zdroj: Knight a kol., 2019

Tab. 4: Klasifikácia iritačného potenciálu podľa Luepkeho

Kumulatívne skóre	Iritačný potenciál
< 1,0	Zanedbateľný
1,0 – 4,9	Nepatrný
5,0 – 8,9	Mierny
9,0 – 21,0	Silný

Zdroj: Knight a kol., 2019

no klasifikovať iritačný potenciál látky (silný, mierny, nepatrný alebo zanedbateľný). Po aplikácii jedu bol sledovaný a fotograficky zaznamenávaný vazoaktívny efekt jedu v intervaloch 0, 30, 120 a 240 sekúnd. Po ukončení experimentu nasledovalo vyhodnotenie získaných výsledkov a výpočet iritačného potenciálu pre jednotlivé koncentrácie jedov použitím Luepkeho hodnotiaceho systému (viď tab. 3, 4 a 6) (Knight a kol., 2019).

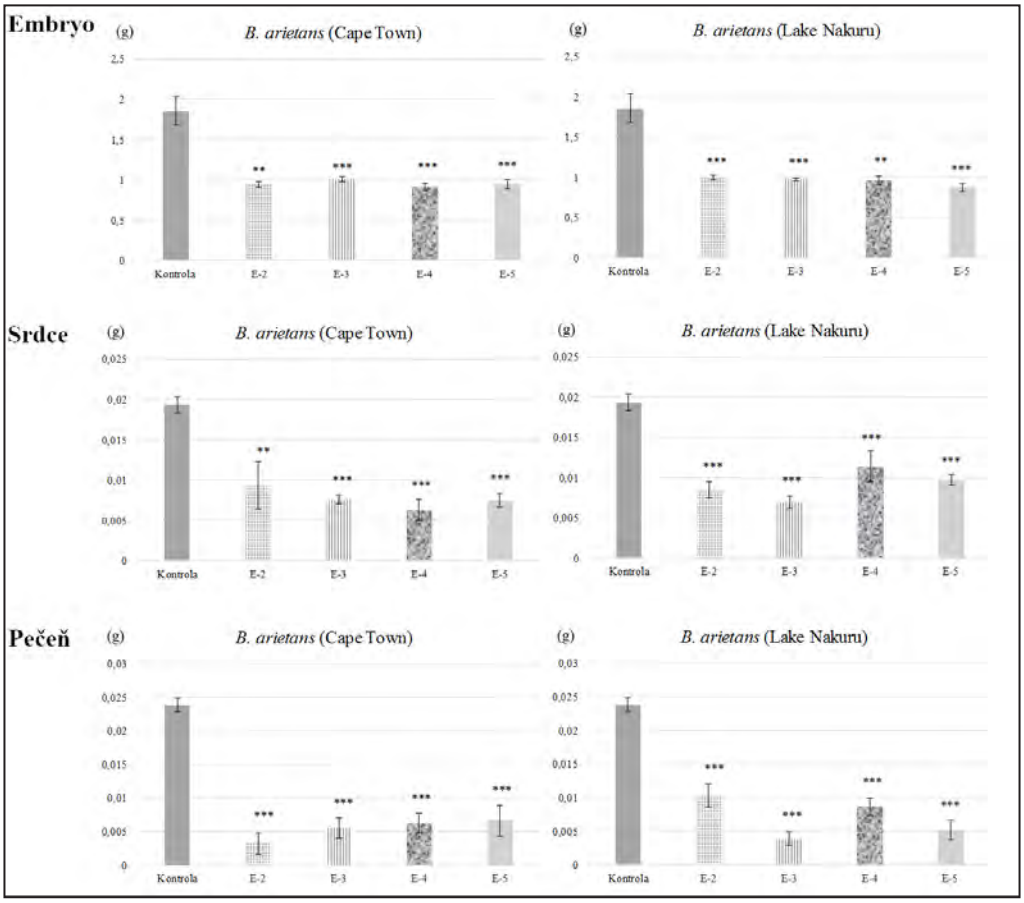
Elektroforetická analýza frakcií bielkovín hadieho jedu

Na stanovenie proteínového spektra hadieho jedu bol použitý automatický, multiparametrický, elektroforetický systém HYDRASYS (SEBIA, Lisses, Francúzsko). Vzorky hadieho jedu (10 µl) boli analyzované použitím komerčnej súpravy HYDRAGEL 7 PROTEINE Kit. 14100 (ECOMED, Žilina, SR), ktorá umožňuje separáciu proteínov na pufrovaných agarózových géloch (gél s obsahom agarózy 8 $g.l^{-1}$ a trisbarbitalový pufer s pH = 9,2). Bielkoviny separované na niekoľko frakcií boli následne vizualizované farbením amidočerňou s koncentráciou 0,4 $g.dl^{-1}$. Po vysušení boli gély vyhodnotené vizuálne aj denzitometricky (λ = 570 nm; EPSON PERFECTION V 700 PHOTO). Jednotlivé frakcie boli kvantifikované v programe PHORESIS (Verzia 5.50, 2009, SEBIA, Lisses, Francúzsko) (Andrejčáková a kol., 2015).

Stanovenie celkovej koncentrácie proteínov hadieho jedu

Princípom stanovenia celkovej koncentrácie proteínov je reakcia medzi meďnatými katiónmi a proteínovými peptidmi v zásaditom prostredí za vzniku farebného komplexu. Celková koncentrácia proteínov v 30 µl vzorky doplnenej 500 µl substrátu bola analyzovaná spektroskopicky, použitím komerčného diagnostického kitu (RANDOX, Crumlin, UK) a automatického biochemického analyzátora ALIZÉ (LISABIO, Pouilly-en-Auxois, Francúzsko). Následne bola meraná absorbancia (λ = 540 nm), výsledky boli vyjadrené v $g.l^{-1}$ (Andrejčáková a kol., 2015).

Obr. 1: Priemerné hmotnosti kuracích embryí, embryonálnych sŕdc a pečení na 9. ED po aplikácii jedu hadov druhu *Bitis arietans* lokalít Cape Town, Južná Afrika a Lake Nakuru, Keňa



Tab. 5: Prehľad mortality po aplikácii rozličných koncentrácií jedu hadov druhu *B. arietans* CT a LN

Jed	Koncentrácia jedu	Počet embryí v skupine	Počet mŕtvych embryí	Mortalita (%)
Kontrola	**0**	10	1	10
B. arietans CT	**E-2**	9	4	44,444
	E-3	11	1	9,09
	E-4	11	1	9,09
	E-5	9	1	11,111
B. arietans LN	**E-2**	11	0	0
	E-3	11	2	18,18
	E-4	11	6	54,54
	E-5	8	1	12,5

VÝSLEDKY A DISKUSIA

S cieľom posúdiť a porovnať vplyv hadieho jedu jedincov druhu *Bitis arietans* afrických lokalít Cape Town a Lake Nakuru na vývinové štádiá kuracích embryí bola stanovená priemerná celková hmotnosť kuracích embryí a priemerné hmotnosti embryonálnych sŕdc a pečení v jednotlivých skupinách (viď obr. 1). Štatisticky významné rozdiely oproti kontrole boli zaznamenané vo všetkých sledovaných skupinách. Okrem troch prípadov (priemerná hmotnosť embryí a embryonálnych sŕdc E-2, CT a priemerná hmotnosť embryí E-4, LN), kedy bola štatistická významnosť ** na hladine pravdepodobnosti $p < 0,01$; bola štatistická významnosť všetkých ostatných testovaných skupín *** na hladine pravdepodobnosti $p < 0,001$.

Na základe zistených hodnôt mortality (viď tab. 5) boli použitím tabuľkového procesora Microsoft Excel z rovnice grafu lineárnej funkcie vypočítané hodnoty LD_{50} (*dosis lethalis media*) pre oba testované jedy. Hodnota LD_{50} je základným ukazovateľom akútnej toxicity jedov. Je to taká dávka jedu, ktorá vyvolá u všetkých testovaných jedincov klinické príznaky a u 50 % smrť. Nízka hodnota LD_{50} je odrazom vysokej toxicity malých dávok testovanej látky. Hodnoty LD_{50} pre jed hadov druhu *B. arietans* lokality CT (12,61 µl/vajce) a lokality LN (7,966 µl/vajce) poukazujú na vyššiu mieru mortality a letálneho účinku po aplikácii jedu hadov druhu *B. arietans* lokality Lake Nakuru. Z výsledkov štúdie monitorujúcej embryotoxický vplyv jedu hadov druhu *B. arietans* štyroch rozličných afrických lokalít na modeli kuracieho embrya možno stanoviť LD_{50}= 7,6388 µl/embryo pre jed zástupcov druhu *B. arietans* z oblasti Lake Nakuru a LD_{50} = 14,47 µl/embryo pre jed hadov druhu *B. arietans* lokality Cape Town, čo bola zároveň najvyššia zistená hodnota LD_{50} spomedzi všetkých štyroch testovaných jedov (Peters a kol., 2020). Tieto výsledky naznačujú vyšší embryotoxický potenciál jedu hadov druhu *B. arietans* z oblasti Lake Nakuru v porovnaní s jedom jedincov z lokality Cape Town, čo potvrdzujú aj nami dosiahnuté výsledky.

Počas váženia a prípravy embryí na pitvu bolo zaznamenaných niekoľko patomorfologických zmien. Po aplikácii jedu hadov druhu *B. arietans* CT, E-4 bolo pozorované embryo s chýbajúcim ľavým okom. Pravé oko bolo na pohľad normálne vyvinuté. V skupine, kde bol aplikovaný jed hadov druhu *B. arietans* LN, E-1 bolo prítomné jedno embryo s morfologickou zmenou pravej hrudníkovej končatiny, na ďalšom embryu boli viditeľné morfologické zmeny hlavy a zobáka.

Literatúra dokumentuje embryotoxický účinok a teratogénny potenciál jedov rozličných druhov hadov, napr. *Vipera aspis* (Gabriel-Robez a Clavert, 1980), *Naja nigricollis, Calloselasma rhodostoma* (Langley, 2010) alebo *Bothrops jararaca* (Bernardi, 2011). Z klinickej praxe prináša uhryznutie jedovatým hadom riziko pre matku aj plod, pričom zdroje monitorujúce prípady envenomácií tehotných žien uvádzajú vyššie percentá fetálnych úmrtí než úmrtí matiek (Langley 2010).

Jed hadov druhu *B. arietans* obsahuje zložky z rozličných skupín. Disintegríny Bitistatín, disintegrín izoforma D-2, disintegrín izoforma D-3, zinková metaloproteináza-disintegrín BA-5A, enzým uvoľňujúci kallidín zo skupiny serínových proteináz, postsynaptický neurotoxín Bitanarín zo skupiny fosfolipáz A_2, baptidy, hyaluronidázy Hy-1 a Hy-2, pravé lektíny C-typu CTL a CTL-2, lektínom podobné proteíny C-typu Snaclec, Cystatín, vaskulárny endoteliálny rastový faktor Barietín, fibrinogenáza Ba100 a ďalšie kvantitatívne menej zastúpené zložky boli izolované a popísané v rámci rozličných experimentálnych štúdií. Mnohé z týchto zložiek majú vplyv na kardiovaskulárny systém (VenomZone n. d., UniProt n. d.).

Po aplikácii jedu hadov druhu *B. arietans* lokalít CT a LN na cievy CAM boli pozorované zmeny v podobe hemorágií a zrazenín. Hyperémia nebola prítomná. Na základe zisteného kumulatívneho skóre bol použitím hodnotiaceho systému podľa Luepkeho stanovený iritačný potenciál pre jednotlivé testované koncentrácie jedov.

Tab. 6: Priemerné kumulatívne skóre a klasifikácia iritačného potenciálu rozličných koncentrácií vybraných hadích jedov

Jed	c	Hyperémia	Hemorágie	Zrážanie	Kumulatívne skóre	Iritačný potenciál
Kontrola	N/a	0	0	0	0	0
B. arietans (Cape town)	E-1	0	5	6	11	Silný
	E-2	0	4,5	0	4,5	Nepatrný
	E-3	0	5,5	0	5,5	Mierny
B. arietans (Lake Nakuru)	E-1	0	6	7	13	Silný
	E-2	0	6	6	12	Silný
	E-3	0	5,5	0	5,5	Mierny

Štúdia hodnotiaca vazoaktivitu hemotoxických hadích jedov použitím HET-CAM testu a hodnotiaceho systému podľa Luepkeho uvádza výskyt hemorágií a krvných zrazenín po aplikácii jedu hadov druhu *B. arietans* z nešpecifikovanej lokality JAR. Zmeny v podobe hyperémie neboli pozorované (Knight a kol., 2019). Rovnako, ani nami aplikované jedy hadov druhu *B. arietans* afrických lokalít Cape Town a Lake Nakuru nevyvolali hyperémiu. Oba testované jedy vyvolali vznik hemorágií a krvných zrazenín, pričom pre jed hadov druhu *B. arietans* z lokality Lake Nakuru boli stanovené vyššie hodnoty iritačného potenciálu než pre jed hadov druhu *B. arietans* z lokality Cape Town. Podobne ako nami stanovené hodnoty LD_{50}, aj toto zistenie poukazuje na vyššiu mieru toxicity jedu zástupcov daného druhu z lokality Lake Nakuru, Keňa.

Kvalita troch rozlične skladovaných vzoriek jedu hadov druhu *B. arietans* z nešpecifikovanej lokality JAR (čerstvý, mrazený, sušený) bola analyzovaná elektroforeticky na agarózových gélových platniach. Elektroforeogramy čerstvého, mrazeného a sušeného jedu hadov druhu *B. arietans* sú do veľkej miery podobné a naznačujú, že kvalita jedu nebola podmienkami skladovania výrazne ovplyvnená. Rozdiely boli zaznamenané iba v kvantite frakcií. Vo vzorke čerstvého jedu bolo po elektroforetickom rozdelení prítomných 7 frakcií, zatiaľ čo v mrazenom a sušenom jede bola detegovaná prítomnosť 6 frakcií. Frakcia č. 4 čerstvého jedu zaniká, resp. splynula s frakciou č. 5 pri teplotných zmenách počas skladovania.

Podmienky skladovania jedu ovplyvnili kvantitatívne zastúpenie celkových proteínov iba nepatrne. Koncentrácia bielkovín bola vo vzorke čerstvého a mrazeného jedu rovnaká (11,2 $g.l^{-1}$). Vo vzorke sušeného jedu bol zaznamenaný mierny pokles kvantity celkových bielkovín (9,65 $g.l^{-1}$).

V priebehu rokov boli publikované rozličné štúdie sledujúce vplyv skladovacích podmienok na zloženie a účinok skladovaných hadích jedov. Analýza rozlične skladovaných vzoriek jedu hadov druhu *Crotalus molossus molossus* naznačuje, že teplota a skladovacie podmienky nemajú výrazný vplyv na stabilitu zložiek hadieho jedu. Autori na základe získaných výsledkov predpokladajú, že proteíny hadích jedov sú stabilnejšie, než sa prvotne predpokladalo (Munekiyo a Mackessy, 1998). Tieto zistenia potvrdzuje aj štúdia porovnávajúca účinok vzoriek sušených hadích jedov z historickej zbierky s účinkom čerstvo odobraných vzoriek jedov tých istých druhov hadov z rovnakých lokalít. Bez prístupu vzduchu je sušený hadí jed schopný zachovať si zloženie a vlastnosti takmer rovnocenné s čerstvo odobratým jedom, aj po vyše osemdesiatich rokoch skladovania (Jesupret a kol., 2020). Z porovnania čerstvého, mrazeného a sušeného jedu hadov druhu *Bitis arietans* z nešpecifikovanej lokality JAR vyplýva, že oba spôsoby, či už zmrazenie na – 80 °C

alebo sušenie desikantom, sú vhodné na spracovanie a skladovanie hadích jedov.

Pri skladovaní sušených hadích jedov je nutné vytvoriť také podmienky, aby nedochádzalo k degradácii jedu vplyvom prítomnosti vzduchu. V rámci štúdia hadích jedov a výskumných expedícií je potrebné zameriavať pozornosť na odber a uskladnenie jedov, najmä vzácnych a zriedkavých druhov hadov.

ZÁVER

Štatisticky významné zmeny v priemerných hmotnostiach embryí, embryonálnych sŕdc a pečení potvrdili, že jed hadov druhu *Bitis arietans* má toxický vplyv na vyvíjajúce sa embryo. Hemorágie a vznik zrazenín po aplikácii oboch testovaných jedov na povrch CAM sú dôkazom prítomnosti vazoaktívnych zložiek a látok s účinkom na hemoregulačný systém v jede hadov druhu *Bitis arietans*. Na základe stanovených hodnôt LD_{50} a iritačného potenciálu možno usúdiť, že jed hadov druhu *Bitis arietans* lokality Lake Nakuru použitý na účely tejto experimentálnej štúdie vykazoval vyššiu mieru toxického účinku než jed jedincov z lokality Cape Town. Bielkovinový profil a celkové množstvá bielkovín stanovené v troch rozlične skladovaných vzorkách jedu hadov druhu *Bitis arietans* z nešpecifikovanej lokality Juhoafrickej republiky (čerstvý, mrazený a sušený) naznačujú, že vybrané spôsoby spracovania a skladovania nemajú negatívny vplyv na zloženie jedu, pretože kvalita jedov bola rozličnými formami skladovania ovplyvnená iba nepatrne. Štúdia demonštruje praktické využitie modelu kuracieho embrya vo výskume hadích jedov.

POĎAKOVANIE

Štúdia bola realizovaná ako súčasť grantových úloh VEGA 1/0241/18, APVV-17-0017 a VEGA 1/0050/19 riešených na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

ZOZNAM LITERATÚRY

Andrejčáková, Z., Petrilla, V., Tomečková, V., Tóth, Š., Pekárová, T., Komanický, V., Šutorová, M., Petrillová, M., Sopková, D., Krešáková, L., Korim, P.: New approaches in monitoring venom of genus *Dendroaspis. Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication*, 2015, 48, (6), 462 – 472. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00387010.2014.906471>. https://doi.org/10.1080/00387010.2014.906471. Accessed April 30, 2020.

Bernardi, M. M., Kirsten, T. B., Manetta, P. R., Habr, S. F., Macrini, D. J., Cury, Y.: Maternal exposure to *Bothrops jararaca* snake venom: effects in mice offsprings. *Journal of the Health Sciences Institute*, 2011, 29, 209 – 213. <https://www.researchgate.net/publication/272817365_Maternal_exposure_to_Bothrops_jararaca_snake_venom_effects_in_mice_offsprings>. Accessed April 30, 2020.

Davies, W. J., Freeman, S. J.: *Chick Embryotoxicity Screening Test* (*CHEST I and II): In vitro toxicity testing protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 1995. 307 – 310. doi:10.1385/0-89603-282-5:307. ISBN 978-1-59259-530-3.

Gabriel-Robez, O., Clavert, J.: Teratogenic and lethal properties of the various fractions of venom of the viper, *Vipera aspis*. *Acta Anat.*, 1980, 108 (2), 226 – 229. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0018863328&origin=inward&txGid=0956dbd5d4d42e5c94af5eab2fa7b3e7>. Accessed April 30, 2020.

Chippaux, J. P., Williams, V., White, J.: Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 1991, 29, (11), 1279 – 1303. <https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_5/b_fdi_31-32/35346.pdf>. https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90116-9. ISSN 0041-0101. Accessed April 30, 2020.

Jesupret, C., Baumann, K., Jackson, T. N. W., Ali, S. A., Yang, D. C., Greisman, L., Kern, L., Steuten, J., Jouiaei, M., Casewell, N. R., Undheim, E. A. B., Koludarov, I., Debono, J., Low, D. H. W.,

Rossi, S., Panagides, N., Winter, K., Ignjatovic, V., Summerhayes, R., Jones, A., Nouwens, A., Dunstan, N., Hodgson, W. C., Winkel, K. D., Monagle, P., Fry, B. G.: Vintage venoms: Proteomic and pharmacological stability of snake venoms stored for up to eight decades. *Journal of Proteomics*, 2014, 105, 285 – 294.

<*https://espace.library.uq.edu.au/data/*UQ_323128/UQ323128OA.pdf?Expires=1588313746&Key-Pair-Id=APKAJKNBJ4MJBJNC6NLQ&Signature=AdU4~daM5IcaqJz~bGmyNcpVDfOHMwDAP03j4VvtdAYNEajntDS3wzPTmp30vSKo8oqQOHExv7N8XfU1U8O9kavfEk-uPW2B61LkCT3x7UfSGpowRgGFVJsmgQjpbeJDJpVQeLXco5lX0~QQymSJEiQa~1kXLP53twjseF1zVCKGCjA7jefqaA5AzZTEwEP2KFiR3ZpbQeb85rmhaR9mQUX9tB0e7OquhlU7oh49iXdFhBEIc6MCbSWheMnHpX49a-UIZA13wyKOf~BJue7jbtcnvRyLTEICgZ2rDD6riGmY5sfUOGkCutu6Epl60jmxKXOGgh8-D3XIqOSV96Ut0Q__>. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.004. ISSN 1874-3919. Accessed April 30, 2020.

Knight, R. B., Dvorcakova, S., Luptakova, L., Vdoviakova, K., Petrilla, V., Petrovova, E.: Evaluation of vasoactivity after haemotoxic snake venom administration. *Toxicon*, 2019, 158, 69 – 76. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010118311590>. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.430. ISSN 0041-0101. Accessed April 30, 2020.

Langley, R. L.: Snakebite during pregnancy: A literature review. *Wilderness & Environmental Medicine, Elsevier*, 2010, 21 (1), 54 – 60. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S108060320900026X>. doi: 10.1016/j.wem.2009.12.025. Accessed April 30, 2020.

Munekiyo, S. M., Mackessy, S. P.: Effects of temperature and storage conditions on the electrophoretic, toxic and enzymatic stability of venom components. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1998, 119B (1), 119 – 127. <https://www.unco.edu/nhs/biology/about-us/mackessy-stephen/documents/1998-Venom-stability-Munekiyo-and-Mackessy.pdf>. Accessed April 30, 2020.

Peters, CH., Petrilla, V., Luptakova, L., Petrovova, E.: *The effects of snake venom (Bitis arietans) on embryonic development*, 2020. <https://www.intechopen.com/online-first/the-effects-of-snake-venom-bitis-arietans-on-embryonic-development>. DOI: 10.5772/intechopen.90887. Accessed April 30, 2020.

Petrovová, E., Sedmera, D., Míšek, I., Lešník, F., Luptáková, L.: Bendiocarbamate toxicity in the chick embryo. *Folia Biologica, Praha*, 2009, 55, (2), 61 – 65. < https://fb.cuni.cz/Data/files/folia_biologica/volume_55_2009_2/fb2009A0011.pdf>. PMID:19454180. Accessed April 30, 2020.

The Universal Protein Resource (UniProt), A comprehensive resource for protein sequence and annotation data. <https://www.uniprot.org/>. Accessed April 30, 2020.

Valenta, J.: J*edovatí hadi* [Venomous snakes] Praha: Galén, 2008. 401 s.

VenomZone. <https://venomzone.expasy.org/3856>. Accessed April 30, 2020.

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 2: 67 – 77, 2021

DISPENZÁCIA VETERINÁRNYCH LIEKOV ZO SKUPINY NESTEROIDNÝCH ANTIFLOGISTÍK

DISPENSING OF VETERINARY MEDICINES FROM THE CLASS OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

Kľoc, Dominik[1]; Fedorová, Monika[2]; Suchovič, Radoslav[2, 3]

[1]Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 04181 Košice
[2]Katedra lekárenstva a sociálnej farmácie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 04181 Košice Slovenská republika
[3]Farmaceutická fakulta, Masarykova univerzita, Palackého třída 1946/1, 612 00 Brno
Česká republika

dominik.kloc@uvlf.sk

ABSTRAKT

Lekárenská starostlivosť zahŕňa poskytovanie odborných informácií a rád o liekoch, pričom dispenzáciu (poradenskú a konzultačnú činnosť) podáva osoba oprávnená vydávať lieky a týka sa nielen humánnych, ale aj veterinárnych liekov. Štúdia je zameraná na dispenzáciu veterinárnych liekov s obsahom nesteroidných antiflogistík. Správna dispenzácia je nevyhnutná k poskytnutiu kvalitnej poradenskej činnosti a rada lekárnika pri výdaji veterinárneho lieku je dôležitou súčasťou zabezpečenia účinnej a bezpečnej terapie zvierat. Štúdia popisuje vybrané liečivá zo širokej skupiny nesteroidných antiflogistík, ich význam vo veterinárnej medicíne a ich použitie u jednotlivých druhov zvierat. Súčasťou štúdie je prehľadná tabuľka obsahujúca základné informácie potrebné k dispenzácii takýchto veterinárnych liekov registrovaných na Slovensku, ktorá môže zjednodušiť a urýchliť prácu lekárnika v praxi. Lieky, ktoré podáva výhradne veterinárny lekár, nie sú súčasťou tejto štúdie.

Kľúčové slová: dispenzácia; nesteroidné antiflogistiká; veterinárne lieky; zvieratá

ABSTRACT

Pharmaceutical care includes a provision of professional information and advice on medicines, whereas dispensing (advisory and consulting activities) is given by a person authorized to dispense medicines and concerns not only human,

but also veterinary medicines. This article is focused on the dispensing of veterinary medicines containing non-steroidal anti-inflammatory drugs. Proper dispensing is essential for a provision of qualified advisory activities and the specific advice a pharmacist (when dispensing veterinary medicines) is an important part of effective and secure therapy for animals. The article describes selected active substances from an extensive class of non-steroidal anti-inflammatory drugs, their importance in veterinary medicine and their usage in relation to individual animal species. The article contains also a summary table containing basic information necessary for the dispensation of such veterinary medicines registered in Slovakia, which can simplify and speed-up the work of a pharmacist in practice. Medicines given exclusively by a veterinarian are not included in this article.

Key words: animals; dispensing; non-steroidal anti-inflammatory drugs; veterinary medicines

ÚVOD

Dispenzácia je informačná a poradenská činnosť o liekoch, zdravotníckych pomôckach a dietetických potravinách. Dispenzáciu podáva osoba oprávnená vydávať lieky, zdravotnícke pomôcky a dietetické potraviny za účelom zabezpečenia účinnosti a bezpečnosti liečby (Vyhláška MZ SR č. 129/2012 Z. z.). Rovnako ako pri humánnych liekoch, lekárnik by mal poskytnúť dispenzáciu aj pri výdaji veterinárneho lieku, lebo aj veterinárny liek je súčasťou sortimentu lekárne, ako uvádza Zákon o liekoch a zdravotníckych pomôckach (Zákon NR SR č. 362/2011 Z. z.). Rada lekárnika pri výdaji veterinárneho lieku musí byť podaná tak, aby sa dodržala účinnosť a bezpečnosť liečby zvierat.

Štúdia sa zaoberá dispenzáciou veterinárnych liekov, ktoré obsahujú nesteroidné antiflogistiká (NSAID). Ide o látky, ktoré potláčajú neprimeranú reakciu organizmu na zápalový podnet, zabraňujú rozvoju zápalových zmien. Okrem antiflogistického účinku majú aj analgetické, antipyretické, a niektoré aj spazmolytické účinky. Väčšina látok tejto skupiny má spoločné nežiaduce účinky ako zvýšené riziko vzniku gastrointestinálnych (GIT) ulcerácií, nefrotoxicita, u dehydratovaných zvierat aj diarhea a anorexia (Lamka a kol., 2014).

Na Slovensku je z tejto skupiny registrovaných mnoho liekov v rôznych silách, pričom v závislosti od množstva liečiva v liekovej forme daného lieku sa môže dispenzácia líšiť. Cieľom tejto štúdie je zozbieranie a utriedenie informácií o veterinárnych liekoch s obsahom NSAID a následným vypracovaním prehľadu základných informácií potrebných k dispenzácii liekov. Súčasťou štúdie je uvedenie príkladov detailnej dispenzácie u vybraných veterinárnych liekov z danej skupiny. Dispenzácie môžu zjednodušiť a urýchliť prácu lekárnika pri poskytovaní informačnej a poradenskej činnosti o veterinárnych liekoch.

MATERIÁL A METÓDY

Pri vypracovávaní základných informácií potrebných k dispenzácii veterinárnych liekov zo skupiny NSAID sme vychádzali z týchto zdrojov:

a) Vademecum veterinárnych liekov a prípravkov v Slovenskej republike
b) webová stránka Ústavu štátnej kontroly veterinárnych biopreparátov a liečiv (ÚŠKVBL)
c) webová stránka Európskej liekovej agentúry (EMA)

V prvom kroku sme vyhľadali názvy liekov s obsahom liečiv zo skupiny NSAID podľa Vademeca veterinárnych liekov a prípravkov. Do prehľadu neboli zahrnuté lieky, ktoré podáva výhradne veterinárny lekár (napr. injekcie, infúzie a pod.). Informácie o liekoch sme získavali zo súhrnov charakteristických vlastností lieku (SPC) a písomných informácií pre používateľa veterinárneho lieku (PIL) z webovej stránky EMA, prípadne ÚŠKVBL. Informácie boli spracované k 27.2.2021. Formou tabuľky sme vytvorili prehľad základných informácií potreb-

ných k dispenzácii veterinárnych liekov zo skupiny NSAID. Lieky v týchto tabuľkách sú rozdelené podľa liečiva, liekovej formy a druhu zvieraťa, pre ktorý je liek určený.

Príklady detailnej dispenzácie obsahujú súbor základných informácií o lieku, v ktorom sú uvedené liečivá a ich množstvo v prípravku, druh zvierat, pre ktoré je liek určený, indikácie, základne kontraindikácie, nežiaduce účinky, liekové interakcie a hlavne spôsob podania lieku, dávkovanie a opatrenia, ktoré by mala osoba podávajúca liek urobiť pre správnu, bezpečnú a účinnú farmakoterapiu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Jednou z najznámejších látok zo skupiny NSAID je kyselina **acetylsalicylová**, ktorá sa používa u všetkých druhov zvierat hlavne pre jej analgetické a antipyretické účinky. Je to jedna z mála nesteroidových protizápalových látok, ktorá je relatívne bezpečná pre psov i mačky, hoci môže spôsobiť významné krvácanie z gastrointestinálneho traktu u psov. Popri analgetických, protizápalových a antipyretických účinkoch sa terapeuticky využíva aj jej antiagregačný účinok na krvné doštičky pri liečbe diseminovanej intravaskulárnej koagulopatie a pri ochoreniach pľúcnych tepien v dôsledku infekcie spôsobenej srdcovými červami u psov. Používa sa tiež u mačiek s kardiomyopatiou (Plumb, 2008).

Veľmi často používanou látkou z tejto skupiny vo veterinárnej medicíne je **meloxikam**. Meloxikam sa užíva na akútne a chronické liečenie bolesti a zápalu u psov a mačiek. Jedným z najčastejších použití je osteoartritída a bolesť spojená s chirurgickým zákrokom. Pre psov bola stanovená akútna aj dlhodobá bezpečnosť a účinnosť. Použitie u mačiek je obmedzené na krátkodobé alebo dlhodobé užívanie v nízkych dávkach. Pri liečbe bolesti spojenej s chirurgickým zákrokom u mačiek má porovnateľnú a dokonca lepšiu účinnosť ako butorfanol. U ošípaných je meloxikam účinný pri syndróme MMA (mastitis-metritis-agalactia). Meloxikam sa nesmie používať pri gravidných a laktujúcich zvieratách, pri zvieratách trpiacich gastrointestinálnymi poruchami, s poškodenou funkciou pečene, srdca alebo obličiek. Nemal by sa podávať psom, mačkám a koňom do veku 6 týždňov a psom s hmotnosťou do 4 kg (Papich, 2011; Hederová, 2017).

Ďalším významným liečivom tejto skupiny je **karprofén**. Je to nesteroidové protizápalové liečivo odvodené od kyseliny fenylpropiónovej. Používa sa na zmiernenie zápalu a bolesti pri muskuloskeletárnych ochoreniach a degeneratívnych ochoreniach kĺbov. Je vhodné aj na tlmenie pooperačnej bolesti a ako pokračovanie parenterálnej analgézie. Podáva sa hlavne psom. Nesmie sa používať u zvierat trpiacich srdcovými, pečeňovými, obličkovými ochoreniami alebo u zvierat, u ktorých hrozí ulcerácia GIT. Nesmie sa podávať šteňatám mladším ako 4 mesiace a dehydratovaným a hypotenzným jedincom. Liečivo sa nesmie používať u gravidných súk a v období laktácie (Plumb, 2008; Lamka a kol., 2014).

Fenylbutazón je liečivo s veľmi silným antiflogistickým účinkom, ktorý sa približuje steroidným antiflogistikám. Oproti salicylátom má silnejšie analgetické účinky a má aj mierne urikozurické vlastnosti. Využíva sa ako analgetikum pri ochoreniach pohybového aparátu, pri bolestivých zraneniach a kolikách, hlavne u koní a psov (Lamka a kol., 2014).

V humánnej medicíne sa **koxiby** užívajú zriedkavo kvôli zvýšenému riziku vzniku tromboembolických kardiovaskulárnych a cerebrovaskulárnych príhod. Ale u zvierat sú indikované na potlačenie bolesti a liečbu zápalov pohybového aparátu, hlavne u psov.

Základné informácie potrebné k dispenzácii veterinárnych liekov s obsahom NSAID

Prehľad informácií potrebných k dispenzácii veterinárnych liekov s obsahom nesteroidných antiflogistík registrovaných na Slovensku je znázornený v tab. 1. Lieky sú rozdelené podľa liečiva, liekovej formy a druhu zvieraťa, pre ktorý sú určené.

Častou liekovou formou tejto skupiny sú žuvacie

Tab. 1: Základné informácie potrebné k dispenzácii veterinárnych liekov s obsahom NSAID

Liečivo	Názov lieku	Lieková forma	Druh zvierat	Indikácie	Základné informácie potrebné k dispenzácii
Meloxikam	Acticam, Inflacam, Loxicom, Metacam, Rheumocam	žuvacie tablety	psy	zmiernenie zápalu a bolesti pri akútnych a chronických svalových a kostných ochoreniach	Tablety sa užívajú denne s jedlom alebo bez jedla. Prvý deň sa podáva jednorazová dávka 0,2 mg.kg^{-1} a udržiavacia dávka je 0,1 mg.kg^{-1} raz denne. Nepodávať psom mladším ako 6 týždňov s hmotnosťou do 4 kg.
	Contacera, Inflacam, Metacam, Novaquin, Rheumocam	perorálna suspenzia	kone	zmiernenie zápalu a bolesti pri akútnych a chronických svalových a kostných ochoreniach	Pred použitím pretrepať. Podáva sa v malom množstve krmiva pred kŕmením. Suspenzie sa dávkujú pomocou odmernej striekačky 0,6 mg.kg^{-1} raz denne až 14 dní. V prvý deň sa podá dvojnásobná dávka. Nepodávať koňom mladším ako 6 týždňov.
	Inflacam, Loxicom, Melosus, Meloxidyl, Meloxoral, Metacam, Rheumocam		psy		Pred použitím pretrepať. Podáva sa priamo do papule alebo zmiešaný v krmive. Suspenzie sa dávkujú pomocou odmernej striekačky alebo v prípade Metacam kvapkadlom. Metacam 0,5 mg.ml^{-1} 1 kvapka dáva 0,02 mg meloxikamu a Metacam 1,5 mg dáva 0,05 mg. Dávkuje sa 0,2 mg.kg^{-1} prvý deň a 0,1 mg.kg^{-1} ďalšie dni. Nepodávať psom mladším ako 6 týždňov s hmotnosťou do 4 kg.
	Loxicom, Melosus, Meloxidyl, Meloxoral, Metacam		mačky		Spôsob podania rovnaký ako u psov. Pri chronických a akútnych ochoreniach je prvá dávka 0,1 mg.kg^{-1} a pokračuje sa podaním 0,05 mg.kg^{-1}/deň. Pri pooperačných bolestiach a zápaloch sa odporúča ošetrenie injekčným roztokom meloxikamu a následne suspenziou v dávke 0,05 mg.kg^{-1}. Nepodávať mačkám mladším ako 6 týždňov.
Kyselina acetylsalicylová	ASA	prášok na perorálny roztok	teľatá, kone, ošípané, kura domáca, morky	horúčkovité a bolestivé stavy, zápalové ochorenia, ošípané a kura domáca aj prevencia a liečba porúch obehového aparátu	Liek sa môže podať individuálne aj hromadne rozpustený v pitnej vode. Liek sa zvyčajne podáva jedenkrát denne, prípadne 2 – 3 x denne po 6 – 8 hodinách maximálne počas 10 dní. Po rozpustení v pitnej vode je potrebné roztok spotrebovať do 6 hodín. Denná dávka pre teľatá je 50 mg.kg^{-1} ž. hm., kone 10 – 60 g na kus, ošípané, morky a kura domáca 1 g na 10 kg ž. hm. Nepodávať zvieratám pri nízkej teplote prostredia.
Fenylbutazón	Phenylbut-ariem	perorálny gél	kone, poníky, psy	bolesť a zápal pohybového aparátu	Podávať čo najkratšiu dobu. Nepodávať spolu s krmivom. Kôň: prvá dávka 4,5 mg.kg^{-1} 2 x denne a pokračovacia dávka 2,5 mg.kg^{-1} 2 x denne počas 7 dní. Poník: prvá dávka 4,5 mg.kg^{-1} 2 x denne, pokračovacia dávka 3,5 mg.kg^{-1} 2 x denne počas 8 dní. Pes: prvá dávka 20 – 60 mg.kg^{-1}/deň, pokračovacia 24 mg.kg^{-1}/deň.

Ketoprofén	Dinalgen	perorálny roztok	hovädzí dobytok, ošípané	zníženie horúčky spojenej s respiračným ochorením	Maximálna dĺžka liečby je 3 dni. Pri liečbe musia zvieratá prijímať dostatočné množstvo tekutín. Podáva sa zriedený v pitnej vode, ktorá je jediný zdroj pitnej vody. Roztok sa pripravuje čerstvý každých 24 hodín. Teľatá 3 $mg.kg^{-1}$, ošípané 1,5 – 3 $mg.kg^{-1}$. Pri podávaní používať ochranné rukavice a okuliare.
	Dolovet vet	perorálny roztok	hovädzí dobytok	zmiernenie zápalu a horúčky	Liek sa podáva s vodu vo fľaške s 0,5 l vody. Podáva sa ihneď po zmiešaní v dávke 4 $mg.kg^{-1}$/deň počas 1 – 3 dní. Pri podávaní používať ochranné rukavice, okuliare a respirátor.
Karporfén	Carporal Carprieve Carprodyl f Rimadyl platable	tablety	psy	zmiernenie zápalu a bolesti pri muskuloskeletárnych ochoreniach a na tlmenie pooperačnej bolesti	Podávajú sa v dávke 4 $mg.kg^{-1}$/deň. Dĺžka liečby závisí od klinickej odpovede. Pri liečbe viac ako 14 dní by mal byť pes pravidelne monitorovaný. Použitie u zvierat mladších ako 6 týždňov alebo starých jedincov predstavuje riziko. Liek nepodávať gravidným sukám a v období laktácie.
Flunixín	Finadyne Transdermal	pour-on roztok	hovädzí dobytok	zníženie horúčky a zníženie bolesti	Aplikuje sa na suchú kožu a zvieratá je potrebné chrániť pred premočením 6 hodín po podaní. Podáva sa na neporušenú kožu na stredovú líniu chrbta. Ošetrované zvieratá je potrebné držať oddelene od ostatných. Dávka je 1 ml roztoku na 15 kg. Pri podávaní používať ochranný odev.
Firokoxib	Previcox	žuvacie tablety	psy	zmiernenie bolesti a zápalu	Tablety sa podávajú 1x denne s jedlom alebo bez jedla v dávke 5 $mg.kg^{-1}$. Nepodávať zvieratám mladším ako 10 týždňov a s hmotnosťou menšou ako 3 kg.
Robenakoxib	Onsior 5, 10, 20, 40	tablety	psy	liečba bolesti a zápalu pohybového aparátu	Podávajú sa 30 min pred alebo po jedle. Nemali by sa lámať. Podáva sa 1 $mg.kg^{-1}$ raz denne 6 dní u mačiek aj psov. Nepodávať psom s hmotnosťou menej ako 2,5 kg a mladším ako 3 mesiace a mačkám mladším ako 4 mesiace.
	Onsior 6		mačky		
Mevakoxib	Trocoxil	žuvacie tablety	psy	liečba bolesti a zápalu pohybového aparátu	Podáva sa pred alebo po hlavnom jedle psa. 2 $mg.kg^{-1}$ jednorazovo. Opakuje sa o 14 dní a potom každý mesiac maximálne 7 mesiacov. Nepodávať psom mladším ako 12 mesiacov a ľahším ako 5 kg.
Cimikoxib	Cimalgex	žuvacie tablety	psy	liečba bolesti a zápalu pohybového aparátu	Podáva sa 1x denne s jedlom alebo bez v dávke 2 $mg.kg^{-1}$. Liečbu monitorovať u psov mladších ako 6 mesiacov.

Zdroj: spracované podľa SPC, resp. PIL z webovej stránky EMA a ÚŠKVBL

tablety, čo je vo veterinárnej medicíne nezvyčajné, keďže v iných skupinách prevláda premix, prášok a roztok. Žuvacie tablety sú ochutené a zviera ich väčšinou dobre prijíma. Pour-on transdermálny roztok sme zaznamenali len u jedného liečiva – flunixín. Táto lieková forma sa nanáša na kožu pozdĺž chrbtice zvieraťa a je špecifická pre aplikáciu zvieratám. Používanie koxibov v humánnej medicíne ustupuje kvôli vzniku cerebrovaskulárnych a kardiovaskulárnych tromboembolických príhod, vo veterinárnej farmakoterapii sú však pomerne často zastúpenou skupinou z NSAID. Vo veterinárnej medicíne sa stretávame s tým, že iná sila toho istého lieku môže byť určená pre iný druh zvieraťa a je nevyhnutné podať iné informácie potrebné k správnej dispenzácii. Takto je to napr. pri lieku s obsahom meloxikamu (Metacam perorálna suspenzia), ktorý je v závislosti od sily možné podať psom, mačkám a koňom. V rámci dispenzácie je potrebné upozorniť majiteľov aj na rôzne špecifiká, napr. liek s obsahom ketoprofénu (Dinalgen) je možné užívať maximálne 3 dni, ďalej po aplikácii lieku s obsahom flunixínu (Finadyne Transdermal) je potrebné chrániť zviera 6 hodín pred premočením a držať od ostatných zvierat oddelene, alebo za ako dlho by mal byť medikovaný roztok spotrebovaný, resp. vymenený za nový. Všetky tieto informácie by mal lekárnik poskytnúť majiteľovi zvieraťa pri výdaji lieku pre zabezpečenie účinnej a kvalitnej farmakoterapie zvierat.

Príklady detailnej dispenzácie

V nižšie uvedenom texte sú príklady detailnej dispenzácie vybraných liekov zo skupiny NSAID.

Kyselina acetylsalicylová

Liek: ASA 467 mg.g^{-1} prášok na perorálny roztok. Výdaj lieku je viazaný na veterinárny lekársky predpis.

Liečivo: 1 g lieku obsahuje 467 mg kyseliny acetylsalicylovej

Druh zvierat: teľatá, kone, kura domáca, morky

Indikácie: Teľatá, kone: horúčkovité a bolestivé stavy, zápalové ochorenia. Ošípané: prevencia a liečba porúch obehového systému, respiračný syndróm prasiat, horúčkovité stavy pri infekciách, začínajúce kĺbové ochorenia. Kura domáca, morky: prevencia a liečba porúch obehového systému (ascites u brojlerov), horúčkovité stavy pri infekciách, začínajúce kĺbové ochorenia, vysoká teplota prostredia a respiračné problémy.

Kontraindikácie: Nepodávať pri poruchách zrážania krvi, vredovej chorobe žalúdka a čriev. Nepodávať zvieratám pri nízkej teplote prostredia.

Osobité bezpečnostné opatrenia: Pri manipulácii s liekom sa odporúča používať ochranné rukavice a respirátor.

Použitie počas gravidity, laktácie a znášky: Neodporúča sa v čase gravidity, laktácie a znášky.

Spôsob podania lieku: Perorálne. Pri individuálnom podaní sa vypočítané množstvo lieku rozpustí v primeranom množstve vody. Pri hromadnom podaní sa obsah dózy (450 g) za stáleho miešania rozpustí v 5 až 10 litrov pitnej vody. Liek sa podáva zvyčajne jedenkrát denne, liečebne sa môže podať aj 2 – 3 krát za deň po 6 – 8 hodinách. Maximálna dĺžka podávania lieku je 10 po sebe nasledujúcich dní.

Dávkovanie: teľatá 50 mg.kg^{-1} ž. hm./deň, kone 10 – 60 g na kus/deň, ošípané, morky a kura domáca 1 g na 10 kg ž. hm./deň

Ochranná lehota: Mäso bez ochrannej lehoty, nepodávať nosniciam, ktorých vajcia sú určené na ľudský konzum.

Čas použiteľnosti: Po otvorení ihneď spotrebovať celý obsah balenia, po nariedení v pitnej vode spotrebovať do 6 hodín [ÚŠKVBL (3) 2021].

Meloxikam

Lieky: INFLACAM, LOXICOM, MELOSUS, MELOXIDYL, MELOXORAL, METACAM perorálna suspenzia pre psy. Výdaj liekov je viazaný na veterinárny lekársky predpis.

Liečivo: suspenzie obsahujú 0,5 mg alebo 1,5 mg meloxikamu na mililiter

Druh zvierat: psy

Indikácie: Zmiernenie zápalu a bolesti pri akútnych

a chronických svalových a kostných ochoreniach.

Kontraindikácie: Nepoužívať pri gravidných a laktujúcich zvieratách, pri zvieratách trpiacich gastrointestinálnymi poruchami, s poškodenou funkciou pečene, srdca alebo obličiek. Nepodávať psom, mačkám a koňom do veku 6 týždňov a psom s ž. hm. do 4 kg.

Liekové interakcie: Neaplikovať súčasne s inými NSAIDs, glukokortikoidmi, diuretikami, antikoagulanciami, aminoglykozidovými antibiotikami a látkami so silnou väzbou na proteíny.

Nežiaduce účinky: Občas boli popisované typické nežiaduce reakcie NSAIDs, ako sú strata apetítu, vracanie, hnačka. Tieto vedľajšie účinky sú vo väčšine prípadov prechodné.

Osobité bezpečnostné opatrenia: Nepoužívať u dehydrovaných, hypovolemických alebo hypotenzných zvierat, pretože je tu potenciálne riziko renálnej toxicity.

Použite počas gravidity a laktácie: Bezpečnosť lieku počas gravidity nebola potvrdená.

Spôsob podania lieku: Pred použitím dobre pretrepať. Liek sa podáva zamiešaný v krmive alebo priamo do tlamy. Klinickú odpoveď je zvyčajne možné pozorovať v priebehu 3 – 4 dní. Liečba sa preruší najneskôr po 10 dňoch, ak nie je viditeľné klinické zlepšenie.

Suspenzie je možné aplikovať pomocou odmernej striekačky priloženej v balení. Prípravky METACAM je možné aplikovať pomocou kvapkadla (pre veľmi malé plemená psov). METACAM 0,5 $mg.ml^{-1}$ perorálna suspenzia pre psy jedna kvapka poskytuje 0,02 mg meloxikamu. METACAM 1,5 $mg.ml^{-1}$ perorálna suspenzia pre psy jedna kvapka poskytuje 0,05 mg meloxikamu.

Dávkovanie: Prvý deň 0,2 $mg.kg^{-1}$, udržiavacia dávka 0,1 $mg.kg^{-1}$ 1 x denne. Klinickú odpoveď je možné pozorovať v priebehu 3 – 4 dní.

Čas použiteľnosti: Po prvom otvorení vnútorného balenia: 6 mesiacov [EMA (3) 2021; EMA (4) 2021; EMA (5) 2021; EMA (8) 2021; EMA (11) 2021; EMA (13) 2021; EMA (16) 2021; EMA (18) 2021; EMA (20) 2021]

Karprofén

Lieky: CARPORAL, CARPRIEVE, CARPRODYL F, RIMADYL PALATABLE, RYCARFA FLAVOUR tablety pre psov. Výdaj liekov je viazaný na veterinárny lekársky predpis.

Liečivo: tableta obsahuje 20 mg, 50 mg, 100 mg alebo 160 mg karprofénu

Druh zvierat: psy

Osobité bezpečnostné opatrenia: Použitie u zvierat mladších ako 6 týždňov alebo u starých jedincov predstavuje určité riziko.

Spôsob podania lieku: Perorálne. Pri liečbe trvajúcej viac ako 14 dní by mal byť pes pravidelne vyšetrovaný. Tablety sú väčšinou ochutené a sú dobre prijímané psami. Tablety možno rozdeliť na 2 časti, v prípade lieku CARPORAL na 2 alebo 4 rovnaké časti.

Dávkovanie: Počiatočná dávka je 4 mg ketoprofénu na kg/deň podaná ako jedna denná dávka alebo rozdelená do dvoch dávok. Na predĺženie analgetického a protizápalového účinku pri pooperačnom parenterálnom podaní je možné pokračovať podávaním tabliet v dennej dávke 4 mg karporfénu na kg ž. hm. počas 5 dní.

Čas použiteľnosti: Rozbalená alebo rozdelená tableta by mala byť použitá do: CARPORAL 3 dní od rozbalenia, CARPRIEVE 24 hodín od rozbalenia, CARPRODYL F do 7 dní od rozbalenia, RYCARFA FLAVOR do 24 hodín od rozbalenia. U ostatných tabliet sa neuvádza [ÚŠKVBL (4) 2021; ÚŠKVBL (5) 2021; ÚŠKVBL (6) 2021; ÚŠKVBL (7) 2021; ÚŠKVBL (8) 2021; ÚŠKVBL (9) 2021; ÚŠKVBL (10) 2021; ÚŠKVBL (11) 2021; ÚŠKVBL (16) 2021; ÚŠKVBL (17) 2021; ÚŠKVBL (18) 2021; ÚŠKVBL (19) 2021; ÚŠKVBL (20) 2021; ÚŠKVBL (21) 2021].

Mevakoxib

Liek: TROCOXIL. Výdaj lieku je viazaný na veterinárny lekársky predpis.

Liečivo: tablety obsahujú 6 mg, 20 mg, 30 mg, 75 mg alebo 95 mg mevakoxibu

Druh zvierat: psy vo veku 12 mesiacov a viac

Indikácie: Liečba bolesti a zápalov spojených

s degeneratívnymi ochoreniami kĺbov u psov v prípadoch, kde je indikovaná nepretržitá liečba presahujúca jeden mesiac.

Kontraindikácie: Nepodávať zvieratám mladším ako 12 mesiacov alebo ľahším ako 5 kg, s gastrointestinálnymi vredmi, s ochorením srdca, pečene, obličiek u dehydratovaných a hypotenzných zvierat.

Liekové interakcie: Nepodávať súčasne s glukokortikoidmi, inými NSAIDs, liečivami so silnou väzbou na plazmatické bielkoviny a nefrotoxickými liekmi. Do úvahy treba brať riziko interakcií aj po 1 – 2 mesiacoch po podaní Trocoxilu.

Nežiaduce účinky: Bežne boli hlásené nežiaduce účinky na tráviaci trakt ako je zvracanie a hnačka. V ojedinelých prípadoch bola hlásená gastrointestinálna ulcerácia.

Použite počas gravidity a laktácie: Nepoužívať u gravidných a lakujúcich zvierat.

Spôsob podania lieku: Liek sa podáva pred alebo s hlavným jedlom psa.

Dávkovanie: 2 mg mevacoxibu/kg ž. hm. Liečba sa opakuje o 14 dní a potom je dávkovací interval 1 mesiac. Liečebný cyklus by nemal presiahnuť 7 po sebe idúcich dávok (6,5 mesiaca) [EMA (27) 2021; EMA (28) 2021; EMA (29) 2021].

ZÁVER

Štúdia je zameraná na dispenzačnú činnosť v lekárni v oblasti veterinárnej medicíny. Lieky s obsahom nesteroidných antiflogistík sú vo veterinárnej medicíne často využívané na liečbu bolesti a rôznych zápalových ochorení. Zo skupiny NSAID sa vo veterinárnych registrovaných liekoch na Slovensku, ktoré podáva chovateľ zvieraťa, vyskytovali nasledujúce liečivá – meloxikam, kyselina acetylsalicylová, fenylbutazón, ketoprofén, karporfén, flunixín, firokoxib, robenakoxib, mevakoxib a cimikoxib. Prehľad základných informácií potrebných k dispenzácii bol spracovaný z 51 registrovaných liekov s týmito liečivami. Dispenzácia veterinárnych liekov a prípravkov je síce menej častým lekárenským výkonom, ale je rovnako dôležitá ako pri humánnych liekoch. Prehľadné texty k dispenzácii veterinárnych liekov môžu farmaceutovi v praxi pomôcť rýchlo nájsť základné informácie potrebné k poskytnutiu kvalitnej poradenskej a informačnej činnosti pri výdaji veterinárneho lieku a zároveň prispieť k bezpečnej a účinnej farmakoterapii zvierat.

ZOZNAM LITERATÚRY

EMA (1): SPC – CIMALGEX žuvacie tablety pre psov. QM01AH93, reg. č. EU/2/10/119/001-012. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/cimalgex-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (2): SPC – CONTACERA 15 mg/ml perorálna suspenzia pre kone. QM01AC06, reg. č. EU/2/12/144/006. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/contacera-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (3): SPC – INFLACAM 1,5 mg/ml perorálna suspenzia pre psy. QM01AC06, reg. č. EU/2/11/134/001. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/inflacam-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (4): SPC – INFLACAM 15 mg/ml perorálna suspenzia pre kone. QM01AC06, reg. č. EU/2/11/134/009. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/inflacam-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (5): SPC – INFLACAM žuvacie tablety pre psy. QM01AC06, reg. č. EU/2/11/134/011. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/inflacam-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (6): SPC – LOXICOM 0,5 mg/ml perorálna suspenzia pre mačky. QM01AC06, reg. č. EU/2/08/090/009. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/loxicom-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (7): SPC – LOXICOM 1 mg ochutené tablety pre psov. QM01AC06, reg. č. EU/2/08/090/019. https://www.ema.europa.eu/

en/documents/product-information/loxicom-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (8): SPC – LOXICOM 1,5 mg/ml perorálna suspenzia pre psy. QM01AC06, reg. č. EU/2/08/090/003. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/loxicom-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (9): SPC – LOXICOM 2,5 mg ochutené tablety pre psov. QM01AC06, reg. č. EU/2/08/090/023. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/loxicom-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (10): SPC – MELOSUS 0,5 mg/ml perorálna suspenzia pre mačky. QM01AC06, reg. č. EU/2/10/116/007. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/melosus-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (11): SPC – MELOSUS 1,5 mg/ml perorálna suspenzia pre psy. QM01AC06, reg. č. EU/2/10/116/005. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/melosus-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (12): SPC – MELOXIDYL 0,5 mg/ml perorálna suspenzia pre mačky. QM01AC06, reg. č. EU/2/06/070/008. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/meloxidyl--epar-product-information_sk.pdf. [cit. 26.2.2021].

EMA (13): SPC – MELOXIDYL 1,5 mg/ml perorálna suspenzia pre psy. QM01AC06, reg. č. EU/2/06/070/001. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/meloxidyl-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 26.2.2021].

EMA (15): SPC – MELOXORAL 0,5 mg/ml perorálna suspenzia pre mačky. QM01AC06, reg. č. EU/2/10/111/006. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/meloxoral-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (16): SPC – MELOXORAL 1,5 mg/ml perorálna suspenzia pre psy. QM01AC06, reg. č. EU/2/10/111/005. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/meloxoral-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (17): SPC – METACAM 0,5 mg/ml perorálna suspenzia pre mačky. QM01AC06, reg. č. EU/2/97/004/034. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/metacam-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (18): SPC – METACAM 0,5 mg/ml perorálna suspenzia pre psy. QM01AC06, reg. č. EU/2/97/004/012. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/metacam-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (19): SPC – METACAM 1 mg žuvacie tablety pre psy. QM01AC06, reg. č. EU/2/97/004/043. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/metacam-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (20): SPC – METACAM 1,5 mg/ml perorálna suspenzia pre psy. QM01AC06, reg. č. EU/2/97/004/003. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/metacam--epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (21): SPC – METACAM 2,5 mg žuvacie tablety pre psy. QM01AC06, reg. č. EU/2/97/004/046. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/metacam-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (22): SPC – NOVAQUIN 15 mg/ml perorálna suspenzia pre kone. QM01AC06, reg. č. EU/2/15/186/001-002. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/novaquin-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (23): SPC – ONSIOR tablety pre psov. QM01AH91, reg. č. EU/2/08/089/004-19. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/onsior-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 26.2.2021].

EMA (24): SPC – PREVICOX žuvacie tablety pre psov. QM01AH90, reg. č. EU/2/04/045/001-6. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/previcox-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 26.2.2021].

EMA (25): SPC – RHEUMOCAM 15 mg/ml perorálna suspenzia pre kone. QM01AC06, reg. č. EU/2/07/078/009. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rheumocam-epar-

product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (26): SPC – RHEUMOCAM žuvacie tablety pre psy. QM01AC06, reg. č. EU/2/07/078/005. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/rheumocam-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 27.2.2021].

EMA (27): SPC – TROCOXIL 30 mg žuvacie tablety pre psov. QM01AH92, reg. č. EU/2/08/084/003-19. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/trocoxil-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 25.2.2021].

EMA (28): SPC – TROCOXIL 75 mg žuvacie tablety pre psov. QM01AH92, reg. č. EU/2/08/084/004-19. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/trocoxil-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 25.2.2021].

EMA (29): SPC – TROCOXIL 95 mg žuvacie tablety pre psov. QM01AH92, reg. č. EU/2/08/084/005-19. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/trocoxil-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 25.2.2021].

EMA (30): SPC – ONSIOR 6 mg tablety pre mačky. QM01AH91, reg. č. EU/2/08/089/001-003, https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/onsior-epar-product-information_sk.pdf. [cit. 26.2.2021].

Hederová, J. a kol.: V*ademecum veterinárnych liekov a prípravkov v Slovenskej republike* [Vademecum of veterinary drugs and preparations in Slovak republic]. Bratislava: Pro-Trade, s.r.o., 2017. 1147 s.

Lamka, J., Ducháček, L.: *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie* [Veterinary drugs for students of pharmacy]. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2014. 152 s.

Papich, M. G.: *Saunders Handbook Of Veterinary Drugs: Small And Large Animal*. 3rd edn., St. Louis: Saunders, 2011. 901 s.

Plumb, D. C.: *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. 6th edn., Stockholm: PharmaVet Inc., 2008. 1136 p.

ÚŠKVBL (1): SPC – ACTICAM 1 mg žuvacie tablety pre psy. QM01AC06, reg. č. 96/005/DC/12-S. http://www.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/07/acticam_1mg_tbl.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (2): SPC – ACTICAM 2,5 mg žuvacie tablety pre psy. QM01AC06, reg. č. 96/006/DC/12-S, http://www.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/07/acticam_25mg_tbl.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (3): SPC – ASA 467 mg/g prášok na perorálny roztok. QN02BA01, reg. č. 96/041/05-S, http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/asa_467mg-g_plv_sol.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (4): SPC – CARPORAL 160 mg tablety pre psy. QM01AE91, reg. č. 96/083/DC/15-S, http://www.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/07/carporal_160mg_tbl.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (5): SPC – CARPORAL 40 mg tablety pre psy. QM01AE91, reg. č. 96/082/DC/15-S, http://www.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/07/carporal_40mg_tbl.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (6): SPC – CARPRIEVE 100 mg. QM01AE91, reg. č. 96/013/DC/11-S, http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/carprieve_100mg_tbl.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (7): SPC – CARPRIEVE 20 mg. QM01AE91, reg. č. 96/011/DC/11-S, http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/carprieve_20mg_tbl.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (8): SPC – CARPRIEVE 50 mg. QM01AE91, reg. č. 96/012/DC/11-S. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/carprieve_50mg_tbl.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (9): SPC – CARPRODYL F 100 mg. QM01AE91, reg. č. 96/004/DC/08-S, http://www.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/07/carprodyl_f_100mg_tbl.doc. [cit. 26.2.2021].

ÚŠKVBL (10): SPC – CARPRODYL F 20 mg. QM01AE91, reg. č. 96/002/DC/08-S, http://www.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/07/carprodyl_f_20mg_tbl.doc. [cit. 26.2.2021].

ÚŠKVBL (11): SPC – CARPRODYL F 50 mg. QM01AE91, reg. č. 96/003/DC/08-S, http://www.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/07/carprodyl_f_50mg_tbl.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (12): SPC – DINALGEN 300 mg/ml. QM01AE03, reg. č. 96/009/MR/09-S, http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/dinalgen_300mg-ml_sol.doc. [cit. 25.2.2021].

ÚŠKVBL (13): SPC – DOLOVET VET 160 mg/g. QM01AE03, reg. č. 96/002/MR/07-S, http://www.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/07/dolovet_vet_160mg-g_plv.doc. [cit. 25.2.2021].

ÚŠKVBL (14): SPC – FINADYNE TRANSDERMAL. QM01AG90, reg. č. 96/076/DC/14-S. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/finadyne_transdermal_50mg-ml_pour-on_sol.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (15): SPC – PHENYLBUTARIEM. QM01AA01, reg. č. 96/086/01-S, http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/phenylbutariem_100mg-ml_gel.doc. [cit. 26.2.2021].

ÚŠKVBL (16): SPC – RIMADYL PALATABLE 100 mg. QM01AE91, reg. č. 96/072/02-S. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/05/rimadyl_palatable_100mg_tbl.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (17): SPC – RIMADYL PALATABLE 20 mg. QM01AE91, reg. č. 96/070/02-S. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/05/rimadyl_palatable_20mg_tbl.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (18): SPC – RIMADYL PALATABLE 50 mg. QM01AE91, reg. č. 96/071/02-S. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/05/rimadyl_palatable_50mg_tbl.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (19): SPC – RYCARFA FLAVOUR 100 mg. QM01AE91, reg. č. 96/032/DC/10-S. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/05/rycarfa_flavoured_100mg_tbl.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (20): SPC – RYCARFA FLAVOUR 20 mg. QM01AE91, reg. č. 96/030/DC/10-S. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/05/rycarfa_flavour_20mg_tbl.doc. [cit. 27.2.2021].

ÚŠKVBL (21): SPC – RYCARFA FLAVOUR 50 mg. QM01AE91, reg. č. 96/031/DC/10-S. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/05/rycarfa_flavour_50mg_tbl.doc. [cit. 27.2.2021].

Vyhláška MZ SR č. 129/2012 Z. z. Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky o požiadavkách na správnu lekárenskú prax, § 33 [Decree of Ministry of Health of Slovak republic No. 129/2012 on requirements on good pharmaceutical practice, § 33]. https://www.slov-lex.sk/pravne-predpisy/SK/ZZ/2012/129/20120515. [cit. 20. 2. 2021.].

Zákon NR SR č. 362/2011 Z. z. o liekoch a zdravotníckych pomôckach a o zmene a doplnení niektorých zákonov, § 24 [Act No. 362/2011 Coll. on Drugs and Medical Devices and on Amendment and Supplementing of Certain Acts as amended later]. https://www.slov-lex.sk/pravne-predpisy/SK/ZZ/2011/362/20190101. [cit. 20.2.2021].

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 2: 78 – 87, 2021

OBSAH CELKOVÝCH POLYFENOLOV, FLAVONOIDOV A ANTIRADIKÁLOVÁ AKTIVITA PLODOV, LISTOV A KÔRY *HIPPOPHAE RHAMNOIDES* L.

CONTENTS OF TOTAL POLYPHENOLS, FLAVONOIDS AND ANTIRADICAL ACTIVITY OF FRUIT, LEAF AND BARK OF *HIPPOPHAE RHAMNOIDES* L.

Eftimová, Jarmila; Galeštoková, Mária

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

jarmila.eftimova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Cieľom experimentu bolo stanoviť obsah celkových polyfenolov, flavonoidov a antiradikálovú aktivitu vzoriek plodov, listov, kôry *Hippophae rhamnoides* L., odrody „Sluníčko". Odroda bola pestovaná v oblasti Košice-okolie (SR) a vzorky boli zbierané v roku 2019. Najvyššia antiradikálová aktivita stanovená ako % redukcie DPPH radikálu bola 16,66 % ± 1,21 v metanolovom extrakte zriedenej vzorky listov (1 : 49). Metanolové extrakty zriedených vzoriek (1 : 24) vykazovali antiradikálovú aktivitu 8,73 % ± 0,92 kôra a 7,14 % ± 0,91 plody. Antiradikálová aktivita prepočítaná na kvercetín (QE) bola v metanolovom extrakte vzorky listov 1930 mg QE.100g^{-1}, plodov 1040 mg QE.100g^{-1} a kôry 1190 mg QE.100g^{-1} suchej drogy. Najvyššiu antiradikálovú aktivitu prepočítanú na Trolox (TEAC) sme stanovili v metanolovom extrakte vzorky listov 9460 mg TEAC.100g^{-1} suchej drogy. V metanolovom extrakte kôry sme stanovili antiradikálovú aktivitu 1645 mg TEAC.100g^{-1} a v plodoch 1040 mg TEAC.100g^{-1} suchej drogy. Antiradikálovú aktivitu prepočítanú na kyselinu askorbovú sme stanovili v metanolovom extrakte vzorky listov 4035 mg AAEAC.100g^{-1} a kôry 1645 mg AAEAC.100g^{-1} suchej drogy. Najvyššiu hodnotu obsahu celkových flavonoidov (ako ekvivalent kvercetín) sme zaznamenali v acetátovom extrakte vzorky listov 4270 mg QE.100g^{-1} a v extrakte vzorky plodov 3130 mg QE.100g^{-1} suchej drogy. Najvyšší obsah celko-vých polyfenolov (ako ekvivalent kyseliny galo-vej) sme stanovili vo vodnom extrakte listov 17 860 mg GA.100g^{-1} a kôry 10 260 mg GA.100g^{-1} suchej drogy. Z výsledkov vyplynulo, že listy, kôra a plody rakytníka rešetliakového sú zdrojom poly-

fenolov, vykazujú antioxidačnú aktivitu a majú uplatnenie v profylaxii ochorení spôsobených oxidačným stresom.

Kľúčové slová: antioxidačná aktivita; flavonoidy; polyfenoly; rakytník rešetliakový

ABSTRACT

The aim of the experiment was to determine the content of total polyphenols, flavonoids and antiradical activity of samples of fruits, leaves, bark of *Hippophae rhamnoides* L., variety „Sunshine". The variety was grown in the Košice-okolie (SR) area and samples were collected in 2019. The highest antiradical activity determined as % reduction of DPPH radical was 16.66% ± 1.21 in the methanol extract of the diluted leaf sample (1 : 49). Methanol extracts of the diluted samples (1 : 24) showed antiradical activity of 8.73% ± 0.92 peel and 7.14% ± 0.91 fruit. The antiradical activity converted to quercetin (QE) was in a methanol extract of a leaf sample of 1930 mg QE.100g^{-1}, fruits 1040 mg QE.100g^{-1} and bark 1190 mg QE.100g^{-1} of dry drug. The highest antiradical activity converted to Trolox (TEAC) was determined in a methanol extract of a leaf sample of 9460 mg TEAC.100g^{-1} of dry drug. We determined the antiradical activity of 1645 mg TEAC.100g^{-1} in methanolic bark extract and 1040 mg TEAC.100g^{-1} of dry drug in fruits. The antiradical activity converted to ascorbic acid was determined in a methanol extract of a leaf sample of 4035 mg AAEAC.100g^{-1} and bark 1645 mg AAEAC.100g^{-1} of dry drug. The highest value of the content of total flavonoids (as quercetin equivalent) was recorded in the acetate extract of the leaf sample 4270 mg QE.100g^{-1} and in the extract of the fruit sample 3130 mg QE.100g^{-1} of dry drug. The highest content of total polyphenols (as gallic acid equivalent) was determined in the aqueous extract of the leaves 17 860 mg GA.100g^{-1}and the bark 10 260 mg GA.100g^{-1}of dry drug. The results showed that the leaves, bark and fruits of Sea buckthorn are a source of polyphenols, have antioxidant activity and have a role in the prophylaxis of diseases caused by oxidative stress.

Key words: antioxidant activity; flavonoids; polyphenols; sea buckthorn

ÚVOD

Rakytník rešetliakový (*Hippophae rhamnoides* L.) patrí do radu *Rosales*, čeľade *Elaeagnaceae* a rodu *Hippophae*. Rastlina je zaradená k adaptogénom a prirodzene rastie v údoliach riek Ázie a Európy (Fielda a kol., 2021). Rakytník rešetliakový je trváci, dvojdomý, svetlomilný, opadavý, 2 až 5 metrov vysoký ker, ktorý sa dobre adaptuje na sucho, mráz a emisie (Valíček, Havelka, 2014; Valíček, Kokoška, Holubová, 2016). Najčastejšie sa pestuje rakytník rešetliakový pravý (*Hippophae rhamnoides* L., subsp. *rhamnoides*) a rakytník rešetliakový karpatský (*Hippophae rhamnoides* subsp. *carpatica* Rousi), ktoré sa od seba morfologicky odlišujú tvarom konárov a plodov (Habán, Habánová, 2013). Samičie rastliny vytvárajú žlté až oranžové kôstkovice vajcovitého, elipsoidného, guľatého tvaru s krátkou stopkou (Valíček, Kokoška, Holubová, 2016).

Kôstkovice v období konzumnej zrelosti obsahujú karotenoidy (β-karotén, lykopén, kryptoxantín, zeaxantín), flavonoidy (kempferol, izorhamnetín, kvercetín, katechín, rutín), proantokyanidíny, katechíny (epikatechín, galokatechín a epigalokatechín), fenolové kyseliny (salicylová, p-kumárová, m-kumárová, galová a p-hydroxyfenyl-mliečna) (Hojerová, Pažoureková, 2012; Koskovac a kol., 2017). Obsahujú vitamíny A, B_1, B_{12}, C, E, K, hesperidín, ktorý chráni a predlžuje účinok vitamínu C (Bajer, 2014; Masoodi a kol., 2020). Taktiež sú zdrojom esenciálnych omega-3, omega-6, omega-7 mastných kyselín a superoxid dismutázy (Mrázová, Babincová, 2018). V kôstkoviciach sa nachádza cholín, kyselina vínna, jablčná, triesloviny, betaín, pektín,

minerálne látky a sacharidy (Valíček, Kokoška, Holubová, 2016). Listy obsahujú flavonoidy, aminokyseliny (metionín, cysteín, lyzín), izoprenoidy, triterpény, β-sitosterol (Koskovac a kol., 2017), lykopén a vitamín C (Valíček, Kokoška, Holubová, 2016). V kôre sa nachádzajú polyfenoly a serotonín, ktorý pozitívne pôsobí pri psychickom vyčerpaní (Masoodi a kol., 2020). Hlavné obsahové látky v semenách tvoria karotenoidy, triesloviny, vitamín E, β-sitosterín, vysoký podiel kyseliny palmitovej, linolovej, linolénovej a olejovej (Valíček, Havelka, 2014).

Nadzemné časti rastliny sa v tradičnej medicíne používajú v profylaxii a liečbe prechladnutí, vírusových, kožných infekcií a žalúdočných vredov (Ghangal a kol., 2013). Plody sa používajú ako antioxidant, stomachikum, roborans, tonikum, karcinostatikum a antisklerotikum (Hemzal, 2015). V *in vitro* pokusoch bol potvrdený inhibičný účinok vodného extraktu listov na rakovinové bunky prostaty (Masoodi a kol., 2020). Liečivé účinky oleja sa využívajú v kozmetike, dermatológii, gynekológii a onkológii pri terapii ožarovaním (Habán, Habánová, 2013; Hemzal, 2015; Valíček, Kokoška, Holubová, 2016). Cieľom experimentálnej štúdie bolo stanoviť obsah celkových polyfenolov, flavonoidov a antiradikálovú aktivitu extraktov vzoriek listov, plodov a kôry rakytníka rešetliakového, odrody „Sluníčko“.

MATERIÁL A METÓDY

Biologický materiál

V experimente boli použité vzorky plodov, listov a kôry rakytníka rešetliakového, odrody „Sluníčko“. Odroda bola pestovaná v pôdnoklimatických podmienkach Košice-okolie, a vzorky boli zbierané v roku 2019. Vzorky boli sušené pri 60 °C, rozpráškované pomocou elektrického mlynčeka a extrakty pripravené pomocou rôznych rozpúšťadiel.

Postup prípravy extraktov

Do troch 100 ml varných baniek sme navážili 0,1 g homogenizovaných vzoriek plodov, kôry a listov rakytníka rešetliakového. Ako extrakčné činidlo sme použili 50 ml metanolu. Pripravené vzorky sme 1 hodinu extrahovali v ultrazvukom kúpeli (Kraintek 18, Slovensko). Extrahované vzorky sme prefiltrovali a straty metanolu doplnili na objem 50 ml. Filtráty sme použili k ďalšiemu stanoveniu. Pre lepšiu viditeľnosť farebnej zmeny a reakcie sme vzorku extraktu listov zriedili 50-krát a vzorku extraktu plodov a kôry 25-krát.

Stanovenie antiradikálovej aktivity DPPH metódou

Antiradikálovú aktivitu metanolových extraktov vzoriek plodov, kôry, listov sme stanovili DPPH metódou. Metóda je založená na poskytnutí vodíkového atómu testovanej látky stabilnému syntetickému radikálu DPPH• (1,1-difenyl-2--(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl), ktorý sa redukuje a vznikne DPPH-H. Reakciu a pokles absorbancie sme sledovali spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke $\lambda = 517$ nm (Paulová, Bochořáková, Táborská, 2004).

Postup stanovenia

Roztok DPPH radikálu 0,06 mmol.dm^{-3} sme si pripravili rozpustením 2,24 mg difenylpikrylhydrazylu v 100 ml metanolu. Zmiešaním 30 µl metanolu a 900 µl roztoku DPPH radikálu sme si pripravili porovnávací roztok DPPH. Absorbanciu porovnávacieho roztoku (A_{DPPH}) sme zmerali pri vlnovej dĺžke $\lambda = 520$ nm, pričom hodnota absorbancie vypovedala o 100 % prítomnosti radikálu DPPH.

Rovnakým postupom sme pripravili rastlinné extrakty, zmiešali 30 µl extraktu vzorky (listy, plody, kôra) a 900 µl roztoku DPPH radikálu. Roztok sme inkubovali 3 minúty a následne odmerali absorbanciu ($A_{extrakt}$) v troch opakovaniach. Absorbancia skúmaného roztoku bola meraná v porovnaní so slepou vzorkou metanol. Výsledky meraní boli vyjadrené ako percento redukcie (inhibície) DPPH podľa vzťahu:

antioxidačná aktivita (%) =
$100 - (A_{extrakt} / A_{DPPH} \times 100)$

$A_{extrakt}$ – absorbancia extraktu po 3 minútach
A_{DPPH} – absorbancia roztoku DPPH

Celkovú antiradikálovú aktivitu (TAA) metanolových extraktov vzoriek sme vyjadrili ako ekvivalent Troloxu (TEAC), kvercetínu (QE) a kyseliny askorbovej (VCEAC). Na základe rovnice kalibračnej priamky štandardov bola vypočítaná koncentrácia vzorky a prepočítaná na mg (ekvivalent).$100g^{-1}$ suchej vzorky.

Stanovenie celkových flavonoidov

Na stanovenie obsahu celkových flavonoidov sme použili spektrofotometrickú metódu založenú na tvorbe farebných chelátových komplexov s chloridom hlinitým v kyslom prostredí kyseliny octovej. Absorbanciu sme merali pri vlnovej dĺžke λ = 425 nm (Kalita a kol., 2013).

Postup stanovenia

Do troch 100 ml varných baniek sme navážili po 0,6 g homogenizovaných vzoriek plodov, listov a kôry. Následne sme pridali 20 ml acetónu, 1 ml 0,5 % roztoku methenamínu, 1 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej a zahrievali pod spätným chladičom na vodnom kúpeli 30 minút. Ochladenú zmes sme prefiltrovali cez vatu do 100 ml odmernej banky. Drogu s vatou sme zahrievali pod spätným chladičom v tej istej varnej banke s 20 ml acetónom po dobu 10 minút ešte dvakrát. Extrakty sme prefiltrovali a doplnili acetónom na objem 100 ml. Takto sme získali roztoky A vzoriek kôry, listov a plodov (Ramos a kol., 2017).

V deliacich lievikoch sme zmiešali 20 ml roztoku (A), 20 ml destilovanej vody, 15 ml etylacetátu a pretrepávali. Acetónové extrakty vzoriek sme pretrepávali s 15 ml etylacetátu a ešte potom trikrát s 10 ml ethylacetátu. Etylacetátové výtrepky sme dvakrát premyli s 50 ml destilovanej vody, preniesli do 50 ml odmernej banky a doplnili po objem banky etylacetátom. Takýmto postupom sme získali roztoky B vzorky kôry, listov a plodov.

Na spektrofotometrické stanovenie sme do 25 ml odmernej banky napipetovali 10 ml roztoku B pridali sme 1 ml 2 % roztoku chloridu hlinitého v zmesi kyseliny octovej a metanolu v pomere 1 : 19. Skúmané roztoky sme doplnili zmesou kyseliny octovej a metanolu v pomere 1 : 19 po 25 ml objem. Porovnávacie roztoky sme pripravili 10 ml roztoku B a doplnili sme zmesou kyseliny octovej a metanolu v pomere 1 : 19 na objem 25 ml. Po 30 minútach inkubácie sme merali absorbanciu roztoku pri vlnovej dĺžke λ = 425 nm oproti slepej vzorke, ktorá neobsahovala roztok chloridu hlinitého. Obsah flavonoidov v % sme vypočítali podľa vzorca:

% flavonoidov = (A k) / m
A – absorbancia skúmaného roztoku pri λ =425 nm
k – prepočítavací koeficient na štandard kvercetín
m – navážka drogy v gramoch

Výsledky boli prepočítané na základe kalibračnej priamky kvercetínu a uvedené v mg QE na 100 g suchej vzorky.

Stanovenie celkových polyfenolov

Na stanovenie celkového množstva polyfenolov sme použili kolorimetrickú metódu s Folin-Ciocalteu (FC) činidlom. Absorbanciu sme merali pri vlnovej dĺžke λ =750 nm (Singleton, Rossi, 1965; Bliainski a kol., 2013).

Postup stanovenia:

Do troch 250 ml varných baniek sme navážili po 0,5 g homogenizovanej drogy (kôry, listov, plodov) a pridali 150 ml vody. Zmes sme priviedli k varu a pod spätným chladičom varili 30 minút. Vychladené zmesi sme previedli do 250 ml odmerných baniek a doplnili destilovanou vodou na objem banky. Roztoky sme prefiltrovali a prvých 50 ml filtrátu sme odstránili. Z vodného extraktu listov, plodov a kôry sme odobrali 5 ml a doplnili destilovanou vodou na objem 25 ml. Potom sme 2 ml roztoku zmiešali s 1 ml kyseliny

Tab. 1: Absorbancie a percento inhibície DPPH radikálu

Vzorka	Absorbancia [nm]		Inhibícia DPPH [%]
	priemer	(SD)	
Listy	0,105	0,002	16,66 ± 1,21
Plody	0,117	0,001	7,14 ± 0,91
Kôra	0,115	0,001	8,73 ± 0,92

* priemer absorbancie vzoriek z listov, plodov a kôry rakytníka;
SD – smerodajná odchýlka

Tab. 2: Antiradikálová aktivita vzoriek vyjadrená ako ekvivalent QE, TEAC, VCEAC

Vzorka	QE $mg.ml^{-1}$ vo vzorke	QE $mg.100g^{-1}$ suchej drogy	TEAC $mg.ml^{-1}$ vo vzorke	TEAC $mg.100g^{-1}$ suchej drogy	AAEAC $mg.ml^{-1}$ vo vzorke	AAEAC $mg.100g^{-1}$ suchej drogy
Listy	0,0386 ± 0,002	1930	0,1892 ± 0,02	9460	0,0807 ± 0,01	4035
Plody	0,0208 ± 0,002	1040	0,0305 ± 0,02	1525	0,0234 ± 0,01	1170
Kôra	0,0238 ± 0,002	1190	0,0605 ± 0,01	3025	0,0329 ± 0,01	1645

*QE - kvercetínu, TEAC – Trolox equivalent antioxidant capacity, AAEAC – ascorbic acid ekvivalent antioxidant capacity

fosfowolfrámovej a 17 ml 20 % roztoku uhličitanu sodného. Po dvoch minútach po pridaní posledného roztoku sme merali absorbancie (UVVIS – Beckman DU530, USA) pri vlnovej dĺžke λ = 750 nm oproti slepej vzorke s 2 ml destilovanej vody. Absorbancia bola meraná v troch opakovaniach a následne bola vypočítaná priemerná hodnota vzoriek a smerodajná odchýlka.

Celkový obsah polyfenolov (ako ekvivalent kyseliny galovej) sme vypočítali pomocou kalibračnej priamky kyseliny galovej a vyjadrili v mg GAE na 100 g suchej vzorky.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Antiradikálová aktivita stanovená DPPH metódou

Namerané hodnoty absorbancií metanolových extraktov vzoriek listov, plodov a kôry rakytníka rešetliakového, priemerné hodnoty, smerodajné odchýlky a percento inhibície DPPH radikálu sú uvedené v tabuľke (viď tab. 1). Táto redukcia sa vzťahuje na 50 ml extraktu obsahujúceho 0,1 g sušenej drogy.

Antiradikálová aktivita stanovená ako % redukcie DPPH bola v metanolovom extrakte zriedenej vzorky listov 16,66 % ± 1,21. Metanolový extrakt zriedenej vzorky kôry vykazoval antiradikálovú aktivitu 8,73 % ± 0,92 a plodov 7,14 % ± 0,91. Antiradikálovú aktivitu plodov rakytníka rešetliakového stanovili Papcun a kol. (2008), avšak na extrakciu používali etanol a extrakty riedili v pomeroch (1 : 9, 2 : 8, 3 : 7, 4 : 6 a 5 : 5). Autori stanovili najvyššiu antiradikálovú aktivitu (94,7 %) pri riedení 5 : 5 a najnižšiu aktivitu (11,9 %) pri riedení 1 : 9. Autori zistili, že ak použili na extrakciu zmes vody a acetónu, stanovili v extrakte plodov nižšiu antiradikálovú aktivitu (74,7 %). Pri vzájomnom porovnávaní hodnôt antiradikálovej aktivity etanolového extraktu plodov (1 : 9) a metanolového extraktu plodov (1 : 24) sme my stanovili v meta-

Tab. 3: Absorbancie, obsah celkových flavonoidov v % a prepočet na ekvivalent QE

Vzorka	Absorbancia [nm]		Obsah celkových flavonoidov v %	QE mg.ml^{-1} vo vzorke	QE mg.100g $^{-1}$ suchej drogy
	priemer	(SD)			
Listy	0,387	0,002	4,27% ± 0,02	0,041 ± 0,0002	4270
Plody	0,285	0,002	3,13% ± 0,02	0,030 ± 0,0002	3130
Kôra	0,155	0,001	1,77% ± 0,01	0,017 ± 0,0001	1770

*QE - ekvivalent kvercetín

nolovom extrakte nižšie hodnoty. Rozdiely v nameraných hodnotách mohli spôsobovať: odroda, lokalita pestovania, pôdno-klimatické podmienky, termín zberu a výber vhodného extrakčného činidla.

Antiradikálovú aktivitu metanolových extraktov vzoriek kôry, listov a plodov sme vyjadrili ako ekvivalenty kvercetínu, Troloxu a kyseliny askorbovej (viď tab. 2.) Antiradikálovú aktivitu (ako ekvivalent QE, TEAC a AAEAC) sme vypočítali pomocou kalibračnej priamky kvercetínu y = 0,6767x – 0, 1311, (R^2 = 0, 9747), Troloxu y = 0,0777x – 0, 1197, (R^2 = 0, 9691) a kyseliny askorbovej y = 0,2093x – 0, 1219, (R2 = 0, 9901).

Najvyššiu antiradikálovú aktivitu (ako ekvivalent kvercetín) vykazoval metanolový extrakt vzorky listov 0,0386 ± 0,002 mg QE.ml^{-1} a najnižšiu extrakt vzorky plodov 0,0208 ± 0,002 mg QE.ml^{-1}. Antiradikálová aktivita metanolového extraktu vzorky listov, prepočítaná na 100 g suchej drogy bola 1930 mg QE.100g^{-1}, plodov 1040 mg QE.100g^{-1} a kôry 1190 mg QE.100g^{-1}.

Najvyššiu antiradikálovú aktivitu (ako ekvivalent Trolox) vykazoval metanolový extrakt vzorky listov 0,1892 ± 0,02 mg TEAC.l-1. V metanolovom extrakte vzorky kôry sme stanovili antiradikálovú aktivitu 0,0605 ± 0,01 mg TEAC.ml^{-1}. Najnižšiu antiradikálovú aktivitu sme zaznamenali v extrakte vzorky plodov (0,0305 ± 0,02 mg TEAC.ml^{-1}). Antiradikálová aktivita metanolového extraktu vzorky listov prepočítaná na 100 g suchej drogy bola 9460 mg TEAC.100g^{-1}, kôry 1645 mg TEAC.100g-1 a plodov 1040 mg TEAC.100g^{-1}. Orsavová (2019) stanovila metódou DPPH antiradikálovú aktivitu vodnoetanolových extraktov (70 : 30) plodov rakytníka rešetliakového odrody Sluníčko na 12,80 g Troloxu.kg^{-1}. Vzájomným porovnaním hodnôt sme zistili, že my sme stanovili v metanolových extraktoch nižšie hodnoty. Naopak, ak porovnávame hodnoty antiradikálovej aktivity našich extraktov plodov s hodnotami (0,57 mg TEAC.100g^{-1}), ktoré stanovili Cosmulescu a kol. (2017), potom my sme stanovili vyššie hodnoty.

Najvyššiu antiradikálovú aktivitu (ako ekvivalent kyseliny askorbovej) sme stanovili v metanolovom extrakte vzorky listov 4035 mg AAEAC.100g^{-1}. V metanolovom extrakte kôry sme stanovili antiradikálovú aktivitu 1645 mg AAEAC.100g^{-1} a plodoch 1170 mg AAEAC.100g^{-1} suchej drogy. Cho a kol. (2017) stanovili DPPH metódou antiradikálovú aktivitu v extrakte z listov rakytníka rešetliakového 20,6 g AAEAC.100g^{-1} suchej drogy, čo je skoro päťkrát vyššia hodnota, než akú sme stanovili my. Korekar a kol. (2014) stanovili antiradikálovú aktivitu v plodoch sedemnástich prírodných populácií rakytníka rešetliakového od 56 do 3909 mg AAEAC.100g^{-1} suchej drogy. Ak porovnávame naše hodnoty antiradikálovej aktivity plodov s hodnotami Korekar a kol. (2014), môžeme konštatovať, že naše hodnoty sa pohybujú v stanovenom rozsahu.

Z dosiahnutých výsledkov vyplynulo, že s klesajúcimi hodnotami absorbancie stúpali hodnoty

Tab. 4: Obsah celkových polyfenolov vyjadrených v % a prepočet na ekvivalent GAE

Vzorka	Namerané hodnoty absorbancií nm		Obsah celkových polyfenolov v %	mg GAE. ml^{-1}	mg GAE.$100g^{-1}$
	priemer	(SD)			
Listy	0,545	0,005	17,86 % ± 0,20	0,3573 ±0,004	17860
Plody	0,160	0,007	1,9 % ± 0,26	0,0380 ±0,005	1900
Plody	0,361	0,004	10,26 % ± 0,15	0,2051 ±0,003	10260

*GAE - ekvivalent kyseliny galovej

antiradikálovej aktivity. Pri porovnávaní antiradikálovej aktivity zriedených metanolových extraktov vzoriek listov, plodov a kôry sme zistili, že extrakt vzorky listov (1 : 49) vykazoval najvyššiu antiradikálovú aktivitu (ako ekvivalent QE, TEAC, AAEAC).

Obsah celkových flavonoidov

Namerané priemerné hodnoty absorbancií acetátového extraktu vzoriek listov, plodov, kôry, smerodajné odchýlky a obsah celkových flavonoidov v % a následne prepočítaných na ekvivalent QE (mg QE.100.g^{-1} suchej drogy) uvádzame v tabuľke (viď tab. 3). Celkový obsah flavonoidov (ako ekvivalent kvercetín) sme vypočítali pomocou kalibračnej priamky kvercetínu $y = 9,5294x + 0,0028$ (R^2=0,9997).

Najvyšší obsah celkových flavonoidov v % sme stanovili v acetátovom extrakte vzorky listov 4,27 % ± 0,02 a najnižší obsah v extrakte vzorky kôry 1,77 % ± 0,01. V acetátovom extrakte vzorky plodov sme namerali 3,13 % ± 0,02 celkových flavonoidov. Najvyššie hodnoty obsahu celkových flavonoidov (ako ekvivalent kvercetín) sme namerali v extrakte listov 4270 mg QE.$100g^{-1}$ a plodoch 3130 mg QE.$100g^{-1}$. Cho a kol. (2017) stanovili v extrakte listov obsah celkových flavonoidov 53,6 mg QE.$100g^{-1}$ sušenej drogy, čo je nižšia hodnota, než akú sme stanovili my (4270 mg QE.$100g^{-1}$). Cosmulescu a kol. (2017) stanovili obsah celkových flavonoidov v extrakte vzorky z plodov rakytníka rešetliakového 147,98 mg QE.$100g^{-1}$ sušenej drogy. Pri vzájomnom porovnaní hodnôt sme zistili, že sme stanovili 21-krát vyššiu hodnotu. Anjum, Tripathi (2015) uvádzajú, že v etylacetátovom extrakte vzorky plodov stanovili obsah celkových flavonoidov 1,16 mg QE. $100g^{-1}$ suchej drogy. Sytařová a kol. (2020) obsah celkových flavonoidov (ako ekvivalent rutín) stanovili v extraktoch listov deviatich odrôd rakytníka rešetliakového od 14,40 – 49,44 mg RE.kg^{-1} a v plodoch od 0,55 – 4,11 mg RE.kg^{-1} suchej drogy. Výsledky nemôžeme navzájom porovnávať, pretože autori použili prepočet na štandard rutín a nie na kvercetín.

Obsah celkových polyfenolov

Obsah celkových polyfenolov vo vodných extraktoch listov, kôry a plodov rakytníka rešetliakového sme prepočítavali na ekvivalent kyseliny galovej (GAE). Celkový obsah polyfenolov bol vyjadrený na základe kalibračnej priamky kyseliny galovej $y = 1,2067x + 0,1138$ (R^2 = 0,9975). V tabuľke (viď tab. 4) uvádzame hodnoty absorbancií vzoriek listov, plodov, kôry rakytníka rešetliakového, priemerné hodnoty nameraných absorbancií, smerodajné odchýlky a hodnoty celkových polyfenolov v % a prepočítané na ekvivalent GAE.$100g^{-1}$ suchej drogy.

Najvyššie percentuálne zastúpenie celkových polyfenolov 17,86 % ± 0,20 sme stanovili vo vodnom extrakte vzorky listov. Vo vodnom extrakte vzorky kôry sme stanovili obsah celkových polyfenolov 10,26 % ± 0,15. Najnižšie množstvo celkových

polyfenolov sme stanovili vo vodnom extrakte plodov 1,9 % ± 0,26. Najvyšší obsah celkových polyfenolov prepočítaných na ekvivalent kyseliny galovej sme stanovili vo vodnom extrakte listov 17 860 mg GAE.100g^{-1} a kôry 10 260 mg GA.100g^{-1} suchej drogy. Najnižší obsah celkových polyfenolov sme zaznamenali vo vodnom extrakte plodov 1900 mg GA.100g^{-1}. Orsavová (2019) stanovila v plodoch rakytníka rešetliakového odrody „Sluníčko" celkový obsah polyfenolov 11 480 mg GAE.100g^{-1}. Pri porovnávaní hodnôt navzájom sme zistili, že naše namerané hodnoty sú nižšie ako uvádza autorka. Cosmulescu a kol. (2017) stanovili obsah celkových polyfenolov v plodoch rakytníka z Rumunska na 343,57 mg GA.100g^{-1} suchej drogy. Pri porovnaní našich hodnôt s hodnotami autorov sme zistili, že sme namerali šesťkrát vyššiu hodnotu. Sytařová a kol. (2020) stanovili v plodoch a listoch deviatich odrôd rakytníka rešetliakového celkové polyfenoly v rozmedzí 0,70 – 3,62 g GAE.kg^{-1} (plody) a 1,88 – 3,72 g GAE.kg^{-1} (listy). Pri vzájomnom porovnávaní hodnôt sme zistili, že sme vo vodnom extrakte listov stanovili vyšší obsah celkových polyfenolov ako uvádzajú autori a pri plodoch sa naše hodnoty pohybujú v stanovenom rozsahu. Korekar a kol. (2014) stanovili obsah celkových fenolov v plodoch v sedemnástich prírodných populáciách rakytníka rešetliakového v rozmedzí od 964 do 10 704 mg GAE.100g^{-1} suchej drogy. Naše stanovené hodnoty sa pohybujú v rozsahu ako uvádzajú autori. Pri stanovení celkových polyfenolov metódou s Folin-Ciocalteu činidlom je potrebné brať do úvahy, že činidlo môže reagovať aj s inými zlúčeninami (kyselina askorbová, sacharidy) a môže nadhodnotiť výsledky (Zendulka, 2008).

Z výsledkov vyplynulo, že na antiradikálovej aktivite vzoriek listov, plodov a kôry sa z celkových polyfenolov podieľali flavonoidy iba malým percentom. Preto je potrebné identifikovať ďalšie skupiny fenolických látok, ktoré sa podieľajú na antiradikálovej aktivite rakytníka rešetliakového. Obsah celkových polyfenolov v rakytníku rešetliakovom je ovplyvňovaný odrodou, klimatickými a pôdnymi podmienkami. Droga rakytníka rešetliakového (list, plod, kôra) má heterogénne zloženie, ktoré ovplyvňuje extrakciu. Množstvo obsahových látok v extraktoch závisí od termínu zberu, spôsobu úpravy drogy, vhodne zvoleného extrakčného činidla a extrakčnej metódy. Ondrejovič a kol. (2009) uvádzajú, že vzhľadom k tomu, že rastlinná droga tvorí heterogénnu zmes, je vhodné pri izolácii fytochemikálií z rastlinnej drogy odstrániť neželané fenolové a nefenolové zlúčeniny vo výslednom extrakte (vosky, tuky, terpény a chlorofyl).

ZÁVER

V experimentálnej štúdii sme stanovili obsah celkových polyfenolov, flavonoidov a antiradikálovú aktivitu vzorky plodov, listov, kôry rakytníka rešetliakového, odrody „Sluníčko", pestovanej v Košice-okolí a vzorky boli zbierané v roku 2019. Antiradikálovú aktivitu metanolových extraktov vzoriek kôry, listov a plodov stanovenú ako % redukcie DPPH radikálu sme vyjadrili ako ekvivalenty kvercetínu (QE), Troloxu (TEAC) a kyseliny askorbovej (VCEAC). Najvyššiu antiradikálovú aktivitu (ako ekvivalent QE, TEAC, VCEAC) vykazoval zriedený (1 : 49) metanolový extrakt vzorky listov rakytníka rešetliakového. V metanolovom extrakte vzorky listov sme stanovili antiradikálovú aktivitu 1930 mg QE.100g^{-1} suchej drogy, 9460 mg TEAC.100g^{-1} suchej drogy a 4035 mg VCEAC.100g^{-1} suchej drogy. Najvyššie hodnoty obsahu celkových flavonoidov (ako ekvivalent kvercetín) sme zaznamenali v acetátovom extrakte listov 4270 mg QE.100g^{-1} a plodov 3130 mg QE.100g^{-1} suchej drogy. Najvyšší obsah celkových polyfenolov sme stanovili v extrakte listov (17 860 mg GA.100g^{-1} suchej drogy) a kôry (10 260 mg GA.100g^{-1} suchej drogy). Obsah celkových polyfenolov a antiradikálovú aktivitu extraktov vzoriek ovplyvňuje odroda, lokalita pestovania, klimatické faktory. Heterogénne zloženie drogy rakytníka rešetliakového (list, plod, kôra) ovplyv-

ňuje extrakciu a stabilitu obsahových látok. Rozhodujúci vplyv má aj spôsob úpravy drogy, zvolená extrakčná metóda a extrakčné činidlo. V experimente sme potvrdili, že listy, kôra a plody rakytníka rešetliakového sú cenným zdrojom polyfenolov, vitamínu C, vykazujú antioxidačnú aktivitu a majú uplatnenie v profylaxii a liečbe ochorení spôsobených oxidačným stresom. Zároveň sa plody a listy môžu využiť pri výrobe funkčných potravín.

ZOZNAM LITERATÚRY

Anjum, N., Tripathi, Y. C.: Flavonoid constituents, total polyphenol and antioxidant efficacy of *Hippophae rhamnoides* L. berries. In *Proceedings of 7th Conference of the International Seabuckthorn Association on "Seabuckthorn: Emerging Technologies for Health Protection and Environmental Conservation" (V. Singh, Ed.inChief)*, 2015, 24 – 26, 383 – 393.

Bajer, J.: *Rakytník zázračná rostlina, oranžový poklad* [Sea buckthorn, a miracle plant, an orange treasure]. Praha: Mladá fronta a. s., 2014, 68 – 73, 109 s.

Blainski, A., Lopes, G. C., Palazzo De Melo. J. C.: Apllication and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, 2013, 18 (6), 6852 – 6865.

Cosmulescu, S., Trandafir, I., Nour, V.: Phenolic acids and flavonoids profiles of extracts from edible wildfruits and their antioxidant properties. *International Journal of Food Properties*, 2017, 20 (12), 3124 – 3134.

Fielda, M. H., Verleijsdonka, B., Peglarb, S., Lewisb, M.: *Hippophaë rhamnoides* L. (*Elaeagnaceae* family) in the Pleistocene epoch of the British Isles. *Review of Palaeobotany and Palynologyjournal*, 2021, 104385. https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2021.104385. Accessed March 12, 2021.

Habán, M., Habánová, M.: Rakytník rešetliakový [Sea buckthorn]. *Miniatlas liečivých rastlín z Herby, podkategória hlošinovité (Eleagnaceae)*, 2013. https://www.liecive.herba.sk/koncentraty/miniatlas-liecivych-rastlin-z-herby/241-hlosinovite-eleagnaceae/1317-rakytnik-resetliakovy [cit. 2019-8-12].

Hemzal, B.: *Rostlinné léky* [Herbal medicines]. Brno: NEPTUN, 2015, 203 s.

Hojerová, J., Pažoureková. S.: Prírodné lipidy v modernej kozmetike. Rastlinné oleje bohaté na omega-7 mastné kyseliny [Natural lipids in modern cosmetics. Vegetable oils rich in omega-7 fatty acids]. *Liečivé rastliny*, 2012, 2012 (4). https://www.liecive.herba.sk/archiv/vsetky-cisla/358-liecive-rastliny-2011/liecive-rastliny-6-2011/1192-prirodne-lipidy-v-modernej-kozmetike-13-rastlinne-oleje-bohate-na-omega-7-mastne-kyseliny. [cit. 2019 -11-6].

Cho, Ch. H., Jang, H., Lee, M, Kang, H., Heo, H. J., Kim, D. O.: Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf extracts protect neuronal PC-12 cells from oxidative stress. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 27 (7), 1257 – 1265.

Kalita, P., Tapan, B. K., Tapas, K. P., Kalita, R.: Estimation of total flavonoid content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum Sensitivum Linn. Journal of drug delivery & therapeutics*, 2013, 3 (4), 33 – 37.

Koskovac, M., Cupara, S., Kipic, M., Barjaktarevic, A., Milovanovic, O., Kojicic, M.: Review Sea buckthorn oil – a valuable source for cosmeceuticals. *Cosmetic*, 2017, 4 (40), 1 – 10.

Korekar, G., Dolkar, P., Singh, H., Srivastava, R. B., Stobdan, T.: Variability and the genotypic effect on antioxidant activity, total phenolics, carotenoids and ascorbic acid content in seventeen natural population of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) from trans-Himalaya. *LWT – Food Science and Technology*, 2014, 55 (1), 157 – 162.

Mrázová, J., Babincová, D.: Osvedčené kombinácie liečivých húb a rastlín v bežnej lekárskej praxi [Proven combinations of medicinal mushrooms and plants in common medical practice]. In *Edukafarm*

Seminárny zborník Inšpirácia v prírode pre medicínu 21. Storočia II. Edukafarm spol. s.r.o, 2018. 1 – 20.

Masoodi, K. Z., Wani, W., Dar, Z. A, Mansoor, S., Anam-ul-Haq, S., Farooq, I., Hussain, K., Wani, S. A., Nehvi, Firdos A., Ahmed, N.: Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) inhibits cellular proliferation, wound healing and decreases expression of prostate specific antigen. *Journal of Functional Foods,* 2020, 73, 104 102.

Ondrejovič, M., Maliar, T., Polívka, Ľ., Šilhár, S.: Polyfenoly jabĺk [Apple polyphenols]. *Chem. Listy*, 2009, 103, 394 − 400.

Orsavová, J.: *Bioaktivní látky u netradičních surovin rostlinného původu* [Bioactive compounds of non-traditional plant raw material]. Disertační práce. 2019, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/43794/orsavov%c3%a1_2019_dp.pdf. [cit. 2021-3-30].

Papuc, C., Diaconescu, C., Nicorescu, V., Crivineanu, C.: Antioxidant activity of polyphenols from sea buckthorn fruits (*Hippophae rhamnoides*). *Revista de Chimie – Bucharest – Original Edition*, 2008, 59 (4), 392 – 394.

Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, E.: Metódy stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro* [*In vitro* methods for estimation of the antioxidant activity of natural compounds]. *Chemické listy,* 2004, 174 – 179.

Singleton, V. L., Rossi, J. A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, 16, 144 – 158.

Sytařová, I., Orsavová ,J., Snopek, L., Mlček, J., Byczyński, Ł., Mišurcová, L.: Impact of phenolic compounds and vitamins C and E on antioxidant activity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries and leaves of diverse ripening times. *Food Chemistry,* 2020, 310, 125 784.

Valíček, P., Havelka. E.: *Rakytník řešetlákový rostlina budoucnosti* [Sea buckthorn – plant of the future]. Benešov: Nakladatelství Start, 2014. 9 – 18, 66 – 68.

Valíček, P., Kokoška. L., Holubová. K.: *Léčivé rostliny třetího tisíciletí* [Medicinal plants of the third millennium]. Benešov: START, 2016. 9, 75, 80 – 83.

Zendulka, O.: *Polyfenoly ve výživě jako možná prevence nádorových onemocnění* [Polyphenols in diet as possible prevention of cancer diseases]. Disertační práce, 2008, 137 s. <https://is.muni.cz/th/167123/lf_d/Disertace.pdf >. [cit 2021-3-30].

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 2: 88 – 98, 2021

ANALÝZA PRESKRIPCIE LIEKOV INDIKOVANÝCH NA TERAPIU ALERGICKEJ RINITÍDY

ANALYSIS OF THE PRESCRIPTION OF MEDICINAL PRODUCTS INDICATED IN ALLERGIC RHINITIS THERAPY

Rozman Antoliková, Natália

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

natalia.antolikova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Alergická rinitída (AR) je bežné chronické ochorenie dýchacích ciest sprostredkované imunoglobulínom E s prevalenciou 10 až 30 % v dospelej populácii. Čoraz viac sa spája so zmenou podnebia vo vzťahu k peľovému alergénu vplývajúcemu na rozsah a závažnosť alergickej rinitídy. Tieto predpoklady sa potvrdili aj v uvedenej štúdii, kde sa analýzou ročnej preskripcie z dvoch nezávislých lekární na východe Slovenska sledoval nárast počtu pacientov s diagnózou J30.1 (Alergická rinitída zapríčinená peľom). Zvýšená preskripcia bola sledovaná hlavne počas jari (marec – máj) s frekvenciou 34,61 % vzhľadom na ročné obdobie. Tento údaj manifestuje aj rozsah prijatých receptov v počte 1944, pričom na základe vývojového diagramu sa v konečnom dôsledku hodnotilo 861 z nich. Prihliadalo sa pri tom na vekovú skupinu pacientov v rozmedzí 15 – 64 rokov. Z preskripčných záznamov vyplýva, že z farmakologickej liečby AR sa odporúčajú antihistaminiká (60,74 %) a kortikoidy (29,27 %).

Kľúčové slová: alergická rinitída; doplnková terapia; farmakoterapia; klinické aspekty ochorenia; preskripčný záznam liečiva

ABSTRACT

Allergic rhinitis is a common chronic disease of airways which is mediated by immunoglobulin E. It affects 10 to 30 % of adult population. It is increasingly associated with climate change in relation to the pollen allergen affecting the

extent and severity of allergic rhinitis. These assumptions were also confirmed by the presented study, where the analysis of annual prescriptions from two independent pharmacies in eastern Slovakia observed an increase in the number of patients diagnosed with J30.1 (Allergic rhinitis caused by pollen). The increased prescription was monitored mainly during spring (March – May) with a frequency of 34.61 % with respect to the season. This data also manifest the range of recipes received in the number of 1944, and on the basis of the flow chart, 861 of them were finally evaluated. The age group of patients in the range of 15 – 64 years was taken into account. Prescribing records suggest that antihistamines (60.74 %) and corticoids (29.27 %) are recommended for pharmacological treatment of AR.

Key words: allergic rhinitis; adjunctive therapy; pharmacotherapy; clinical aspects of the disease; drug prescription records

ÚVOD

Pôvod alergickej rinitídy (AR) je potrebné hľadať v chronickej nádche. Alergická nádcha zastrešuje širokú škálu nozologických jednotiek s pestrou patofyziológiou. Definuje sa ako zápal sliznice nosa, charakterizovaný minimálne jedným z príznakov ako kýchanie, svrbenie (alebo iný dráždivý pocit v nose), výtok z nosa, upchávanie nosa (kongescia sliznice) (Čižnár, 2009; Sur a Plesa, 2015; Hrubiško, 2016). U väčšiny pacientov sa ale vyskytujú aj pridružené prejavy, medzi ktorými dominujú očné príznaky (svrbenie, slzenie, pocit cudzieho telesa v oku, opuch mihalníc). Sleduje sa aj väčšia/menšia strata čuchu, svrbenie uší, bolesti hlavy, poruchy spánku, únava, frustrovanosť. Zápal takmer vždy postihuje aj prepojené sliznice, preto je často prítomná aj rinokonjunktivitída, resp. rinosinusitída (Hrubiško, 2016). Alergickú rinitídu teda definuje každá viacmenej chronická nádcha neinfekčného pôvodu, spojená s vyššie uvedenými prejavmi. Postihuje 10 až 15 % detí vo vekovej skupine 6 – 7 ročných a 25 – 35 % detí vo vekovej skupine 13 – 14 ročných. U chlapcov je častejšia, v dospelosti sa pomer medzi pohlaviami vyrovnáva, pričom špecifickými IgE protilátkami sa jej pôvod dokáže iba v približne polovici prípadov (Čižnár, 2009; Hrubiško, 2016). Prvým krokom úspešnej liečby je preto stanovenie konkrétneho typu rinitídy pozitívnym alergickým kožným testom alebo prostredníctvom sérovo špecifického IgE testu (Hoyte a Nelson, 2018).

Kontakt s alergénom vyvolá alergický zápal nosovej sliznice u predtým senzibilizovaného jedinca (prítomnosť alergénovo špecifickej protilátky IgE v sére, alebo priamo v sliznici horných dýchacích ciest viazanej na mastocyty). Skorá fáza alergickej zápalovej reakcie je vyvolaná vazoaktívnymi mediátormi (histamín, prostaglandíny, leukotriény) spôsobujúcimi vazodilatáciu s extravazáciou plazmy, následkom čoho je sliznica nosa zdurená, začervenaná s prítomnou seróznou tekutinou. Zápalové mediátory dráždením nervových zakončení zapríčiňujú svrbenie a kýchanie. Neskorá fáza zápalu nastupuje po niekoľkých hodinách od expozície. Spája sa s aktiváciou T-lymfocytov, mastocytov, bazofilov, eozinofilov, endotelových a epitelových buniek. Vstupnú bránu pre alergény predstavujú dýchacie cesty, a preto sú jej najčastejšou príčinou vzdušné alergény ako roztoče bytového prachu. Pôvodcami sú aj domáce zvieratá, ale aj plesne, či predovšetkým pele rastlín (Čižnár, 2009; Gažová, 2021). Ukazuje sa, že zvyšujúca sa teplota a vystavenie oxidu uhličitému zintenzívňuje produkciu peľu z jednotlivých rastlín. Zároveň sa ukázalo, že zvýšenie počtu dní bez mrazu a neskorší výskyt prvého mrazu korelujú s dlhšími peľovými sezónami (Hoyte a Nelson, 2018). Za podstatne zriedkavejšiu príčinu sa považujú alergény vstupujúce do organizmu inou cestou ako sliznicami nosa, teda potravou, bodnutím hmyzom alebo parenterálnou cestou (pri podaní liekov). Na základe uvedeného môžeme alergickú rinitídu diferencovať na infekčnú (pôvodcom sú baktérie, vírusy, huby) a neinfekčnú, ktorá je alergická (celoročná, sezónna a profesijná)

Tab. 1: Klasifikácia alergickej rinitídy podľa MKCH-10

J30 Vazomotorická a alergická rinitída	J30.0 Vazomotorická rinitída
	J30.1 Alergická rinitída zapríčinená peľom
	J30.2 Iná sezónna alergická rinitída
	J30.3 Iná alergická rinitída
	J30.4 Alergická rinitída, bližšie neurčená

Zdroj: Národné centrum zdravotníckych informácií (NCZI), 2021

alebo nealergická. Nealergická neinfekčná AR je opisovaná ako idiopatická, vazomotorická, hyperreaktívna bez prítomnosti eozinofilov, resp. často indukovaná liekmi (Gažová, 2021).

V terapii AR sa naďalej uplatňuje vyhýbanie sa alergénom, aplikácia liečiv na symptomatickú úľavu, protizápalové terapeutiká a alergická imunoterapia (Hoyte a Nelson, 2018). Nakoľko sa z hľadiska závažnosti nejedná o ochorenie život ohrozujúce, často sú symptómy podceňované a liečba zanedbávaná. Neliečená rinitída pritom znižuje kvalitu života, vedie k zvýšenej únavnosti, bolestiam hlavy, kognitívnym poruchám. V závažných prípadoch sa spolupodieľa na sprievodných ochoreniach ako hypertrofia lymfatických tkanív, otitídy, chronická sinusitída a bronchiálna astma (Čižnár, 2009). Posledné roky sa však zaznamenali pokroky v terapii AR zahŕňajúce intranazálne antihistaminiká a nové spôsoby podávania intranazálnych steroidov (v USA dostupné v rôznych liekových formách ako OTC, čiže voľne predajné) (Hoyte a Nelson, 2018).

Cieľom predkladanej štúdie bolo preto zosumarizovať terapiu alergickej rinitídy v našich podmienkach prostredníctvom ročnej analýzy preskripcie z dvoch verejných lekární a priniesť odporúčania týkajúce sa racionálnej a účinnej terapie v boji proti sezónnej polinóze.

MATERIÁL A METÓDY

Výsledky štúdie vychádzajú z údajov preskripčných záznamov liečiv pre pacientov s diagnózou J30.0 – J30.4 (viď tab. 1) podľa MKCH-10. V predkladanej analýze boli použité preskripčné záznamy pacientov vo vekovom rozhraní 15 – 64 rokov (obdobie adolescencie a dospelosti) v čase od 1.1 do 31.12.2020 (obdobie jedného roku, 2020).

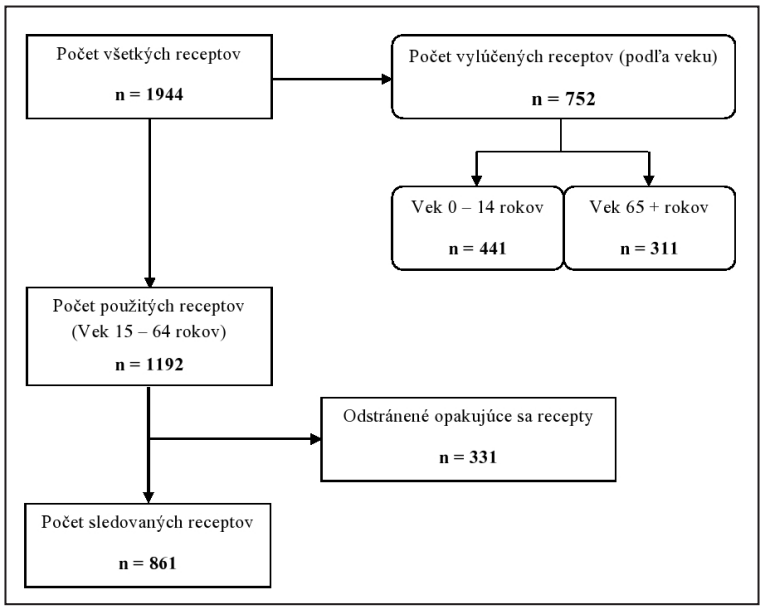
Preskripcia liečiv bola sledovaná v dvoch verejných lekárňach v Bardejove, pričom v ich bezprostrednej blízkosti sa nenachádzali žiadne zdravotné strediská, čím sa získali objektívnejšie dáta. Prostredníctvom vývojového diagramu (viď obr. 1) sa stanovil konečný počet analyzovaných receptov, z celkového množstva 1944.

Celkovo sa hodnotilo 1944 receptov. Vzhľadom na vybranú vekovú kategóriu 15 až 64 rokov sa vylúčila pediatrická populácia vo veku do 14 rokov (441 receptov) a následne aj geriatrická populácia s počtom lekárskych predpisov 311. Výsledkom tejto selekcie bolo 1192 receptov predpísaných pacientom vo vybranej vekovej kategórii, t. j. adolescencie a dospelosti. Zo získaných záznamov boli vylúčené opakované predpisy liečiv u toho istého pacienta, čím sa v konečnom dôsledku získalo 861 receptov na ďalšiu analýzu.

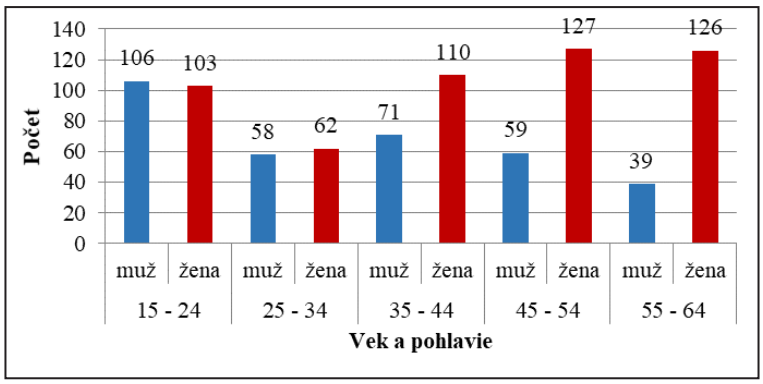
VÝSLEDKY

V rámci jednotlivých nižšie uvedených výsledkov sa vychádzalo z 861 vyselektovaných receptov. Najčastejšie boli spracované recepty s diagnózou J30.1 (Alergická rinitída zapríčinená peľom) (viď graf 3). Ostatné výsledky sa vzťahujú na analýzu alergickej rinitídy v Dg. J30.0 – J30.4.

Obr. 1: Vývojový diagram



Graf 1: Rozdelenie receptov podľa veku a pohlavia pacientov



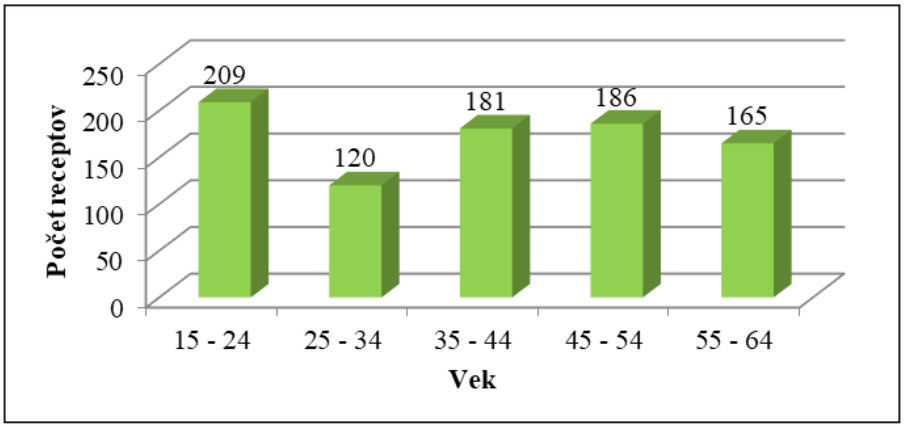
Pohlavie a vek pacientov

Prvý graf (viď graf 1) je venovaný asociácii medzi výskytom AR a pohlavím, pričom graf 2 vyjadruje vekovú skupinu s najväčším a najmenej výrazným počtom predpisovaných receptov v diagnózach J30.0 – J30.4.

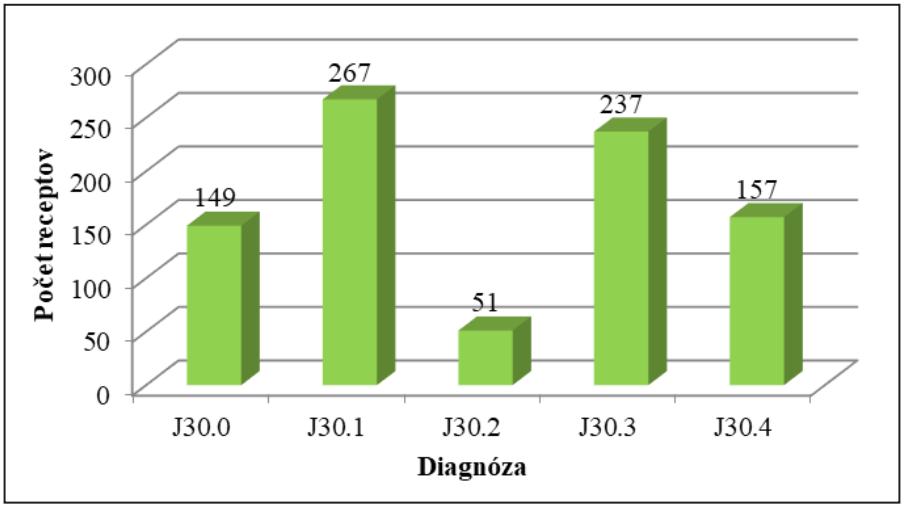
Z celkového počtu analyzovaných receptov, teda 861, nebola medzi pohlaviami sledovaná rovnováha. Zo záznamov vyplýva, že v diagnózach (J30.0 – J30.4) sú viac senzitívnejšie ženy ako muži. Nižšia preskripcia u mužov môže byť spôsobená aj ich menej častými návštevami lekárov, v tomto prípade imunológ/alergiológ. Rozdiel medzi pohlaviami bol výraznejší od veku 35 rokov a viac v prospech žien (viď graf 1).

V grafe 2 je znázornený počet receptov predpisovaných pacientom v určitých vekových kategóriách. Najvyšší počet je vo veku adolescencie a mladej dospelosti, a to 24,27 %. Nasledujú skupiny 35 – 44 rokov/45 – 54 rokov (vyše 21 %) a s 19,16 %

Graf 2: Zastúpenie pacientov podľa veku



Graf 3: Preskripcia s prihliadnutím na diagnózu J30.0 – J30.4



Po alergickej rinitíde zapríčinenej peľom sa vyskytovali záznamy s Dg. J30.3 (Iná alergická rinitída) tvoriace 27,53 %, Dg. J30.4 (Alergická rinitída, bližšie neurčená) s výskytom 18, 23 % a Dg. J30.0 (Vazomotorická rinitída) so 17, 31 %. Najmenej sa vyskytovala diagnóza J30.2 (Iná sezónna alergická rinitída), ktorá zaberala 5,92 %.

je sledovaná najstaršia veková skupina 55 – 64 rokov. Najnižšie percento prislúcha skupine 25 – 34 rokov (13,94 %).

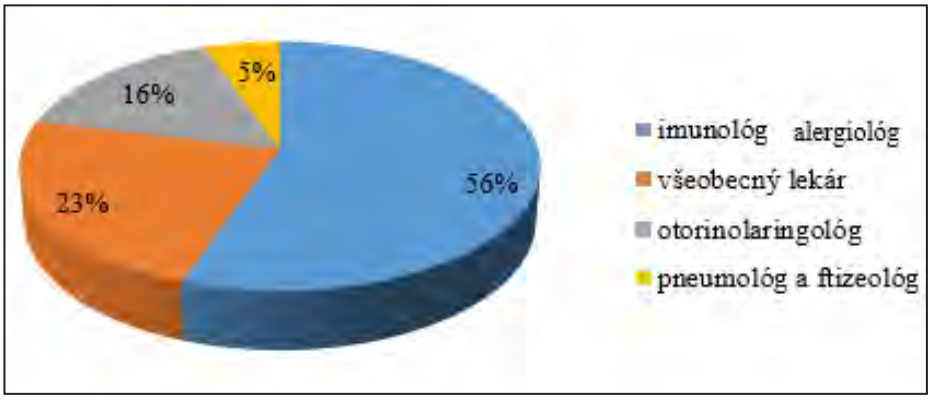
Preskripcia podľa diagnózy

V nasledujúcom grafe (viď graf 3) je znázornená preskripcia liečiv na základe diagnózy, pričom dominuje J30.1 (Alergická rinitída zapríčinená peľom), ktorá tvorila 31,01 %.

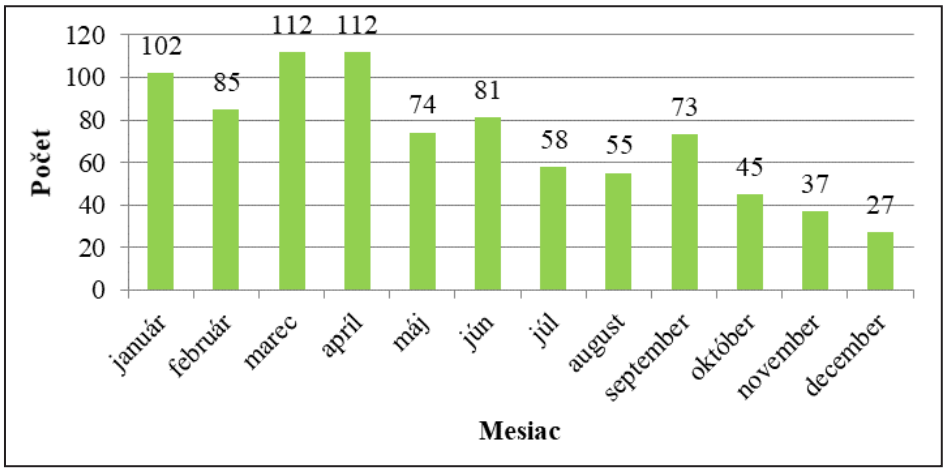
Rozdelenie lekárskych predpisov na základe špecializácie lekára a podľa mesiaca expedovania

V rámci farmakoterapie prislúchajú niektorým liečivám tzv. indikačné a/alebo preskripčné obmedzenia. Na základe preskripčného obmedzenia ide o liečivá schválené konkrétnym lekárom – špecialistom. V prípade alergickej rinitídy ide hlavne o kortikoidy predpisované otorinolaringológom, imunológom, alergiológom alebo pneumológom

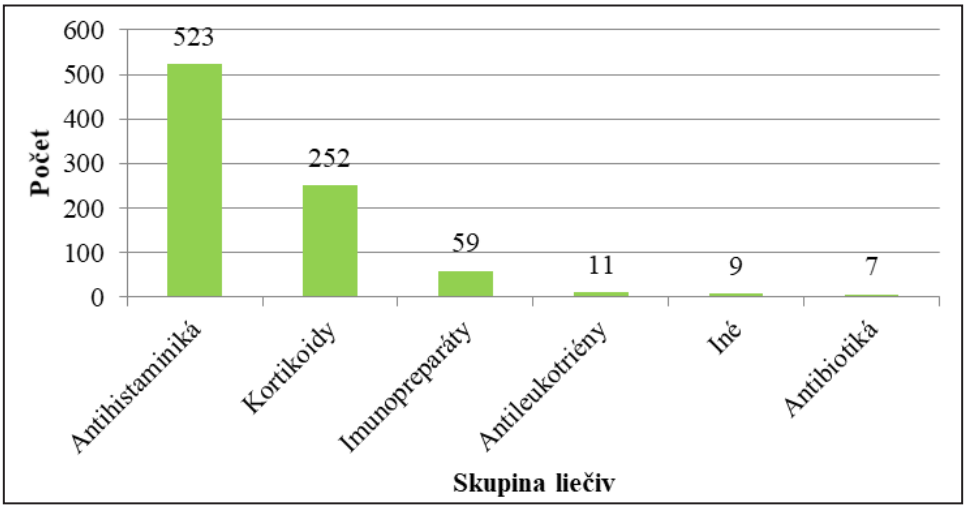
Graf 4: Preskripcia na základe špecializácie lekára



Graf 5: Vzťah preskripcie k ročnému obdobiu v liečbe AR



Graf 6: Farmakoterapia alergickej rinitídy



Tab. 2: Sumár predpisovaných liečiv

Skupina	Počet receptov	Liečivo	Počet receptov	% zastúpenie
Antihistaminiká	523	levocetirizín	155	18,00 %
		desloratadín	150	17,42 %
		rupatadín	67	7,78 %
		cetirizín	45	5,23 %
		azelastín	30	3,48 %
		loratadín	27	3,14 %
		bilastín	25	2,90 %
		fexofenadín	12	1,39 %
		bisulepín	6	0,70 %
		dimetindén	3	0,35 %
		olopatadín	3	0,35 %
Kortikoidy	252	flutikazón	100	11,61 %
		mometazón	108	12,54 %
		flutikazón furoát	20	2,32 %
		beklometazón	11	1,28 %
		flutikazón + azelastín	8	0,93 %
		prednizón	3	0,35 %
		budezonid	1	0,12 %
		metylprednizón	1	0,12 %
Imunopreparáty	59	trávové pele	33	3,83 %
		extrakt alergénov	17	1,97 %
		stromové pele	4	0,46 %
		bravčový transfer faktor	3	0,35 %
		roztoče	1	0,12 %
		lysatum bacteriale mixtum	1	0,12 %
Antileukotriény	11	montelukast	11	1,28 %
Iné	9	pseudoefedrín + kombinácie	6	0,70 %
		tetryzolín + kombinácie	3	0,35 %
Antibiotiká	7	iné antibiotiká	2	0,23 %
		tobramycín, dexametazón	2	0,23 %
		amoxicilín	1	0,12 %
		cefexím	1	0,12 %
		bacitracín, neomycín	1	0,12 %

a ftizeológom. Ďalšou skupinou s preskripčným obmedzením sú imunopreparáty, indikované alergiológom a imunológom. Tie by sa mali zvážiť u pacientov so stredne ťažkou alebo ťažkou perzistujúcou alergickou rinitídou nereagujúcou na zvyčajnú liečbu; u pacientov s alergickou astmou; u pacientov netolerujúcich štandardnú liečbu alebo u tých, ktorí sa chcú vyhnúť dlhodobému užívaniu liekov (Sur a Plesa, 2015). Percentuálne zastúpenie receptov na základe špecializácie lekára uvádza graf

Tab. 3: Fixné kombinácie predpisovaných liečiv

Fixná kombinácia liečiv	Počet receptov	% zastúpenie
flutikazón + azelastín	8	0,93 %
pseudoefedrín + desloratadín	6	0,70 %
tetryzolín + antazolín	3	0,35 %
tobramycín + dexametazón	2	0,23 %
amoxicilín + inhibítor betalaktamázy	1	0,12 %
bacitracín + neomycín	1	0,12 %
neomycín + bacitracín	2	0,23 %

4. Výsledky vzťahujúce sa na obdobie preskripcie v Dg. J30.0 – J30.4 znázorňuje graf 5. Ide o sledovanie konkrétnych mesiacov v roku vo vzťahu k množstvu lieku v danom období. Ich najvyšší počet bol vydaný v mesiacoch marec a apríl s rovnakým percentuálnym zastúpením, a to 13,01 %. S mierne nižším percentom (11,85 %) boli lieky expedované v januári. S hodnotou nad 9 % sa objavili mesiace február a jún. Najmenej vydaných liekov bolo koncom roka v decembri s frekvenciou 3,14 %.

Vzhľadom na ročné obdobia sa najviac receptov spracovalo počas jari (marec – máj) s frekvenciou 34,61 %.

Analýza preskripcie

Z vyselektovaného počtu receptov na základe hore uvedeného vývojového diagramu sa v grafe 6 uvádzajú jednotlivé počty receptov v rámci konkrétnych farmakologických skupín.

Pacientom s alergickou rinitídou boli najčastejšie aplikované antihistaminiká (60,74 %) a kortikoidy (29,27 %). Nasledovali imunopreparáty (6,85 %). Najmenej indikované sa zdajú byť antileukotriény (1,28 %). Tesne nad 1 % sa umiestnili kombinované preparáty. Od nich v nižšom zastúpení sa vyskytli už len antibiotiká (0,82 %) predpisované vo výnimočných prípadoch.

V rámci konkrétnych farmakoterapeutických skupín sa však nachádza viacero liečiv. Pri každom pacientovi bolo liečivo započítané vždy len raz. Jednotlivé zastúpenie je zobrazené v tabuľke 2.

Niektoré z uvedených liečiv sú obsiahnuté v preparátoch vo fixnej kombinácii. Tie, ktoré sa vyskytli v rámci uvedenej práce sú obsiahnuté v tabuľke 3.

DISKUSIA

Alergická rinitída predstavuje ochorenie nosovej sliznice vyznačujúce sa paroxyzmálnym opakovaným kýchaním, vodnatou rinoreou a upchatím nosa. Polinóza je sezónna alergická rinitída spôsobená peľovými antigénmi, často komplikovaná alergickou konjunktivitídou. Histopatologicky sa sleduje zápal nosovej sliznice exsudatívneho charakteru (Okubo a kol., 2017). S prihliadnutím na patogenézu ochorenia sa v najnovších štúdiách objavujú informácie ohľadom terapie AR, kde sú pacienti v prevažnej miere liečení antihistaminikami ako prvá voľba, za nimi nasledujú kortikoidy aplikované intranazálne (Kawauchi a kol., 2019). Ako vyplýva z predkladanej štúdie, v roku 2020, kedy sa realizovala analýza preskripcie liečiv, bola na Slovensku (východ) sledovaná rozsiahla polinóza, teda peľová alergická rinitída. Jej výskytu nasvedčuje veľké množstvo spracovaných receptov v diagnózach J30.0 – J30.4, v celkovom počte 1944. Z tohto čísla sa odrátali recepty indikované pediatrickej a geriatrickej

populácii, keďže sa štúdiá venuje vekovému rozpätiu adolescencie a dospelosti. Z analýzy sa vylúčila aj opakovaná preskripcia liečiv u toho istého pacienta, čím sa dospelo ku konečnému počtu spracovaných receptov v počte 861, ktorým z 31,01 % prislúchala alergická rinitída zapríčinená peľom (J30.1).

Pacienti trpiaci alergickou rinitídou pociťujú nielen výrazne zníženú kvalitu života, ale disponujú aj vyšším rizikom vzniku ťažkej formy bronchiálnej astmy, s čím prirodzene rastie aj návštevnosť lekára, nároky na zdravotnú starostlivosť a v krajných prípadoch aj ich hospitalizácia (Busse a kol., 2020). Keďže sa AR vyskytuje prakticky v každom veku, nie je prekvapením, že jej vysoký výskyt bol pozorovaný v detskom veku, u adolescentov a aj v mladom dospelom veku (Passali a kol., 2018). Z výsledkov predkladanej štúdie plynie, že ochorenie alergickej rinitídy sa najčastejšie vyskytovalo v období adolescencie a v mladom dospelom veku 15 – 24 rokov (24,27 %). Najmenej receptov bolo predpisovaných pacientom od 25 do 34 rokov (13,94 %). V rámci pohlavia sa objavil fenomén, kde vo veku od 15 do 30 (eventuálne 35 rokov) bola frekvencia preskripcie medzi mužmi a ženami takmer vyrovnaná, prípadne sa do mierneho popredia dostali muži. Toto zistenie zodpovedá výsledkom štúdie v rámci Európy z roku 2020, v ktorej bol najčastejší výskyt senzibilizácie na alergény u detí a mladých dospelých. Podľa štúdie mali najvyššiu mieru vo veku do 30 rokov mladí muži (Beutner a kol., 2020). Od vekovej hranice 35 rokov sa ale do značného popredia dostali ženy, ako to vyplýva z grafu vo výsledkoch (viď graf 1).

Sezónna AR dosahuje svoj vrchol na jar, v priebehu marca a apríla, a v jeseni, od augusta do septembra (Xi a kol., 2020). Analyzované recepty za rok 2020 na Slovensku boli tiež vo zvýšenej miere spracované počas jari (marec – máj) s frekvenciou 34,61 %. Ich vyšší počet bol nepretržite zaznamenaný až do júna s následnou tendenciou poklesu a v zapätí s nárastom v septembri. V ďalších jesenných mesiacoch mala preskripcia klesajúci charakter, pričom prekvapivý nárast bol zaznamenaný v zimných mesiacoch január a február, pričom išlo pravdepodobne o preventívne užívanie preparátov ako prípravu na jarné obdobie charakteristické vyšším výskytom alergénov.

Manažment liečby AR prioritne zahŕňa vyhýbanie sa alergénom a terapiu systémovými a/alebo lokálnymi antihistaminikami samostatne alebo v kombinácii so systémovými a/alebo lokálnymi kortikoidmi. Aplikujú sa aj dekongestíva, anticholinergiká a antagonisty leukotriénových receptorov. Protokoly liečby sú rôzne. Staršie štúdie odporúčajú intranazálne kortikosteroidy na počiatočnú liečbu pretrvávajúcich príznakov ovplyvňujúcich kvalitu života pacienta a nesedatívne antihistaminiká druhej generácie pre mierne intermitentné prejavy ochorenia (v porovnaní s antihistaminikami prvej generácie majú antihistaminiká druhej generácie lepší profil nepriaznivých účinkov a spôsobujú menšiu sedáciu, s výnimkou cetirizínu) (Sur a Plesa, 2015). V súčasnosti revidované smernice pre liečbu alergickej rinitídy odporúčajú používať antihistaminiká druhej generácie, najmä intranazálne, čím zlepšujú skóre nazálnych symptómov (kýchanie, výtok z nosa, upchatie nosa, svrbenie nosa) s rýchlejším nástupom účinku a efektom podobným intranazálnym kortikosteroidom (Hoyte a Nelson, 2018; Kawauchi a kol., 2019). Intranazálne antihistaminiká majú tiež rýchlejší nástup účinku v porovnaní s orálnymi antihistaminikami (Hoyte a Nelson, 2018). Pacienti so závažnejším ochorením neodpovedajúci na štandardné postupy s/bez liečby druhej línie by mali podstúpiť imunoterapiu (Sur a Plesa, 2015).

Z predkladanej štúdie vyplýva, že najčastejšie predpisované boli antihistaminiká s percentuálnym zastúpením 60,74 %. Nasledovali kortikosteroidy, ktoré tvorili 29,27 % zo všetkých liečiv. Nižšími percentami preskripcie boli zastúpené antileukotriény, liečivom montelukast (1,28 %) a lokálne pôsobiace antibiotiká (0,82 %). O nízkom profile aplikácie montelukastu napovedá nedávne zistenie súvisiace s vývojom jeho neuropsychiatrických nežiaducich účinkov. FDA upozornila na opatrnosť pri jeho použití. Podlieha aj indikačnému obmedzeniu

(Rajput a kol., 2020).

Cieľom predmetnej štúdie bolo zhodnotiť farmakoterapiu alergickej rinitídy praktizovanú na Slovensku, pričom sa zistilo, že najrozšírenejšia forma AR bola polinóza. Práca Sur a Plesa (2015) prináša praktické informácie pre pacientov s alerickou rinitídou, teda aj polinózou. Uvádzajú, že v liečbe je prospešné zvážiť aj zvlhčovanie nosa soľným roztokom samostatne alebo ako formu adjuvantnej liečby. Zároveň poukazujú na to, že dojčenie, resp. oneskorené prijímanie pevnej stravy v tomto období, kontakt s domácim miláčikom v detstve, používanie systémov na filtráciu vzduchu nemajú preukázanú účinnosť v prevencii alergickej rinitídy. Ďalšie odporúčania týkajúce sa alergikov, polinotikov, zverejnil aj Národný portál zdravia. Týmto pacientom odporúča v čase maximálneho výskytu alergizujúceho peľu obmedziť pohyb v prírode alebo používať peľové masky, dýchať viac nosom ako ústami a nezabúdať na ochranu očí športovými okuliarmi. Po návrate z vonku sa odporúča osprchovať, umyť si aj vlasy (v nich sa zachytí najviac peľu), tvár a vymeniť si oblečenie (dať ho do miestnosti mimo spálne). Zároveň je prospešný pobyt vonku po daždi a v domácom prostredí používať proti peľové sieťky alebo čističky vzduchu (NPZ).

ZÁVER

Liečba alergickej rinitídy by mala zohľadňovať vek pacienta a závažnosť príznakov. Optimálne by mala zahŕňať vyhýbanie sa alergénom a farmakoterapiu doplniť nefarmakologickými postupmi. V prvej línii farmakologickej liečby alergickej rinitídy sa odporúčajú antihistaminiká a kortikoidy aplikované lokálne alebo systémovo, v kombinácii alebo samostatne.

POĎAKOVANIE

Výsledky predkladanej štúdie bolo možné spracovať vďaka dátam poskytnutým z Lekárne Pharmacia, Dlhý rad 6, Bardejov a Dr. Max, OC Hypernova, Mlynská 2, Bardejov. Zároveň sa na spracovaní výsledkov podieľala aj kolegyňa pracujúca v týchto lekárňach, Klaudia Adamojurková. Touto cestou sa im chcem poďakovať.

ZOZNAM LITERATÚRY

Beutner, C., Forkel, S., Gupta, S., Fuchs, T., Schön, M. P., Geier, J., Buhl, T.: Sex- and age-dependent changes in polysensitization to common aeroallergens over 20 years. *Journal of Asthma and Allergy*, 2020, 13, 725 – 730.

Busse, W. W., Maspero, J. F., Lu , Y., Corren, J., Hanania, N. A., Chipps, B. E., Katelaris, C. H., FitzGerald, J. M., Quirce, S., Ford, L. B., Rice, M. S., Kamat, S., Khan, A. H., Jagerschmidt, A., Harel, S., Rowe, P., Pirozzi, G., Amin, N., Ruddy, M., Graham, N. M. H., Teper, A.: Efficacy of dupilumab on clinical outcomes in patients with asthma and perennial allergic rhinitis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2020, 125 (5), 565 – 576.

Čižnár, P.: Alergická rinitída a možnosti jej liečby [Allergic rhinitis and treatment option]. *Pediatr. Prax*, 2009, 10 (2), 66 – 70.

Gažová, A.: Farmakoterapeutické možnosti ovplyvnenia sezónnej a chronickej alergickej rinitídy a alergickej konjunktivitídy [Therapeutical options of affecting seasonal and chronic allergic rhinitis and allergic conjuctivitis]. *Pharma tribune*, 2021, 1, 8 – 9.

Hoyte, F. C. L., Nelson, H. S.: Recent advances in allergic rhinitis. *F1000 Research*, 2018, 7, 1333.

Hrubiško, M.: Rinitída a astma – alergické choroby jedných dýchacích ciest [Allergic rhinitis and asthma – united airway diseases]. *Via pract.*, 2016, 13 (3), 102 – 105.

Kawauchi, H., Yanai, K., Wang, D.-Y., Itahashi, K., Okubo, K.: Antihistamines for allergic rhinitis treatment from the viewpoint of nonsedative properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (1), 213.

NCZI – Národné centrum zdravotníckych informácií [NHIC – National health

information center]. [Medzinárodná klasifikácia chorôb – MKCH], 2021. http://www.nczisk.sk/Standardy-v-zdravotnictve/Pages/Medzinarodna-klasifikacia-chorob-MKCH-10.aspx. [cit. 2021-04-09].

NPZ – Národný portál zdravia [National Health Portal], 2020. https://www.npz.sk/sites/npz/Stranky/NpzArticles/2020_04/Rady_pre_alergikov__Ako_prezit_pelovu_sezonu_pocas_pandemie.aspx?did=6&sdid=81&tuid=0&. [cit. 2021-04-09].

Okubo, K., Kurono, Y., Ichimura, K., Enomoto, T., Okamoto, Y., Kawauchi, H., Suzaki, H., Fujieda, S., Masuyama, K.: Japanese guidelines for allergic rhinitis 2017. *Allergology International*, 2017, 66 (2), 205 – 219.

Passali, D., Cingi, C., Staffa, P., Passali, F., Muluk, N. B., Bellussi, M. L.: The International Study of the Allergic Rhinitis Survey: outcomes from 4 geographical regions. *Asia Pacific allergy*, 2018, 8 (1), e7.

Rajput, M. S. A., Arain, A. A., Rajput, A. A., Adeel, M., Ghaffar, S., Suahil, A.: Effect of Montelukast on the symptom severity score of allergic rhinitis. *Cureus*, 2020, 12 (3), e7403.

Sur, D. K. C., Plesa, M.: Treatment of allergic rhinitis. *American Family Physician*, 2015, 92 (11), 985 – 992.

Xi, L., Wang, G., Shi, B., Li, Y., Zhang, L.: The work behaviors of patients with allergic rhinitis (AR) during the autumn pollen season. *Annals of Palliative Medicine*, 2020, 9 (5), 2776 – 2785.

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** 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 umiestniť fotografie, obrázky a grafy priamo do textu článku a v texte uviesť odkaz na príslušnú fotografiu, obrázok a graf, napr. (viď obr. 1). Fotografie majú mať minimálne rozlíšenie na úrovni 300 dpi a musia byť jasné a ostré. Vzhľadom na technické komplikácie, ku ktorým môže dôjsť pri konvertovaní farebných obrázkov pre potreby čierno-bielej tlače sa odporúča zaslať obrázky a ilustrácie vo verzii vhodnej pre takúto tlač. V časopise môžu mať obrázky a ilustrácie šírku len 8,5 cm a nachádzať sa na strane širokej 17,5 cm, preto by veľkosť písmen v legende mala zodpovedať týmto rozmerom (Times New Roman 10). Obrázky, fotografie a grafy majú byť orámované, priebežne očíslované a má k nim byť pripojený príslušný text týkajúci sa obsahu a prípadne aj zdroja. Číslo a text nemá byť súčasťou fotografie/obrázku/grafu. Číslo a názov obrázku, fotografie a grafu sa má umiestniť nad a príslušný text týkajúci sa obsahu a prípadne aj zdroja (legenda) sa má umiestniť pod nimi. Pri mikrofotografiách text obsahuje aj údaje o mierke a technike farbenia. Hlavné objekty, zmeny a zistenia sa v mikrofotografiách označujú 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 majú byť priebežne číslované a majú obsahovať podstatné a dôležité údaje, ktoré sa nenachádzajú v texte. Číslo a príslušný opis (názov) sa uvádza nad tabuľkou. Tabuľky obsahujú vodorovné a zvislé čiary, ktoré podporujú prehľadnosť zverejnených údajov. Pod tabuľkou sa uvádza vysvetlenie symbolov/skratiek použitých v tabuľke vrátane štatistiky (legenda).

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