

FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis
UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609

ISSN 2729-790X



3

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 štvrtročne s príspevkami v slovenskom, českom alebo anglickom jazyku s abstraktom v angličtine.

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

Šéfredaktorka/Editor-in-Chief:

Výkonná redaktorka/Deputy/Managing Editor:

Redakčná rada/Editorial Board:

Jana Mojžišová

Zita Faixová

Abu-Darwish, M. S. (Shoubak, Jordan), Boknik, P. (Münster, Germany), Castejon, A. M. (Fort Lauderdale, Florida, USA), Csöllei, J. (Brno, Czech Republic), Deelman, L. E. (Groningen, Netherlands), Devinyak, O. (Uzhhorod, Ukraine, El Naggat, El M. B. A. (Damanhour, Egypt), Getova, D. (Plovdiv, Bulgaria), Kyselovič, J. (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), Šekeroğlu, N., (Turkey, Kilis), Šimůnek, T. (Hradec Králové, Czech Republic), Zitterl, K. (Vienna, Austria)

Vydavateľ/Publisher:

© Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2019

Adresa redakcie/Editor Address:

Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, e-mail: folia.pharma@uvlf.sk

Technická redaktorka/Technical Editor:

Holečková, Z., tel.: +421 917 729 873, e-mail: zuzana.holeckova@uvlf.sk

Grafická úprava/graphic design:

Báštiová, I.

ISSN: 2585-9609

EVČ: EV 5741/18

IČO: 00 397 474

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

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

VYDÁVA
UNIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE V KOŠICIACH
SLOVAKIA



FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA
III., 3, 2021

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

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, III., 3, 2021

O B S A H

Pitoňáková, Silvia; Bedlovičová, Zdenka: VPLYV EXTRAČNÝCH PODMIENOK NA ANTIOXIDAČNÚ AKTIVITU STRIEBORNÝCH NANOČASTÍČ PRIPRAVENÝCH Z RASTLINNÝCH EXTRAKTÓV IMPACT OF EXTRACTION CONDITIONS ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES PREPARED FROM PLANT EXTRACTS	5
Šuleková, Monika; Veľasová, Veronika: RIZIKÁ VYBRANÝCH KONZERVAČNÝCH LÁTKO A ICH STANOVENIE VO FARMACEUTICKÝCH VZORKÁCH NEGATIVE EFFECT OF SELECTED PRESERVATIVES AND THEIR DETERMINATION IN PHARMACEUTICAL SAMPLES	13
Cibuľašová, Kristína; Vrabľová, Dana; Kolesárová, Mária; Košuthová, Hedviga: TERAPEUTICKÝ MANAŽMENT SCHIZOFRÉNIE REZISTENTNEJ NA LIEČBU (KAZUISTIKA) THERAPEUTIC MANAGEMENT OF TREATMENT-RESISTANT SCHIZOPHRENIA (CASE STUDY)	21
Štempeľová, Iveta; Fedorová, Monika: OFTALMOLOGIKÁ A ICH POMOCNÉ LÁTKY SO ZNÁMYM ÚČINKOM (PREHLADOVÝ ČLÁNOK) OPHTHALMOLOGICALS AND THEIR EXCIPIENTS WITH A KNOWN EFFECT (A REVIEW)	29
Chovanová, Simona; Kolesárová, Mária: SPOTREBA OPIOIDNÝCH VERSUS NEOPIOIDNÝCH ANALGETÍK U PACIENTOV THE EXPENDITURE OF OPIOID VERSUS NON-OPIOID ANALGESICS IN PATIENTS	38
Bačkorová, Miriam; Bačkor, Martin: VPLYV NADBYTKU DUSÍKA NA VYBRANÉ PARAMETRE OXIDAČNÉHO STRESU V HYDROPONICKY PESTOVANEJ MEDOVKE LEKÁRSKEJ (<i>MELISSA OFFICINALIS</i> L.) EFFECT OF NITROGEN EXCESS ON THE SELECTED OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN HYDROPONICS LEMON BALM (<i>MELISSA OFFICINALIS</i> L.)	52
Kľoc, Dominik; Váczi, Peter; Suchovič, Radoslav: DISPENZÁCIA VYBRANÝCH VETERINÁRNYCH LIEKOV ZO SKUPINY TETRACYKLÍNÓV DISPENSING OF SELECTED VETERINARY MEDICINES FROM THE CLASS OF TETRACYCLINES	62
Horváth, Peter; Eftimová, Jarmila: VPLYV LOKALITY, TERMÍNU A ROKU ZBERU NA OBSAHOVÉ LÁTKY V KORENI <i>RHODIOLA ROSEA</i> L. INFLUENCE OF SITE, DATE AND YEAR OF COLLECTION ON INGREDIENTS IN ROOT OF <i>RHODIOLA ROSEA</i> L.	72
Pol'ančíková, Nikoleta; Uhrinová, Anna: ANTIOXIDAČNÁ AKTIVITA HÚB RODU <i>CORDYCEPS</i> (FR.) ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FUNGI OF THE GENUS <i>CORDYCEPS</i> (FR.)	84
Hornýák, Gabriella; Čonková, Eva: ANTIBIOFILMOVÁ ÚČINNOSŤ VYBRANÝCH SILÍC NA BIOFILM-TVORIACE KVASINKY <i>CANDIDA ALBICANS</i> A <i>CANDIDA KRUSEI</i> ANTIBIOFILM EFFICIENCY OF SELECTED ESSENTIAL OILS ON BIOFILM-FORMING YEASTS <i>CANDIDA ALBICANS</i> AND <i>CANDIDA KRUSEI</i>	93
Pokyny pre autorov	103



VPLYV EXTRAČNÝCH PODMIENOK NA ANTIOXIDAČNÚ AKTIVITU STRIEBORNÝCH NANOČASTÍC PRIPRAVENÝCH Z RASTLINNÝCH EXTRAKTOV

IMPACT OF EXTRACTION CONDITIONS ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES PREPARED FROM PLANT EXTRACTS

Pitoňáková, Silvia; Bedlovičová, Zdenka

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

silviapitonak@gmail.com

ABSTRACT

Nanočastice v kombinácii s rastlinnými extraktmi preukázali potenciál v antimikrobiálnom účinku, ktorý je dôležitý pri neustále sa rozširujúcej rezistencii na antibiotiká. Táto štúdia hodnotí vplyv extrakčných podmienok na antioxidačnú aktivitu nanočastíc striebra pripravených z rastlinných extraktov.

Nanočastice striebra (AgNP) boli pripravené zelenou syntézou pomocou d'atelinového extraktu a 2,2 a 5,5 mM roztoku dusičnanu strieborného. Najvýhodnejšie podmienky na prípravu AgNP boli vyššia teplota (80 – 90 °C) a vyššia (5,5 mM) koncentrácia AgNO₃. Najmenšie nanočastice boli pripravené pomocou extraktu získaného pri laboratórnej teplote s použitím 5,5 mM dusičnanu strieborného ($x_{50} = 38,59$ nm). Stanovením antioxidačnej aktivity sme pozorovali

lepšie výsledky pre nanočastice striebra pripravené z 2,2 mM AgNO₃ a na vychytávanie voľných radikálov bola vhodnejšia nižšia teplota biosyntézy AgNPs.

AgNP boli testované na antibakteriálnu aktivitu pomocou difúzneho testu proti Gram-pozitívnym (*Staphylococcus aureus*) a Gram-negatívnym (*Escherichia coli*) baktériám. Získané výsledky potvrdili antibakteriálnu účinnosť v porovnaní so štandardom – gentamicínom.

Kľúčové slová: antibakteriálna aktivita; antioxidačná aktivita; d'atelina lúčna; strieborné nanočastice

ABSTRACT

Nanoparticles in combination with plant extracts have showed potential in antimicrobial

action, which is important in the ever-expanding resistance to antibiotics. This study evaluates the influence of extraction conditions on the antioxidant activity of silver nanoparticles prepared from plant extracts.

Silver nanoparticles (AgNPs) were prepared by green synthesis using clover extract and 2.2 and 5.5 mM solution of silver nitrate. The most preferred conditions for the preparation of AgNPs were: higher temperature (80 – 90 °C) and higher (5.5 mM) AgNO₃ concentration. The smallest nanoparticles were synthesized by extract prepared at room temperature using 5.5 mM silver nitrate ($x_{50} = 38.59$ nm). By determining antioxidant activity, we found better results for silver nanoparticles prepared from 2.2 mM AgNO₃ and a lower temperature of AgNPs biosynthesis was more suitable for free radical scavenging.

The AgNPs were also tested for antibacterial activity, using a well diffusion assay, against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria. The obtained results confirmed antibacterial efficiency compared to the standard – gentamicin.

Key words: antibacterial activity; antioxidant activity; red clover; silver nanoparticles

ÚVOD

Rýchlo sa rozvíjajúce nanotechnológie prinášajú aj do medicínskych vied nové možnosti skúmania a využitia. V štúdií hodnotíme vplyv extrakčných podmienok na antioxidačnú aktivitu strieborných nanočastíc pripravených z rastlinných extraktov. Na prípravu rastlinných extraktov sme si vybrali ďatelinu lúčnu, nakoľko je často považovaná za burinu, ale má v sebe skrytý potenciál. Zmienky o použití ďateliny lúčnej nachádzame u amerických eklektikov, ktorí vo svojej knihe z roku 1898, King's American Dispensatory, ďatelinu popisujú ako prostriedok na liečbu čierneho kašľa, bronchitídy, tuberkulózy a tiež načrtli protinádorové účinky (Pilát

a Ušák, 1964). V literatúre sú popísané pozitívne účinky na kožu, nervový systém, kardiovaskulárny systém, pozitívne estrogénne pôsobenie, ovplyvnenie prejavov sprevádzajúcich klimakterium, osteoporózu, antikarcinogénne, antioxidačné, antimikrobiálne, P-vitamínové, antidiabetické a ďalšie účinky.

Cieľom štúdie bola príprava viacerých druhov extraktov ďateliny lúčnej, príprava strieborných nanočastíc pri rôznych podmienkach (teplota, koncentrácia AgNO₃, typ extraktu), stanovenie antioxidačnej aktivity vybraných extraktov a nanočastíc striebra, charakterizovanie nanočastíc dostupnými metódami, porovnanie vplyvu rozdielnych extrakčných podmienok na antioxidačnú aktivitu pri príprave strieborných nanočastíc a stanovenie antibakteriálnej aktivity vybraných vzoriek AgNPs.

MATERIÁL A METÓDY

Sušina kvetov ďateliny lúčnej (*Trifolium pratense*) bola získaná komerčne (Agrokarpáty Plavnica, Slovensko). Ako prekursor syntézy strieborných nanočastíc pomocou extraktov ďateliny lúčnej bol použitý dusičnan strieborný (AgNO₃) (Mikrochem, Slovensko). Priebeh syntézy strieborných nanočastíc (AgNPs) bol sledovaný *in situ* v kremennej kyvete s optickou dĺžkou lúča 1 cm na UV/Vis spektrofotometri Cary 60 (Agilent Technologies, USA). Antioxidačná aktivita extraktov ďateliny lúčnej, ako aj strieborných nanočastíc bola sledovaná metódou poklesu absorbie voľného radikálu DPPH (2,2-difenylypikrylhydrazyl) (Sigma Aldrich, Nemecko) s koncentráciou 0,2 mM v metanole (Slavus, Slovensko).

Príprava extraktov ďateliny lúčnej

600 mg rozomletej sušiny kvetov ďateliny lúčnej sme rozsuspendovali v 12 ml destilovanej vody. Extrakcie boli robené tromi metódami – sonifikáciou v priebehu 15 minút pri laboratórnej teplote 2 hodiny a refluxom počas dvoch hodín.

Zelená syntéza strieborných nanočastíc

Ako prekursor syntézy strieborných nanočastíc sme použili 2,2 a 5,5 mM vodné roztoky dusičnanu strieborného (AgNO_3). Roztoky dusičnanu strieborného sme používali vždy čerstvé a chránené pred svetlom. Roztok AgNO_3 s objemom 2700 μl sme vložili do kremennej kyvety, pridali sme 300 μl príslušného extraktu a spektrofotometricky sme sledovali priebeh reakcie *in situ* priamo v kyvete. V oblasti okolo 450 nm sme pozorovali nárast absorbie v dôsledku vzniku povrchovej plazmónovej rezonancie (SPR), ktorá je charakteristická pre vznik nanosuspenzie. Reakcia je ukončená, keď absorbcia viac nestúpa.

Stanovenie antioxidačnej aktivity

Antioxidačnú aktivitu sme stanovili využitím metódy DPPH. Do skúmaviek sme pipetovali 250 μl príslušného extraktu, resp. nanosuspenzie, ku ktorým sme pridali 2 ml čerstvo pripraveného 0,2 mM roztoku DPPH. Vzorky sme inkubovali v tme pri laboratórnej teplote počas 30 minút, následne sme merali absorbciu pri 517 nm oproti kontrolnej vzorke, ktorou bolo 250 μl metanolu zmiešaného s 2 ml roztoku DPPH. Antioxidačnú aktivitu sme vyjadrili v percentách podľa vzťahu:

$$A = \frac{A_0 - A}{A_0} * 100 \quad [\%], \quad (1)$$

kde A_0 je absorbcia kontrolnej vzorky a A absorbcia extraktu, resp. nanosuspenzie. Antioxidačnú aktivitu strieborných nanočastíc sme porovnali so štandardom, ktorým bol trolox (kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchrómán-2-karboxylová) a kvantitatívne sme ju vyjadrili ako ekvivalenty troloxu ($\text{TE} \cdot \text{ml}^{-1}$), ktoré sme vypočítali z rovnice kalibračnej priamky.

Stanovenie antibakteriálnej aktivity strieborných nanočastíc

Na stanovenie antimikrobiálnej aktivity sme testovali mikroorganizmy *S. aureus* CCM 4223 a *E. coli* CCM 3988, ktoré boli získané z českej zbierky

mikroorganizmov – CCM. Do agarovej platne boli vyrezané jamky s priemerom 5,5 mm a do jamiek sa pipetovalo 50 μl vzorky. Ako štandard sme použili antibiotikum gentamicín s koncentráciou 10 mM. Takto pripravené platne boli inkubované 24 hodín pri 37 °C. Po inkubácii sme platne odfotografovali a pomocou softvéru ImageJ sme merali veľkosť inhibičných zón. Pre stanovenie antimikrobiálnej aktivity sme použili AgNPs pripravené pomocou vodného extraktu ďateliny lúčnej pripraveného pri laboratórnej teplote a dusičnanu strieborného s koncentráciou 2,2 a 5,5 mM pri teplote 80 °C. Antibakteriálna aktivita bola následne vyrátaná ako percento relatívneho priemeru inhibičnej zóny (% RIZD) s použitím vzorca (Rojas a kol., 2006):

$$\% \text{ RIZD} = \frac{\text{IZD vzorka} - \text{IZD negatívna kontrola}}{\text{IZD gentamicín} - \text{IZD negatívna kontrola}} \times 100 \quad (2)$$

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zelená syntéza strieborných nanočastíc

Detekcia bioredukcie Ag^+ iónov na koloidné nanočastice striebra Ag^0 bola pozorovaná jednak vizuálne farebnou zmenou roztoku (zo svetložltej na červenohnedé sfarbenie), ako aj pomocou UV/Vis spektrálnej analýzy. V tabuľke 1 uvádzame celkový čas syntézy strieborných nanočastíc v závislosti od teploty a koncentrácie, ako aj absorpčné maximum zodpovedajúce povrchovej plazmónovej rezonancii pre daný extrakt.

Z uvedených výsledkov možno konštatovať, že najrýchlejšie prebieha biosyntéza strieborných nanočastíc pri vyšších teplotách (80 – 90 °C) pri koncentrácii dusičnanu strieborného 5,5 mM. Z toho vyplýva, že koncentrácia prekursoru, ako aj teplota majú významný vplyv na rýchlosť bioredukcie strieborného katiónu. Na obrázku 1 sú zobrazené UV/Vis absorpčné pásy prislúchajúce povrchovej plazmónovej rezonancii v poslednej minúte biosyntézy AgNPs pre extrakty ďateliny lúčnej pripravené za laboratórnej teploty syntetizované pri 70 – 90 °C, kde modrou farbou je zobrazené absorp-

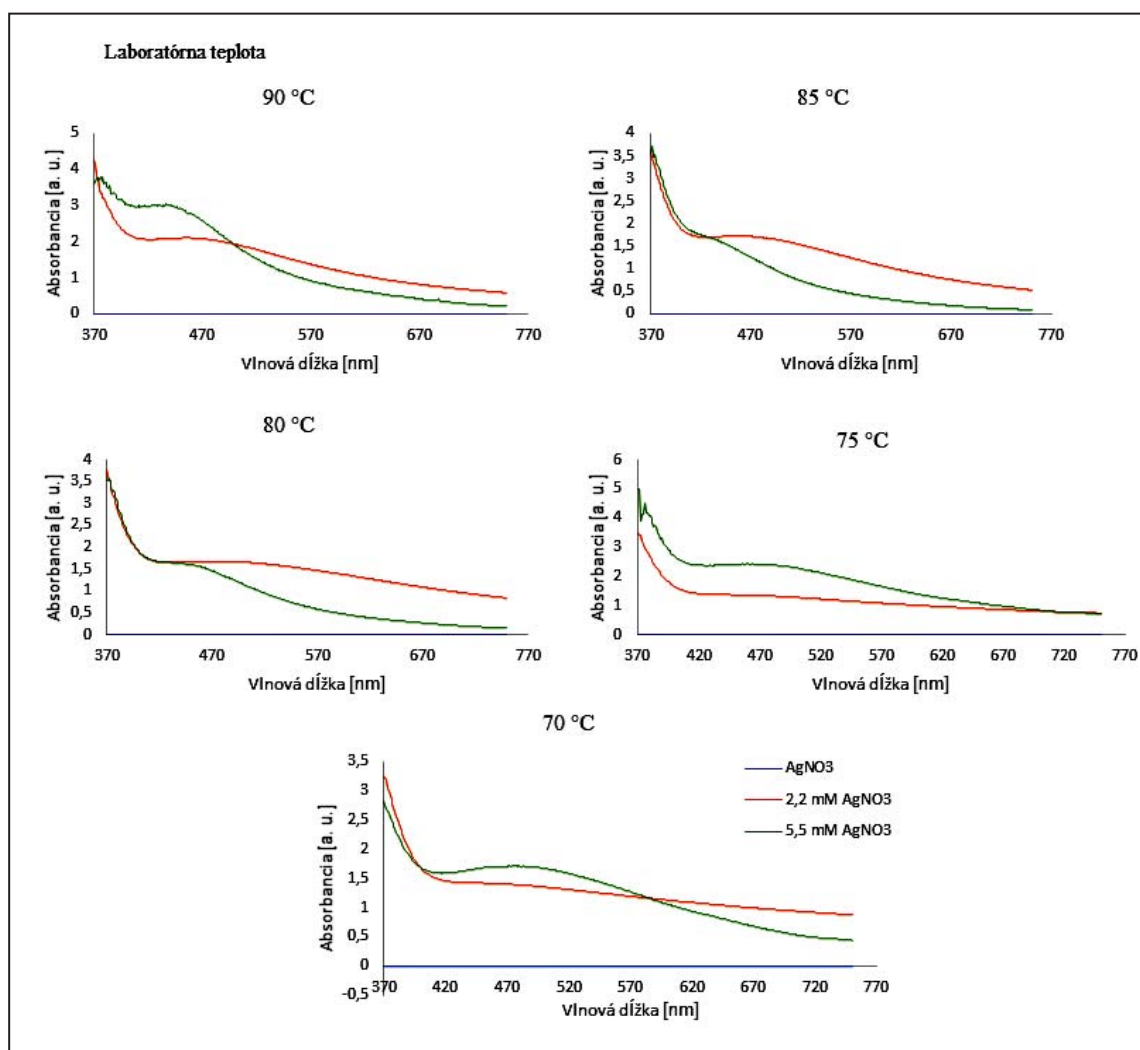
Tab. 1: Absorpčné maximá a reakčné časy zelenej syntézy AgNPs z rôznych typov extraktov pri rôznych teplotách a koncentráciách AgNO₃

Extrakcia	Koncentrácia prekursoru c [mM]	Teplota t [°C]	$\lambda_{\max}$ [nm]	Čas reakcie t [min]
Laboratórna teplota	2,2	70	451	32
		75	452	21
		80	471	13
		85	463	9
		90	456	7
	5,5	70	465	11
		75	455	6
		80	445	3
		85	424	2
		90	437	2
Sonifikácia	2,2	70	466	22
		75	465	18
		80	462	15
		85	480	12
		90	453	8
	5,5	70	458	9
		75	453	5
		80	449	3
		85	446	3
		90	434	2
Reflux	2,2	70	434	42
		75	433	26
		80	433	17
		85	434	13
		90	427	6
	5,5	70	434	12
		75	435	8
		80	423	5
		85	428	3
		90	415	2

čné spektrum čistého dusičnanu strieborného, červenou je zobrazený SPR pás pre nanočastice pripravené z 2,2 mM AgNO₃ a zelenou pre nanočastice pripravené z 5,5 mM AgNO₃. V našom prípade intenzita absorpcie bola rozdielna pri jednotlivých teplotách, teda môžeme predpokladať, že pri vyšších

teplotách a koncentráciách prekursoru dochádza k väčšej konverzii Ag⁺ na Ag⁰. Vlnové dĺžky, ktoré predstavujú maximum absorpcie prislúchajúcej SPR, boli pri vyšších teplotách (80 – 90 °C) vo všeobecnosti nižšie ako pri nižších teplotách u oboch koncentrácií AgNO₃.

Obr. 1: Absorpčné spektrá biosyntetizovaných strieborných nanočastíc (70 – 90 °C; 2,2 a 5,5 mM AgNO₃) z extraktov pripravených pri laboratórnej teplote



Antioxidačná aktivita

Antioxidačnú aktivitu sme stanovili podľa metódy DPPH, ktorá je založená na meraní redukčnej schopnosti antioxidantov voči DPPH• radikálu. V tabuľke 2 sú uvedené výsledky vychytávacej aktivity voľného radikálu DPPH príslušných extraktov d'ateliny lúčnej, resp. pripravených nanosuspenzií. Vychytávaciu aktivitu sme vyjadrili ako percento vychytania (%) podľa vzorca 1 a ako ekvivalent troloxu (TE) v mg TE.ml⁻¹.

Antioxidačná aktivita strieborných nanočastíc pripravených z extraktov d'ateliny lúčnej je v korelá-

cii s antioxidačnou aktivitou samotných extraktov. Z hodnôt antioxidačnej aktivity extraktov pripravených rôznymi extrakčnými metódami vyplýva, že najvyššiu schopnosť vychytávania voľného radikálu DPPH má extrakt pripravený za varu (reflux); 72,4 %; na druhej strane najnižšiu túto schopnosť (26,52 %) má extrakt pripravený sonifikáciou. Z hodnôt vychytávacej aktivity strieborných nanočastíc vyplýva, že najvyššiu majú nanočastice syntetizované z extraktu pripraveného refluxom a najnižšiu opäť AgNPs nasyntetizované z extraktu po sonifikácii. Z hľadiska koncentrácie AgNO₃, vyššiu antioxi-

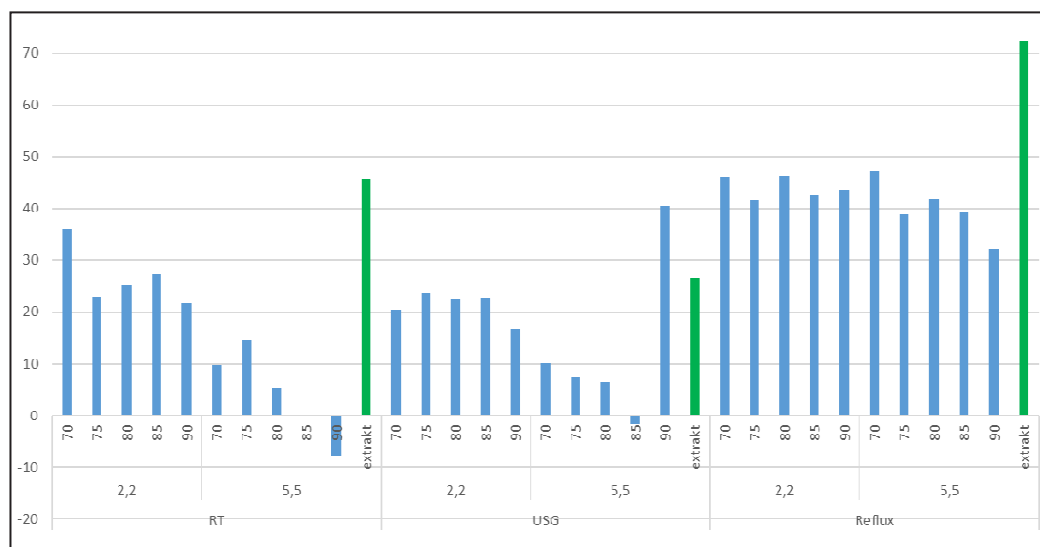
Tab. 2: Antioxidačná aktivita extraktov d'ateliny lúčnej a nanosuspenzií

Extrakcia	C_{AgNO_3} [mM]	t [°C]	A [a.u.]	SD	% vychytávacej aktivity	Ekvivalenty troloxu [mg TE.ml ⁻¹]
Laboratórna teplota	2,2	70	1,1854	0,000917	36,20	0,0766
		75	1,4330	0,001709	22,87	0,0393
		80	1,3899	0,001750	25,19	0,0458
		85	1,3516	0,003936	27,26	0,0516
		90	1,4544	0,001389	21,72	0,0361
	5,5	70	1,6766	0,009418	9,76	0,0027
		75	1,5879	0,000889	14,54	0,0160
		80	1,7604	0,010901	5,25	–
		85	1,8551	0,003051	0,16	–
		90	2,0023	0,003669	– 7,76	–
Sonifikácia	2,2	70	1,4773	0,003915	20,49	0,0326
		75	1,4184	0,000557	23,66	0,0415
		80	1,4402	0,002639	22,48	0,0382
		85	1,3460	0,027627	22,69	0,0524
		90	1,4503	0,031601	16,71	0,0367
	5,5	70	1,5842	0,001966	10,19	0,0165
		75	1,6326	0,022346	7,45	0,0092
		80	1,6528	0,005406	6,31	0,0062
		85	1,7959	0,005680	– 1,80	–
		90	1,7305	0,006242	1,90	–
Reflux	2,2	70	0,9169	0,021904	46,03	0,1169
		75	0,9919	0,043863	41,62	0,1057
		80	0,9103	0,002380	46,21	0,1179
		85	0,9739	0,011911	42,45	0,1535
		90	0,9577	0,044148	43,40	0,1108
	5,5	70	0,9318	0,012193	47,18	0,1147
		75	1,0784	0,040358	38,87	0,0926
		80	1,0256	0,020315	41,86	0,1006
		85	1,0727	0,037862	39,19	0,0935
		90	1,1954	0,012002	32,24	0,0750
Vodné extrakty	Lab. teplota Sonifikácia Reflux		0,9211	0,029975	45,64	0,1163
			1,2450	0,008919	26,52	0,0676
			0,4247	0,032486	72,40	0,1909

dačnú aktivitu vykazovali strieborné nanočastice pripravené z menej koncentrovaného dusičnanu strieborného. Z hľadiska reakčnej teploty možno

povedať, že vo väčšine prípadov je pre vychytávanie voľných radikálov výhodnejšia nižšia reakčná teplota (vid' obr. 3).

Obr. 2: Vychytávacia schopnosť AgNPs v porovnaní so samotným extraktom



Tab. 3: Antibakteriálna aktivita biosyntetizovaných AgNPs

AgNPs	Koncentrácia prekursoru AgNO ₃	Typ baktérie	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Ďatelina lúčna	2,2 mM	94,24 ± 7,29	96,36 ± 4,68
	5,5 mM	109,96 ± 7,75	118,50 ± 7,66
AgNO ₃	2,2 mM	89,25 ± 8,02	90,66 ± 6,34
	5,5 mM	99,78 ± 4,84	117,81 ± 2,11

Stanovenie antimikrobiálnej aktivity

Antibakteriálna aktivita bola stanovená metódou jamkového difúzneho testu (Baláž a kol., 2017) na dvoch typoch baktérií, *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitívna) a *Escherichia coli* (Gram-negatívna). Ako pozitívna kontrola bol použitý gentamicín. Hodnoty v tabuľke 3 sú uvedené ako % RIDZ, ktoré sme vypočítali podľa vzťahu 2. Oba typy testovaných baktérií boli rezistentné voči rastlinnému extraktu. Dusičnan strieborný v oboch koncentráciách mal významnú antibakteriálnu aktivitu. Hodnoty získané pre 10 mM roztok gentamicínu ako pozitívnej kontroly sú považované za 100 % RIDZ.

Stanovením antibakteriálnej aktivity 2,2 mM a 5,5 mM nanočastíc pripravených pomocou extraktov z ďateliny lúčnej sme potvrdili antibakteriálnu účinnosť voči Gram-pozitívnym aj Gram-negatívnym baktériám. Všeobecne možno konštatovať, že biosynteticky pripravené AgNPs pomocou

rastlinných extraktov sú účinnými antibakteriálnymi látkami a účinok je závislý od koncentrácie AgNO₃ (Pandit, 2015). Takýto výsledok potvrdila aj naša štúdia, v ktorej nanočastice pripravené z 5,5 mM AgNO₃ vykazovali vyššiu antibakteriálnu aktivitu ako tie, ktoré boli syntetizované z 2,2 mM dusičnanu strieborného.

ZÁVER

V štúdiu sme hodnotili vplyv extrakčných podmienok na antioxidačnú aktivitu strieborných nanočastíc pripravených z rastlinných extraktov. Extrakty ďateliny lúčnej sme pripravili pri rôznych podmienkach – pri laboratórnej teplote, sonifikáciou a refluxom. Zelenou syntézou sme pripravili strieborné nanočastice z extraktu ďateliny lúčnej a 2,2 a 5,5 mM roztoku dusičnanu strieborného. Najrýchlejšie prebiehala biosyntéza AgNPs pri vyšších teplotách

(80 – 90 °C) a pri vyššej koncentrácii (5,5 mM) AgNO₃. Metódou DPPH sme stanovili antioxidačnú aktivitu. Najvyššiu schopnosť vychytávať voľný radikál DPPH mal extrakt pripravený refluxom. Vyššiu antioxidačnú aktivitu vykazovali strieborné nanočastice pripravené z 2,2 mM AgNO₃ a na vychytávanie voľných radikálov bola vhodnejšia nižšia teplota. Vybrané pripravené AgNPs sme podrobili aj skúške na antibakteriálnu aktivitu. Pomocou jamkového difúzneho testu sme sledovali účinnosť voči Gram-pozitívnym (*Staphylococcus aureus*) a Gram-negatívnym (*Escherichia coli*) baktériám. Nanočastice v kombinácii s rastlinnými extraktmi preukázali potenciál využitia v biomedicínskom odvetví. Ich ďalšie štúdium dáva nádej aj vo využití antimikrobiálneho pôsobenia, čo môže predstavovať potenciálnu cestu spomalenia bakteriálnej rezistencie.

POĎAKOVANIE

Štúdiá vznikla za finančnej podpory projektu VEGA 2/0044/18 – Vysoko-energetické mletie pre syntézu nanomateriálov bio-prístupom a vybrané environmentálne aplikácie.

Podakovanie za poskytnutie možnosti merania na UV/Vispektrofotometri patrí RNDr. Valérii Verebovej, PhD. z Katedry chémie, biochémie a biofyziky UVLF. Ďakujeme za spoluprácu RNDr. Matejovi Balážovi, PhD. z Ústavu geotechniky Slovenskej akadémie vied a prof. MVDr. Eudmile Tkáčikovej, PhD. za možnosť stanovenia antibakteriálnej aktivity.

ZOZNAM LITERATÚRY

Baláž, M., Balážová, Ľ., Daneu, N., Dutková, E., Balážová, M., Bujňáková, Z., Shpotyuk, Y.: Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles and their stabilization by wet stirred media milling. *Nanoscale Res. Lett.*, 2017, 12, 83 – 91.

Pandit, R.: Green synthesis of silver nanoparticles from seed extract of *Brassica nigra* and its antibacterial activity. *Nusantara Bioscience*, 2015, 7 (1), 15 – 19.

Pilát, A., Ušák, O.: *Atlas rostlin* [Plant Atlas]. Praha, SPN, 1964, 108 s.

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



RIZIKÁ VYBRANÝCH KONZERVAČNÝCH LÁTOK A ICH STANOVENIE VO FARMACEUTICKÝCH VZORKÁCH

NEGATIVE EFFECT OF SELECTED PRESERVATIVES AND THEIR DETERMINATION IN PHARMACEUTICAL SAMPLES

Šuleková, Monika; Veľasová, Veronika

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

monika.sulekova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Hlavným cieľom tejto štúdie bolo stanovenie konzervačných látok, následné hodnotenie ich obsahu a poukázanie na ich možné toxické účinky na organizmus. Boli analyzované konzervačné látky ako kyselina benzoová, benzoan sodný, kyselina sorbová a sorban draselný vo vybraných farmaceutických vzorkách. Tieto analyty majú svoje najväčšie uplatnenie ako konzervačné látky vo farmaceutických, kozmetických a potravinárskych výrobkoch. Merania boli realizované metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s reverznou fázou s detektorom diódového poľa (RP-HPLC-DAD). Mobilná fáza bola zložená z acetonitrilu (zložka A) a acetátového tlmivého roztoku s hodnotu pH = 4,5 (zložka B)

v pomere A:B = 40:60 (v/v). Separácie analytov prebiehali na kolóne s reverznou fázou C18 Polaris 250 x 4,6 mm; veľkosť častíc 5 µm (Varian). Prísne dodržiavanie maximálneho obsahu ako aj ADI hodnôt jednotlivých konzervačných látok je potrebné na minimalizáciu nežiaducich účinkov. Mali by sme mať na mysli, že tieto farmaceutické formulácie nie sú iba jediným zdrojom, v ktorom sa nachádzajú konzervačné látky. Problém môže nastať pri nadmernej konzumácii prípravkov nielen farmaceutických, ale predovšetkým aj potravinárskych, kde sa pridávajú tieto pomocné látky, a to riziko je oveľa väčšie.

Kľúčové slová: HPLC; konzervačné látky; nežiaduce účinky

ABSTRACT

The main aim of the study was to determine the preservatives, subsequently to evaluate their content and to point out their possible toxic effects on the organism. Preservatives such as benzoic acid, sodium benzoate, sorbic acid and potassium sorbate were analyzed in the selected pharmaceutical samples. These analytes are mostly used as preservatives in pharmaceutical, cosmetic and food products. Measurements were performed by reverse-phase high performance liquid chromatography with diode array detector method (RP-HPLC-DAD). The mobile phase consisted of acetonitrile (component A) and an acetate buffer pH 4.5 (component B) in a ratio of A:B = 40:60 (v/v). The analytes were separated on Polaris, C18-A column, 250 x 4.6 mm, particle size 5 µm (Varian).

To minimize adverse effects, a strict adherence to the maximum content, as well as the ADI values of specific preservatives is necessary. We should keep in mind that these pharmaceutical formulations are not the only source of preservatives. The problem can occur with excessive consumption of not only pharmaceuticals, but especially food products, where these excipients are added, and the risk is much higher.

Key words: adverse effects; HPLC; preservatives

ÚVOD

Liek je liečivo alebo zmes liečiv a pomocných látok, ktoré sú upravené technologickým procesom do liekovej formy a sú určené na ochranu pred chorobami, na diagnostiku chorôb, liečenie chorôb alebo na ovplyvňovanie fyziologických funkcií (NRSR, 2011).

Farmaceutické pomocné látky majú v lieku rôzne funkcie. Umožňujú jeho výrobu a formovanie, dávajú mu tvar, chránia ho pred rozkladom pri skladovaní,

uľahčujú jeho podanie, riadia uvoľňovanie alebo jeho vstrebávanie a i. Dôležitú časť takýchto pomocných látok tvoria konzervačné látky, tzv. antimikrobiálne látky (Komárek, 2006).

Konzervačné látky sú prísady, ktoré majú schopnosť zabrániť množeniu mikrobov vo výslednom produkte a chránia produkty pred kontamináciou mikrobmami, ako sú baktérie a huby, počas ich skladovania a používania spotrebiteľom. Môžu predĺžiť čas použiteľnosti. Medzi takéto konzervačné látky zaraďujeme napríklad kyselinu sorbovú (E 200), sorban draselný (E 202), kyselinu benzoovú (E 210) a benzoan sodný (E 211). Práve tieto konzervanty boli vybrané na stanovenie v predkladanej štúdii. Svoje využitie nájdu nielen vo farmaceutickom priemysle, ale aj v potravinárstve a kozmetike.

Jednotlivé konzervanty majú stanovené maximálne koncentračné zastúpenie v prípravku, tieto hodnoty sa nesmú prekročiť. Nakoľko sa perorálne užívajú liečivá v kombinácii s potravinovými doplnkami, môže dôjsť ku kumulácii a prekročeniu akceptovateľnej dennej dávky (ADI). Prekročenie týchto koncentrácií a dávok môže viesť k závažným nežiaducim účinkom, ktoré môžu v niektorých prípadoch končiť aj fatálne. Preto je potrebné tieto konzervanty vo farmaceutických vzorkách identifikovať a kvantifikovať. Na tento účel môžu slúžiť chromatografické metódy.

Za najvhodnejšiu chromatografickú metódu bola zvolená vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na reverzných fázach s UV detekciou.

Celkovo sa podrobilo kvalitatívnej a kvantitatívnej analýze 11 farmaceutických vzoriek, kde tri z nich obsahovali viac ako jednu zo stanovovaných konzervačných látok.

MATERIÁL A METÓDY

Kvalitatívne a kvantitatívne merania jednotlivých konzervačných látok sa uskutočnili na HPLC chromatografe ULTIMATE 3000 (Thermo Fisher Scientific, Nemecko). Ten pozostával z pumpy

(DIONEX ULTIMATE, LPG-3400RS, Nemecko), dávkovacieho ventilu, autosamplera (WPS-3000 TRS), detektora (DAD-3000RS), termostatu kolóny (TCC-3000RS), analytickej kolóny Polaris 250, C18-A, 250 x 4,6 mm; 5 μ m (Varian, USA) a vyhodnocovacieho zariadenia.

V tejto štúdii sme sa zamerali na stanovenie štyroch konzervačných látok (kyselina benzoová E 210, benzoan sodný E 211, kyselina sorbová E 200 a sorban draselný E 202) metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s reverznou fázou C18. Zásobné roztoky štandardov E 200, E 202, E 210 boli pripravené o koncentrácii 5 mg.ml⁻¹ odvážením a rozpustením 500 mg daného štandardu v mobilnej fáze. Zásobný roztok štandardu E 211 bol pripravený o koncentrácii 0,5 mg.ml⁻¹ odvážením a rozpustením 50 mg daného štandardu v mobilnej fáze. Z pripravených zásobných roztokov štandardov boli pripravené kalibračné roztoky pre kvantitatívnu analýzu konzervačných látok nariadením do odmerných baniek s objemom 50 ml. Koncentračné rozmedzie pre jednotlivé konzervanty bolo nasledovné:

25 až 150 μ g.ml⁻¹ pre kyselinu sorbovú, 10 až 100 μ g.ml⁻¹ pre sorban draselný,

50 až 400 μ g.ml⁻¹ pre kyselinu benzoovú a 20 až 500 μ g.ml⁻¹ pre benzoan sodný.

Vzorky boli pred vlastnou analýzou spracované tak, že 1 ml kvapalnej formulácie sme odpipetovali do odmernej banky s objemom 10 ml a doplnili ultračistou vodou po rysku. Niektoré vzorky (kvôli vyššiemu obsahu konzervačných látok) boli ešte riedené v pomere 1 : 1 priamo vo vialke nariadením 500 μ l upravenej vzorky a 500 μ l ultračistej vody a dôkladným premiešaním vialky s nariadenou vzorkou na vortexe. Pred každým nástrekom vzorky na chromatografickú kolónu bola vzorka ešte prefiltrovaná cez striekačkový filter PVDF s veľkosťou pórov 0,22 μ m.

Pri vypracovaní chromatografických podmienok separácie štyroch konzervačných látok sme vychádzali z chromatografickej metódy použitej pri stanovení kyseliny sorbovej vo farmaceutickej vzorke

spracovanej v rámci diplomovej práce (Veľasová, 2018). Na základe tejto práce bola ako stacionárna fáza zvolená kolóna s reverznou fázou C18 Polaris 250 x 4,6 mm, 5 μ m (Varian) a zložkami mobilnej fázy boli čistý acetonitril bez ďalšej úpravy a acetátový tlmivý roztok s pH 4,5. Pomer zložiek mobilnej fázy bol nastavený na 40:60 (v/v), prietok mobilnej fázy na 1 ml.min⁻¹ a kolóna bola termostatovaná na 25 °C. Jednotlivé zložky mobilnej fázy boli privádzané pomocou čerpadiel ovládanými ventilmi, ktoré umožňovali miešanie zložiek v požadovanom pomere. Vzorky boli dávkované mikrostriekačkou Hamilton na chromatografickú kolónu o objeme 20 μ l. Pred samotným dávkovaním boli roztoky vzoriek vždy prefiltrované pomocou striekačkového filtra o veľkosti častíc 0,22 μ m priamo do vialiek. Pri vypracovaní metódy bola využitá izokratická elúcia, to znamená, že zloženie mobilnej fázy počas analýzy bolo konštantné, a teda sa neporušovala základná línia (baseline). Z tohto dôvodu ekvilibrácia chromatografického systému nebola po každej elúcii potrebná. Detekcia bola na začiatku vývoja metódy prevádzaná v oblasti absorpcie sorbanu draselného a benzoanu sodného pri 252 nm. Vzhľadom na to, že kyselina sorbová a kyselina benzoová absorbujú pri kratších vlnových dĺžkach pri 225 a 232 nm, bolo výhodné pre dosiahnutie dostatočnej citlivosti využiť možnosť prepnutia vlnovej dĺžky.

Nakoľko v predchádzajúcej experimentálnej práci boli optimalizované chromatografické podmienky stanovenia iba jednej konzervačnej látky, kyseliny sorbovej, bolo potrebné venovať pozornosť optimalizácii podmienok ešte pre ďalšie konzervanty (kyselina benzoová, benzoan sodný a sorban draselný). Výber vhodných podmienok bol zdĺhavý a náročný. Vzhľadom na to, že v analyzovaných farmaceutických vzorkách boli prítomné štyri analyty (kyselina benzoová E 210, benzoan sodný E 211, kyselina sorbová E 200 a sorban draselný E 202), bolo ťažké nájsť optimálne zloženie mobilnej fázy, pri ktorom by dochádzalo k dostatočnej separácii jednotlivých konzervantov. Ohľad musel byť klade-

Tab. 1: Podmienky HPLC analýzy konzervačných látok

Stacionárna fáza	Mobilná fáza	Prietok [ml.min ⁻¹]	DAD detektor
Polaris C18-A (Agilent); dĺžka kolóny 250 mm; vnútorný priemer kolóny 4,6 mm; veľkosť častíc 5,0 µm	A: CH ₃ CN	1,0	259 nm (E 200)
	B: acetátový tlmivý roztok		259 nm (E 202)
	A:B = 40:60 (v/v)		232 nm (E 210)
			225 nm (E 211)

ný aj na to, aby žiadny pík z matrice neinterferoval so skúmanými analytmi. Pomerne značným problémom sa ukázala separácia kyseliny benzoovej, a preto veľká pozornosť bola venovaná separácii tejto látky od ostatných interferentov, ktoré neboli predmetom našej štúdie. Pre identifikáciu píkov konzervačných látok bolo zloženie mobilnej fázy nastavené izokraticky v pomere 60:40 (v/v) CH₃CN : acetátový tlmivý roztok s prietokovou rýchlosťou 1 ml.min⁻¹. Pri uvedenom zložení mobilnej fázy kyselina benzoová eluovala pri retenčnom čase 2,137 min, benzoan sodný 4,023 min, kyselina sorbová 4,070 min a sorban draselný 4,509 min. Nakoľko na chromatografických záznamoch píky prislúchajúce látkam, ktoré neboli predmetom našej štúdie, neinterferovali s píkmi analytov a doba analýzy bola vyhovujúca, bolo toto zloženie mobilnej fázy zvolené za optimálne. Z vialiek, v ktorých sa nachádzali vzorky, resp. štandardy jednotlivých konzervantov, sa dávkoval objem 20 µl na chromatografickú kolónu pomocou automatického injektora. Na detekciu všetkých štyroch konzervačných látok bol použitý spektrofotometrický DAD detektor pri vlnových dĺžkach uvedených prehľadne v tabuľke 1. Termostat v kolónovom priestore bol nastavený na teplotu 25 °C. Pracovný tlak na kolóne počas HPLC analýzy bol 180 barov. Najvhodnejšie podmienky konzervačných látok sú zosumarizované v tabuľke 1.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Stanovenie koncentrácie štyroch konzervantov bolo realizované metódou kalibračných priamok. Pre zostrojenie kalibračných priamok jednotlivých konzervantov pomocou chromatografického softvéru Chromeleon boli využité údaje odčítané z chromatografických záznamov roztokov štandardov so stúpajúcou koncentráciou. Lineárna časť bola vyhodnotená v koncentračnom rozmedzí 25 až 150 µg.ml⁻¹ pre kyselinu sorbovú, 10 až 100 µg.ml⁻¹ pre sorban draselný, 50 až 400 µg.ml⁻¹ pre kyselinu benzoovú a 20 až 500 µg.ml⁻¹ pre benzoan sodný. Linearita bola zhodnotená pomocou hodnoty korelačného koeficienta R², ktorý mal v prípade všetkých štyroch konzervantov hodnoty vyššie než 0,99. V nasledujúcich tabuľkách (viď tab. 2 až 5) sú uvedené hodnoty koncentrácií jednotlivých štandardov, im zodpovedajúce plochy pík, ako aj retenčné časy potrebné k identifikácii a kvantifikácii konzervačných látok vo vzorkách.

Za izokratických podmienok bolo analyzovaných 11 farmaceutických vzoriek v kvapalnom stave. Vo vybraných vzorkách sa nachádzala buď jedna konzervačná látka, resp. zmes konzervačných látok. Pri optimálnych chromatografických podmienkach [čerpanie mobilnej fázy prebiehalo v izokratickom móde pri prietokovej rýchlosti 1 ml.min⁻¹, teplota

Tab. 2: Parametre chromatografickej analýzy štandardu kyseliny sorbovej

$c_{(E\ 200)}$ [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	$c^*_{(E\ 200)}$ [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	t_R [min]	Plocha píku [mAU.min]
25	25,0477	4,067	43,7186
50	50,4368	4,070	79,6807
70	78,1561	4,067	118,9434
100	95,6544	4,070	143,7287
125	122,2374	4,067	181,3819
150	153,4677	4,067	225,6177

$c_{(E\ 200)}$ vypočítaná koncentrácia analytu E 200, $c^*_{(E\ 200)}$ koncentrácia analytu E 200 odčítaná z kalibračnej priamky

Tab. 3: Parametre chromatografickej analýzy štandardu sorbanu draselného

$c_{(E\ 202)}$ [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	$c^*_{(E\ 202)}$ [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	t_R [min]	Plocha píku [mAU.min]
10	0,4890	2,440	1,6434
20	0,9883	2,450	3,3796
40	2,5045	2,450	4,9041
60	5,0523	2,450	6,6899
100	7,4695	2,443	8,2824

$c_{(E\ 202)}$ vypočítaná koncentrácia analytu E 202, $c^*_{(E\ 202)}$ koncentrácia analytu E 202 odčítaná z kalibračnej priamky

Tab. 4: Parametre chromatografickej analýzy štandardu kyseliny benzoovej

$c_{(E\ 210)}$ [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	$c^*_{(E\ 210)}$ [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	t_R [min]	Plocha píku [mAU.min]
0,05	0,0366	2,133	25,8396
0,10	0,1100	2,137	49,6478
0,20	0,2064	2,137	80,9367
0,30	0,3039	2,140	112,5919
0,40	0,3930	2,140	141,5048

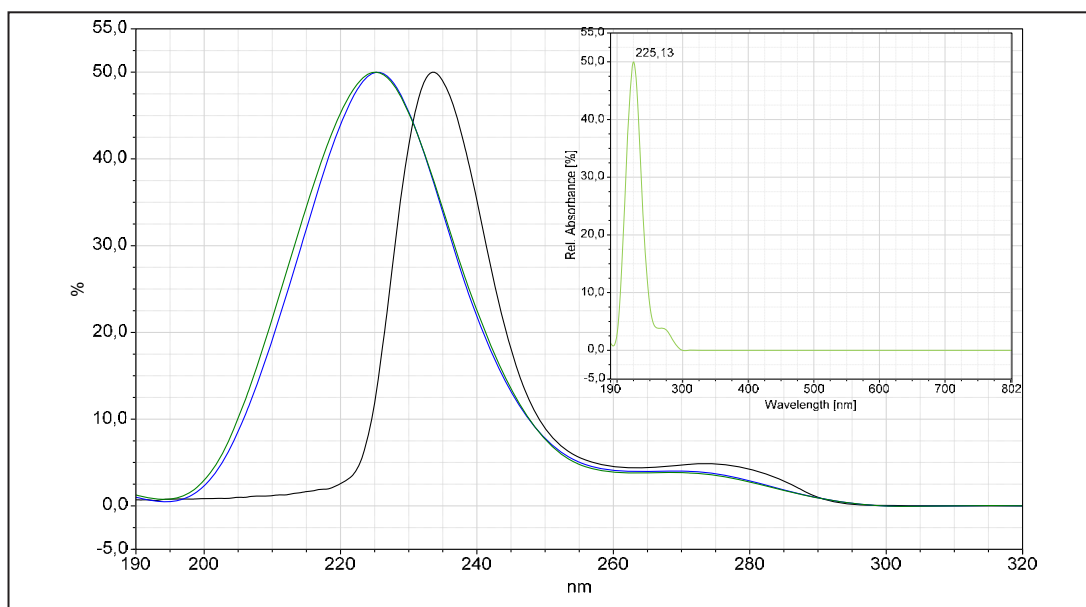
$c_{(E\ 210)}$ vypočítaná koncentrácia analytu E 210, $c^*_{(E\ 210)}$ koncentrácia analytu E 210 odčítaná z kalibračnej priamky

Tab. 5: Parametre chromatografickej analýzy štandardu benzoanu sodného

$c_{(E\ 211)}$ [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	$c^*_{(E\ 211)}$ [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	t_R [min]	Plocha píku [mAU.min]
20	18,5732	4,017	1,6043
40	38,7634	4,017	3,01434
60	59,3591	4,017	4,7133
80	80,5474	4,023	6,3284
100	103,3493	4,023	8,0665
120	120,4670	4,019	9,3713
200	199,2954	4,030	15,3801
500	499,6452	4,057	38,2745

$c_{(E\ 211)}$ vypočítaná koncentrácia analytu E 211, $c^*_{(E\ 211)}$ koncentrácia analytu E 211 odčítaná z kalibračnej priamky

Obr. 1: Prekryv absorpčných spektier vzorky Fenistilu (zelené spektrum), benzoanu sodného (modré spektrum) a kyseliny benzoovej (čierne spektrum).



na kolóne 25 °C, pomer zložiek mobilnej fázy A:B = 40:60, (v/v)] bola uskutočnená analýza reálnych vzoriek a zo získaných plôch pík bola vypočítaná koncentrácia konzervačných látok v kvapalných farmaceutických formuláciách.

V prípade troch analyzovaných vzoriek (Solmucol, IBSA SR, Livsane – Islandský lišajník, Dr. Lüschoff GmbH & Co. KG, Nemecko a Paralen SUS, Zentiva, ČR) sa nachádzali súčasne dve konzervačné látky (E 202 a E 211), preto ešte pred vlastnou analýzou týchto vzoriek sme pripravili kombinovaný štandard deklarovaných dvoch konzervačných látok a podrobili ich HPLC analýze. Pri uvedených izokratických podmienkach sa nám podarilo odseparovať píky až na základnú líniu, takže uvedené podmienky boli vhodné aj pre simultánne stanovenie uvedených dvoch konzervantov. Skúšali sme pripraviť a zanalyzovať aj kombinovaný štandard pre všetky štyri konzervačné látky, ale pri uvedených izokratických podmienkach nedochádzalo k dostatočnej separácii jednotlivých pík.

Pri HPLC analýze vzorky perorálnych roztokových kvapiek Fenistilu (GSK Consumer Healthcare GmbH & Co. KG, Nemecko) sa objavil pík, ktorý svojím retenčným časom neodpovedal deklarovanej konzervačnej látke kyseline benzoovej z PIL. Pík (na obrázku označený zelenou farbou) eluoval pri retenčnom čase 4,020 min a kyselina benzoová (modro označený pík) za daných izokratických podmienok eluovala pri retenčnom čase 2,137 min. Z toho dôvodu sme identifikáciu konzervantu ešte realizovali premeraním absorpčných spektier (na obrázku 1), a ako je zrejmé z prekryvu týchto spektier, ani v tomto prípade sa nepotvrdila deklarovaná konzervačná látka. Z HPLC analýzy a premeraním spektier sme potvrdili prítomnosť benzoanu sodného, ktorý eluoval v retenčnom čase 4,020 min.

Najvyššia hodnota obsahu konzervačných látok medzi analyzovanými vzorkami bola zistená pri vzorke protizápalového roztoku Glimbax, Doppel Farmaceutici s. r. l., Taliansko (9 735,542 µg.ml⁻¹), kde v PIL je aj zdôraznené, že „liek obsahuje

Tab. 6: Maximálna denná dávka konzervačných látok a ich ADI hodnoty

Vzorka	Analyt	Max. denná dávka analytu [mg.kg ⁻¹ /deň]	ADI [mg.kg ⁻¹ /deň]
Solmucol	E 202	0,426	5,0
	E 211	0,405	5,0
Trifed	E 211	0,402	5,0
Paralen SUS	E 202	0,901	3,0
	E 211	2,815	5,0
Mucosolvan	E 210	0,538	5,0
Hylak forte	E 202	0,0412	3,0
Calcium Chloratum	E 211	0,395	5,0
Glimbax	E 211	6,258	5,0
Stoptussin	E 200	0,617	3,0
Livsane - Islandský lišajník	E 202	0,391	3,0
	E 211	0,447	5,0
Fenistil	E 211	0,051	5,0
SymbioLac	E 202	0,693	3,0

nátriumbenzoát (E 211), ktorý môže mať mierne dráždivý účinok na pokožku, oči a sliznice.“ Po prepočítaní získanej koncentrácie konzervačnej látky benzoanu sodného na dospelého človeka s hmotnosťou 70 kg, maximálny denný príjem pri užívaní 15 ml neriedeného roztoku Glimbax v troch dávkach je 6,25 mg.kg⁻¹ telesnej hmotnosti. Príslušné hodnoty ADI pre jednotlivé farmaceutické vzorky sú prehľadne uvedené v tabuľke 6.

ZÁVER

Analýza liekových pomocných látok je dost diskutovanou témou podliehajúcou rôznym kontrolám. Nakoľko konzervačné látky spôsobujú pri zvýšenej konzumácii viaceré zdravotné riziká, predovšetkým u citlivých ľudí a u detí, preto sme sa rozhodli venovať sa identifikácii a kvantifikácii štyroch potravinárskych konzervačných látok, ktoré sa nachádzajú aj vo farmaceutických vzorkách. Farmaceutické vzorky zakúpené v lekární boli analyzované metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej

chromatografie (HPLC) na Ústave farmaceutickej chémie; Katedry chémie, biochémie a biofyziky UVLF v Košiciach. Nakoľko kyselina benzoová a benzoan sodný z uvedených štyroch konzervačných látok predstavujú najväčšie zdravotné riziko, ako napr. u ľudí trpiacich astmou a urtikáriou, alebo vo väčšom množstve môžu tiež vyvolávať žalúdočné problémy, u novorodencov spôsobovať hyperbilirubinémiu, ako aj hyperaktivitu u detí, preto väčšina farmaceutických vzoriek bola selektovaná práve na vzorky s obsahom benzoanu sodného. Konzervačné látky (kyselina benzoová E 210, benzoan sodný E 211, kyselina sorbová E 200 a sorban draselný E 202) boli identifikované a kvantifikované metódou HPLC v systéme reverzných fáz s UV detekciou, RP-HPLC. Ako stacionárna fáza bola zvolená kolóna s reverznou fázou C18 Polaris 250 x 4,6 mm, s priemerom častíc 5 µm a zložkami mobilnej fázy boli čistý acetonitril bez ďalšej úpravy a acetátový tlmivý roztok s pH 4,5. Pomer zložiek mobilnej fázy bol nastavený na 40:60 (v/v), prietok mobilnej fázy na 1 ml.min⁻¹ a kolóna bola termostatovaná na 25

°C. Po spracovaní nameraných údajov programom Chromeleon 7.2 bola uskutočnená kvantitatívna analýza metódou kalibračnej priamky. Po zhodnotení výsledkov a po porovnaní s ADI hodnotami môžeme konštatovať, že iba v jednom prípade vzorky protizápalového roztoku bola prekročená najvyššia prípustná hodnota, a že aplikáciou tohto protizápalového roztoku je prekročený maximálny denný príjem E 211. Hodnoty ADI sa udávajú pre prídavné látky určené na konzumáciu, teda na vnútorné použitie, a protizápalový roztok Glimbax je určený na ústny výplach alebo na kloktanie, tým pádom nedochádza k jeho vnútornému užitiu. Z toho vyplýva, že hodnota získaná analýzou nemôže byť považovaná za smerodajnú a porovnávaná s hodnotami ADI, nakoľko povolené percentuálne hodnoty pre topické užívanie benzoanu sodného sa pohybujú číselne o desatinu vyššie. Namerané hodnoty a hodnoty ADI jednotlivých konzervantov sú zosumarizované v tabuľke 6.

V prípade ostatných vzoriek neboli prekročené ADI hodnoty, avšak mali by sme mať na mysli, že tieto farmaceutické formulácie nie sú iba jediným zdrojom, v ktorom sa nachádzajú konzervačné látky. Treba mať na pamäti, že problém môže

nastať pri nadmernej konzumácii prípravkov nielen farmaceutických, ale predovšetkým aj potravinárskych, kde sa pridávajú tieto pomocné látky, resp. ešte v kombinácii s ďalšími pomocnými látkami, ako sú napr. farbivá, a to riziko je oveľa väčšie.

ZOZNAM LITERATÚRY

Komárek, P., Rabišková, M.: *Technologie léků* [Drug technologies]. Praha: Galén, 2006, 399 s.

Národná rada Slovenskej republiky. *Zákon o liekoch a zdravotníckych pomôckach a o zmene a doplnení niektorých zákonov, 2011* [National Council of the Slovak republic. Act No. 362/2011 Coll. on medicinal products and medical devices as amended]. <https://www.slov-lex.sk/pravne-predpisy/SK/ZZ/2011/362/20180615.html>. [cit. 2018-10-6].

Veľasová V.: *Analýza konzervačných látok metódou HPLC v sirupe proti kašľu (diplomová práca)* [Analysis of preservatives in cough medicine by the HPLC method]. Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2018. 60 s.



TERAPEUTICKÝ MANAŽMENT SCHIZOFRÉNIE REZISTENTNEJ NA LIEČBU (KAZUISTIKA)

THERAPEUTIC MANAGEMENT OF TREATMENT-RESISTANT SCHIZOPHRENIA (CASE STUDY)

Cibuľašová, Kristína¹; Vrabľová, Dana²; Kolesárová, Mária¹; Košuthová, Hedviga^{1,3}

¹Katedra farmakológie a toxikológie

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

²Psychiatrická ambulancia, Jodav 1 s.r.o., 1.mája 5558, 066 01 Humenné

³Združená tkanivová banka, Lekárska fakulta

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Trieda SNP 1, 040 11 Košice
Slovenská republika

hedviga.kosuthova@upjs.sk

ABSTRAKT

Na príklade kazuistiky 39-ročného pacienta chceme poukázať na problém manažmentu schizofrénie rezistentnej na liečbu, ktorou trpí až tretina schizofrenických pacientov. Pri tomto type schizofrénie opakovane zlyháva farmakoterapia, aj pri použití rôznych chemických skupín antipsychotík. Jednoznačné stanovenie diagnózy ako aj samotný priebeh liečby býva navyše často komplikovaný nespoluprácou pacienta, ktorá je typickým znakom pacientov trpiacich schizofróniou, či už sú farmakorezistentní, alebo nie. Pozorovaný pacient prekonal viacero relapsov a podstúpil celkovo 6 hospitalizácií počas 14-tich rokov liečby. Ani farmakoterapia klopazínom,

liekom poslednej voľby, využívaným predovšetkým pri schizofrónii rezistentnej na liečbu, nebola okamžite úspešná. Problémom bola hlavne výrazná negatívna symptomatológia. Vhodným nástrojom na zatiaľ najdlhšie udržanie pacienta v remisii sa ukázala byť kombinácia klopazínu, pri jeho dôslednej titracii s ohľadom na potreby pacienta, s depotnou formou aripiprazolu. Táto kombinácia vyhovujúco účinkuje na pozitívne i negatívne symptómy. Liečba je doplnená antidepresívom venlafaxínom na zmiernenie úzkosti. K zlepšeniu stavu prispeli aj nefarmakoterapeutické postupy, ako art-terapia, návštevy denného stacionára či zmena bydliska, ktorá pacienta oddelila od neustálej bezprostrednej prítomnosti brata s rovnakým ochorením.

Kľúčové slová: antipsychotiká; aripiprazol; farmakoterapia; klozapín; schizofrénia

ABSTRACT

On the example of a case report of a 39-year-old patient, we want to point out the problem of management of treatment-resistant schizophrenia, which affects up to one third of schizophrenic patients. In this type of schizophrenia, the pharmacotherapy with various chemical groups of antipsychotics repeatedly fails. In addition, the unambiguous diagnosis as well as the course of the treatment itself is often complicated by non-compliance of a patient, which is a typical feature of patients suffering from schizophrenia, regardless they are drug-resistant or not. The observed patient overcame several relapses and underwent 6 hospitalizations altogether during 14 years of the treatment. Even pharmacotherapy with clozapine, the drug of the last choice used primarily in treatment-resistant schizophrenia, was not successful right away. The problem was mainly in the significant negative symptomatology. The combination of clozapine, with its thorough titration according to the patient's needs, and aripiprazole in the depot form has been shown to be suitable tool for keeping the patient in remission for the longest time. This combination has satisfactory effect on the both – positive and negative symptoms. The treatment is supplemented with the antidepressant venlafaxine to relieve anxiety. The improved state of health was sustained also by non-pharmacotherapeutic procedures, such as art therapy, visits at a day hospital, or the change of residence, which separated the patient from the household where he shared the bedroom with his brother with the same disease.

Key words: antipsychotic agents; aripiprazole; clozapine; pharmacotherapy; schizophrenia

ÚVOD

Schizofrénia je veľmi závažné psychické ochorenie. Dominantná je pri nej pozitívna symptomatológia, manifestujúca sa bludmi, halucináciami, agresivitou, agitovanosťou a stereotypnými pohybmi. Mnohokrát je súčasne prítomná aj výrazná negatívna symptomatológia prejavujúca sa celkovou afektívnou otupenosťou, poruchami kognitívity a oploštenosťou k emočným reakciám. Psychopatológia zahŕňa predovšetkým dysreguláciu dopamínergického systému, ktorá sa prejavuje nadmernou transmisou v mezolimbickej oblasti a zvýšenou aktiváciou D_2 receptorov, čo môže mať za následok vznik pozitívnych príznakov. Za negatívnu symptomatológiu sú naopak zodpovedné hypoaktívne D_1 receptory v prefrontálnom kortexe a D_3 receptory vo ventrálnom striate, zodpovedajúce za procesy pamäte, pozornosti a učenia. Na rozvoji ochorenia sa podieľa aj dysregulácia serotonínu, noradrenalínu, acetylcholínu, či gama-aminomaslovej kyseliny (Dragašek a Vančová, 2019).

Je dôležité nájsť pre pacienta správny druh a formu liečby, ovplyvňujúcu obe skupiny symptómov želateľným spôsobom, čo môže trvať dlhšie časové obdobie. Popri pomocných nefarmakologických postupoch je pilierom liečby farmakoterapia antipsychotikami I. (klasické neuroleptiká) a II. generácie (atypické antipsychotiká), pričom na terapiu negatívnych symptómov sú účinnejšie druhé z nich (Dušek a Večeřová-Procházková, 2010). Užívanie antipsychotík je spojené s častým výskytom nežiaducich účinkov, ktoré znižujú aj tak dosť nízku compliance schizofrenických pacientov. Nedodržiavanie stanovenej farmakoterapie spôsobuje vznik relapsu a re-hospitalizáciu (Patel a kol., 2014). Zvýšiť compliance pacienta a pomôcť stabilizovať stav je možné zvolením depotných foriem antipsychotík. Liečbu antipsychotikami je možné doplniť tymostabilizátormi, benzodiazepínmi, antidepresívami či hypnotikami. Ďalšou možnosťou je elektrokonvulzívna terapia (ECT). Terapiu dopĺňa stacionárna liečba, psychoterapia a edukácia pacien-

ta a jeho rodiny o ochorení (Moťovský, 2010).

V súčasnej klinickej praxi je schizofrénia rezistentná na liečbu (treatment-resistant schizophrenia – TRS), ktorou trpí až tretina pacientov so schizofréniou, definovaná neúspechom aspoň dvoch liečebných stratégií antipsychotikami z rôznych chemických skupín, v trvaní 3 až 4 týždne pre každú z nich. Pre tento typ schizofrénie je odporúčaným liečivom klopazín, ktorý je však pre možný výskyt závažných nežiaducich účinkov vo všeobecnosti v terapii schizofrénie až liekom poslednej voľby (Virčík, 2016).

OPIS PRÍPADU

Pacientom je nezamestnaný 39-ročný muž zo SŠ vzdelaním, ktorý sa lieči na paranoidnú schizofréniu (F20.00) 14 rokov, počas ktorých absolvoval už 6 hospitalizácií. V čase prvého ataku ochorenia bol jeho brat, zdieľajúci s ním izbu, už 2 roky liečený na rovnakú diagnózu. Počas týchto 2 rokov sa pacient sťažoval na bolesti hlavy, a podľa jeho vlastných slov v tomto období fajčil marihuanu.

Na oddelenie pacienta po prvýkrát násilím priviedol otec v roku 2007, po cca polročnej anamnéze zmeneného správania. Medzi prvé príznaky patrila paranoidná pohotovosť, verbálno-akustické halucinácie, vysoká intrapsychická tenzia, agitovanosť, agresivita, zanedbaná hygiena a anozognózia (neschopnosť pacienta vnímať svoje ochorenie). Po podaní olanzapínu 15 mg *pro die* sa pacientov stav stabilizoval. Pacient sa neskôr, pri farmakoterapii uvedenej v tab. 1, zúčastňoval ergoterapeutických aktivít a navštevoval denný stacionár. Zo psychiatrického zariadenia bol prepustený s diagnostickým záverom F23.1 – Akútna polymorfna psychotická epizóda s príznakmi schizofrénie. V neskoršom období roku 2007 mu ambulantný psychiater znížil dávkovanie na 10 mg olanzapínu večer. V priebehu tohto roka pacient vystriedal 4 pracovné príležitosti.

Na druhú nútenú hospitalizáciu ho priviezol otec vo februári 2008 kvôli celkovému zhoršeniu

zdravotného stavu. V popredí klinického obrazu boli rovnaké znaky ako pri prvej hospitalizácii s pridruženými paranoidnými perzekučnými bludmi. Popri liečbe olanzapínom bola nasadená liečba antidepressívami (milnacipran, venlafaxín; obe patria do skupiny inhibítorov spätného vychytávania serotonínu a noradrenalínu) a zopiklónom na nespavosť (viď tab. 1) spolu s pracovnou terapiou. Pacient bol naďalej autistický, málo komunikatívny so sklonom k sociálnej izolácii. Bola mu aplikovaná ECT, po ktorej sa jeho stav upravil, bol viac sociabilný, subdepresívny, bez manifestných psychotických príznakov. Pre organické zmeny v CNS mu bol k farmakoterapii pridaný piracetam. V apríli 2008 bol prepustený z oddelenia s diagnózou F25.1 – Schizoafektívna porucha depresívneho typu. U pacienta perzistovalo depresívne ladenie, anxiózný pohľad, znížená pozornosť. Pre zlú compliance mu bolo neskôr v roku 2008 upravené dávkovanie milnacipranu (viď tab. 1). Do novembra 2008 pribral 10 kilogramov, spal až 10 – 15 hodín denne, bol depresívne naladený.

V septembri 2009 došlo k celkovému zhoršeniu psychopatológie. Ambulantný psychiater zamenil olanzapín za quetiapín (viď tab. 1), čo najskôr vyvolalo zlepšenie zdravotného stavu. Neskôr sa však pacient cítil melancholicky a začínal mať dojem, že pociťuje cudzie emócie. V decembri 2009 bol privedený na vyšetrenie v doprovide príslušníkov polície, kvôli heteroagresívnym prejavom s ohrozovaním a inzultovaním rodinných príslušníkov. Pacient bol prijatý na oddelenie s výraznou intrapsychickou tenziou, iritabilitou, vysokou mierou paranoidity s odklonom od reality v dôsledku non-compliance. Opakovane opustil areál nemocnice a bol agresívny. Po pristúpení k ECT bol pokojnejší, sociabilný a zlepšil sa aj jeho postoj k rodine. Bol prepustený z nemocnice s diagnózou F20.0 – Paranoidná schizofrénia, a zmenenou farmakoterapiou (viď tab. 1).

V domácej liečbe však poberal len depotný risperidón raz za 14 dní. Ostatné liečivá nebral, čo malo negatívny dopad na jeho psychický stav. V

Tab. 1: Farmakoterapia pacienta za celé obdobie liečby

OBDOBIE	NASTAVENÁ FARMAKOTERAPIA	ZMENY POČAS AMBULANTNEJ LIEČBY
1. HOSPITALIZÁCIA (2007, 25 ROKOV)	– olanzapín oro tbl (5 mg ráno, 10 mg večer)	– neskôr len 10 mg denne
2. HOSPITALIZÁCIA (2008)	– olanzapín oro tbl (10 mg 0-0-1) – milnacipran (50 mg 1-1-0) – venlafaxín (150 mg 1-0-0) – zopiklón (7,5 mg <i>p.p.</i>) – ECT – piracetam (2,4 – 4,8 mg denne)	– zámena olanzapínu za quetiapín (300 mg ráno, večer) – zlá odpoveď na zmenu liečby
3. HOSPITALIZÁCIA (2009)	– olanzapín oro tbl (10 mg večer) – ECT – risperidón (50 mg <i>i.m.</i> á 14 dní) – zolpidém <i>p.p.</i>	– ambulantne len risperidón (50 mg <i>i.m.</i> á 14 dní), lebo odmieta tabletovú formu – neskôr je nutné pridať risperidón (2 mg <i>p.o.</i> večer)
4. HOSPITALIZÁCIA (2011)	– klozapín (100 mg ½-0-1) – ECT – piracetam 1200 mg	– escitalopram (10 mg ráno) – zmena antidepresíva na paroxetín (20 mg ½-1-0)
5. HOSPITALIZÁCIA (2017)	– haloperidol (3 dni), – klozapín (100 mg ½-0-1) – venlafaxín (75 mg R) – zopiklón (7,5 mg <i>p.p.</i>)	– zámena klozapínu za aripiprazol (15 mg ráno, 10 mg večer)
6. HOSPITALIZÁCIA (2018)	– haloperidol (parent.) – klozapín (100 mg ½-0-½) – aripiprazol (15 mg 1-0-0) – aripiprazol (400 mg <i>i.m.</i> á 28 dní) – venlafaxín (150 mg 1-0-0)	– nový ambulantný psychiater, vynechanie <i>p.o.</i> aripiprazolu , (upravenie dávkovania klozapínu (viď tab. 2) – významný pokrok v liečbe, zlepšenie PANSS, mierne zníženie hmotnosti

marci 2010 na kontrolnom vyšetrení udáva sluchové halucinácie paranoidného charakteru. Pre zlú prognózu je pridaný k liečbe risperidón v tabletovej forme (viď tab. 1). Po úprave liečby sa pacientovi zlepšil zdravotný stav, bol viac sociabilný, aktívny, mal silnú túžbu zamestnať sa a viesť plnohodnotný život.

Na 4. hospitalizáciu prišiel sám v januári 2011, kvôli zvýšeniu nervozity. Pri príjme popisuje výskyt verbálno-akustických halucinácií s dopadom na jeho konanie. Je na ňom evidentné veľké zanedbávanie hygienických návykov. Jeho stav je vyhodnotený ako schizofrénia rezistentná na liečbu. K risperidónu v depotnej forme je pridaný klozapín (viď tab. 1). Pre pretrvávajúce poruchy vnímania a depresiu mu bola ponúknutá ECT, po ktorej psychotická

symptomatológia ustúpila. Nálada je nevýrazná, ale zlepšená. Depotnú formu liečby odmieta, plánuje ísť za prácou do zahraničia.

Pacient sa v období rokov 2011 až 2017 javí stále viac asociálny, depresívny a autistický. Nepocituje žiadne emócie, je čoraz smutnejší, veľa spí, cíti veľkú únavu, priberá na váhe (viď tab. 3). Popri paranoidnej schizofrénii mu bola začiatkom roka 2013 diagnostikovaná Postschizofrérická depresia – F20.04. Ku klozapínu bola pridaná terapia antidepresívom escitalopram (viď tab. 1). Počas tohto obdobia nastalo krátkodobé zlepšenie zdravotného stavu iba v lete 2014, keď pacient začal behať, schudol 3 kg a navštevoval denný stacionár.

V apríli 2017 viedli k už 5. hospitalizácii akustické imperatívne halucinácie. V popredí je

Tab. 2: Dávkovanie klozapínu

ROK	2018	2018	2019	2019	2019	2019 – 2020
MESIAC	aug	sep – dec	jan – feb	mar – máj	jún – júl	aug – sep
KLOZAPÍN 25 MG	0-0-1	0-0-1	0-0-1	0-0-1	1-0-1	0-0-1
KLOZAPÍN 100 MG	½-½-1	1-0-1	1-0-1	1-0-1	0-0-1	1-0-1

Tab. 3: Zmena hmotnosti pacienta počas liečby klozapínom

ROK	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
TELESNÁ HMOTNOSŤ [KG]	81	98	102	99	112	122	122	120	119	118

okrem nich mierne zvýšená intrapsychická tenzia, anozognózia, sociálna izolácia a zvýšenie hmotnosti. Antidepresívna medikácia je zmenená na venlafaxín (viď tab. 1). V úvode pobytu je mu po dobu troch dní podávaný haloperidol v parenterálnej forme. Postupne psychotická symptomatika odznela.

Po krátkodobom zlepšení nastáva koncom roka 2017 mesiac trvajúca psychóza ako dôsledok vysadenia farmaceutík. V decembri 2017 mu bol ambulantne zamenený klozapín za aripiprazol (viď tab. 1). Pacient opakovane liečivo vysadil, pretože sa po ňom cítil veľmi strnulý a nepokojný. Rozprával sám so sebou, mal paranoidné myšlienky a hostilné prejavy, čo viedlo v januári 2018 k 6. hospitalizácii a zmene liečby (viď tab. 1). Olanzapín v liečbe nezaberá, pristupuje sa k návratu ku klozapínu a k perorálnej forme aripiprazolu sa pridáva jeho depotná forma (viď tab. 1). Pacient bol prepustený z liečby vo februári.

V auguste 2018 sa vystupňuje agresivita a poruchy vnímania so sklonom k absurdnej gestikulácii. Kontrolné vyšetrenie prebieha pri inom ambulantnom psychiatrovi, u ktorého je pacient evidovaný dodnes. Pacientovi bolo upravené dávkovanie klozapínu (viď tab. 2), a to najskôr kvôli úprave celkového psychického stavu. Pri ďalších kontrolách je pravidelne monitorovaný aj krvný obraz. Jeho

zmeny vedú v júni 2019 k prechodnému zníženiu dávkovania klozapínu (viď tab. 2).

Perorálny aripiprazol bol z liečby vynechaný, čo výrazne zlepšilo psychický stav pacienta. K tomu prispela vo veľkej miere aj zmena bydliska, kde už nezdieľa izbu s chorým bratom. V súčasnosti je bez pocitu chorobnosti a porúch vnímania, stále však dominuje autistické myslenie a negatívne symptómy. Dôležitá bola aj práca s jeho rodinou, ktorá napokon prijala pacientovu novú osobnosť. To mu pomohlo viac komunikovať a viesť aktívnejší život, zaujíma sa o dianie v rodine a v športe. Pacient schudol (viď tab. 3). Pravidelne chodíva do denného stacionára. Pri vtieravých myšlienkach mu pomáha kreslenie. Popri pravidelnom poberaní antipsychotík užíva doplnkovú terapiu, omega-3 mastné kyseliny a vitamíny skupiny B.

DISKUSIA

Schizofrénia sa u pacienta prejavila 2 roky po tom, ako bola diagnostikovaná jeho bratovi, s ktorým zdieľal izbu. Riziko vzniku ochorenia je vo všeobecnosti 1 %, u osôb s chorým súrodencom je však prevalencia takmer 13 % (Höschl, 2004). U predisponovaného pacienta mohla v úvodných štádiách ochorenia prepuknúť indukovaná porucha s

bludmi. V požívaní marihuany hľadal pravdepodobne únik z tejto reality, čo však mohlo ešte viac poškodiť jeho stav. Psychoaktívny 9-tetrahydrokanabinol sa spája s indukovaním psychotického stavu schizofrénie, a to najmä u rizikovej skupiny ľudí s pozitívnou rodinnou anamnézou (Manseau a Goff, 2015).

Pacient počas 14-tich rokov liečby vystriedal viacero antipsychotík a ich rôzne dávkovania. Problémom bola častokrát neadekvátna odpoveď, ale aj nespolupráca pacienta, vyúsťujúca v opakovaný relaps ochorenia. Non-compliance je jedným zo znakov schizofrénie, pričom vznik relapsu je takmer 5-násobne pravdepodobnejší u pacientov porušujúcich predpísanú terapiu (Janů a Racková, 2004). Rizikom bolo tiež ambulantné zamieňanie farmakoterapie stratégiou STOP, opakovane použité prvým ambulantným psychiatrom. Pre zmenu antipsychotík sú menej rizikové postupy skríženej titrácie, či prekríženie s postupným znížením (Seifertová, 2004).

U pacienta v priebehu rokov, napriek liečbe, dochádzalo k vystupňovaniu pozitívnych aj negatívnych symptómov. Klopapín mu bol prvýkrát nasadený počas štvrtej hospitalizácie, pre stále sa vracajúce akustické halucinácie. To však nestačilo na zlepšenie pacientovho stavu, preto sa pristúpilo aj k ECT, ktorá mala u tohto pacienta viditeľný prínos pre jeho liečbu. Primárne sa ECT používa v prípade urgentnej potreby, ak pacient v minulosti lepšie odpovedal na ECT ako na iný druh terapie, alebo ak pacient uprednostňuje tento druh liečby. Inak je táto metóda využívaná ako tzv. liečba 4. voľby (Dragašek, 2011).

Z nežiaducich účinkov na terapiu antipsychotikami sa už od úvodných mesiacov vyskytlo priberanie na váhe ako dôsledok užívania olanzapínu. Pri terapii klopapínom bolo priberanie ešte rapidnejšie. Porovnanie antipsychotík s placebom v 83 klinických štúdiách zaradilo olanzapín a klopapín k liečivám najviac ovplyvňujúcim nárast hmotnosti (Pillinger a kol., 2020). K nárastu hmotnosti pacienta prispelo aj vystupňovanie negatívnych symptómov, apatia a

depresie.

Po dlhoročnej liečbe s viacerými relapsami a nepriaznivom vývoji ochorenia bolo nevyhnutné pridať ku klopapínu druhé liečivo. Niektorí autori priradujú dominantné postavenie pri neadekvátnej odpovedi na liečbu samotným klopapínom, kombinovanej terapii klopapínu s aripiprazolom (Galling a kol., 2017). Aripiprazol bol predpísaný na základe jeho hlavného účinku na negatívne symptómy a narušenú kognitívitu, kvôli jeho preferenčnej afinite k D_3 receptorom a duálnemu mechanizmu účinku. U pacienta bolo non-compliance charakteristickým faktorom, preto bola stanovená terapia depotnou formou aripiprazolu, ktorá umožňuje lepšiu adherenciu pacienta k liečbe. Prechod na liečbu depotným aripiprazolom je nutné počas prvých dvoch týždňov liečby doplniť aj perorálnou formou liečiva. Perorálny aripiprazol spolu s depotným však pacient užíval súčasne s klopapínom až 6 mesiacov, kedy vypukla manifestácia agresivity a jadrovej schizofrénnej symptomatológie. Pri tejto situácii bola vykonaná zmena ambulantného psychiatra, ktorý nasadil ukončenie užívania perorálneho aripiprazolu a postupné zvyšovanie dennej dávky klopapínu. Po úprave medikamentózne liečby došlo k významnému pokroku v liečbe. Počas liečby klopapínom sa však hmotnosť pacienta rokmi zvyšovala až na 122 kg. Po podávaní aripiprazolu môžeme postupne sledovať jej mierny zostup. Podobné výsledky boli dosiahnuté pri retrospektívnej analýze záznamov pacientov so schizofróniou rezistentnou k liečbe, ktorí prešli na kombinovanú liečbu klopapínu s aripiprazolom. Až 75 % pacientov vykazovalo redukciu priemernej hmotnosti približne o 5 kg (Karunakaran a kol., 2007). Okrem toho sa pacientovi mierne zvýšila hladina HDL, došlo k zlepšeniu jeho pozitívnej aj negatívnej symptomatológie a zastaveniu jeho sociálneho úpadku. V odbornej literatúre bol popísaný prípad kedy pacient s TRS vykazoval po roku užívania klopapínu v kombinácii s depotným aripiprazolom zlepšenie stavu a zníženie schizofrénnej symptomatológie minimálne o 50 % (Sepede a kol., 2016). V našom prípade nebolo zlepšenie až také dramatické,

môžeme však jednoznačne konštatovať, že pacient sa vďaka tejto klinicky priaznivej farmakoterapii začal lepšie adaptovať do spoločnosti. Tá ho začala viac podporovať, a tak nadobudol väčšiu istotu a pohodu. Po 14 rokoch liečby je pacient konečne v remisii, bez pozitívnej symptomatológie. V záťažových situáciách síce naďalej pociťuje zhoršenie zdravotného stavu, únavu a nepokoj, naučil sa ale kontrolovať svoje vtieravé myšlienky pomocou kreslenia, počúvania rádia, hrania hier a cestou pracovnej terapie. Viacerí autori poukazujú na prospešnosť pridania umenia ako doplnkovej terapie (Attard a kol., 2016). Pacientovi jednoznačne prospelo, že už nezdíeľal izbu so svojim rovnako postihnutým bratom. Pravidelne navštevuje denný stacionár, čo mu pomáha v psychosociálnej a kognitívnej oblasti.

ZÁVER

Pacient vystriedal širokú škálu antipsychotík a ich dávkovania, a to nielen pre non-compliance, ale aj kvôli neadekvátnej reakcii na väčšinu z nich. Klopazín, považovaný za dosiaľ jediné liečivo účinné pri TRS na pozitívne symptómy, bol nasadený počas 4. hospitalizácie. Počas liečby pacient dobre reagoval na ECT. Dávkovanie klopazínu bolo potrebné titrovať kvôli riziku agranulocytózy, hypotenznému a tlmivému účinku. K zlepšeniu stavu pacienta výrazne prispela kombinácia klopazínu s depotným aripiprazolom a úprava dávkovania klopazínu. Na celkovom výsledku sa podieľal aj ohľaduplnejší postoj rodiny, ktorá napokon prijala pacientovu novú osobnosť poznačenú traumou a poruchou kognitivity. K stabilizácii jeho zdravotnému stavu prispievajú aj pravidelné kontroly denného stacionára, pracovná terapia, počúvanie rádia, hranie hier a art terapia.

POĎAKOVANIE

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt „Otvorená vedecká komunita pre moderný interdisciplinárny výskum v medicíne (OPENMED)“,

kód ITMS2014+: 313011V455, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

ZOZNAM LITERATÚRY

Attard, A., Larkin, M.: Art therapy for people with psychosis: a narrative review of the literature. *Lancet Psychiatry*, 2016, 3 (11), 1067 – 1078.

Dragašek, J.: Utilisation of electroconvulsive therapy in treatment of depression disorders. *Psychiatrie*, 2011, 15 (1), 9 – 12.

Dragašek, J., Vančová, Z.: Úloha dopamínových D3 parciálnych agonistov v modernej liečbe schizofrénie [The role of partial dopamine D3 agonists in the modern treatment of schizophrenia]. *Psychiatria pre prax*, 2019, 19 (4), 143 – 146.

Dušek, K., Večeřová-Procházková A.: *Diagnostika a terapie duševních poruch* [Diagnosis and therapy of mental disorders]. České Budějovice: Grada Publishing, 2010. 632 s.

Galling, B., Roldán, A., Hagi, K., Rietschel, L., Walyzada, F., Zheng, W., Xiao-Lan Cao, X.-L., Xiang, Y.-T., Zink, M., Kane, J. M., Nielsen, J., Leucht, S., Correll, Ch. U.: Antipsychotic augmentation vs. monotherapy in schizophrenia: systematic review, meta-analysis and meta-regression analysis. *World Psychiatry*, 2017, 16 (1), 77 – 89.

Höschl, C.: *Psychiatrie* [Psychiatry]. Praha: Tisig, 2004. 883 s.

Janů, L., Racková, S.: Compliance v léčbě schizofrenie [Compliance in the treatment of schizophrenia]. *Psychiatrie pro praxi*, 2004, 5, 245 – 249.

Karunakaran, K., Tungaraza, T. E., Harborne, G. C.: Is clozapine-aripiprazole combination a useful regime in the management of treatment-resistant schizophrenia? *J. Psychopharmacol.*, 2007, 21 (4), 453 – 456.

Manseau, M., W., Goff, D. C.: Cannabinoids and schizophrenia: risks and therapeutic potential. *Neurotherapeutics*, 2015, 12 (4), 816 – 824.

Mořovský, B.: Manažment liečby pacienta so schizofréniou [Management and treatment of

patient with schizophrenia]. *Via practica*, 2010, 7 (4), 174 – 179.

Patel, K. R., Cherian, J., Gohil, K., Atkinson, D.: Schizophrenia: overview and treatment options. *P. T.*, 2014, 39 (9), 638 – 645.

Pillinger, T., McCutcheon, R., Vano, L., Mizuno, Y., Arumham, A., Hindley, G., Beck, K., Natesan, S., Efthimiou, O., Cipriani, A., Howes, O. D.: Comparative effects of 18 antipsychotics on metabolic function in patients with schizophrenia, predictors of metabolic dysregulation, and association with psychopathology: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Psychiatry*, 2020, 7 (1), 64 – 77.

Seifertová, D.: *Postupy v léčbě psychických poruch* [Procedures in the treatment of mental disorders]. Praha: Medical Tribune CZ, 2004, 479 s.

Sepede, G., DiLorio, G., Spano, M. C., Lorusso, M., Sarchione, F., Santacroce, R., Salerno, R. M., Di Giannantonio, M.: A case of resistant schizophrenia successfully treated with clozapine/long-acting injectable aripiprazole combination. *Clin. Neuropharmacol.*, 2016, 39 (6), 322 – 324.

Virčík, M.: Klozapín v kombinácii s amisulpridom v liečbe farmakorezistentnej schizofrénie [Clozapine and amisulprid combination in treating pharmaco-resistant schizophrenia]. *Psychiatria pre prax*, 2016, 17 (4), 165 – 167.



OFTALMOLOGIKÁ A ICH POMOCNÉ LÁTKY SO ZNÁMYM ÚČINKOM (PREHLADOVÝ ČLÁNOK)

OPHTHALMOLOGICALS AND THEIR EXCIPIENTS WITH A KNOWN EFFECT (A REVIEW)

Štempeľová, Iveta^{1,2}; Fedorová, Monika¹

¹Katedra lekárenstva a sociálnej farmácie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

²Ústav aplikovanej farmácie, Farmaceutická fakulta
Masarykova univerzita, Palackého třída 1946/1, 612 00 Brno
Česká republika

iveta.stempelova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Prehľadový článok sumarizuje informácie o registrovaných liekoch na Slovensku zo skupiny oftalmologík z pohľadu ich liekových foriem a obsahu pomocných látok so známym účinkom podľa aktuálne platnej verzie prílohy pokynov Európskej komisie EMA/CHMP/302620/2017. Ďalej približuje informácie pre vybrané pomocné látky so známym účinkom, ktoré by mali byť uvedené v písomnej informácii pre používateľa lieku a cesty podania, na ktoré sa uvedené informácie vzťahujú. Obsah a účinky pomocných látok so známym účinkom v liekoch je potrebné vziať do úvahy a informovať o nich pacientov pri dispenzácii, prípadne v rámci poskytovania konzultačnej činnosti v lekárni.

Kľúčové slová: oftalmologiká; pomocné látky; registrované lieky; Slovensko

ABSTRACT

The review deals with authorised medicines which contain active substances from ATC group of ophthalmologicals (S01). It focuses on dosage forms and excipients with a known effect (according to annex to the European Commission guideline: „Excipients in the labelling and package leaflet of medicinal products for human use“ (EMA/CHMP/302620/2017)). It also describes information on the selected excipients with a known effect which should be published in a package leaflet and adequate routes of administration which are the information designed

for. Patients should be informed about effects of excipients within pharmacy dispensation and pharmaceutical consultations.

Key words: authorised medicines; excipients; ophthalmologicals; Slovakia

ÚVOD

Oko je vysoko špecializovaný orgán. Bariéry, ktoré zabezpečujú ochranu pred vstupom patogénov zároveň obmedzujú prestup liekov do štruktúr oka. Najčastejším spôsobom podávania liekov v oftalmológii je lokálna aplikácia. Lokálne aplikované lieky majú kvôli mnohým fyzickým a biochemickým bariéram oka limitovanú biologickú dostupnosť. Očné liekové formy (LF) sa vyznačujú sterilitou a sú určené k aplikácii na očnú guľu, do spojovkového vaku alebo priamo do spojovky. Lokálna aplikácia očných liekov sa používa pri liečbe chorobných procesov prebiehajúcich v tkanivových štruktúrach očnej gule, prípadne v jej pomocných orgánoch. Pri nedostatočnej účinnosti sa lokálna aplikácia kombinuje s celkovou aplikáciou, prípadne sa lieky podávajú len celkovo (Awwad a kol. 2017; Oleárová, 2018; Kertys a Kertysová, 2019; Tomčíková, 2020).

Anatomickeo-terapeuticko-chemická klasifikácia liečiv (ATC) obsahuje skupinu Oftalmologiká (S01) zahŕňajúcu liečivá zo skupín: Antiinfektíva (S01A), Antiflogistiká (S01B), Antiflogistiká a antiinfektíva v kombinácii (S01C), Antiglaukomatiká a miotiká (S01E), Mydriatiká a cykloplegiká (S01F), Dekongesčné liečivá a antialergiká (S01G), Lokálne anestetiká (S01H), Diagnostiká v oftalmológii (S01J), Chirurgické pomocné látky (S01K), Liečivá pôsobiace pri poruchách očných ciev (S01L) a Iné oftalmologiká (S01X). V prehľadovom článku sme poukázali na prítomnosť a účinky vybraných pomocných látok (PL) so známym účinkom, ktoré sa nachádzajú v registrovaných oftalmologických liekoch na Slovensku.

MATERIÁL A METÓDY

Medzi oftalmologické lieky boli zaradené lieky, ktoré spĺňali kritérium, že liečivo v nich obsiahnuté patrí do ATC skupiny S01. Podľa WHO máme v skupine S01 na úrovni chemickej podskupiny (5. úroveň ATC kódu) 241 ATC skupín, pričom lieky registrované na Slovensku sa nachádzajú v 61 ATC skupinách (WHO, 2020) (spracované k 24.1.2021).

Pre získanie informácií o registrovaných oftalmologických liekoch na Slovensku a prítomnosti PL so známym účinkom v nich sme využívali liekovú databázu Štátneho ústavu pre kontrolu liečiv a príslušné súhrny charakteristických vlastností (SPC) liekov, prípadne databázu Európskej liekovej agentúry a príslušné SmPC (Summary of product characteristics) liekov. Celkovo sme spracovali informácie z 223 SPC, resp. SmPC liekov registrovaných na Slovensku. Informácie boli spracované k 24.01.2021.

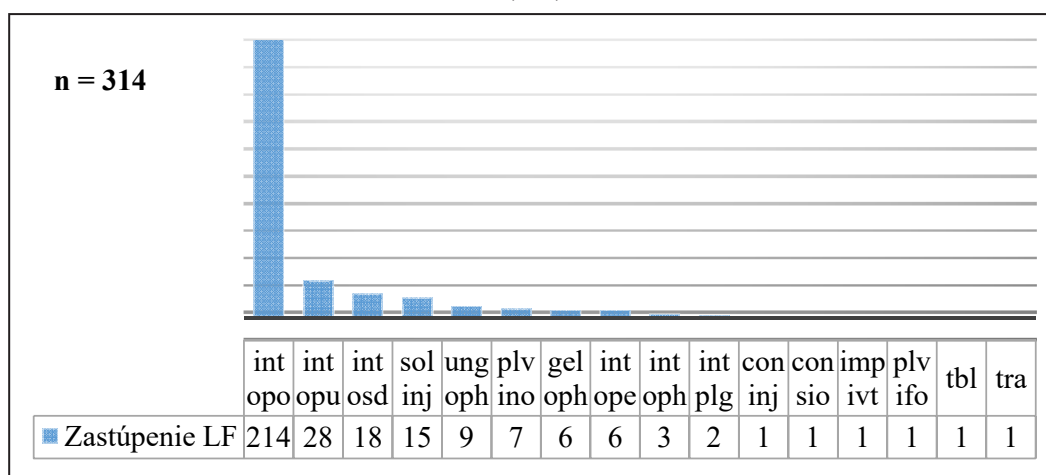
Informácie o PL so známym účinkom boli čerpané z aktuálneho znenia prílohy pokynov Európskej komisie EMA/CHMP/302620/2017 s názvom: „Excipients in the labelling and package leaflet of medicinal products for human use“ (ďalej len „Príloha EK“) (EMA, 2019). Informácie boli spracované k 24.01.2021.

VÝSLEDKY

Oftalmologiká predstavujú rozmanitú skupinu, do ktorej sú zaradené liečivá obsiahnuté v liekoch, ktoré podľa spôsobu výdaja rozdeľujeme na a) lieky, ktorých výdaj nie je viazaný na lekársky predpis; b) lieky, ktorých výdaj je viazaný na lekársky predpis a c) lieky, ktorých výdaj je viazaný na lekársky predpis s obmedzením predpisovania (ŠÚKL, 2021).

Oftalmologické liečivá sme zaznamenali v 314 registrovaných liekoch na Slovensku. Tieto lieky sa vyskytovali v 16 rôznych LF podľa príslušných SPC/SmPC. Zastúpenie jednotlivých LF znázorňuje graf 1.

Graf 1: Zastúpenie liekových foriem registrovaných liekov obsahujúcich liečivá z ATC skupiny Oftalmologiká (S01)



con inj – injekčný koncentrát, **con sio** – koncentrát na roztok na vnútroočný výplach, **gel oph** – očný gél, **imp ivt** – intravitreálny implantát s aplikátorom, **int ope** – očná emulzná instilácia, **int oph** – očná roztoková instilácia, jednodávkový obal, **int opo** – očná roztoková instilácia, **int opu** – očná suspenzná instilácia, **int osd** – očná roztoková instilácia v jednodávkovom obale, **int plg** – očná instilácia s predĺženým uvoľňovaním, **plv ifo** – prášok na infúzny roztok, **plv ino** – prášok na injekčný roztok, **sol inj** – injekčný roztok, **tbl** – tablety, **tra** – transplantát, **ung oph** – očná masť

Zdroj: spracované podľa <https://www.sukl.sk/>

Medzi najčastejšie sa vyskytujúce liekové formy patrili očné instilácie (roztokové, suspenzné a pod.), ktoré spolu predstavovali 86,3 % zo všetkých LF. Na Slovensku máme registrovaný 1 liek vo forme intravitreálneho implantátu (s obsahom dexametazónu) a 1 liek vo forme transplantátu (autológne epitelové bunky ľudskej rohovky expandované *ex vivo* obsahujúce kmeňové bunky).

Informácie o PL so známym účinkom, ktoré by držiteľia rozhodnutia o registrácii humánneho lieku mali uvádzať v písomnej informácii pre používateľa humánneho lieku (PIL), v niektorých prípadoch aj doporučené informácie pre uvedenie v SPC sa uvádzajú v Prílohe EK. Aktuálne platí verzia prílohy účinná od 22. novembra 2019 (EMA, 2019).

Registrované oftalmologické lieky obsahujúce PL so známym účinkom sme zaznamenali celkovo v 44 ATC skupinách (5. úroveň ATC kódu). Z celkového počtu 314 registrovaných oftalmologických liekov

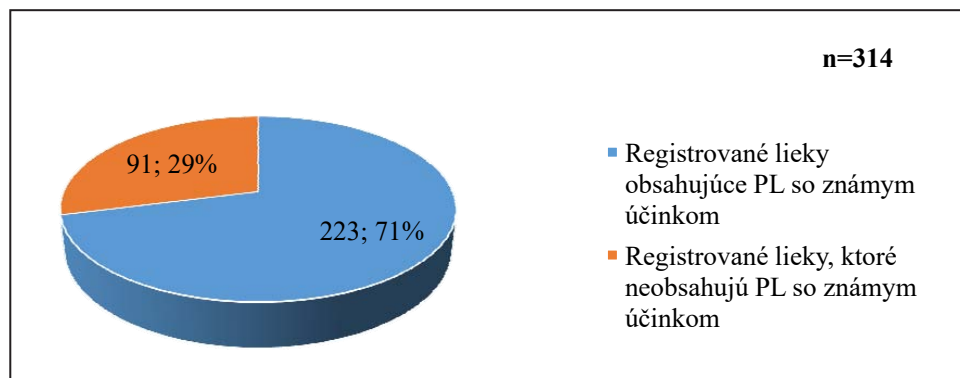
obsahovalo PL so známym účinkom podľa informácií uvádzaných v SPC/SmPC 223 registrovaných liekov (viď graf 2).

Registrované oftalmologické lieky obsahovali podľa SPC/SmPC nasledujúcich 14 PL so známym účinkom: benzalkóniumchlorid (BCH), cetalkóniumchlorid, cetrimid, cetylalkohol, dekahydrát tetraboritanu sodného (Bórax), fosforečnanové pufre/fosforečnany, kyselina boritá, laktóza, polykvaternium 1 (POLYQUAD), polyoxyetylénovaný hydrogenovaný ricínový olej, propylénglykol, sacharóza, sodík, vosk z ovčej vlny (Lanolín) (ŠÚKL, 2020).

Prehľad liečiv ATC skupiny Oftalmologiká (S01) obsiahnutých v registrovaných liekoch, u ktorých sme zaznamenali v SPC/SmPC uvedenú informáciu o prítomnosti PL so známym účinkom, prehľad ich LF a výskyt konkrétnych PL so známym účinkom uvádza tabuľka 1.

Príloha EK (EMA/CHMP/302620/2017) uvádza

Graf 2: Registrované lieky obsahujúce liečivá ATC skupiny Oftalmologiká (S01)



Zdroj: spracované podľa <https://www.sukl.sk/>

Tab. 1: Liečivá ATC skupiny Oftalmologiká (S01) obsiahnuté v registrovaných liekoch, ktoré obsahujú PL so známym účinkom

ATC skupina	Názov liečiva/liečiv	LF	PL so známym účinkom
S01AA12	tobramycín	int opo	BCH
S01AA13	kyselina fusidová	int opu	BCH
S01AA20	bacitracín + neomycín + hydrokortizón	ung oph	vosk z ovčej vlny (lanolín), cetylalkohol
S01AA24	kanamycín	int opo	KB, dekahydrát tetraboritanu sodného (bórax)
S01AA30	bacitracín + neomycín	ung oph	vosk z ovčej vlny (lanolín)
S01AE05	levofloxacín	int opo	BCH
S01BA01	dexametazón	int opo	BCH, fosforečnanové pufre
S01BA02	hydrokortizón	ung oph	vosk z ovčej vlny (lanolín)
S01BA14	loteprednol	int opu	BCH
S01BC03	diklofenak	int opo	BCH
S01BC10	nepafenak	int opu	BCH
S01BC11	brómfenak	int opo	BCH
S01CA01	dexametazón + levofloxacín	int opo	BCH, fosforečnany
	dexametazón + gentamicín	int opo	BCH, fosforečnany
	dexametazón + tobramycín	int opu	BCH
S01EA05	brimonidín	int opo	BCH
S01EB01	pilocarpín	int opo	BCH
S01EC01	acetazolamid	tbl	laktóza, sacharóza
S01EC03	dorzolamid	int opo	BCH
S01EC04	brinzolamid	int opu	BCH
S01EC54	brinzolamid + brimonidín	int opu	BCH
S01ED01	timolol	int opo	BCH
S01ED02	betaxolol	int opo	BCH
		int opu	BCH
S01ED05	karteolol	int plg	BCH

S01ED51	timolol + bimatoprost	int opo	BCH
S01ED51	timolol + brimonidín	int opo	BCH, fosforečnanové pufre
S01ED51	timolol + dorzolamid	int opo	BCH
S01ED51	timolol + latanoprost	int opo	BCH, dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného
S01ED51	timolol + latanoprost	int osd	hydroxystearoylmakrogol-glycerol (hydrogenovaný ricínový olej)
S01ED51	timolol + latanoprost	int opo	hydroxystearoylmakrogol-glycerol (hydrogenovaný ricínový olej)
S01ED51	timolol + bimatoprost	int opo	hydrogenfosforečnan disodný, heptahydrát (fosforečnany)
S01ED51	timolol + travoprost	int opo	hydroxystearoylmakrogol glycerol 40
S01ED51	timolol + dorzolamid	int opo	BCH
S01ED51	timolol + latanoprost	int opo	BCH, dihydrogenfosforečnan sodný, monohydrát, hydrogenfosforečnan sodný (celkový fosfát)
S01ED51	timolol + travoprost	int opo	BCH, makrogol-glycerol- hydroxystearátu 40
S01ED51	timolol + dorzolamid	int opo	BCH
S01ED51	timolol + latanoprost	int opo	BCH, fosforečnany
S01ED51	timolol + travoprost	int opo	polykvaternium-1 (POLYQUAD), propylénglykol, ricínoleoylmakro- gol-glycerol 40
S01ED51	timolol + brinzolamid	int opo	BCH
S01ED51	timolol + travoprost	int opo	polykvaternium-1 (POLYQUAD), propylénglykol, ricínoleoylmakro- gol-glycerol
S01ED51	timolol + latanoprost	int opo	BCH, hydrogenfosforečnan sodný, monohydrát dihydrogenfosforečnan sodný (fosforečnany)
S01EE01	latanoprost	int opo	BCH
S01EE01	latanoprost	int opo	hydroxystearoylmakrogol glycerolu 40 (hydrogenizovaný ricínový olej)
S01EE01	latanoprost	int osd	hydroxystearoylmakrogol- glycerolu 40 (polyoxyetylénovaný hydrogenovaný ricínový olej)
S01EE01	latanoprost	int opo	hydroxystearoylmakrogol-glycerolu 40, fosforečnany
S01EE01	latanoprost	int opo	BCH, fosforečnany
S01EE01	latanoprost	int opo	BCH, monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, bezdodý hydrogenfosforečnan sodný
S01EE03	bimatoprost	int opo	BCH

S01EE03	bimatoprost	int opo	BCH, heptahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (fosforečnan)
S01EE04	travoprost	int opo	BCH, hydroxystearoylmakrogol-glycerolu
S01EE04	travoprost	int opo	polykvaternium-1 (POLYQUAD), propylénglykol, ricínoleoylmakrogol-glycerol 40 (HCO-40)
S01EE04	travoprost	int opo	propylénglykol, polyoxyetylén-hydrogenovaný ricínový olej 40 (HCO-40)
S01EX05	netarsudil	int opo	BCH
S01FA06	tropikamid	int opo	BCH
S01FA56	tropikamid + fenylefrín + lidokaín	sol inj	sodík
S01FB01	fenylefrín	int opo	BCH
S01GA02	tetryzolín	int opo	BCH
S01GA02	tetryzolín	int opo	fosforečnany
S01GA52	tetryzolín + antazolín	int opo	BCH
S01GX01	kyselina kromoglyková	int opo	BCH
S01GX02	levokabastín	int opu	BCH
S01GX06	emedastín	int opo	BCH
S01GX07	azelastín	int opo	BCH
S01GX08	ketotifén	int opo	BCH
S01GX09	olopatadín	int opo	BCH, fosforečnanové pufre
S01GX09	olopatadín	int opo	hydrogenfosforečnan sodný, dodekahydrát (fosforečnany)
S01GX09	olopatadín	int opo	BCH
S01GX10	epinastín	int opo	BCH
S01XA01	guajazulén	ung oph	vosk z ovčej vlny (lanolín)
S01XA12	dexpantenol	gel oph	cetrimid
S01XA18	cyklosporín	int ope	cetalkóniumchlorid
	karbomér	gel oph	cetrimid
S01XA20	karbomér	gel oph	BCH
	dexpantenol + polyvinylalkohol	int opo	BCH, fosforečnany
	povidon	int opo	BCH
S01XA21	merkaptamín	int opo	BCH

BCH – benzalkóniumchlorid, **con sio** – koncentrát na roztok na vnútroočný výplach, **gel oph** – očný gél, **imp ivt** – intravitreálny implantát s aplikátorom, **int ope** – očná emulzná instilácia, **int oph** – očná roztoková instilácia, jednodávkový obal, **int opo** – očná roztoková instilácia, **int opu** – očná suspenzná instilácia, **int osd** – očná roztoková instilácia v jednodávkovom obale, **int plg** – očná instilácia s predĺženým uvoľňovaním, **KB** – kyselina boritá, **LF** – lieková forma, **plv ifo** – prášok na infúzny roztok, **plv ino** – prášok na injekčný roztok, **sol inj** – injekčný roztok, **tbl** – tablety, **tra** – transplantát, **ung oph** – očná masť

Zdroj: spracované podľa https://www.whocc.no/atc_ddd_index/, <https://www.sukl.sk/>, <https://www.ema.europa.eu/en/>, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/annex-european-commission-guideline-excipients-labelling-package-leaflet-medicinal-products-human_sk.pdf.

Tab. 2: PL so známym účinkom v registrovaných oftalmologických liekoch, príslušné LF, možné cesty podania liekov podľa prílohy pokynov EK (EMA/CHMP/302620/2017)

PL so známym účinkom	LF	Cesta podania (EMA/CHMP/302620/2017)
BCH	int opo, int opu, int plg, gel oph	všetky cesty podania, podanie do oka
cetylalkohol	ung oph	topická
dekahydrát tetraboritanu sodného (Bórax)	int opo	všetky cesty podania
fosforečnanové pufre	int opo	podanie do oka
polyoxyetylénovaný hydrogenovaný ricínový olej	int osd, int opo	parenterálna, perorálna, topická
KB	int opo	všetky cesty podania
laktóza	tbl	perorálna
propylénglykol	int opo	všetky cesty podania , perorálna, parenterálna, dermálna
sacharóza	tbl	perorálna
sodík	sol inj	perorálna, parenterálna
vosk z ovčej vlny (lanolín)	ung oph	topická
cetalkóniumchlorid	int ope	neuvedené
cetrimid	gel oph	neuvedené
polykvaternium-1 (POLYQUAD)	int opo	neuvedené

BCH – benzalkóniumchlorid, **gel oph** – očný gél, **int ope** – očná emulzná instilácia, **int opo** – očná roztoková instilácia, **int opu** – očná suspenzná instilácia, **int plg** – očná instilácia s predĺženým uvoľňovaním, **int osd** – očná roztoková instilácia v jednodávkovom obale, **KB** – kyselina boritá, **sol inj** – injekčný roztok, **tbl** – tablety, **ung oph** – očná masť

Zdroj: spracované podľa https://www.whocc.no/atc_ddd_index/, <https://www.sukl.sk/>, <https://www.ema.europa.eu/en>, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/annex-european-commission-guideline-excipients-labelling-package-leaflet-medicinal-products-human_sk.pdf

aj cesty podania liekov, na ktoré sa vzťahujú informácie o PL so známym účinkom, uvedené v tomto doporučení. Tabuľka 2 zahŕňa 14 PL so známym účinkom v registrovaných oftalmologických liekoch na Slovensku, LF týchto liekov a cesty podania PL so známym účinkom uvedené v Prílohe EK, na ktoré sa vzťahujú príslušné informácie v nej uvedené. Medzi PL so známym účinkom, ktoré sa nenachádzajú v Prílohe EK, ale sú uvedené v SPC/SmPC sledovanej skupiny registrovaných liekov patria: cetalkóniumchlorid, cetrimid a polykvaternium-1 (POLYQUAD).

Informácie pre PIL (vybrané PL so známym účinkom)

V tejto časti sme sa zamerali na PL so známym účinkom, ktoré majú v Prílohe EK uvedené informácie určené pre cestu „**podania do oka**“ a zároveň sú súčasťou registrovaných oftalmologických liekov. Medzi takéto PL patria: benzalkóniumchlorid a fosforečnanové pufre.

Lieky s obsahom **benzalkóniumchloridu** aplikované „všetkými cestami podania“ a lieky s jeho obsahom určené na „podanie do oka“ majú podľa pokynov EK v PIL obsahovať údaje uvedené v tabuľke 3.

Tab. 3: PL so známym účinkom: benzalkóniumchlorid

Cesta podania/ Hranica	Informácie pre PIL	Vysvetlenie
Všetky/Nula	Tento liek obsahuje x mg BCH v každom/každej jednotke dávkovania resp. jednotke objemu, čo zodpovedá x mg/hmotnosť, resp. objem.	
Podanie do oka/Nula	Mäkké kontaktné šošovky môžu reagovať s BCH a môže sa zmeniť farba kontaktných šošoviek. Pred použitím tohto lieku si musíte vybrať kontaktné šošovky a naspäť ich vložte po 15 minútach. BCH môže tiež spôsobiť podráždenie oka, hlavne ak máte suché oči alebo poruchy rohovky (to je priehľadná vrstva v prednej časti oka). Ak máte nezvyčajné pocity v oku, bodanie (štipanie) alebo bolesť v oku po užití/použití tohto lieku, oznámte to svojmu lekárovi.	Dostupné údaje sú obmedzené a nevyplývajú z nich žiaden rozdiel v profile nežiaducich udalostí u detí v porovnaní s dospelými. Avšak vo všeobecnosti detské oči citlivejšie reagujú na určité podnety ako oči dospelých. Podráždenie môže ovplyvňovať dodržiavanie liečby u detí. Bolo hlásené, že BCH spôsobuje podráždenie očí, príznaky suchých očí a môže ovplyvniť slzný film a povrch rohovky. Liek sa musí používať s opatrnosťou u pacientov so suchými očami a u pacientov, ktorí môžu mať poškodenú rohovku. V prípade dlhodobého použitia musia byť pacienti monitorovaní.

BCH – benzalkóniumchlorid

Zdroj: spracované podľa https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/annex-european-commission-guideline-excipients-labelling-package-leaflet-medicinal-products-human_sk.pdf

Lieky obsahujúce **fosforečnanové pufre** určené na „podanie do oka“ majú podľa pokynov EK v PIL obsahovať údaje uvedené v tabuľke 4.

ZÁVER

Zrak je často považovaný za najdôležitejší zmysel človeka. Oko zároveň predstavuje jedinečný terapeutický cieľ v ľudskom tele (Awwad, 2017). ATC skupina Oftalmologiká (S01) zahŕňa lieky, ktoré sa líšia spôsobom výdaja, niektoré sú určené na systémové, väčšina však na lokálne podanie. Tieto lieky môžu obsahovať pomocné látky so známym účinkom. Príkladom je benzalkóniumchlorid, ktorý môže spôsobiť podráždenie oka, ale aj reagovať s mäkkými kontaktnými šošovkami, alebo pomocné

látky fosforečnany môžu vo veľmi zriedkavých prípadoch spôsobiť zakalené škrvny na rohovke kvôli hromadeniu vápnika počas liečby. Farmaceuti by mali v rámci poskytovania lekárenskej starostlivosti, prípadne v rámci konzultačnej a poradenskej činnosti v lekárni, pacientov informovať o prítomnosti PL so známym účinkom vo vydávaných liekoch, o možných účinkoch PL so známym účinkom, a to aj kvôli riziku ich súčasného príjmu z liekov a potravín, čo môže viesť k prejavu či kumulovaniu ich účinkov. Na základe tejto skutočnosti je potrebné, aby sa farmaceuti a zdravotnícki pracovníci, ktorí poskytujú relevantné informácie o liekoch pacientom, vzdelávali aj v oblasti týkajúcej sa PL so známym účinkom.

Tab. 4: PL so známym účinkom: fosforečnanové pufre

Cesta podania/ Hranica	Informácie pre PIL	Vysvetlenie
Podanie do oka/Nula	Tento liek obsahuje x mg fosforečnanov v každom/každej jednotke dávkovania/ jednotke objemu, čo zodpovedá x mg/hmotnosť, resp. objem. Ak máte závažné poškodenie priehľadnej vrstvy prednej časti oka (rohovky), fosforečnany môžu vo veľmi zriedkavých prípadoch spôsobiť zakalené škvrny na rohovke kvôli hromadeniu vápnika počas liečby.	Zodpovedajúce vyjadrenie v SPC: “V súvislosti s používaním očných kvapiek obsahujúcich fosforečnany boli veľmi zriedkavo u niektorých pacientov so závažne poškodenými rohovkami hlásené prípady kalcifikácie rohovky.”

SPC – Súhrn charakteristických vlastností lieku

Zdroj: spracované podľa https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/annex-european-commission-guideline-excipients-labelling-package-leaflet-medicinal-products-human_sk.pdf

ZOZNAM LITERATÚRY

Awwad, S., Ahmed, A. H. A. M., Sharma, G., Heng, J. S., Khaw, P. T., Brocchini, S., Lockwood, A.: Principles of pharmacology in the eye. *British Journal of Pharmacology*, 2017, 174, 4205-4223. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5715579/>. Accessed March 9, 2021.

European Medicines Agency. Annex to the European Commission guideline on ‘Excipients in the labelling and package leaflet of medicinal products for human use’ (SANTE-2017-11668) Excipients and information for the package leaflet. (EMA/CHMP/302620/2017 Rev. 1*). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/annex-european-commission-guideline-excipients-labelling-package-leaflet-medicinal-products-human_en.pdf. Updated November 22, 2019. Accessed January 24, 2021.

Kertys, M., Kertysová, A.: *Základy preskripcie liekov a farmaceutickej technológie pre študentov medicíny* [Basics of drug prescription and pharmaceutical technology for students of medicine]. Ústav farmakológie. Martin: Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova Lekárska fakulta, 2019. 101 s.

Oleárová, A.: Správna aplikácia očných kvapiek – úloha farmaceuta v edukácii pacienta [Properly application of eye drops – the role of the pharmacist in patient education]. *Praktické lekárnictvo* 2018, 8 (1), 32 – 34. <https://www.solen.sk/casopisy/prakticke-lekarnictvo/spravna-aplikacia-ocnych-kvapiek-uloha-farmaceuta-v-edukacii-pacienta>. Accessed January 20, 2021.

ŠÚKL. *Vyhľadávanie liekov, zdravotníckych pomôcok a zmien v liekovej databáze* [Search for drugs, medical devices and changes in drug database]. Bratislava. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/databazy-a-servis/vyhladavanie-liekov-zdravotnickych-pomocok-a-zmien-v-liekovej-databaze?page_id=235. [cit. 2021-01-24].

Tomčíková, D. a kol.: *Vybrané kapitoly z oftalmológie* [The selected chapters from ophthalmology]. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2020. 95 s. https://www.fmed.uniba.sk/fileadmin/lf/sluzby/akademicka_kniznica/PDF/Elektronicke_knihy_LF_UK/Vybrane_kapitoly_z_oftalmologie.pdf. [cit. 2021-01-20].

WHO Collaborating centre for drug statistics methodology: *ATC/DDD Index 2020*. Oslo. https://www.whocc.no/atc_ddd_index/. Updated December 17, 2020. Accessed January 20, 2021.



SPOTREBA OPIOIDNÝCH VERSUS NEOPIOIDNÝCH ANALGETÍK U PACIENTOV THE EXPENDITURE OF OPIOID VERSUS NON-OPIOID ANALGESICS IN PATIENTS

Chovanová, Simona; Kolesárová, Mária

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

maria.kolesarova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Analgetiká zohrávajú dôležitú úlohu v terapii bolesti. Štúdia analyzuje a porovnáva spotrebu opioidných versus neopioidných analgetík u hospitalizovaných pacientov v troch nemocniciach – Spišská Nová Ves (SN), Humenné (HE) a Svidník (SK). Analyzovanú vzorku spolu tvorilo 112 868 hospitalizovaných pacientov na rôzne špecializovaných oddeleniach troch nemocníc, ktorým bola za obdobie 07. – 12. 2019 predpísaná analgetická liečba. Z výsledkov vyplýva, že vo všetkých troch nemocniciach boli analgetiká indikované pacientom s prevahou ženského pohlavia vo vekovej kategórii 61 – 70 rokov. Vo všetkých troch nemocniciach boli indikované prevažne neopioidné analgetiká v priemere 81 %. Opioidné analgetiká boli indikované prevažne v perorálnej liekovej forme v priemere 61,4 %

hlavne v SN a HE, kým neopioidné analgetiká boli využívané vo všetkých troch nemocniciach v skôr parenterálnej liekovej forme v priemere 56,76 %. V prípade opioidných analgetík bol vo všetkých troch nemocniciach najčastejšie využívaný tramadol, či už v parenterálnej alebo perorálnej liekovej forme, kde bol hlavne indikovaný vo fixnej kombinácii s paracetamolom. Z neopioidných analgetík bol najčastejšie využívaný metamizol, a to vo všetkých troch nemocniciach. Opioidné aj neopioidné analgetiká boli najčastejšie využívané na oddelení chirurgie a oddelení neurológie v terapii diagnóz Poškodenie *plexus lumbosacralis* a Poškodenie driekových a iných medzistavcových platničiek s radikulopatiou. Z celkového pohľadu bola spotreba opioidných a neopioidných analgetík vo všetkých troch nemocniciach podobná. Rozdiely v spotrebe konkrétnych analgetík v

jednotlivých nemocniciach mohli byť ovplyvnené nákladmi na liečbu, liečebnými postupmi, ale aj počtom pacientov a lôžok na jednotlivých oddeleniach.

Kľúčové slová: analgézia; bolesť; neopioidné analgetiká; opioidné analgetiká

ABSTRACT

Analgesics play an important role in therapy of pain. The study analyzes and compares the consumption of opioid versus non-opioid analgesics in hospitalized patients in three hospitals – Spišská Nová Ves (SN), Humenné (HE) and Svidník (SK). The analyzed sample consisted of 112.868 hospitalized patients in various specialized wards of three hospitals, who were prescribed analgesic treatment for the period of 07. – 12. 2019. The results showed that in all three hospitals, analgesics were indicated in patients with a predominance of female sex in the age sample of 61 – 70 years. Predominantly non-opioid analgesics were indicated in all three hospitals (approximately 81 %). Opioid analgesics were indicated predominantly in oral drug form (approximately 61.4 %), mainly in SN and HE, while non-opioid analgesics were indicated in all three hospitals in the previous parenteral dosage form (approx. 56.76 %). In the case of opioid analgesics, tramadol was most often used in all three hospitals, either in parenteral or peroral drug form, where it was mainly indicated in fixed combination with paracetamol. Of the non-opioid analgesics, metamizole was the most frequently used in all three hospitals. Both opioid and non-opioid analgesics have been most commonly used by the Department of Surgery and Department of Neurology in the treatment of diagnosis such as Damage to the *lumbosacral plexus* and Damage to the lumbar and other intervertebral discs with radiculopathy. From the overall point of view, the consumption of opioid and non-opioid analgesics

in all three hospitals was similar. Differences in the consumption of specific analgesics in individual hospitals could be influenced by the cost of treatment, treatment procedures, but also by the number of patients and beds in the individual wards.

Key words: analgesion; non-opioid analgesics; opioid analgesics; pain

ÚVOD

Analgetiká sa v ústavných zdravotníckych zariadeniach využívajú na tlmenie bolesti u pacientov po úrazoch alebo operáciách, pri silných bolestivých pôrodných kontrakciách, na kombinovanú a stupňovanú anestéziu. Nezastupiteľnú úlohu zohrávajú v zmierňovaní bolesti aj u pacientov s onkologickými ochoreniami. Na trhu dnes existuje bohatá paleta analgetík vo variabilných aplikačných formách. Ako smernica v oblasti farmakoterapie analgetikami slúžia záväzné odporúčania WHO (angl. World Health Organization) vo forme tzv. „analgetického rebríka“ (Masár a kol., 2013). Pri akútnej bolesti sa po tomto rebríku postupuje zostupne „**step down**“. Pri silnej bolesti sa podáva silnejšie analgetikum s rýchlejšim nástupom účinku. Pri chronickej bolesti sa po spomínanom rebríku vystupuje vzostupným smerom „**step up**“ a berie sa do úvahy dlhodobé podávanie analgetika (Hakl, 2013).

Liečivá používané v liečbe bolesti delíme na analgetiká opioidné (slabé/silné) a neopioidné (nesteroidné antiflogistiká – NSAIDs, analgetiká-antipyretiká) (Fraňová a Šutovská, 2014). V niektorých prípadoch je nutné pacientom k základnej medikácii pridať adjuvančné lieky, tzv. koanalgetiká, napr. antikonvulzíva, antidepresíva alebo pomocné lieky, ktoré modulujú nežiaduce účinky analgetík, napr. laxatíva (Martuliak, 2019).

Hlavným cieľom štúdie bolo porovnať a analyzovať spotrebu opioidných a neopioidných analgetík u hospitalizovaných pacientov v troch

Tab 1: Počet preskripcií analgetík v nemocnici SN, HE, SK za sledované obdobie

nemocnica SPIŠSKÁ MONÁ VES						
analgetiká	počet pacientov			percento (%)		
OPOIDNÉ analgetiká	3 920	♀	2 285	8,17 %	♀	4,76 %
		♂	1 635		♂	3,41 %
NEOPOIDNÉ analgetiká	44 082	♀	25 766	91,83 %	♀	53,68 %
		♂	18 316		♂	38,16 %
spolu	48 002			100 %		
nemocnica HUMENNÉ						
analgetiká	počet pacientov			percento (%)		
OPOIDNÉ analgetiká	2 903	♀	1 434	7,40 %	♀	3,65 %
		♂	1 469		♂	3,74 %
NEOPOIDNÉ analgetiká	36 344	♀	20 037	92,60 %	♀	51,05 %
		♂	16 307		♂	41,55 %
spolu	39 247			100 %		
nemocnica SVIDNÍK						
analgetiká	počet pacientov			percento (%)		
OPOIDNÉ analgetiká	1 457	♀	748	5,69 %	♀	2,92 %
		♂	709		♂	2,77 %
NEOPOIDNÉ analgetiká	24 162	♀	13 591	94,31 %	♀	53,05 %
		♂	10 571		♂	41,26 %
spolu	25 619			100 %		

nemocniciach, a to v Spišskej Novej Vsi (SN), Humennom (HE) a Svidníku (SK).

MATERIÁL A METÓDY

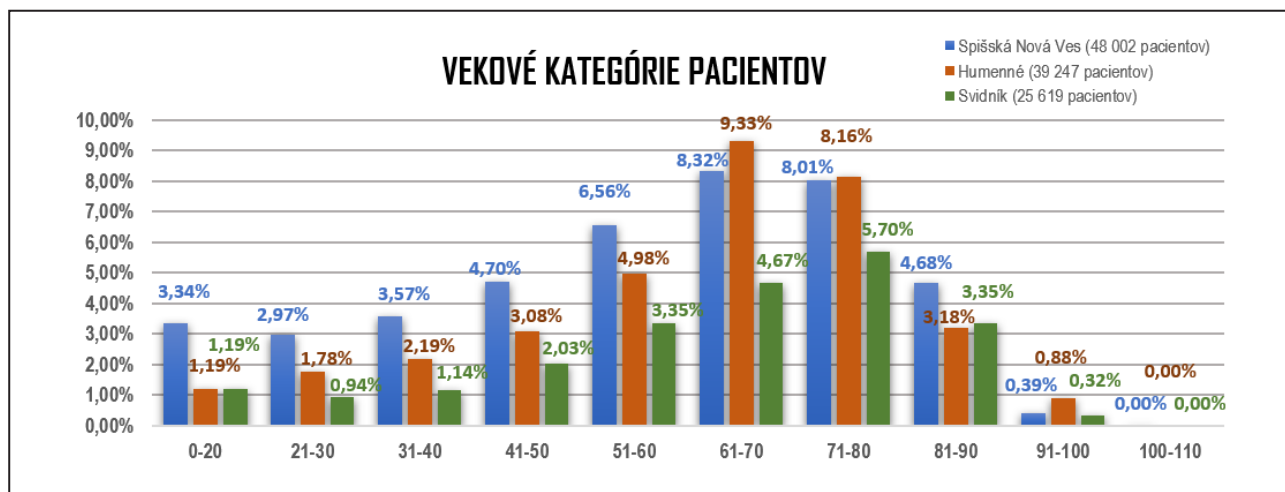
Prieskum spotreby opioidných versus neopoidných analgetík bol vykonávaný formou podrobnej analýzy dát poskytnutých vybranými ústavnými zdravotníckymi zariadeniami, a to nemocnicami v Spišskej Novej Vsi (SN), v Humennom (HE) a vo Svidníku (SK) v období 07. – 12. 2019. Získané dáta pochádzali z nemocničného informačného systému spoločnosti Prosoft spol, s.r.o. s názvom PROMIS. Dáta obsahovali zoznam preskripcií opioidných a neopoidných analgetík u pacientov hospitalizovaných na rôzne špecializovaných oddeleniach v daných nemocniciach. Výsledky analýzy boli spracované formou tabuliek a grafov prostredníctvom programu

Microsoft. Spotreba analgetík bola porovnávaná na základe cesty podania (perorálne vs. parenterálne vs. transdermálne analgetiká). Spotreba jednotlivých liečiv je uvádzaná v merných jednotkách ako tbl; amp; ks. Vzhľadom k veľkému množstvu výsledkov uvádzame len najvyššiu spotrebu konkrétneho analgetika v rámci jednotlivých oddelení všetkých troch nemocníc navzájom a tiež najčastejšiu diagnózu pacientov, pri ktorej bolo indikované konkrétne analgetikum. Diagnózy sú uvádzané podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb, revízia 10 (MKCH10) (ICD – 10 Version: 2016).

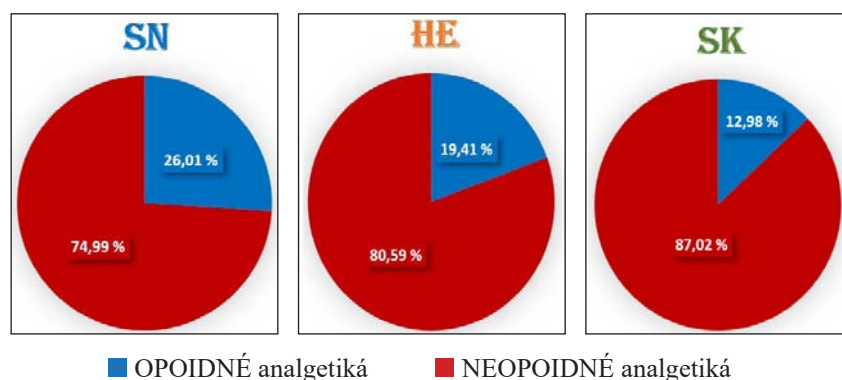
VÝSLEDKY

Za sledované obdobie (II. polrok 2019) boli vo všetkých troch ústavných zdravotníckych zariadeniach spolu predpisované analgetiká **112**

Graf 1: Vekové kategórie hospitalizovaných pacientov, ktorým boli predpísané analgetiká



Graf 2: Porovnanie spotreby opioidných versus neopioidných analgetík v nemocnici SN, HE, SK



868 pacientom. Najviac pacientov s poskytnutou analgetickou liečbou vykazovala nemocnica SN (48 002 pacientov). Vo všetkých troch nemocniciach boli v priemere predpisované neopioidné analgetiká v **92,91 %** a opioidné analgetiká v **7,09 %** prípadoch (viď tab. 1).

Pohlavie a vek pacientov

Z výsledkov vyplýva, že opioidné aj neopioidné analgetiká boli predpisované vo vyššej miere hospitalizovaným ženám vo vekovej kategórii 61 – 70 rokov a 71 – 80 rokov (viď tab. 1; graf 1).

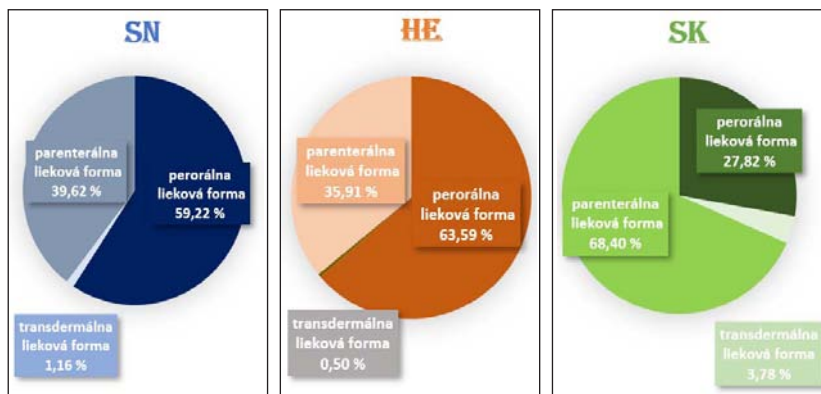
Spotreba opioidných a neopioidných analgetík

Spotreba neopioidných analgetík vo všetkých troch nemocniciach predstavovala v priemere 81 %. Nemocnica SN spotrebovala 26,01 % opioidných analgetík. Nemocnica HE spotrebovala 19,41 % opioidných analgetík. Najmenšia z analyzovaných nemocníc, nemocnica SK, spotrebovala len 12,98 % opioidných analgetík za sledované obdobie (viď graf 2).

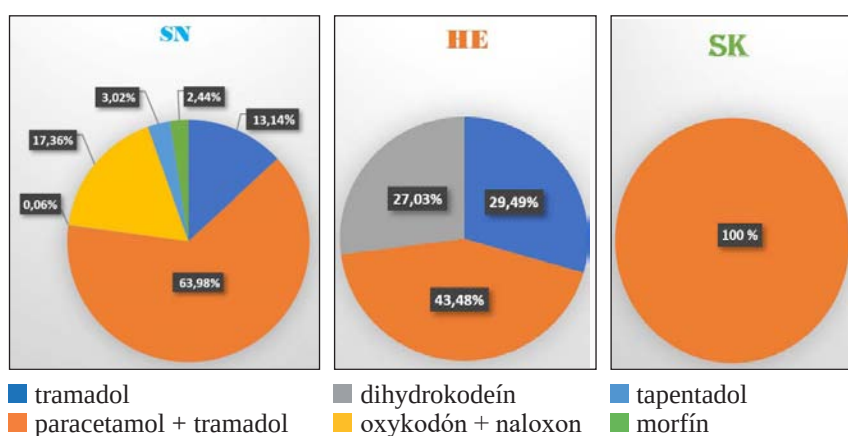
Spotreba opioidných analgetík

Spotrebu opioidných analgetík z hľadiska ich cesty podania v troch analyzovaných nemocniciach (SN,

Graf 3: Spotreba opioidných analgetík z hľadiska cesty podania v nemocniciach SN, HE, SK



Graf 4: Porovnanie spotreby perorálnych opioidných analgetík v nemocniciach SN, HE, SK



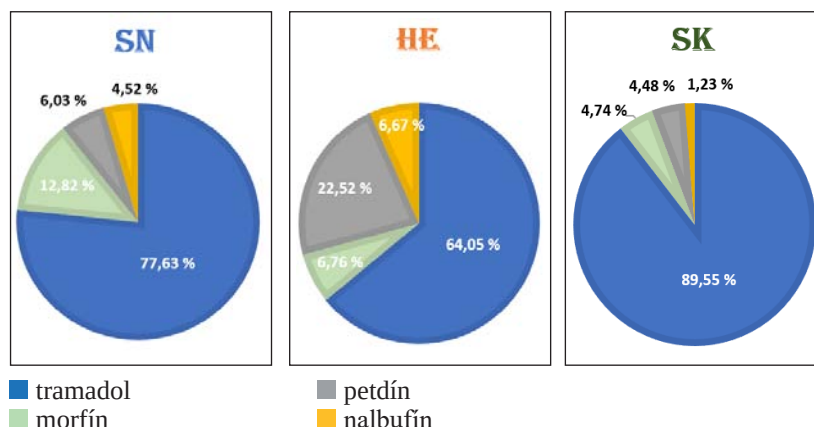
HE, SK) znázorňuje graf 3. Z výsledkov vyplýva, že opioidné analgetiká boli v nemocnici v SN a HE používané hlavne v perorálnej liekovej forme v priemere 61,4 %; kým parenterálna lieková forma opioidných analgetík bola indikovaná v priemere 37,77 % a v malom množstve bola používaná aj transdermálna lieková forma v priemere 0,83 %. Vo svidníckej nemocnici prevažovala parenterálna lieková forma (68,40 %) nad perorálnou liekovou formou (27,82 %) a transdermálnou liekovou formou (3,78 %).

Perorálne liekové formy opioidných analgetík

Spotreba perorálnych opioidných analgetík bola najrozmanitejšia v nemocnici SN (viď graf 4).

Viac ako trojnásobnú spotrebu mala fixná kombinácia **paracetamol + tramadol** oproti p. o. tramadolu vo forme filmom obalených tabliet. Z výsledkov vyplýva, že nemocnica SN vykazovala najväčšiu spotrebu tabliet kombinácie **paracetamol + tramadol**, a to 5 262,5 tabliet, z toho 56,86 % bolo indikovaných na neurologickom oddelení. Najčastejšie uvádzaná diagnóza bola **G54.1 Poškodenie plexus lumbosacralis**. V nemocnici HE sa spotrebovalo 2 893 tabliet fixnej kombinácie **paracetamol + tramadol** s najväčšou spotrebou na oddelení neurológie (63,83 %) pri najčastejšej diagnóze **M51.1 Poškodenie driekových a iných medzistavcových platničiek s radikulopatiou**. Zaujímavosťou je, že v nemocnici SK sa ako jediné

Graf 5: Porovnanie spotreby parenterálnych analgetík v nemocniciach SN, HE, SK



perorálne opioidné analgetikum indikovala fixná kombinácia **tramadol + paracetamol**, najčastejšie na doliečovacom a geriatrickom oddelení (77,06 %) pri najčastejšej diagnóze **N39.0 Infekcia močovej sústavy, miesto bližšie neurčené**.

Druhým najčastejšie indikovaným *p. o.* opioidným liečivom bol **tramadol**, ktorý bol používaný v nemocnici SN a HE (viď graf 4). Najvyššia spotreba až 1 962 kapsúl 50 mg tramadolu bola v nemocnici HE, kde 42,61 % týchto kapsúl bolo spotrebovaných na chirurgickom oddelení. Najčastejšou diagnózou s indikovaným tramadolom bola **M17.1 Iná primárna artróza kolenného kĺbu**. Podobne najčastejšia spotreba tramadolu v nemocnici SN bola na oddelení chirurgie, avšak hlavne pri diagnózach **E11.74 Diabetes mellitus 2. typu: s mnohopočetnými komplikáciami, so syndrómom diabetickej nohy, kompenzovaný** a **S32.4 Zlomenina acetabula**.

Najväčšia spotreba **dihydrokodeínu** bola zaznamenaná hlavne v nemocnici HE, kde bolo spotrebovaných 1 798 tabliet, prevažne na neurologickom oddelení (95,50 %) najčastejšie pri diagnóze **M51.1 Poškodenie driekových a iných medzistavcových platničiek s radikulopatiou**.

Perorálna lieková forma kombinácie liečiv **oxykodón + naloxón**, ďalej **tapentadol** a **morfín** bola za analyzované obdobie terapeuticky využíva-

ná len u pacientov hospitalizovaných v nemocnici SN. Celková spotreba fixnej kombinácie **oxykodón + naloxón** bola 1 428 tabliet, hlavne na oddelení dlhodobochorých (42,51 %). V nemocnici SN bolo spotrebovaných 248 tabliet s obsahom **tapentadolu**, ktorý bol indikovaný iba na neurologickom oddelení (100 %). Pri oboch liečivách bola najčastejšie uvádzaná diagnóza **G54.1 Poškodenie plexus lumbosacralis**.

V nemocnici SN bolo spotrebovaných aj 154 tabliet **morfínu**, prevažne na internom oddelení (76,62 %). Najčastejšie uvádzaná diagnóza: **A41.0 Sepsa zapríčinená *Staphylococcus aureus***.

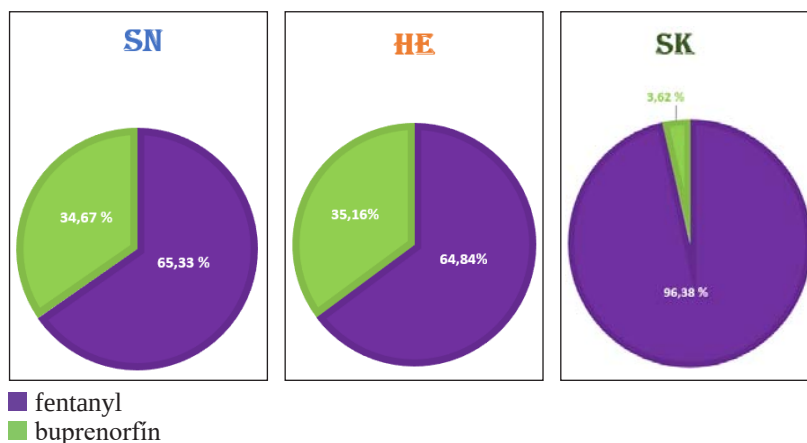
Parenterálne liekové formy opioidných analgetík

Graf 5 znázorňuje percentuálne zastúpenie spotreby jednotlivých parenterálnych analgetík za sledované obdobie.

Spotreba *sol inj* tramadolu

Najvyššia spotreba **tramadolových ampúl** bola v nemocnici SN (4 217,85 ampúl) s najvyššou spotrebou na chirurgickom oddelení (73,59 %). V nemocnici HE sa spotrebovalo 2 406,5 ampúl tramadolu, hlavne na oddelení chirurgie (27,30 %). 2 058,5 ampúl tramadolu bolo indikovaných v nemocnici SK, hlavne na oddelení neurológie (53,85

Graf 6: Porovnanie spotreby transdermálnych náplastí s obsahom fentanylu a buprenorfinu



%). Najčastejšie uvádzané diagnózy, pri ktorých bol použitý tramadol, boli **S22.44 Sériová zlomenina rebier s postihnutím štyroch a viacerých rebier**, **M51.1 Poškodenie driekových a iných medzistavcových platničiek s radikulopatiou**.

Spotreba sol inj morfinu

Spotreba injekčných 705,5 ampúl morfinu bola najvyššia opäť v nemocnici SN (12,82 %), z toho bolo 45,92 % spotrebovaných hlavne na oddelení chirurgie, prevažne pri diagnóze **C34.9 Zhubný nádor priedušky alebo pľúc, bližšie neurčený**. 254 ampúl morfinu spotrebovala nemocnica HE prevažne na oddelení anesteziológie a multiodborovej a intenzívnej starostlivosti (90,94 %) pri diagnóze **Z48.8 Iná bližšie určená následná chirurgická starostlivosť**. V nemocnici SK sa spotrebovalo 109 ampúl morfinu, hlavne na internom oddelení (39,45 %) pri diagnóze **N39.0 Infekcia močovej sústavy, miesto bližšie neurčené** a **O82.0 Pôrod jedného plodu elektívnym (plánovaným) cisárskym rezom**.

Spotreba sol inj petidínu

Parenterálna spotreba 846 ampúl petidínu bola najväčšia v nemocnici HE prevažne v ortopedickej ambulancii (67,38 %) pri diagnóze **M17.1 Iná primárna artróza kolenného kĺbu**. 332 ampúl

sa spotrebovalo v nemocnici SN hlavne na gynekologicko-pôrodníckom oddelení (87,95 %) pri diagnóze **O82.1 Pôrod jedného plodu naliehavým cisárskym rezom**. V nemocnici SK sa použilo 103 ampúl petidínu hlavne na chirurgickom oddelení (78,64 %) pri diagnóze **K80.20 Kameň žlčníka bez cholecystitídy, bez prejavov obštrukcie žľových ciest**.

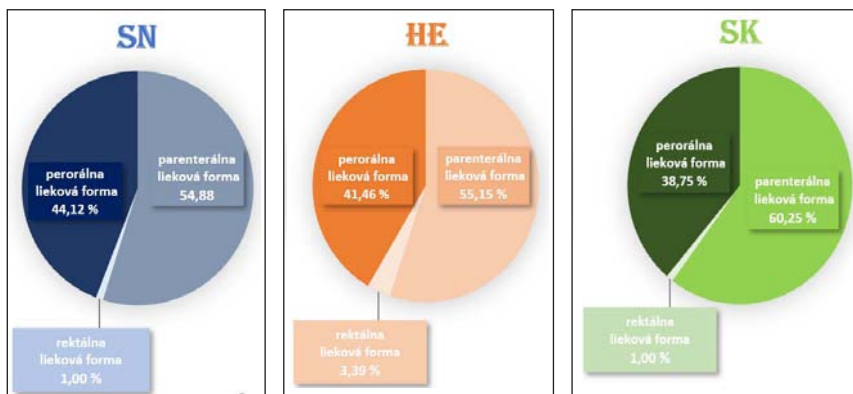
Spotreba sol inj nalbufínu

V nemocnici HE bola zaznamenaná najvyššia spotreba nalbufínu v množstve 250,52 ampúl prevažne na oddelení anesteziológie a multiodborovej intenzívnej starostlivosti (64,87 %). V nemocnici SN bolo spotrebovaných 248,5 ampúl hlavne na chirurgickom oddelení (57,59 %), kým v nemocnici SK bol nalbufín spotrebovaný v množstve 28,25 ampúl iba na oddelení anesteziológie a multiodborovej intenzívnej starostlivosti. Nalbufín bol najčastejšie indikovaný pri **O80.0 Spontánny pôrod jedného plodu záhlavím** (SN), **35.8 Akútna apendicída, bližšie neurčená** (HE) a **R57.2 Septický šok** (SK).

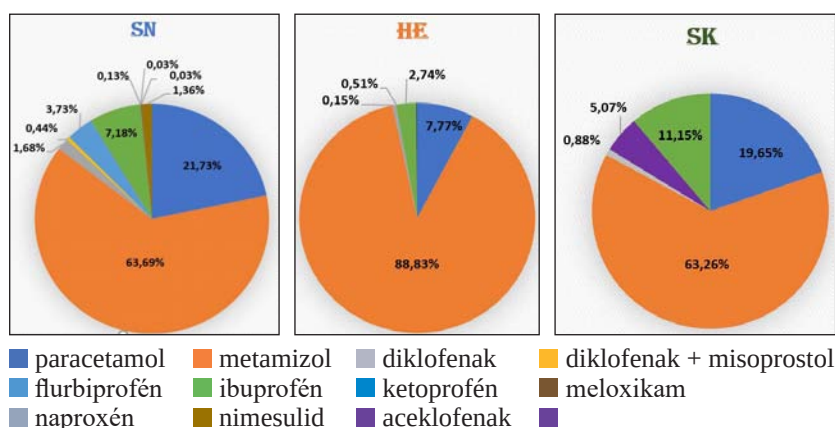
Transdermálne liekové formy opioidných analgetík

Vo forme transdermálnych náplastí (*tdm emp*) sú

Graf 7: Spotreba perorálnych versus parenterálnych neopioidných analgetík



Graf 8: Porovnanie spotreby perorálnych neopioidných analgetík v nemocniciach SN, HE, SK



dostupné liečivá: **fentanyl** a **buprenorfín** (viď graf 6).

Spotreba fentanylových *tdm emp*

Z transdermálnych náplastí boli častejšie používané fentanylové vo všetkých troch nemocniciach (viď graf 6). Najviac transdermálnych **fentanylových náplastí** bolo spotrebovaných v nemocnici SK (96,38 %) v množstve 133 ks, prevažne na internom oddelení (36,85 %) hlavne pri diagnóze **M51.1 Poškodenie driekových a iných medzistavcových platničiek s radikulopatiou**.

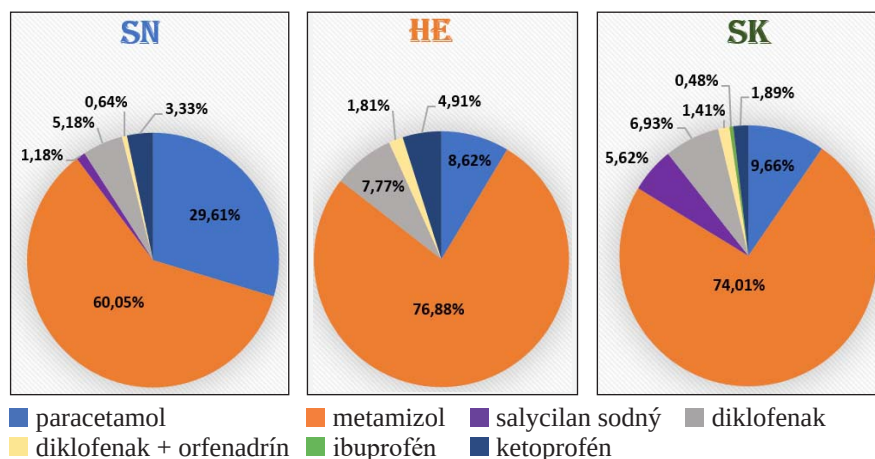
V nemocnici SN bolo spotrebovaných 105,5 ks (65,33 %) fentanylových náplastí, z toho 46,45 % na oddelení dlhodobu chorých prevažne pri diagnóze

C64 Zhubný nádor obličky okrem obličkovej panvičky. Kým v nemocnici HE sa spotrebovalo 29,5 ks (64,84 %) fentanylových náplastí iba na internom oddelení, najviac pri diagnóze **C01 Zhubný nádor koreňa jazyka**. Z výsledkov analýzy tiež vyplýva, že v praxi sa fentanylové náplasti strihajú aj napriek upozorneniu uvedenom v SPC.

Spotreba buprenorfínových *tdm emp*

V prípade spotreby **buprenorfínových náplastí** bolo použitých 56 ks v nemocnici SN, hlavne na oddelení dlhodobu chorých (58,93 %). V nemocnici HE bolo spotrebovaných 16 ks buprenorfínových *tdm emp* prevažne na internom oddelení (68,75 %).

Graf 9: Porovnanie spotreby parenterálnych neopioidných analgetík v nemocniciach SN, HE, SK



Iba 5 ks buprenorfinových *tdm emp* bolo použitých interným oddelením nemocnice SK. Medzi najčastejšie diagnózy patrili **C34.8 Zhubný nádor priedušky alebo pľúc presahujúci viaceré oblasti** (HE), **M54.6 Bolesť v oblasti hrudníkovej chrbtice** (SN), **N39.0 Infekcia močovej sústavy, miesto bližšie neurčené** (SK).

Spotreba neopioidných analgetík

Graf 7 znázorňuje porovnanie spotreby jednotlivých neopioidných analgetík z hľadiska ich cesty podania.

Z výsledkov vyplýva, že vo všetkých troch nemocniciach bola spotreba parenterálnych neopioidných analgetík vyššia a pohybovala sa v priemere na úrovni 56,76 %; kým spotreba perorálnych liekových foriem neopioidných analgetík bola v priemere na úrovni 41,44 %. V priemere 1,79 % sa používala aj rektálna forma neopioidných analgetík vo všetkých troch nemocniciach.

Perorálne liekové formy neopioidných analgetík

Percentuálne zastúpenie spotreby jednotlivých perorálnych neopioidných analgetík znázorňuje graf 8. Spotreba perorálnych neopioidných analgetík bola najrozmanitejšia opäť v nemocnici SN. Najväčšiu spotrebu v rámci všetkých troch nemocníc mali

perorálne tablety s liečivom **metamizol**. Druhým najčastejšie indikovaným liečivom bol **paracetamol**. V menšom zastúpení boli spotrebované aj nesteroidné antiflogistiká (NSAIDs) s priemernou spotrebou 11,69 %. Vo všetkých troch nemocniciach bol najčastejšie spotrebovaným perorálnym NSAIDs **ibuprofén**.

Najrozmanitejšia spotreba NSAIDs bola zaznamenaná v nemocnici SN, a zahŕňala **ibuprofén**, **flurbiprofén**, **diklofenak**, **meloxicam** a iné, používané prevažne na neurologickom a fyziatricko-rehabilitačnom oddelení.

V prípade perorálneho **metamizolu** bola najvyššia spotreba zaznamenaná v nemocnici HE, kde bolo použitých 5 279,84 tabliet (88,83 %), hlavne na oddelení dlhodoboch chorých (31,70 %) s najčastejšou diagnózou **M17.1 Iná primárna artróza kolenného kĺbu**. V nemocnici SN bolo použitých 10 781 tbl **metamizolu** (63,69 %) prevažne na oddelení chirurgie (29,71 %), najčastejšie pri diagnóze **O80.0 Spontánny pôrod jedného plodu záhlavím**. V nemocnici SK sa spotrebovalo za sledované obdobie 4 795 tbl (63,26 %) prevažne na doliečovacom a geriatrickom oddelení (32,51 %) pri najčastejšej diagnóze **J20.9 Akútna bronchitída, bližšie neurčená**.

V prípade perorálneho **paracetamolu** bola

najvyššia spotreba zaznamenaná v nemocnici SN – 3 678,15 tabliet, hlavne na oddelení chirurgie (29,17 %) a najčastejšou indikáciou bol **J18.9 Zápal pľúc, bližšie neurčený**. V nemocnici HE sa použilo 1 336,7 tbl **paracetamolu**, hlavne na internom oddelení (27,01 %). Najčastejšou indikáciou bol **O80.0 Spontánny pôrod jedného plodu záhlavím**. Nemocnica SK zaznamenala spotrebu 1 489,5 tbl hlavne na internom oddelení (50,39 %) a najčastejšou diagnózou bola **Q03.8 Iný vrodený hydrocefalus**.

Parenterálne liekové formy neopioidných analgetík

Percentuálne zastúpenie spotreby jednotlivých parenterálnych neopioidných analgetík znázorňuje graf 9. Najväčšiu spotrebu v rámci všetkých troch nemocníc mali injekčné/infúzne roztoky s liečivom **metamizol** a **paracetamol**. Menšiu, ale nezanedbateľnú skupinu, tvorila spotreba NSAIDs vo všetkých troch nemocniciach.

Najviac – 19 072,52 ampúl **metamizolu** sa spotrebovalo v nemocnici HE, prevažne na oddelení chirurgie (31,37 %) prevažne pri diagnóze **M51.1 Poškodenie driekových a iných medzistavcových platničiek s radikulopatiou**. 13 335,18 ampúl **metamizolu** bolo spotrebovaných v nemocnici SN, tiež prevažne na oddelení chirurgie (40,43 %), hlavne pri diagnóze **G54.1 Poškodenie plexus lumbosacralis**. V nemocnici SK sa spotrebovalo 10 952 ampúl **metamizolu** prevažne na oddelení neurológie (26,09 %) pri diagnóze **G54.1 Poškodenie plexus lumbosacralis**.

Spotreba infúzneho roztoku **paracetamolu** bola najvyššia v nemocnici SN s použitím 6 575,35 ampúl hlavne na oddelení chirurgie (64,93 %), pri najčastejšej diagnóze **G54.1 Poškodenie plexus lumbosacralis**. Nemocnica HE spotrebovala 2 138,2 ampúl **paracetamolu** hlavne oddelení chirurgie (24,70 %) pri diagnóze **M17.1 Iná primárna artróza kolenného kĺbu**. V nemocnici SK bolo spotrebovaných 1 430 ampúl prevažne na internom oddelení (21,61 %) pri diagnóze **G54.1 Poškodenie plexus lumbosacralis**.

Z NSAIDs bol vo všetkých troch nemocniciach najčastejšie spotrebovaný **diklofenak** (viď graf 9). Najvyššia spotreba NSAIDs bola zaznamenaná na oddeleniach neurológie (HE, SK) a chirurgie (SN). Najčastejšie boli podávané pacientom s diagnózou **M51.1 Poškodenie driekových a iných medzistavcových platničiek s radikulopatiou**.

DISKUSIA

Analgetiká zohrávajú nezastupiteľnú úlohu v rámci terapie hospitalizovaných pacientov. Monitoring spotreby jednotlivých analgetík odzrkadľuje trendy v liečbe bolesti u hospitalizovaných pacientov a takisto môže poukázať na niektoré nedostatky.

Za II. polrok 2019 sme zaznamenali v nemocniciach SN, HE a SK 112 868 hospitalizovaných pacientov, ktorým bola poskytnutá analgetická terapia. V každej zo sledovaných nemocníc tvorili prevažnú väčšinu pacientov ženy vo vekovej kategórii 61 – 70 rokov. Tento výsledok pravdepodobne úzko súvisí s demografickým vývojom populácie za posledné desaťročia (prevaha ženského pohlavia, starnutie populácie) (Šprocha a kol., 2019). Hospitalizácie prevažne starších pacientov nie sú ničím výnimočným, často súvisia s polymorbiditou a dlhšou dobou rekonvalescencie, častejšími komplikáciami a horšími prognózami. Podiel žien nižších vekových kategórií je ovplyvnený aj hospitalizovaním žien v období tehotenstva/pôrodu.

Základom pre farmakologickú liečbu bolesti je trojstupňový analgetický rebrík (I. neopioidné analgetiká, II. slabé opioidy, III. silné opioidy). Pri akútnej bolesti, napr. stavy po operáciách, sa postupuje podľa rebríka zostupne „step down“. Preferujeme rýchlo sa uvoľňujúce formy analgetík s krátkou dobou trvania. U chronickej bolesti postupujeme opačne „step up“, a naopak využívame hlavne retardované formy analgetík (Kulichová, 2009).

Spotreba opioidov má podľa viacerých zdrojov stúpajúcu tendenciu. Spotreba opioidov bola v rámci spotreby všetkých troch nemocníc v priemere 19 %, kým spotreba neopioidných analgetík bola v priemere

na úrovni 81 %.

V nemocnici SN, HE prevažovala spotreba perorálnej liekovej formy opioidov (v priemere 61,40 %), na rozdiel od svídnickej nemocnice, kde prevládala parenterálna lieková forma (68,40 %).

Z perorálnych opioidov bola spotreba tabliet v kombinácii **paracetamol + tramadol** niekoľkonásobne vyššia ako spotreba všetkých ostatných perorálnych opioidov vo všetkých troch nemocniciach. Išlo hlavne o pacientov hospitalizovaných na neurologických oddeleniach, s diagnózou **G54.1 Poškodenie plexus lumbosacralis**. K spotrebe určite prispela absencia typických nežiaducich účinkov opioidov, či prijateľná cena širokej palety dostupných generických liekov. Kombinácia liečiv **paracetamol + tramadol** zodpovedá II. stupňu analgetického rebríka (stredné až silné bolesti). Okrem aditívneho analgetického efektu tejto kombinácie je zabezpečený aj supraaditívny efekt jednotlivých liečiv (vzájomne sa násobiaci účinok) (Sliva, 2005).

Ostatné perorálne opioidné analgetiká ako **oxykodón + naloxón, tapentadol a morfin** boli predpisované len v nemocnici Spišská Nová Ves. Spotreba bola zaznamenaná na oddelení neurológie (tapentadol) a oddelení dlhodobých chorých (oxykodón + naloxón) a oddelení vnútorného lekárstva (morfin). Dôvod, prečo ostatné nemocnice nevyužívali v rámci farmakoterapie bolesti u svojich pacientov možnosť farmakoterapie týmito opioidmi vo forme tabliet, je otázný. Nemocnice HE a SK majú rovnako ako nemocnica SN na svojej pôde spomínané oddelenia, a tým pádom aj špecialistov s požadovanou odbornosťou pre preskripciu týchto liečiv.

Perorálne opioidné analgetikum **dihydrokodeín** bolo predpisované len v nemocnici Humenné. Toto liečivo patrí medzi slabé opioidné analgetiká, nie je viazané na osobitnú objednávku označenú šikmým modrým pruhom a nemá žiadne preskripčné obmedzenie. **Dihydrokodeín** bol predpisovaný pacientom hospitalizovaným na neurologickom oddelení hlavne na diagnózu **M51.1 Poškodenie drierkových a iných medzistavcových platničiek s radikulopatiou**. Pacienti s touto diagnózou väčšinou

vykazujú miernu až stredne silnú intenzitu bolesti (Kulichová, 2009).

Počas monitoringu parenterálnych opioidových analgetík sme v rámci všetkých troch nemocníc očakávané zaznamenali najvyššiu spotrebu injekčných roztokov **tramadolu** (77 %). Zaujímavým zistením však bola spotreba **petidínu** v nemocnici Humenné, kde spotreba injekčného roztoku **petidínu** (22,52 %) bola väčšia ako spotreba injekčného roztoku **morfinu** (6,76 %). Spotrebu až 67,38 % ampúl **petidínu** sme zaznamenali na ortopedickej ambulancii u pacientov s diagnózou **M17.1 Iná artróza kolenného kĺbu**. **Petidín** je opioid, ktorý nie je vhodný na terapiu chronickej bolesti (kumulácia toxického metabolitu norpetidínu – tremor, kŕče) (Kozák a kol., 2018). V nemocnici SN bol využívaný hlavne na gynekologicko-pôrodnickom oddelení (87,95 %) na tlmenie silných pôrodných kontrakcií. **Petidín** vykazuje nižšie spazmogénne účinky v porovnaní s morfinom (Čech a kol., 2014). Uplatňuje sa preto tiež pri terapii akútnych kolikovitých žľčnkových bolestí spôsobených žľčnkovými kameňmi.

Podľa našej analýzy bola v menšom množstve využívaná lieková forma transdermálnych náplastí. Za analyzované obdobie II. polroka 2019 bolo spolu vo vybraných troch nemocniciach spotrebovaných 267 *tdm emp* s obsahom **fentanyl**u a 77 *tdm emp* s obsahom **buprenorfinu**. Transdermálne náplasti boli aplikované hlavne pacientom s nádormi lokalizovanými v niektorej časti GIT-u, napr. so zhubným nádorom koreňa jazyka alebo hrubého čreva. Týmto pacientom bola pravdepodobne kvôli diagnóze uprednostnená aplikácia *tdm emp* pred farmakoterapiou perorálnymi liekovými formami opioidov. Transdermálne terapeutické systémy (TTS) sú považované za výhodnejšiu liekovú formu pre onkologických pacientov v porovnaní s *p. o.* liekovými formami. Medzi výhody patrí riadené uvoľňovanie liečiva po dobu 72 hod (zníženie potreby častého podávania analgetík), a tiež obchádzanie GIT-u, kvôli častej nauzei onkologických pacientov, čo tiež patrí medzi hlavné dôvody ich použitia.

Medzi nežiaduce účinky TTS patrí nižší výskyt obštipácie ako napr. u pacientov užívajúcich **morfín**, výskyt bradypnoe je popisovaný len u 1 – 2 % pacientov (Beneš, Macháček, Cwierka, 2003).

Z výsledkov analyzovaných dát vyplynulo, že v klinickej praxi sa transdermálne opioidové náplasti strihajú, a to aj napriek upozorneniu v SPC lieku. Dôvod, prečo analyzované dáta neobsahovali žiadne transmukózne liekové formy je ten, že slúžia na preklenutie prelomovej bolesti a tak sú užívané pacientmi prevažne v domácom prostredí.

Zaznamenali sme niekoľko zaujímavostí aj pri spotrebe neopioidových analgetík. Na Slovensku patrí **metamizol** v tabletovej forme dlhodobo k najčastejšie predpisovaným liekom. V roku 2018 bol podľa rebríčka NCZI liek s názvom *Novalgín* top liek v spotrebe až 1,4 mil. balení (Štatistické výstupy NCZI, 2018). Toto tvrdenie potvrdila aj nami realizovaná analýza. Lieky s obsahom **metamizolu** v tabletovej aj injekčnej forme mali najvyššiu spotrebu z pomedzi všetkých analgetík. Dôvodom bude pravdepodobne relatívne bezpečný profil **metamizolu**. Hlavným nežiaducim účinkom sú krvné dyskrázie (agranulocytóza), ktoré sú síce u pacientov zriedkavé, no ide o veľmi závažné nežiaduce účinky. Paradoxom je, že vo viacerých krajinách sveta ich výskyt viedol dokonca k deregistácii liekov s obsahom **metamizolu** (Olearová a Jurečková, 2019).

Druhým najpoužívanejším neopioidným (perorálnym aj parenterálnym) analgetikom a antipyretikom bol **paracetamol**. V klinickej praxi je **paracetamol** považovaný za bezpečné analgetikum s minimom NÚ (Hasarova, 2008). Vo vysokých dávkach (jednotlivá dávka 150 – 250 mg.kg⁻¹ môže byť hepatotoxický (Kršiak a kol., 2009). Vo všetkých troch nemocniciach bola uprednostňovaná parenterálna cesta podania **paracetamolu**. Intra-venózna aplikácia **paracetamolu** je indikovaná na krátkodobú liečbu stredne silnej bolesti alebo hypertermie, v prípade klinického odôvodnenia, alebo keď nie je možné perorálne podanie. Pri perorálnej aplikácii sa maximálna plazmatická koncentrácia

dosahuje cca za 0,5 hod; v pooperačnom období sa tento čas môže dokonca predĺžiť na cca 1,5 hod kvôli spomalenej motilita GIT-u (Hasarova, 2008). V nemocniciach SN, SK bola spotreba infúzneho roztoku **paracetamolu** najväčšia na oddelení chirurgie. Najčastejšie bol indikovaný pacientom s diagnózou **G54.1 Poškodenie plexus lumbosacralis** alebo **M17.1 Iná primárna artróza kolenného kĺbu**.

Zaujímavá bola aj spotreba perorálnych NSAIDs. Lekári v nemocnici SN predpisovali obdobne ako pri opioidných perorálnych analgetikách širokú paletu dostupných perorálnych NSAIDs (**ibuprofén, diklofenak, flurbiprofén, aceklofenak, nimesulid, meloxicam, naproxén, ketoprofén**) na oddeleniach neurológie, rehabilitačnom či internom oddelení v porovnaní s nemocnicou Humenné, v ktorej monitorujeme úzky profil NSAIDs z enormného množstva dostupných liečiv na našom trhu. Najvyššiu spotrebu zo všetkých perorálnych NSAIDs mali lieky s obsahom ibuprofénu.

Z výsledkov našej analýzy tiež vyplýva, že nemocnice nevyužívajú dostupné, terapeuticky výhodné kombinácie analgetík s liečivami modulujúcimi ich nežiaduce účinky. Napríklad gastroprotektívne kombinácie NSAIDs + inhibítor protónovej pumpy alebo prostaglandínov (misoprostol) (Grofik, 2018). Potenciálnym dôvodom bude pravdepodobne cena lieku, prípadne dĺžka hospitalizácie pacienta.

Analýza ukázala, že najviac využívaným parenterálnym neopioidným liečivom bol **metamizol**. Z ostatných podávaných parenterálnych neopioidov boli v najväčšom množstve spotrebované infúzne roztoky paracetamolu a z NSAIDs injekčné roztoky **diklofenaku, ketoprofénu** a infúzne roztoky **diklofenaku s orfenadrínom**.

ZÁVER

Štúdia porovnávala spotrebu opioidných versus neopioidných analgetík v troch vybraných nemocniciach SN, HE a SK za obdobie II. polroka

2019. Získané výsledky ukazujú, že za dané obdobie vo všetkých troch nemocniciach boli analgetiká predpisované 112 868 pacientom, pričom najväčší počet pacientov s analgetickou liečbou bol zaznamenaný v nemocnici SN (48 002).

Vo všetkých troch nemocniciach boli analgetiká indikované pacientom s prevahou ženského pohlavia vo vekových kategóriách 61 – 70 rokov (SN, HE) a 71 – 80 rokov (SK).

V prípade spotreby analgetík boli vo všetkých troch nemocniciach indikované prevažne neopioidné analgetiká so spotrebou v priemere 81 % s najvyšším podielom vo svidníckej nemocnici (87,02 %).

V rámci opioidných analgetík bola uprednostňovaná *p. o.* lieková forma v priemere 61,4 %; hlavne v nemocnici v HE a SN, kým vo svidníckej nemocnici prevládala parenterálna lieková forma opioidných analgetík (68,4 %). Neopioidné analgetiká boli prevažne indikované v parenterálnej liekovej forme vo všetkých troch nemocniciach (57,76 %).

V prípade **opioidných analgetík** bol vo všetkých troch nemocniciach najčastejšie využívaný **tramadol**, či už v parenterálnej alebo *p. o.* liekovej forme, kde bol hlavne indikovaný vo fixnej kombinácii s paracetamolom. Najčastejšie bol podávaný na oddelení neurológie, chirurgie a na doliečovacom a geriatrickom oddelení. Opioidné analgetiká boli najčastejšie indikované pri diagnózach **M51.1. Poškodenie plexus lumbosacralis** a **G54.1 Poškodenie driekových a iných medzistavcových platničiek s radikulopatiou**, ktoré sa vyznačujú silnou neuropatickou bolesťou.

Najširšiu škálu perorálnych opioidov využívala nemocnica v SN, v ktorej ako jedinej bola okrem **dihydrokodeínu** zaznamenaná aj spotreba kombinácie liečiv **oxykodón + naloxón**, **tapentadol** a **morfin**. V rámci parenterálnych opioidných analgetík bol okrem tramadolu často využívaný aj **petidín**, hlavne v nemocnici v HE (22,52 %). V terapii silných bolestí boli využívané aj transdermálne terapeutické systémy s **fentanylom** a **buprenorfi-**

nom hlavne u pacientov s nádorovými ochoreniami GIT-u. Najväčšia spotreba *tdm emp* s obsahom **fentanylu** bola zaznamenaná v nemocnici Svidník [133 náplastí (cca 27 balení lieku)]. Tieto TTS **fentanylu** a **buprenorfinu** boli predpisované pacientom na internom, doliečovacom a na neurologickom oddelení.

V rámci **neopioidných analgetík** mali najväčšiu spotrebu vo všetkých troch nemocniciach perorálne aj parenterálne lieky s liečivom **metamizol** (cca 70 %). **Metamizol** bol najčastejšie indikovaný na oddelení chirurgie, neurológie a doliečovacom a geriatrickom oddelení pri diagnózach **M51.1. Poškodenie plexus lumbosacralis** a **G54.1 Poškodenie driekových a iných medzistavcových platničiek s radikulopatiou**. Spotreba perorálnych neopioidových analgetík bola najrozmanitejšia opäť v nemocnici SN, kde okrem spomínaného **metamizolu** (63,69 %) a **paracetamolu** (21,73 %) bola zaznamenaná aj spotreba pomerne širokej palety NSAIDs – **ibuprofén**, **flurbiprofén**, **diklofenak** a **meloxicam** prevažne na neurologickom a fyziatricko-rehabilitačnom oddelení.

Z celkového pohľadu bola spotreba opioidných a neopioidných analgetík vo všetkých troch nemocniciach podobná. Rozdiely v spotrebe konkrétnych analgetík v jednotlivých nemocniciach mohli byť ovplyvnené nákladmi na liečbu, liekovým formulárom nemocnice, liečebnými postupmi, ale aj počtom pacientov a lôžok na jednotlivých oddeleniach.

ZOZNAM LITERATÚRY

Beneš, P., Macháček, J., Cwierotka, K.: Léčba bolesti u pacientů s onkologickým onemocněním a zkušenosti s podáním TTS fentanylu v České republice [Treatment of pain in patients with malignant diseases and experience with TSS-fentanyl administration in Czech Republic]. *Interní medicína pro praxi*, 2003, 5 (3), 109 – 114. https://www.solen.cz/artkey/int-200303-0003_Lecba_bolesti_u_pacientu_s_onkologickym_onemocnenim_a_

zkusenosti_s_podanim_TTS_fentanyl_v_Ceske_re.php. [cit. 2020-12-12].

Čech, E., Hakej, Z., Maršál, K. a kol.: *Pôrodnictví* [Obstetrics]. 3. vyd. Praha: Grada Publishing, a. s., 2014. 576 s.

Fraňová, S., Šutovská, M.: *Farmakoterapia bolesti* [Pharmacotherapy of pain]. 1. vyd. Martin: Univerzita Komenského v Bratislave Jesseniova Lekárska Fakulta v Martine, 2014, 153 s.

Grofik, M.: Bolesť chrbta – možnosti farmakologickej intervencie [Back pain – options for pharmacological intervention]. *Praktické lekárstvo*, 2018, 8 (4), 165 – 167. <https://www.solen.sk/casopisy/prakticke-lekarnictvo/bolest-chrbta-moznosti-farmakologickej-intervencie>. [cit. 2020-08-08].

Hakl, M.: Zásady podávání anestetik [Principles of analgesic administration]. *Praktické lékařství*, 2013, 9 (4 – 5), 173 – 176.

<https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2013/04/05.pdf> [cit. 2020-08-23].

Hasarová, D.: Paracetamol známy – neznámy [Paracetamol known – unknown]. *Paliatívna medicína a liečba bolesti*, 2008, 1, 37 – 39. <https://www.solen.sk/casopisy/paliativna-medicina-a-liecba-bolesti/paracetamol-znamy-neznamy>. [cit. 2020-06-15].

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

Kršiak, M., Švihovec, J., Zupanets, I., Kriška, M.: Optimální dávkování paracetamolu při léčbě bolesti a horečky [Optimal dosage of paracetamol for treating pain and fever]. *Praktické lékařství*, 2009, 5 (4), 219 – 222. https://www.solen.cz/artkey/ped-201001-0005_Optimalni_davkovani_paracetamolu_pri_lecbe_bolesti_a_horecky.php. [cit. 2020-08-18].

Kulichová, M.: Rozdiely medzi akútnou a chronickou bolesťou s ohľadom na diagnostiku a liečbu [Differences between acute and chronic pain in regard to diagnostic and therapy]. *Paliatívna medicína a liečba bolesti*, 2009, 2

(2), 60 – 64. <https://www.solen.sk/storage/file/article/7510fdf3d47f87e0be5c218efc0e6017.pdf>. [cit. 2020-07-06].

Martuliak, I.: *Farmakoterapia bolesti pre lekárov a farmaceutov* [Pharmacotherapy of pain for doctors and pharmacists]. 1. vyd. Banská Bystrica: Martimed, s. r. o., 2019. 302 s.

Masár, O., Ďuricová, G., Mauritzová, I.: *Manažment bolesti v urgentnej medicíne* [Management of pain in emergency medicine]. Bratislava: Univerzita Komenského, 2013. 88 s.

NCZI, *Spotreba humánných liekov a zdravotníckych pomôcok v SR za rok 2018* [NHIC – Consumption of human medicines and medical devices in SR for 2018]. http://data.nczisk.sk/statisticke_vystupy/top_100_liekov/spotreba_liekov/Spotreba_liekov_a_zdravotnickych_pomocok_v_SR_2018_Sprava_k_publikovanym_vystupom.pdf. [cit. 2019-05-08].

Oleárová, A., Jurčková, K.: Metamizol ovplyvnil nástup účinku filgrastímu [Metamizole-affected onset of action of filgrastim]. *Klinická farmakológia a farmácie*, 2019, 33 (3), 46 – 49. https://www.solen.cz/artkey/far-201903-0009_metamizol_ovplyvnil_nastup_ucinku_filgrastimu.php. [cit. 2020-08-08].

Sliva, J.: Význam fixnej kombinácie paracetamolu s tramadolom v liečbe bolesti [Importance of fixed combination of paracetamol with tramadol in therapy of pain]. *MEDInews*, 2005, 2, 19 – 20. <https://www.edukafarm.sk/data/soubory/casopisy/mediNEWS/02-2015/03%20Vyznam%20fixnej%20kombinacie.pdf>. [cit. 2020-08-11].

Šprocha, B., Bleha, B., Garajová, A., Pilinská, V., Mészáros, J., Vaňo, B.: *Populačný vývoj v krajoch a okresoch Slovenska od začiatku 21. storočia* [Population development in regions and districts of Slovakia from the beginning of 21th century]. Bratislava: INFOSTAT – Výskumné demografické centrum, 2019. 142 s.

http://www.infostat.sk/vdc/pdf/populacny_vyvoj_2019.pdf. [cit. 2019-08-19].



**VPLYV NADBYTKU DUSÍKA NA VYBRANÉ PARAMETRE
OXIDAČNÉHO STRESU V HYDROPONICKY PESTOVANEJ MEDOVKE LEKÁRSKEJ
(*MELISSA OFFICINALIS* L.)**

**EFFECT OF NITROGEN EXCESS ON THE SELECTED OXIDATIVE STRESS
PARAMETERS IN HYDROPONICS LEMON BALM (*MELISSA OFFICINALIS* L.)**

Bačkorová, Miriam¹; Bačkor, Martin²

¹Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

²Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Mánesova 23, 043 52 Košice
Slovenská republika

miriam.backorova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Štúdia sa zaoberá vplyvom nadbytku dusíka na niektoré parametre oxidatívneho stresu hodnotené v rastline *Melissa officinalis* L. Medovka lekárska bola tri týždne kultivovaná v hydroponickom médiu a potom exponovaná dusičnanom. Dusík bol do hydroponického média pridávaný vo forme KNO₃ (dusičnan draselný) v koncentráciách 100 mM a 200 mM, a NH₄NO₃ (dusičnan amónny) v koncentráciách 25 mM a 50 mM. Po siedmich dňoch pôsobenia dusičnanov na medovku lekársku sa stanovoval obsah rozpustných proteínov, ktorý bol významne vyšší v nadzemnej časti rastliny a štatisticky významne vzrástol po aplikácii 200 mM KNO₃ a 50 mM NH₄NO₃. Obsah

peroxidu vodíka v koreňoch medovky rástol pri všetkých testovaných koncentráciách dusičnanov, zatiaľ čo v listoch vzrástol len pri najvyšších koncentráciách 200 mM KNO₃ a 50 mM NH₄NO₃. Nárast superoxidového aniónu bol pozorovaný pri koncentrácii 50 mM NH₄NO₃, v listoch, podobne ako v prípade TBARS (reaktívne látky s kyselinou tiobarbiturovou). Tieto parametre oxidačného stresu boli v pozitívnej korelácii s obsahom celkových fenolov v listoch medovky lekárskej, ako aj flavonoidov. Obsah flavonoidov v listoch sa významne zvýšil pri 200 mM KNO₃. Z výsledkov vyplýva, že príjem vyššieho množstva dusíka spôsobuje nárast antioxidačnej aktivity v prospech medovky lekárskej.

Kľúčové slová: antioxidanty; dusík; *Melissa officinalis* L.; reaktívne formy kyslíka

ABSTRACT

This study deals with the effect of nitrogen excess on some parameters of oxidative stress in *Melissa officinalis* L. plants which were assessed. Lemon balm was cultured in hydroponic medium for three weeks. Nitrogen was added to the hydroponic medium in the form of KNO_3 (potassium nitrate) at concentrations of 100 mM and 200 mM, and NH_4NO_3 (ammonium nitrate) at concentrations of 25 mM and 50 mM. After seven days of nitrate treatment of the lemon balm, the soluble protein content was determined to be significantly higher in the aboveground part of the plant and to increase statistically significantly after application of 200 mM KNO_3 and 50 mM NH_4NO_3 . The content of hydrogen peroxide in the roots of lemon balm increased at all tested concentrations of nitrates, while in the leaves it increased only at the highest tested concentrations of KNO_3 and NH_4NO_3 . An increase in superoxide anion was observed at a concentration of 50 mM NH_4NO_3 in the leaves, similar to TBARS (thiobarbituric acid reactive substances). These observed parameters of oxidative stress were positively correlated with content of phenols in the leaf of lemon balm, as well as flavonoids. The content of flavonoids in the leaf was significantly increased after application of 200 mM KNO_3 . The results of the study showed that the intake of higher amounts of nitrogen causes an increase in antioxidant activity in favor of lemon balm.

Key words: antioxidants; *Melissa officinalis* L.; nitrogen; reactive oxygen species

ÚVOD

Dusík patrí medzi makrobiogénne prvky, ktoré majú pre rastliny neoceniteľný význam. Pri úplnej

alebo čiastočnej absencii biogénnych prvkov dochádza k poruchám rastu a vývinu rastlín. Dusík zohráva významnú úlohu v metabolizme rastlín tým, že je potrebný pre tvorbu makro a mikronutrientov. Tvorí súčasť bielkovín, nukleových kyselín, enzýmov, vitamínov, mnohých organických a anorganických zlúčenín. Tiež je nevyhnutnou zložkou protoplazmy rastlín, živočíchov a mikroorganizmov. Zohráva dôležitú úlohu pri udržiavaní a zvyšovaní pôdnej úrodnosti. Jeho nedostatok na jednej strane znižuje úrodu a často ovplyvňuje aj jej kvalitu. Na strane druhej, jeho nadbytok často negatívne ovplyvňuje kvalitu úrody. Vyššie množstvo dusičnanov takto môže spôsobiť zmeny obsahových látok, či fotosyntetických pigmentov v rastlinách. Vysoké dávky dusičnanov sa zaraďujú medzi stresové faktory, ktoré môžu v rastlinách vyvolať stresovú reakciu (Masclaux-Daubresse a kol., 2010).

Oxidačný stres je výsledkom negatívneho pôsobenia voľných radikálov alebo reaktívnych foriem kyslíka a dusíka (ROS/RNS). Vzniká v dôsledku narušenia rovnováhy medzi produkciou týchto stresových faktorov a antioxidačnou aktivitou organizmu. Nerovnováha v bunke spôsobuje narušenie oxidačno-redukčného statusu, termodynamického stavu, vplýva na metabolizmus bunky, ovplyvňuje priebeh biosyntetických a funkčnosť biochemických procesov (Arora a kol., 2002).

Antioxidanty sú substancie, ktoré dokážu zabrániť oxidácii substrátu, pričom sú tieto látky prítomné v nižšej koncentrácii ako oxidovateľný substrát. Úlohou antioxidačných mechanizmov je zamedzenie vzniku oxidačných látok alebo ich reakcii s inými molekulami buniek. Vo všeobecnosti možno antioxidanty definovať ako organické zlúčeniny, ktoré sú schopné chrániť iné materiály pred oxidačným poškodením. V podstate ide o každú zlúčeninu, ktorá je schopná reagovať s ROS/RNS bez toho, aby sa sama zmenila na vysoko reaktívnu zlúčeninu. Nadmerná produkcia ROS/RNS vyvoláva peroxidáciu polynenasýtených mastných kyselín, ktoré sa nachádzajú v lipidovej dvojvrstve bunkovej

membrány. Táto reťazová reakcia peroxidácie lipidov vedie k poškodeniu membrány, k oxidácii nielen membránových lipidov, ale aj proteínov a DNA (Kalyanamran, 2013).

Vystavenie rastlín stresovým podmienkam životného prostredia je spojené so zvýšenou produkciou reaktívnych foriem. V dôsledku toho je odpoveďou rastlín na stres rad fyziologických úprav so snahou o toleranciu voči pôsobeniu stresových faktorov. Dochádza k tvorbe stresových bielkovín a aktivácii antioxidačného ochranného systému. Skúmaním odpovedí rastlín na rozličné formy stresu je tak možné objasniť proces rastlinnej tolerance, a tým ovplyvniť produktivitu a kvalitu liečivého materiálu (Halliwell, 2015).

Cieľom štúdie bolo poukázať na zmeny v základných fyziologických parametroch vrátane antioxidačnej aktivity, v závislosti od pôsobenia jednotlivých koncentrácií dusičnanov ako stresových faktorov. Modelovým objektom tejto štúdie sa stala medovka lekárska (*Melissa officinalis* L.), ktorá má v dôsledku svojich účinkov uplatnenie v mnohých indikáciách.

MATERIÁL A METÓDY

Pre experimentálne účely boli použité semená (tvrdky) medovky lekárskej (*Melissa officinalis* L.), odroda Citra (Agrokarpoty Plavnica, s.r.o.).

Kultivácia experimentálnej rastliny

Kľúčne rastliny medovky lekárskej (*Melissa officinalis* L.) získané výsevom boli hydroponicky pestované v kultivačnej miestnosti. Pestovanie bolo realizované v 5-litrových nádobách naplnených roztokom podľa Hoaglanda (Hoagland, 1950), pričom hustota rastlín v jednej nádobe bola 25. Médium bolo nepretržite prevzdušňované a menené raz za týždeň. Kultivačná miestnosť bola osvetlená umelým osvetlením s intenzitou svetla $210 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR. Rastliny boli vystavené 12-hodinovej fotoperióde (od 6:00 h do 18:00 h svetlo, od 18:00 h do 6:00 h tma). Vlhkosť vzduchu v kultivačnej miestnos-

ti bola 60 % a priemerná teplota dosahovala hodnoty 28/23 °C (deň/noc). Experimentálne rastliny boli po 3-týždňovej hydroponickej kultivácii exponované vplyvu dusíka. Ten bol pridaný k médiu vo forme KNO_3 a NH_4NO_3 . Kontrolná skupina rastlín pre oba varianty nebola vystavená pôsobeniu dusičnanov.

Stanovenie vybraných fyziologických parametrov – obsahu vody

Obsah vody bol stanovený v listoch a koreňoch kontrolných rastlín a rastlín exponovaných KNO_3 a NH_4NO_3 . Vzorky z hydropónie boli osušené filtračným papierom. Najprv sa zaznamenala čerstvá hmotnosť listov a koreňov, po vysušení vzoriek v sušiarňi pri teplote 40 °C bola zaznačená hmotnosť suchých listov a koreňov. Percentuálny obsah sušiny sa stanovil podľa vzorca: % sušiny = s. hm. x 100/č. hm a z toho obsah vody ako 100 – % sušiny (Kováčik, 2012).

Stanovenie rozpustných proteínov

Čerstvé listy a korene boli homogenizované v ľadovom kúpeli vo fosfátovom tlmivom roztoku s prídavkom inertného morského piesku. Homogenát o objeme 2 ml sa následne centrifugoval (20 min, 15 000 rpm). Obsah rozpustných proteínov bol stanovený štandardnou metódou podľa Bradfordovej (Bradford, 1976) s použitím 50 μl supernatantu a 950 μl Bradfordovej roztoku. Výsledná absorbancia sa merala po 15 minútach pri vlnovej dĺžke 595 nm. Pre zostrojenie kalibračnej krivky sa ako štandard použil hovädzí sérový albumín (Repčák a kol., 2015). Spektrofotometrické stanovenia boli vykonané pomocou spektrofotometra UVI Light XTD 2 (Secoman, ALES Cedex, Francúzsko).

Spektrofotometrické stanovenie peroxidu vodíka a superoxidového radikálu

Obsah peroxidu vodíka sa stanovil na základe vytvorenia žltého sfarbeného komplexu peroxidu vodíka s iónmi titánu (Kováčik, 2012). Známe množstvo biomasy sa homogenizovalo vo fosfátovom tlmivom roztoku s prídavkom morského piesku

vo vychladenej trecej miske. Vzorky sa následne centrifugovali (15 min pri 4 °C a 15 000 rpm). K 1 ml supernatantu sa pridalo 0,5 ml 0,1 % TiCl_4 v 20 % H_2SO_4 a zmes sa znova centrifugovala za vyššie uvedených podmienok. Absorbancia sa merala pri vlnovej dĺžke 410 nm.

Obsah superoxidového radikálu bol stanovený ako množstvo nitritu, ktorý vznikol z hydroxylamínu meraním absorbancie pri vlnovej dĺžke 530 nm. Ten v reakčnej zmesi tvorí „diaz“ zlúčeninu (Elstner a Heupel, 1976). Reakčná zmes obsahovala 0,27 ml fosfátového pufru; 0,03 ml 10 mM hydroxylamínu; 0,3 ml supernatantu; 0,3 ml 17 mM sulfanilamidu; 0,3 ml 7 mM a-naftylamínu a 0,3 ml dietyléteru.

Stanovenie lipidickej peroxidácie

Malondialdehyd (MDA) predstavuje hlavný degradačný produkt polynenasýtených mastných kyselín. Je jednou z hlavných látok reagujúcich s kyselinou tiobarbiturovou (TBA). Rozsah lipidickej peroxidácie sa určil ako množstvo reaktívnych foriem kyseliny tiobarbitúrovej (TBARS) získaných z reakcie s TBA. Známe množstvo biomasy sa homogenizovalo s prídavkom inertného piesku v 0,1 % (w/v) TCA na konečný objem 15 ml. Homogenát bol odstredený centrifugáciou (15 min, 20 °C, 15 000 rpm) s následným prenesením supernatantu do sklenenej skúmavky. K 0,5 ml supernatantu bolo pridaných 1,5 ml 20 % TCA obsahujúcej 0,5 % (w/v) TBA. Zmes v skúmavke sa zahrieva vo vodnom kúpeli pri teplote 95 °C, po dobu 30 minút. Po zahriatí sa zmes prudko ochladila ponorením do vody s ľadovou drťou a následne sa opäť centrifugovala. Výsledná absorbancia vzoriek bola meraná pri vlnovej dĺžke 532 nm (komplex MDA-TBA) a 600 nm (korekcia nešpecifického zákalu). Množstvo TBARS bolo vyjadrené s použitím mólového absorpčného koeficientu MDA-TBA komplexu $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Kováčik, 2012).

Stanovenie rozpustných fenolov a flavonoidov

Celkové stanovenie rozpustných fenolov a flavonoidov bolo stanovené v pripravených

homogenátoch. Rastlinný materiál pozostávajúci z listov a koreňov bol homogenizovaný pri 4 °C v 80 % metanole a centrifugovaný (15 min, 4 °C, 15 000 rpm). Obsah celkových rozpustných fenolov bol spektrofotometricky stanovený pomocou Folin-Ciocalteuovho činidla ako ekvivalent kyseliny galovej. Reakčná zmes s výsledným objemom 1,5 ml obsahovala 30 μl supernatantu z homogenátov, 470 μl redistilovanej vody, 975 μl 2 % uhličitanu sodného a 25 μl Folin-Ciocalteu činidla. Po premiešaní sa vzorky inkubovali jednu hodinu pri teplote 45 °C. Po ochladení na laboratórnu teplotu sa zmerala absorbancia pri vlnovej dĺžke 750 nm. Ako štandard bola použitá kyselina galová. Flavonoidy sa tiež stanovili spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 420 nm, prostredníctvom metódy s AlCl_3 . K 0,5 ml supernatantu sa pridal 1 ml 2 % metanolového roztoku AlCl_3 . Po hodine inkubácie sa merala absorbancia. Samotný obsah flavonoidov bol stanovený z kalibračnej krivky kvercetínu.

Štatistické spracovanie výsledkov

Všetky experimenty sme uskutočnili za rovnakých podmienok, trikrát nezávisle od seba. Na vyhodnotenie signifikancie získaných výsledkov bol použitý ANOVA test (program MINITAB Release 11, Minitab inc., State College, Pensylvánia).

VÝSLEDKY

Obsah vody a sušiny

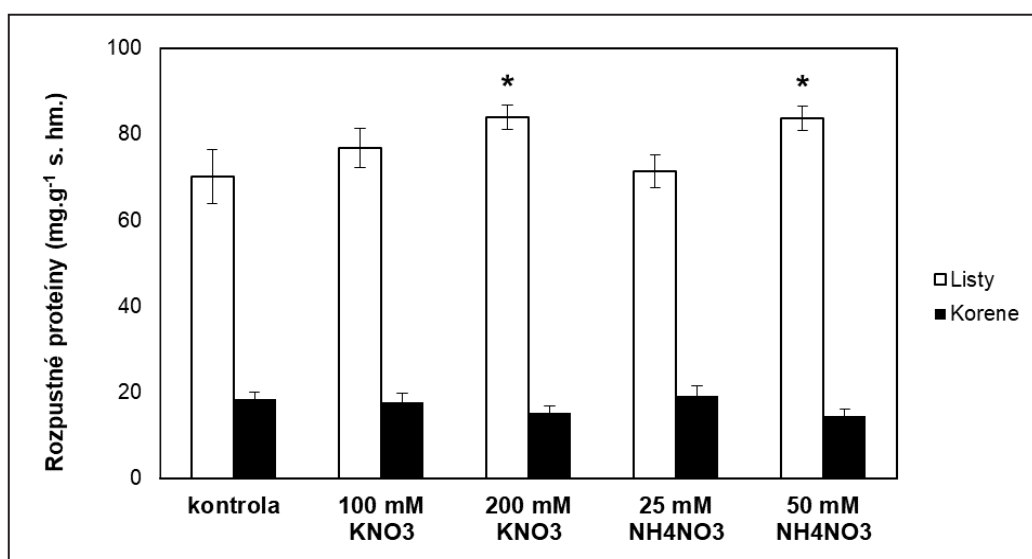
V experimente bolo ako stresový faktor použité médium s prídavkom KNO_3 (100 mM, 200 mM) a NH_4NO_3 (25 mM, 50 mM). Vo vzorkách vystavených týždňovému pôsobeniu týchto stresorov bol v prípade listov zaznamenaný mierny nárast obsahu vody pri oboch testovaných koncentráciách KNO_3 (100 mM, 200 mM KNO_3). Vplyvom pôsobenia NH_4NO_3 na koreňový systém došlo k poklesu obsahu vody pri vyššej testovanej koncentrácii 50 mM NH_4NO_3 v porovnaní s kontrolou, pričom tieto hodnoty neboli štatisticky významné (viď tab. 1).

Tab. 1: Obsah vody v % v nadzemnej/podzemnej časti listy/korene *Melissa officinalis* L.

Medovka lekárska	Listy	Korene
	Priemer a SD	Priemer a SD
Kontrola	76,3 ± 2,9	82,4 ± 2,9
100 mM KNO ₃	82,3 ± 3,5	81,3 ± 3,2
200 mM KNO ₃	81,5 ± 1,8	80,5 ± 1,5
25 mM NH ₄ NO ₃	76,3 ± 2,2	77,3 ± 2,4
50 mM NH ₄ NO ₃	75,8 ± 2,1	73,1 ± 2,4

Údaje zobrazujú priemerné hodnoty a smerodajné odchýlky SD (n = 3).

Graf 1: Obsah rozpustných proteínov



Obsah rozpustných proteínov (mg.g⁻¹ s. hm.) v nadzemnej/podzemnej časti (listy/korene) *Melissa officinalis* L. vystavenej týždennému pôsobeniu KNO₃ a NH₄NO₃ (K – kontrola, + 100 mM KNO₃ a + 200 mM KNO₃; + 25 mM NH₄NO₃ a + 50 mM NH₄NO₃). Údaje zobrazujú priemerné hodnoty a smerodajné odchýlky (n = 3). Údaje v stĺpcoch označené * vykazujú štatisticky významný rozdiel (P < 0,05) oproti kontrolnej skupine rastlín.

Obsah rozpustných proteínov

Pri stanovení obsahu rozpustných proteínov bol v listovej ploche zaznamenaný nárast obsahu rozpustných proteínov v porovnaní získaných výsledkov s kontrolou (viď graf 1). Ten bol štatisticky významný (P < 0,05) najmä pri vyššej koncentrácii dusičnanov (200 mM KNO₃ a 50 mM NH₄NO₃). V koreňoch medovky možno vplyvom pôsobenia dusičnanov evidovať mierne odchýlky v porovnaní s kontrolou.

Obsah peroxidu vodíka a superoxidového radikálu

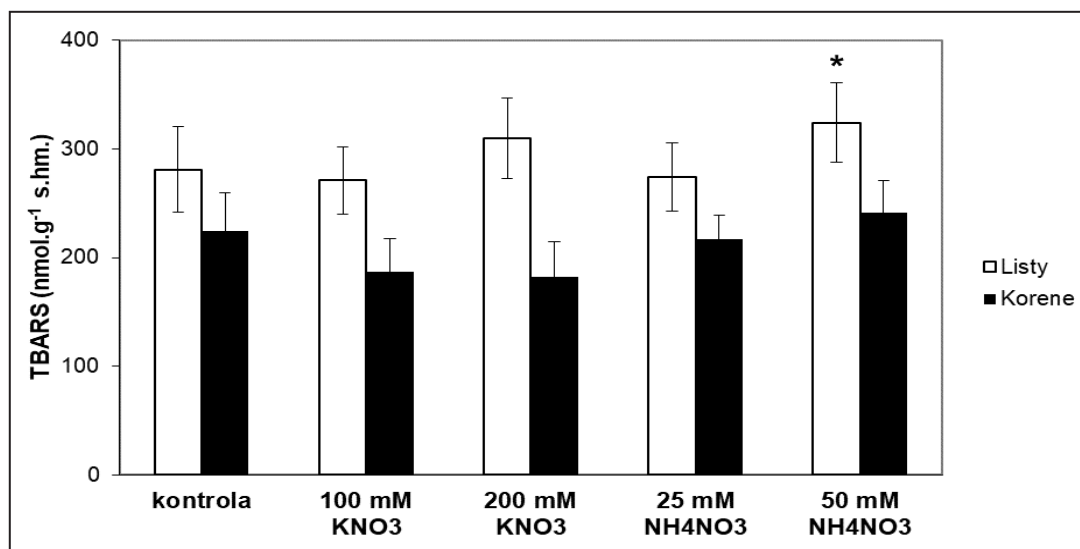
Výsledky v tabuľke 2 poukazujú na výrazný nárast obsahu peroxidu vodíka v listoch a v podzemných častiach *Melissa officinalis* L. v porovnaní s kontrolou. V dôsledku jednotýždňovej aplikácie dusičnanov do hydroponického média bol v listoch evidovaný signifikantný nárast (68,7 ± 6,1 μmol.g⁻¹ s. hm.) obsahu H₂O₂ pri koncentrácii 50 mM NH₄NO₃. V koreňoch so zvyšujúcou sa koncentráciou testovaných roztokov stúpal aj obsah peroxidu

Tab. 2: Priemerný obsah peroxidu vodíka a superoxidového radikálu

Medovka lekárska	Peroxid vodíka	$\mu\text{mol.g}^{-1}$ s. hm.	Superoxid	$\mu\text{g.g}^{-1}$ s. hm.
	Listy	Korene	Listy	Korene
Kontrola	$43,5 \pm 6,5$	$49,5 \pm 6,2$	$37,5 \pm 3,1$	$57,5 \pm 4,9$
100 mM KNO_3	$43,1 \pm 6,7$	$63,1 \pm 6,7^*$	$43,2 \pm 3,2$	$53,2 \pm 6,2$
200 mM KNO_3	$62,1 \pm 5,9^*$	$69,7 \pm 5,9^*$	$48,5 \pm 4,6$	$58,9 \pm 4,6$
25 mM NH_4NO_3	$47,6 \pm 5,2$	$77,2 \pm 6,3^{**}$	$40,6 \pm 3,7$	$61,8 \pm 5,8$
50 mM NH_4NO_3	$68,7 \pm 6,1^{**}$	$85,7 \pm 8,7^{**}$	$52,8 \pm 4,5^*$	$60,4 \pm 4,6$

Obsah peroxidu vodíka ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ s. hm.) a superoxidového radikálu ($\mu\text{g.g}^{-1}$ s. hm.) v nadzemnej/podzemnej časti (listy/korene) *Melissa officinalis* L. vystavenej týždennému pôsobeniu KNO_3 a NH_4NO_3 (K – kontrola, + 100 mM KNO_3 a + 200 mM KNO_3 ; + 25 mM NH_4NO_3 a + 50 mM NH_4NO_3). Údaje zobrazujú priemerné hodnoty a smerodajné odchýlky (n = 3). Údaje v stĺpcoch označené * vykazujú štatisticky významný rozdiel ($P < 0,05$), údaje v stĺpcoch označené ** vykazujú štatisticky významný rozdiel ($P < 0,01$) oproti kontrolnej skupine rastlín.

Graf 1: Obsah rozpustných proteínov



Obsah TBARS (nmol.g^{-1} s. hm.) v nadzemnej/podzemnej časti (listy/korene) *Melissa officinalis* L. vystavenej týždennému pôsobeniu KNO_3 a NH_4NO_3 (K – kontrola, + 100 mM KNO_3 a + 200 mM KNO_3 ; + 25 mM NH_4NO_3 a + 50 mM NH_4NO_3). Údaje zobrazujú priemerné hodnoty a smerodajné odchýlky (n = 3). Údaje v stĺpcoch označené * vykazujú štatisticky významný rozdiel ($P < 0,05$) oproti kontrolnej skupine rastlín.

vodíka. Pri oboch testovaných koncentráciách 25 mM, 50 mM NH_4NO_3 bol tento nárast štatisticky významný. Dokonca pri hladine významnosti $P < 0,01$ oproti kontrole.

Z výsledkov získaných spektrofotometrickým meraním bol pozorovaný štatisticky významný nárast

superoxidového radikálu v listovej ploche pri vyššej testovanej koncentrácii 50 mM NH_4NO_3 (viď tab. 2) v porovnaní s kontrolou ($52,8 \pm 4,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ s. hm.). V koreňoch tento nárast nebol významný ani pri vyšších koncentráciách roztokov dusičnanov.

Tab. 3: Priemerný obsah rozpustných fenolov a flavonoidov

Medovka lekárska	Fenoly	mg.g ⁻¹ s. hm.	Flavonoidy	mg.g ⁻¹ s. hm.
	Listy	Korene	Listy	Korene
Kontrola	32,5 ± 3,1	17,5 ± 1,9	2,8 ± 0,7	0,9 ± 0,0
100 mM KNO ₃	40,6 ± 5,5*	16,8 ± 2,2	2,9 ± 0,6	0,9 ± 0,1
200 mM KNO ₃	59,8 ± 7,5**	18,3 ± 2,1	3,6 ± 0,4 *	1,1 ± 0,3
25 mM NH ₄ NO ₃	41,7 ± 3,8*	15,2 ± 1,6	2,6 ± 0,5	1,0 ± 0,2
50 mM NH ₄ NO ₃	62,7 ± 4,7**	19,3 ± 1,8	3,3 ± 0,5	0,9 ± 0,1

Obsah fenolov a flavonoidov (mg.g⁻¹ s. hm.) v nadzemnej/podzemnej časti (listy/korene) *Melissa officinalis* L. vystavenej týždennému pôsobeniu KNO₃ a NH₄NO₃ (K – kontrola, + 100 mM KNO₃ a + 200 mM KNO₃; + 25 mM NH₄NO₃ a + 50 mM NH₄NO₃). Údaje zobrazujú priemerné hodnoty a smerodajné odchýlky (n = 3). Údaje v stĺpcoch označené * vykazujú štatisticky významný rozdiel (P < 0,05), údaje v stĺpcoch označené ** vykazujú štatisticky významný rozdiel (P < 0,01) oproti kontrolnej skupine rastlín.

Sledovanie lipidovej peroxidácie

V rámci peroxidácie membránových lipidov bol v listoch zaznamenaný nárast obsahu látok reagujúcich s kyselinou tiobarbiturovou (TBA) v porovnaní s kontrolou (viď graf 2). Tento nárast bol štatisticky významný (P < 0,05) pri vyššej testovanej koncentrácii 50 mM NH₄NO₃ (324 ± 32,6 nmol.g⁻¹ s.hm.). V prípade koreňovej časti neboli zaznamenané výrazné zmeny.

Obsah rozpustných fenolov a flavonoidov

Obsah rozpustných fenolov dosahoval v listoch medovky výrazný nárast s rastúcou testovanou koncentráciou 100 mM, 200 mM KNO₃ a 25 mM, 50 mM NH₄NO₃ v hydroponickom médiu (viď tab. 3). Pri vyšších testovaných koncentráciách dusičnanov (200 mM KNO₃, 50 mM NH₄NO₃) bola zaznamenaná hladina štatistickej významnosti P < 0,01. V podzemných častiach rastlín nedošlo k významným zmenám vzhľadom ku kontrole. Obsah flavonoidov v nadzemnej časti rastlín *Melissa officinalis* L. v dôsledku aplikácie dusičnanov do hydroponického média rástol v porovnaní s kontrolou (viď tab. 3). Štatisticky významný nárast flavonoidov bol evidovaný pri najvyššej koncentrácii KNO₃ (P < 0,05). V koreňoch rastlín nedošlo k významným zmenám vzhľadom ku kontrole.

DISKUSIA

Na rastliny vplývajú vonkajšie faktory, ktoré môžu vyvolať stresovú reakciu. Pôsobenie stresových faktorov vedie k aktivácii kompenzačných mechanizmov, ktoré zabráňujú poškodeniu organizmu. V prípade, že intenzita stresového podnetu presiahne úroveň kompenzačných mechanizmov, dochádza k stresovej reakcii. Medzi abiotické faktory, ktoré sú schopné vyvolávať v rastlinách oxidačný stres patria extrémne teploty, nadmerné pôsobenie UV žiarenia, zvýšené pôsobenie svetla, vysoké koncentrácie ťažkých kovov, nedostatok kyslíka, a tiež nadbytok alebo nedostatok dusíka (Hasanuzzaman a kol., 2020).

Dusík patrí medzi životne dôležité prvky. Zabezpečuje správne fungovanie všetkých životných funkcií rastlinného organizmu. Nárast dusičnanov v rastlinách vyvoláva tvorbu génov, ktoré ovplyvňujú celkový rast a vývoj rastliny, či priebeh fotosyntézy. Vyššie množstvo dusičnanov môže v rastlinách vyvolať zmeny v obsahových látkach a fotosyntetických pigmentoch (Petrov a kol., 2015).

V preloženej štúdii bola modelovým objektom hydroponicky kultivovaná medovka lekárska, vystavená pôsobeniu dvoch rôznych koncentrácií KNO₃ a NH₄NO₃, pričom koncentrácia NH₄NO₃

musela byť nižšia ako koncentrácia KNO_3 . Tejto skutočnosti predchádzal experiment, pri ktorom boli použité rovnaké koncentrácie KNO_3 a NH_4NO_3 , a to konkrétne koncentrácie 100 mM a 200 mM. Koncentrácie NH_4NO_3 spôsobili toxicitu rastlín, preto možno usudzovať silnejší vplyv NH_4NO_3 ako stresového faktora na metabolizmus rastlín, v dôsledku prítomnosti dvoch atómov dusíka v molekule, a tým aj silnejšieho vplyvu dusíka na rastlinu.

V rámci fyziologických parametrov bol v medovke lekárskej sledovaný obsah vody. Ten sa mení vplyvom rôznych stresových faktorov (Sharma a kol., 2012). V prípade listovej plochy neboli zaznamenané výrazné zmeny obsahu vody pôsobením dusičnanov. Vplyvom NH_4NO_3 na koreňový systém došlo k poklesu obsahu vody pri vyššej testovanej koncentrácii (50 mM NH_4NO_3), kde jeho hodnota dosiahla 73,1 %. Absorpcia NO_3^- je indukovaná koncentráciou nitrátu v substráte a súčasne podlieha spätnej regulácii vyprodukovaných asimilátov. Vznik salinického stresu je sprevádzaný dehydratáciou a s ňou spojeným znížením obsahu vody v rastlinných pletivách (Mostajeran a kol., 2014). Súčasne došlo ku signifikantnému zvýšeniu množstva rozpustných proteínov v listových pletivách. Zvýšený primárny metabolizmus prebieha v takých rastlinách, ktoré sa na zvýšený obsah solí v pôdnom substráte aklimatizovali. Vyplýva to z vlastností týchto metabolitov podieľať sa na ochrane proteínov, bunkových membrán, likvidovaní ROS, prípadne regulácii osmotickej rovnováhy (Chaves a kol., 2009).

Jedným z dôsledkov abiotického stresu je narušenie rovnováhy medzi tvorbou ROS a antioxidačnými obrannými systémami, ktorého spúšťačom je nadmerné hromadenie ROS. Zaujímavé je, že rovnováha medzi detoxikáciou a tvorbou ROS je udržiavaná tak enzymatickým, ako aj neenzymatickým antioxidačným obranným systémom pod silným environmentálnym stresom. V stresových podmienkach môže nárast ROS prekročiť kapacitu účinnosti antioxidačnej ochrany. Táto nerovnováha môže vyvolať oxidačný stres, ktorý

je jednou z hlavných príčin oxidačného poškodenia biomakromolekúl (Apel, 2004).

Z reaktívnych foriem kyslíka boli sledované peroxid vodíka a superoxidový aniónový radikál. V prípade peroxidu vodíka bol so stúpajúcou koncentráciou dusíka pozorovaný jeho nárast v listovej aj koreňovej časti. Po aplikácii NH_4NO_3 v koreňovej sústave bol zaznamenaný štatisticky významný nárast jeho obsahu s hodnotou $85,7 \mu\text{mol.g}^{-1}$ s. hm. Pri stanovení obsahu superoxidu sme evidovali významný prírastok hlavne v listovej ploche, pri koncentrácii 50 mM NH_4NO_3 . V priebehu ontogenézy sú rastliny vystavované pôsobeniu rôznych abiotických stresových faktorov. Zvýšením intenzity týchto faktorov dochádza v rastlinách k indukciu programovanej bunkovej smrti – apoptóze. Mechanizmus indukcie zahŕňa zvýšenie hladiny ROS, ktoré vplývajú na expresiu viacerých génov. Tým sú zapojené do riadenia rastu, bunkového cyklu a samotnej programovanej smrti buniek (Petrov a kol., 2015). Viaceré štúdie skúmali parametre oxidačného stresu účinkom krátkodobej expozície (6 – 18 hod) stresovým faktorom. Dalo by sa očakávať, že dlhšia expozícia (v našom prípade týždeň) bude viesť k menej výrazným zmenám, a to z dôvodu adaptácie rastlín na stres.

Peroxidácia lipidových membrán vyvolaná ROS vedie k poškodeniu lipidov a funkcie membrán, čo sa prejaví zmenou fluidity a permeability. Malóndialdehyd (MDA) je jedným z konečných produktov peroxidácie polynenasýtených mastných kyselín vo fosfolipidoch (Sharma a kol., 2012). Aj keď sme pozorovali zvýšené hodnoty ROS v listoch aj koreňovej časti, nárast MDA sa výrazne prejavil hlavne v listoch po vystavení vyššej testovanej koncentrácii NH_4NO_3 (50 mM). V súvislosti s oxidačným stresom a rizikom neurodegeneratívnych ochorení sa Pereira a kol. (2009) zaoberali štúdiom antioxidačnej aktivity *Melissa officinalis* L. v podmienkach *in vivo* s využitím TBARS metódy. Vodný extrakt medovky lekárskej vykazoval vysokú aktivitu proti tvorbe TBARS produktov. Zaujímavé je aj poznanie, že inhibícia peroxidácie lipidov v spojení

s extraktmi medovky lekárskej mala vzťah aj s jej obsahom fenolových zlúčenín.

Oxidačný stres predstavuje nerovnováhu medzi oxidantmi a antioxidantnými ochrannými systémami v prospech oxidantov (Katalinic a kol., 2006). V rámci vyváženého stavu potencuje zvýšená tvorba voľných radikálov aktiváciu ochranných mechanizmov. To sa potvrdilo aj v našom prípade, kedy sme na základe zvýšenej produkcie peroxidu vodíka a superoxidu (vplyvom pôsobenia stresových faktorov KNO_3 , NH_4NO_3) pozorovali aj zvýšený obsah rozpustných fenolov a flavonoidov. V prípade fenolov sa ich obsah v listovej ploche zvyšoval s rastúcou testovanou koncentráciou dusičnanov. Namerané hodnoty predstavujú dokonca štatisticky významný rozdiel. Aj Atanassova a kol. (2011) sa v rámci svojej štúdie zaoberali stanovením obsahu celkových rozpustných fenolov a flavonoidov v rastlinách čeľade *Lamiaceae*. Z troch sledovaných rastlín (*Melissa officinalis*, *Salvia officinalis*, *Mentha piperitae*) bol najvyšší obsah týchto fytochemických látok práve v suchom materiáli *Melissa officinalis* L. Prítomnosť fenolových látok v rastlinách priaznivo ovplyvňuje ich antioxidačnú aktivitu. Súvisí to najmä s ich schopnosťou vychytávať voľné radikály a vytvárať cheláty s kovmi (Castrica a kol., 2019).

ZÁVER

Medovka lekárska je viacročná rastlina, ktorá sa vyznačuje mnohými terapeutickými účinkami. Aplikáciou zvýšenej koncentrácie dusičnanov došlo k poklesu obsahu vody a k nárastu obsahu peroxidu vodíka v koreňovej sústave. Obsah rozpustných proteínov a superoxidového aniónu bol vyšší v nadzemnej časti liečivej rastliny. K zvýšeniu reaktívnych foriem kyseliny tiobarbiturovej ako indikátorov lipidovej peroxidácie došlo opäť v listovej časti rastliny. Nárast dusičnanov v hydroponickom médiu viedol k významnému nárastu obsahu rozpustných fenolov aj flavonoidov v listových pletivách. Získané výsledky štúdie naznačujú, že príjem vyššieho množstva dusíka spôsobuje nárast

antioxidačnej aktivity v prospech medovky lekárskej.

POĎAKOVANIE

Táto práca sa uskutočnila v rámci riešenia projektu Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky KEGA č. 010UVLF-4/2021.

ZOZNAM LITERATÚRY

Apel, K., Hirt, H.: Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal trasduction. *Annal Review of Plant Biology*, 2004, 55, 373 – 399.

Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C.: Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 2002, 82 (10), 1227 – 1238.

Atanassova, M., Georgieva, S., Ivancheva, K.: Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology & Metallurgy*, 2011, 46 (1), 81 – 88.

Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method fot the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72, 248 – 254.

Castrica, M., Rebucci, R., Giromini, C., Tretola, M., Cattaneo, D., Baldi, A.: Total phenolic content and antioxidant capacity of agri-food waste and by-products. *Italian Journal of Animal Science*, 2019, 18 (1), 336 – 341.

Elstner, E. F., Heupel, A.: Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Analytical Biochemistry*, 1976, 70, 616 – 620.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C.: *Free radicals in biology and medicine*. 5th edn. New York: Oxford University Press, 2015. 881 p.

Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., Fotopoulos, V.: Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress:

revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 2020, 9 (8), 681.

Hoagland, D. R., Arnon, D. I.: The water-culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experiment Station Circular*, 1950, 347, 1 – 32.

Chaves, M. M., Flexas, J., Pinheiro, C.: Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 2009, 103, 551 – 560.

Kalyanaram, B.: Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox biology*, 2013, 1 (1), 244 – 257.

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M.: Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food chemistry*, 2006, 94 (4), 550 – 557.

Kováčik, J.: *Stresová fyziológia rastlín* [Stress physiology of plants]. Košice: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, 2012. 50 s.

Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., Suzuki, A.: Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of botany*, 2010, 105 (7), 1141 – 1157.

Mostajeran, A., Gholaminejad, A., Asghari, G.: Salinity alters curcumin, essential oil and chlorophyll of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2014, 9 (1), 49.

Pereira, R. P., Fachineto, R., de Souza Prestes, A., Puntel, R. L., Da Silva, G. N. S., Heinzmann, B. M., Rocha, J. B. T.: Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*, *Neurochemical research*, 2009, 34 (5), 973 – 983.

Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B., Gechev, T. S.: ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in plant science*, 2015, 6, 69.

Repčák, M., Bačkor, M., Paľove-Balang, P., Gajdošová, S.: *Návody na cvičenia z fyziológie rastlín* [Instructions for exercises in plant physiology]. 4. vyd. Košice: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, 2015. 31 – 32.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M.: Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 26.

Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Stitt, M.: Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiology*, 2004, 136 (1), 2483 – 2499.



DISPENZÁCIA VYBRANÝCH VETERINÁRNYCH LIEKOV ZO SKUPINY TETRACYKLÍNŮV

DISPENSING OF SELECTED VETERINARY MEDICINES FROM THE CLASS OF TETRACYCLINES

Kľoc, Dominik¹; Váczi, Peter²; Suchovič, Radoslav^{3, 4}

¹Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky

²Katedra farmakológie a toxikológie

³Katedra lekárenstva a sociálnej farmácie

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach,

Komenského 73, 041 81 Košice

Slovenská republika

⁴Farmaceutická fakulta, Masarykova univerzita, Palackého Třída 1946/1, 612 00 Brno

Česká republika

dominik.kloc@uvlf.sk

ABSTRAKT

Výdaj lieku v lekárni je spojený s poskytnutím relevantných informácií o jeho používaní, dávkovaní a možných rizikách – teda s dispenzáciou. Nakoľko sa sortiment lekární rozrášťa aj o veterinárne lieky, poradenská a konzultačná činnosť má význam nielen pri humánných, ale aj veterinárnych prípravkoch. Zámerom tohto článku je prezentovať najdôležitejšie informácie o antibiotikách zo skupiny tetracyklínov používaných v prevencii a terapii chorôb zvierat, a to z pohľadu poradenskej a konzultačnej činnosti farmaceuta.

Tetracyklínové antibiotiká patria k liečivám, ktoré sa pomerne často používajú aj pre potravinové zvieratá, nevyhnuté sa ani intenzívnym veľkochovom. Preto v štúdiu kladieme dôraz aj na tzv. ochranné lehoty, na ktoré je potrebné chovateľov upozorniť. Netreba zabúdať, že tak ako pri všetkých antibiotikách, aj výdaj tetracyklínov je viazaný na veterinárny lekárske predpis. Zaujímavým je porovnanie dispenzácie humánných a veterinárnych liekov s prihliadnutím na isté špecifiká. Význam poradenskej a konzultačnej činnosti je zvlášť dôležitý pri veterinárnych liekoch, ktoré podáva majiteľ, resp. chovateľ zvierat. Práve takéto

lieky sú predmetom nášho článku.

Prehľadné spracovanie základných informácií potrebných k dispenzácií veterinárnych tetracyklínov do tabuľkovej formy, ako aj názorné ukážky kompletnej dispenzácie by mali pomôcť farmaceutovi lepšie sa zorientovať v množstve faktov, ktoré sú uvedené v príbalovej informácii, prípadne v súhrne charakteristických vlastností veterinárneho lieku. To zaručí nielen uľahčenie práce farmaceutovi, poskytnutie kvalitného poradenstva, ale i úspech v terapii a v konečnom dôsledku aj spokojnosť chovateľa.

Kľúčové slová: antibiotiká; dispenzácia; tetracyklíny; veterinárne lieky

ABSTRACT

Dispensing medicine in a pharmacy is associated with the provision of relevant information on its use, dosage and possible risks – dispensation. As the range of pharmacies is also expanding with veterinary medicines, advisory and consulting activities are important not only for human but also veterinary preparations. The purpose of this article is to present the most important information about tetracycline antibiotics used in the prevention and treatment of animal diseases, in terms of advisory and consulting activities of a pharmacist.

Tetracycline antibiotics are among the drugs that are quite often used for food-producing animals, not excluding even intensive large-scale farming. Therefore, in our study we place emphasis on the so-called withdrawal periods which need to be brought to the attention of the owners. It should not be forgotten that, as with all antibacterial agents, dispensing of tetracyclines is joint to veterinary prescription. It is interesting to compare dispensation of human and veterinary drugs with regard to certain specifics. The importance of advisory and consulting activities is especially important for veterinary drugs

administered by the owner and animal breeder respectively. It is such drugs that are the subject of our article.

The transparent processing of the basic information needed to dispense the veterinary tetracyclines in table form, as well as illustrative examples of complete dispensing, should help the pharmacist to better understand a number of facts, which are given in the package leaflet or in the summary of veterinary product characteristics. This will guarantee not only the facilitation of the pharmacist's work, the provision of quality counselling, but also success in therapy and, ultimately, owner's satisfaction.

Key words: antibiotics; dispensing; tetracyclines; veterinary drugs

ÚVOD

Základnou a najdôležitejšou pracovnou úlohou farmaceuta je poskytovanie konzultačnej a poradenskej činnosti. Podanie správnej informácie o užívaní, dávkovaní a skladovaní liekov je základnou podmienkou účinnej a bezpečnej terapie ľudí a zvierat. Táto poradenská činnosť sa nazýva dispenzácia, ktorú definuje vyhláška MZ SR č. 129/2012 Z. z. o požiadavkách na správnu lekárenskú prax:

„Dispenzácia je informačná a poradenská činnosť o liekoch, zdravotníckych pomôckach a dietetických potravinách, ktorú vykonávajú osoby oprávnené vydávať lieky, zdravotnícke pomôcky a dietetické potraviny pre pacientov.“

„Informácie a rady sa podávajú tak, aby sa dodržala účinnosť a bezpečnosť liečby liekmi, zdravotníckymi pomôckami a dietetickými potravinami.“

Dispenzácia veterinárneho lieku musí byť poskytnutá odborne, ale takým štýlom jazyka, aby majiteľ zvierat pochopil všetky náležitosti súvisiace s jeho podaním. Dispenzácia veterinárnych liekov a prípravkov sa výrazne odlišuje od dispenzácie humánnych liekov. Súvisí to s liekovou formou, spôsobom a miestom podania lieku a medzidruho-

vými rozdielmi. Ďalším špecifikom pri dispensácii veterinárnych liekov je dávkovanie a ochranná lehota.

Ochrannú lehotu definuje zákon NR SR č. 362/2011 Z. z. o liekoch a zdravotníckych pomôckach a o zmene a doplnení niektorých zákonov:

„Ochranná lehota je lehota medzi posledným podaním veterinárneho lieku potravinovému zvieraťu za zvyčajných podmienok používania a výrobou potravín z tohto zvieraťa, aby sa zabezpečilo, že potraviny z neho neobsahujú rezíduá liečiv v množstve prekračujúcom najvyššie povolené limity ustanovené osobitným predpisom.“

Všetky tieto informácie by mal farmaceut podať majiteľovi zvieraťa pri výdaji lieku.

Cieľom tejto štúdie bolo spracovať prehľad informácií o veterinárnych antibiotikách zo skupiny tetracyklínov, ktoré sú potrebné pri správnej dispensácii a výdaji lieku. Informácií v príbalových letákoch a v Súhrne charakteristických vlastností liekov (SPC) je príliš veľa. V lekárenskej praxi pri výdaji lieku nie je čas na ich komplexné študovanie, pričom aj samotná orientácia v nich nie je ľahká. Zámerom tohto článku je zjednodušiť, skvalitniť a urýchliť poskytovanie informačnej a poradenskej činnosti pri výdaji veterinárnych liekov a prípravkov a napomôcť tak pri ich výdaji a poskytovaní poradenskej činnosti.

MATERIÁL A METÓDY

Primárnym zdrojom informácií v tejto štúdii bolo Vademecum veterinárnych liekov a prípravkov v Slovenskej republike (2017), v ktorom sme vyhľadali preparáty s obsahom veterinárnych tetracyklínov. Informácie o liekoch sme získavali zo súhrnov charakteristických vlastností lieku (SPC) a písomných informácií pre používateľa veterinárneho lieku (PIL) z webovej stránky Ústavu štátnej kontroly veterinárnych biopreparátov a liečiv (ÚŠKVBL).

Formou tabuľky sme vytvorili prehľad základných informácií potrebných k dispensácii veterinárnych liekov s obsahom tetracyklínov. Lieky v týchto tabuľkách sú rozdelené podľa liečiva, liekovej

formy a druhu zvieraťa, pre ktorý je liek určený. Do prehľadu neboli zahrnuté lieky, ktoré podáva výhradne veterinárny lekár (napr. injekcie, infúzie a pod.).

Príklady detailnej dispensácie obsahujú súbor základných informácií o lieku, v ktorom sú uvedené liečivá a ich množstvo v prípravku, druh zvieraťa, pre ktoré je liek určený, indikácie, základné 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

Informácie a rady poskytované pri výdaji humánneho lieku sa najčastejšie týkajú podmienok správneho užívania, interakcií, kontraindikácií, nežiaducich účinkov, prevencie ochorení, životného štýlu, prípadne výsledkov skríningových vyšetrení v lekárni. Poradenská činnosť pri výdaji veterinárneho lieku sa výrazne líši od dispensácie humánnych liekov a prípravkov. Rozdielnosť je podmienená viacerými faktormi.

Medzidruhové rozdiely

Hlavným rozdielom sú anatomické a fyziologické medzidruhové rozdiely. Dĺžka liečby, dávka a spôsob podania toho istého lieku sa môžu líšiť v závislosti od druhu zvieraťa. Príkladom je kontraindikované podanie tetracyklínov zvieratám s vyvinutými predžalúdkami (hovädzí dobytok) (http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/doxipan_mix_100_prm.doc).

Ochranná lehota

Ďalším špecifikom, ktoré súvisí z rozdielnou dispensáciou, je kategória liečených zvierat. Pri podávaní liekov zvieratám, ktorých produkty sú určené pre ľudskú spotrebu, sa uplatňuje ochranná lehota. Najčastejšie sa jedná o mäso, vnútornosti, vajcia, mlieko a mliečne výrobky. Ochranná lehota je čas medzi posledným podaním veterinárneho

lieku potravinovému zvierat'u a výrobou potravín z tohto zvierat'a. Poskytnutie informácie chovateľovi zvierat'a o ochrannej lehote je jednou z najdôležitejších častí dispenzácie veterinárnych liekov. Dodržiavaním ochrannej lehoty sa zabezpečí, že potraviny z liečených zvierat neobsahujú reziduá liečiv v množstve prekračujúcom najvyššie povolené limity (Zákon NR SR č. 362/2011 Z. z.). Reziduá liečiv sa nachádzajú aj v maštal'nom hnoji. Preto pri niektorých liekoch sa musí hnoj na určitý čas uchovať pred jeho použitím (http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/nuflor_40mg-g_prm.doc).

Spôsob podania lieku

Jednou z odlišností je aj spôsob podania lieku. Veterinárne lieky je možné na rozdiel od humánnych podať aj hromadne, t. j. vypočítané množstvo lieku sa podá väčšej skupine zvierat (kŕdľu, stádu a pod.) zamiešané v krmive alebo v pitnej vode. Týmto spôsobom, ktorý je často využívaný vo veľkochovoch, sa liečia všetky jedince v skupine (Lamka a kol., 2014). Farmaceut by mal poskytnúť majiteľovi zvierat'a informáciu o spôsobe aplikácie, či daný liek je možné podať len individuálne alebo aj hromadne. Perorálne lieky u ľudí sa podávajú najčastejšie priamo bez potreby ďalších pomôcok. Podanie perorálneho lieku zvierat'u si niekedy vyžaduje použitie aplikačnej pomôcky. Napr. perorálne pasty sa najčastejšie podávajú pomocou tuby/striekačky s piestom. Farmaceut by mal chovateľa na túto skutočnosť upozorniť, prípadne názorne ukázať ako s tubou pracovať, aké množstvo lieku uvoľniť a ako nasmerovať striekačku pri aplikácii do ústnej dutiny. Pri infekčných ochoreniach je potrebné chovateľovi zdôrazniť, aby nepoužil tú istú striekačku pre liečbu viacerých jedincov. Premixy, prášky a perorálne roztoky sa podávajú v miskách, žľaboch alebo kŕmidlách. Pri tetracyklínoch je dôležité vyhnúť sa podaniu týchto liekov v korodovaných miskách a žľaboch, aby bola zabezpečená účinná antimikrobiálna terapia (Hederová a kol., 2017).

Lieková forma

Dispenzácia veterinárnych liekov sa odlišuje aj v závislosti od liekovej formy. Preferované, resp. najviac používané liekové formy vo veterinárnej medicíne sa líšia od liekových foriem preferovaných pri liečbe ľudí. Pri humánnych liekoch sú to jednoznačne tablety, ktoré sa zapijú malým množstvom vody. Pri liečbe zvierat ide hlavne o prášky, premixy, roztoky a zriedkavejšie tablety. Premix je špecifická lieková forma, ktorá sa používa výhradne vo veterinárnej medicíne. Ide o prášky alebo granuláty, ktoré sa zamiešavajú do krmiva a najčastejšie sa podávajú hromadne. Pri ich výdaji by mal farmaceut majiteľa upozorniť na správne zamiešanie lieku v pitnej vode alebo v krmive, na dobu použiteľnosti po zamiešaní, resp. ako často je potrebné medikované krmivo/vodu meniť. Pri terapii je medikované krmivo/voda jediným zdrojom potravy/pitnej vody a je potrebné dohliadať, aby boli spotrebované celé (Hederová a kol., 2017; http://www2.uskvbl.sk...pulmodox_500mg-g_prm.doc).

Dávkovanie

Dôležitou súčasťou poradenskej činnosti je informácia o dávkovaní lieku. Dávka veterinárnych liekov sa určuje najčastejšie podľa živej hmotnosti zvierat'a, ktorá má byť stanovená čo najpresnejšie. Pri určovaní dávky lieku je potrebné dbať na zabezpečenie správnej koncentrácie liečiva v krmive/pitnej vode a zohľadniť aj ich denný príjem zvieratami. Farmaceut by mal chovateľa upozorniť na jednotlivú dávku, prípadne vypočítať potrebné množstvo lieku pre zviera s určitou hmotnosťou, aby bolo zachované správne dávkovanie (Hederová a kol., 2017).

Ochranné pracovné prostriedky

Farmaceut je povinný informovať majiteľa zvierat'a, že pri zamiešavaní prášku, granulátu do krmiva alebo pri akejkoľvek manipulácii s liekom je potrebné použiť ochranné pracovné prostriedky ako respirátor, rukavice, ochranné okuliare, prípadne ochranný plášť. S niektorými liekmi (lieky s obsahom tetracyklínov) by nemali manipulovať, podávať a

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

Názov lieku	Lieková forma	Druh zvierat	Indikácie	Základné informácie potrebné k dispenzácii
AMIX VET D, DOXIPAN MIX, DOXYGAL SP, DOXYPREX, DOXYVIT a iné	premix	ošípané	liečba a prevencia respiračných infekcií spôsobených baktériami citlivými na doxycyklín	Je potrebné sa vyhýbať podávaniu produktov obsahujúcich ióny Ca^{2+} a Mg^{2+} a ostatných dvojmocných kationov. Tehotné ženy by sa mali vyhýbať manipulácii s liekom. Nepodávať v korodovaných žľaboch a nepodávať napájaciami, ktoré môžu oxidovať. Roztok/krmivo je potrebné pripraviť každý deň čerstvé. Nepodávať vtákom produkujúcim vajcia na ľudskú spotrebu.
AMIX VET D	prášok	ošípané		
CENTIDOX		ošípané, teľatá		
DFV DOXIVET		teľatá, ošípané, kura domáca		
DOXIPAN		kura, morky, teľatá, ošípané		
DOXYGAL 50		ošípané, teľatá, králiky, hydina		
DOXYGAL 400 a iné		kura domáca, ošípané		
RONAXAN 20, RONAXAN 100	tablety	psy a mačky		podávať s krmivom po dobu 5 až 10 dní

Zdroj: spracované podľa SPC z webovej stránky ÚŠKVBL

Tab. 2: Základné informácie potrebné k dispenzácii veterinárnych liekov s obsahom chlór-tetracyklínu

Názov lieku	Lieková forma	Druh zvierat	Indikácie	Základné informácie potrebné k dispenzácii
AMIX vet CTC	premix	ošípané	septikémie, gastritídy, enteritídy, bronchitídy, pneumónie, pleuritídy, peritonitídy	Nepodávať nosniciam, ktorých vajcia sú určené na ľudský konzum. Tehotné ženy by sa mali vyhýbať manipulácii s liekom. Je potrebné sa vyhýbať podávaniu dvojmocných kationov. Denná dávka premixu sa podá 2 x denne v 12 h intervaloch. Prášky AUREOVIT a MEDITEK sa podávajú len individuálne.
AUREOFARM		ošípané, teľatá, kurčatá		
AUREOGAL		ošípané		
AUREOVIT		ošípané, teľatá, hydina		
AMIX VET CTC 150/1000	prášok	ošípané		
AUREOGAL		ošípané, jahňatá, teľatá, hydina		
AUREOVIT		ošípané, teľatá, hydina		
CHLOROMED		teľatá		
MEDITEK		ošípané, brojlery		

Zdroj: spracované podľa SPC z webovej stránky ÚŠKVBL

Tab. 3: Základné informácie potrebné k dispenzácii veterinárnych liekov s obsahom oxytetracyklínu a tetracyklínu

Názov lieku	Lieková forma	Druh zvierat	Indikácie	Základné informácie potrebné k dispenzácii
Oxytetracyklín				
EGOCIN	premix	kura domáca, morky, ošípané, teľatá	septikémia, infekcie gastrointestinálnej, respiračnej, urogenitálnej sústavy	Liek sa podáva perorálne zamiešaný v krmive. Nepodávať v korodovaných žľaboch a v poslednej tretine gravidity a nosniciam.
OXYPHARM	prášok	ošípané, teľatá, hydina, holuby, exotické vtáctvo, králiky, psy, mačky	liečba septických stavov a orgánových infekcií, u vtákov liečba infekcií respiračného traktu	Liek sa podáva v pitnej vode alebo v kašovitom krmive. Medikovaný roztok/krmivo je potrebné spotrebovať do 24 h. Dávka a dĺžka liečby závisí od druhu zvierat'a a infekcie.
Tetracyklín				
TETRACYKLIN PG	prášok	kurčatá, morky, ošípané, teľatá, psy a mačky	respiračné a gastrointestinálne infekcie, sekundárne infekcie pri vírusovej psinke a leptospiroze psov	Podáva sa 30 mg/kg 2 x denne po dobu najmenej 5 dní. Pri ťažkých stavoch je možné počiatočnú dávku zdvojnásobiť.

Zdroj: spracované podľa SPC z webovej stránky ÚŠKVBL

prísť do kontaktu tehotné a dojčiace ženy (http://www.uskvbl.sk...aureovit_12_c80_plv_sol.doc).

So všetkými týmito špecifikami dispenzácie veterinárnych liekov a prípravkov sa farmaceut v praxi stretne zriedkavo a nemá dostatočné skúsenosti pre jej zabezpečenie. Z tohto dôvodu sme sa aj takouto formou snažili množstvo dostupných informácií a odporúčaní sprehľadniť a zjednodušiť tak prácu farmaceutovi.

Tabuľky so základnými informáciami potrebnými k dispenzácii

Pre jednoduchšie orientovanie sa v množstve liekov sme vytvorili tabuľky, v ktorých sa nachádzajú základné informácie k podaniu dispenzácie na lieky obsahujúce doxycyklín (viď tab. 1), chlór tetracyklín (viď tab. 2), oxytetracyklín a tetracyklín (viď tab. 3).

V týchto tabuľkách si farmaceut vie rýchlo nájsť liek podľa liečiva a liekovej formy.

Príklady detailnej dispenzácie

Tu uvádzame niekoľko príkladov kompletnej dispenzácie, ktorá obsahuje všetky informácie potrebné k podaniu kvalitnej poradenskej činnosti a má zaručiť bezpečnú a účinnú farmakoterapiu zvierat.

EGOCIN 200 mg/g premix na medikáciu krmiva

Liečivo: 1 g premixu obsahuje 200 mg hydrochloridu oxytetracyklínu.

Druh zvierat: kura domáca, morky, ošípané, teľatá.

Indikácie: septikémia, liečba infekcií gastrointestinálnej, respiračnej, urogenitálnej sústavy spôsobených mikroorganizmami citlivými na oxytetracyklín.

Kontraindikácie: nepodávať pri poškodení obličiek a dospelým bylinožravcom.

Osobité bezpečnostné opatrenia: liek nepodávať s mliekom.

Nežiaduce účinky: gastrointestinálne poruchy a zriedkavo fotosenzitívna reakcia.

Použitie počas gravidity: nepodávať v poslednej tretine gravidity a nosniciam, ktorých vajcia sú určené na ľudskú spotrebu.

Spôsob podania lieku: liek sa podáva perorálne zamiešaný do krmiva.

Dávkovanie: kura domáca a morky 19 mg/kg/deň počas 4 – 5 dní, ošípané pri liečbe leptospirózy 19 mg/kg/deň počas 7 – 14 dní a pri ostatných indikáciách 20 – 30 mg/kg/deň počas 4 – 5 dní, teľatá 20 – 30 mg/kg/deň počas 4 – 5 dní.

Ochranná lehota: mäso a vnútornosti 10 dní.

Čas použiteľnosti: v pôvodnom obale 3 roky, po prvom otvorení a po zamiešaní do krmiva 3 mesiace (http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/egocin_200mg-g_prm.doc).

OXYPHARM 110 mg/g prášok na perorálny roztok

Liečivo: 1 g lieku obsahuje 110 mg hydrochloridu oxytetracyklínu.

Druh zvierat: ošípané, teľatá, hydina, holuby, exotické vtáctvo, králiky, psy, mačky.

Indikácie: ošípané, teľatá, psy, mačky, králiky: liečba septických stavov a orgánových infekcií ako enteritídy, gastritídy, pneumónie, septikémie, peritonitídy; hydina, holuby a exotické vtáctvo liečba infekcií respiračného traktu: hemofilová nádcha, pasteurelóza, mykoplazmóza, sinusitída, bronchitída.

Kontraindikácie: nepodávať prežúvavcom s rozvinutým žalúdkom a zvieratám s poškodenou pečeňou a obličkami.

Použitie počas gravidity: len po posúdení prínosu/rizika veterinárnym lekárom.

Spôsob podania lieku: liek sa podáva perorálne, rozpustený v pitnej vode alebo zamiešaný v kašovitom krmive. Pripravený roztok je potrebné spotrebovať do 24 hodín.

Dávkovanie: ošípané 3 – 4 g lieku/10 kg ž. hm., teľatá 2 – 3 g lieku/10 ž.hm., králiky 10 g lieku/1 l pitnej vody, hydina 2,5 – 5 g lieku/1 l pitnej vody, holuby a exotické vtáky 20 g lieku/1 l pitnej vody, pes, mačka a kožušinové zvieratá 0,5 g lieku/kg ž. hm.

Ochranná lehota: mäso a vnútornosti 7 dní. Nepodávať nosniciam, ktorých vajcia sú určené na ľudský konzum a holubom, ktorých mäso je určené na ľudský konzum.

Čas použiteľnosti: v pôvodnom obale 2 roky, po zamiešaní lieku do vody/krmiva 24 hodín (http://www.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/07/oxypharm_110mg-g_sol.doc).

TETRACYKLIN PG 120 mg/g prášok na perorálny roztok

Liečivo: 120 mg hydrochlorid tetracyklínu na 1 g prášku.

Druh zvierat: kurčatá, morky, ošípané, teľatá psy a mačky.

Indikácie: pneumónie, bronchitídy a enteritídy prasiat a teliat, respiračné a gastrointestinálne bakteriálne infekcie hydiny, psov a mačiek, sekundárne infekcie pri vírusovej psinke a leptospiróze psov.

Kontraindikácie: poškodenie pečene a obličiek.

Spôsob podania lieku: liek sa má rozpustiť najprv v menšom množstve vody a následne sa nariedi na potrebný objem. V krmive musí byť dôkladne zamiešaný.

Dávkovanie: 30 mg/kg 2 krát denne, po dobu najmenej 5 dní. Pri ťažkých stavoch je možné počiatočnú dávku zdvojnásobiť.

Ochranná lehota: mäso a orgány 10 dní, nepodávať nosniciam, ktorých vajcia sú určené na ľudský konzum.

Čas použiteľnosti: v neporušenom obale 2 roky (http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/05/tetracyklin_pg_120mg-g_plv_sol.doc).

RONAXAN 20 mg tablety, RONAXAN 100 tbl. ad us. vet.

Liečivo: jedna tableta obsahuje 20 mg alebo 100 mg doxycyklínu.

Druh zvierat: 20 mg tablety sú určené pre psy a mačky a 100 mg len pre psy.

Použitie počas gravidity: neodporúča sa užívať počas gravidity. Počas laktácie len po zhodnotení terapeutického prínosu a rizika lieku zodpovedným veterinárnym lekárom.

Spôsob podania lieku: tablety sa podávajú perorálne s potravou, aby sa predišlo prípadným tráviacim poruchám.

Dávkovanie: 10 mg/kg/deň. Pri akútnych formách ochorenia po dobu 5 dní, pri chronických ochoreniach 10 dní.

Čas použiteľnosti: 3 roky v pôvodnom obale (http://www2.uskvbl.sk...ronaxan_20mg_tbl.doc, http://www2.uskvbl.sk...ronaxan_100mg_tbl.doc).

ZÁVER

V tejto štúdii sú uvedené informácie o podávaní veterinárnych liekov zo skupiny tetracyklínových antibiotík, ktoré aplikuje majiteľ zvierat'a. Lieky a prípravky, ktoré aplikuje veterinárny lekár, nie sú predmetom predloženej štúdie.

Informácie a rady farmaceuta sú podstatnou súčasťou bezpečnej a účinnej farmakoterapie zvierat'a. Aj keď chovateľ dostane usmernenie o užívaní lieku od veterinárneho lekára, liek sa k nemu dostane až pri výdaji v lekární a častokrát je potrebná názorná ukážka správneho podania lieku. Napríklad použitie aplikačnej pomôcky alebo spôsob prípravy medikovanej krmnej zmesi.

Prehľadne zostavené dispensácie sú dôležité pre rýchlejšie a jednoduchšie zorientovanie sa pri výdaji lieku. Táto štúdia by mala slúžiť ako pomôcka pri expedovaní tetracyklínových antibiotík podávaných majiteľom zvierat'a a poskytovaní poradenskej činnosti o najčastejšie vydávaných veterinárnych antibiotikách.

ZOZNAM LITERATÚRY

Hederová, J. a kol.: *Vademecum veterinárnych liekov a prípravkov v Slovenskej republike*

[Vademecum of veterinary drugs and preparations in the Slovak republic]. Bratislava: Pro-Trade, s.r.o., 2017. 1147 s.

Lamka, J., Ducháček, L.: *Veterinárni léčiva pro posluchače farmacie* [Veterinary Drugs for Students of Pharmacy]. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2014. 152 s.

ÚŠKVBL (SPC) – AMIX vet CTC 150 mg/g perorálny prášok. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/amix_vet_ctc_150mg_g_plv.doc. [cit. 20.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – AMIX vet CTC 1000 mg/g perorálny prášok. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/amix_vet_ctc_1000mg_g_plv.doc. [cit. 20.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – AMIX vet CTC 150 mg/g premix na medikáciu krmiva. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/amix_vet_ctc_150mg_g_prm.doc. [cit. 20.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – Amix vet D 500 mg/g premix na medikáciu krmiva. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/amix_vet_d_500mg-g_prm.doc. [cit. 20.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – Amix vet D 500 mg/g prášok na perorálny roztok. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/amix_vet_d_500mg-g_plv.sol_.doc. [cit. 20.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – AUREOFARM 80mg/g premix na medikáciu krmiva. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/aureofarm_80mg-g_prm.doc. [cit. 20.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – AUREOGAL 160 mg/g prášok na perorálny roztok. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/10/aureogal_160mg-g_plv_sol.doc. [cit. 20.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – AUREOGAL 160 mg/g premix na medikáciu krmiva. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/10/aureogal_160mg-g_prm.doc. [cit. 20.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – AUREOVIT 12 „C160“ premix na medikáciu krmiva. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/aureovit_12_c160_prm.doc. [cit. 20.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – AUREOVIT 12 „C80“ perorálny prášok. http://www.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2021/03/aureovit_12_c80_plv_sol.doc. [cit. 20.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – AUREOVIT 12 „C80“ premix na medikáciu krmiva. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/aureovit_12_c80_prm.doc. [cit. 20.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – Centidox 1000 mg/g, prášok na podanie v pitnej vode alebo v mlieku (náhrade) pre hovädzí dobytok a ošípané. http://www.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/07/centidox_1000mg-g_plv.doc. [cit. 25.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – DFV DOXIVET 500 mg/g, prášok na prípravu perorálneho roztoku s pitnou vodou pre ošípané a kurčatá. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/dfv_doxivet_500mg-g_plv_sol.doc. [cit. 25.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – Doxipan 200 mg/g prášok na perorálny roztok. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/doxipan_200_mg-g_plv_sol.doc. [cit. 25.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – DOXIPAN MIX 100 mg/g premix na medikáciu krmiva. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/doxipan_mix_100_prm.doc. [cit. 25.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – DOXYGAL 400 mg/g prášok na perorálny roztok. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/doxygal_400mg-g_plv_sol.doc. [cit. 25.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – DOXYGAL 50 mg/g prášok na perorálny roztok. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/doxygal_50mg-g_plv_sol.doc. [cit. 25.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – Doxyprex 100 mg/g premix na medikovanie krmiva pre ošípané (odstavčatá). http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/doxyprex_100mg-g_prm.doc. [cit. 25.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – DOXYVIT 100 mg/g premix na medikáciu krmiva pre ošípané. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2021/01/doxyvit_100mg-g_prm.doc. [cit. 25.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – DOXYVIT 100 mg/g

vodorozpustný prášok. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2021/01/doxyvit_100_mg-g_plv_sol.doc. [cit. 25.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – EGOGIN 200 mg/g premix na medikáciu krmiva. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/egocin_200mg-g_prm.doc. [cit. 15.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – Chloromed 150 mg/g prášok na perorálne použitie pre teľatá. http://www.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/07/chloromed_150mg-g_plv.doc. [cit. 14.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – MEDITEK AMOX 500 mg/g prášok na perorálny roztok. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/meditek_amox_500mg-g_plv_sol.doc. [cit. 17.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – MEDITEK CTC 150 mg/g perorálny prášok. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2021/02/meditek_ctc_150mg-g_plv.doc. [cit. 20.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – MEDITEK DOX 100 mg/g prášok na perorálny roztok. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/meditek_dox_100mg-g_plv_sol.doc. [cit. 17.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – NUFLOR 40 mg/g premix na medikovanie krmiva pre ošípané. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/nuflor_40mg-g_prm.doc. [cit. 19.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – OXYPHARM 110 mg/g prášok na perorálny roztok. http://www.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/07/oxypfarm_110mg-g_sol.doc. [cit. 15.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – Pulmodox 500 mg/g premix na medikáciu krmiva. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/06/pulmodox_500mg-g_prm.doc. [cit. 19.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – RONAXAN 100 tbl. ad us. vet., http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/10/ronaxan_100mg_tbl.doc. [cit. 16.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – RONAXAN 20 mg tablety. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/10/ronaxan_20mg_tbl.doc. [cit. 16.3.2021].

ÚŠKVBL (SPC) – TETRACYKLIN PG

120 mg/g prášok na perorálny roztok. http://www2.uskvbl.sk/wp-content/uploads/2020/05/tetracyklin_pg_120mg-g_plv_sol.doc. [cit. 19.3.2021].

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. 28. 3. 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, § 24]. <https://www.slov-lex.sk/pravne-predpisy/SK/ZZ/2011/362/20190101>. [cit. 28. 3. 2021].



VPLYV LOKALITY, TERMÍNU A ROKU ZBERU NA OBSAHOVÉ LÁTKY V KORENI *RHODIOLA ROSEA* L.

INFLUENCE OF SITE, DATE AND YEAR OF COLLECTION ON INGREDIENTS IN ROOT OF *RHODIOLA ROSEA* L.

Horváth, Peter; Eftimová, Jarmila

Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 04181 Košice

jarmila.eftimova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Rozchodnica ružová (*Rhodiola rosea* L.) patrí na Slovensku k introdukovaným adaptogénnym druhom, ktorý sa pestuje pre produkciu koreňov s významným farmaceutickým potenciálom. V experimentálnej štúdii sme sledovali vplyv lokality (Levoča), termínu (jar – marec, jeseň – november) a roku zberu (2018, 2019) na množstvo obsahových látok v koreni v treťom roku ekologického pestovania. V metanolových extraktoch koreňov z jarného a jesenného termínu zberu sme stanovili obsah celkových polyfenolov, flavonoidov a antioxidačnú aktivitu. Spektrofotometrickou metódou pomocou Folin-Ciocalteuovo činidla sme stanovili v extrakte koreňov z jarného zberu obsah celkových polyfenolov (ako ekvivalent kyseliny galovej – GAE) 1410 mg GAE/g a v extrakte koreňov zo zberu v jeseni 333,1 mg GAE/g suchej drogy.

Najvyššiu hodnotu obsahu celkových flavonoidov (ako ekvivalent kvercetínu) sme zaznamenali v extrakte koreňov z jarného zberu (15,2 mg QE/g) a v extrakte koreňov zo zberu v jeseni 7,8 mg QE/g suchej drogy. Najvyššia antioxidačná aktivita stanovená ako percento (%) redukcie DPPH radikálu bola v extrakte koreňov z jarného zberu (6,699 %) a pri jesennom zbere 1,911 % pri prepočte na 1 µl extraktu. Pomocou ABTS^{•+} metódy sme v extrakte koreňov z jarného zberu stanovili celkovú antioxidačnú aktivitu prepočítanú na ekvivalent Troloxu (TEAC) 22,758 mg TEAC/g a v extrakte koreňov z jesenného zberu 5,595 mg TEAC/g suchej drogy. Z výsledkov vyplynulo, že lokalita, rok a termín zberu výrazne ovplyvňujú obsah celkových polyfenolov, flavonoidov a antioxidačnú aktivitu, a preto pestovateľom odporúčame vykonávať zber koreňov v treťom roku pestovania a v jarnom termíne. Korene *Rhodiola rosea* L. sú zdro-

jom polyfenolov, flavonoidov, vykazujú anti-oxidačnú aktivitu a môžu sa využívať v profylaxii a liečbe ochorení spôsobených oxidačným stresom.

Kľúčové slová: antioxidačná aktivita; flavonoidy; polyfenoly; *Rhodiola rosea* L.

ABSTRACT

Rhodiola rosea L. belongs to the introduced adaptogenic species in Slovakia, which is grown for the production of roots with significant pharmaceutical potential. In the experimental study, we monitored the influence of the locality (Levoča), date (spring – March, autumn – November) and year of harvest (2018, 2019) on the amount of ingredients in the root in the third year of organic cultivation. We determined the content of total polyphenols, flavonoids and antioxidant activity in methanolic root extracts from the spring and autumn harvest dates. The content of total polyphenols (as gallic acid equivalent – GAE) in the spring extract from the spring harvest was determined by the spectrophotometric method using the Folin-Ciocalteu reagent to be 1410 mg GAE/g and in the root extract from the autumn harvest 333.1 mg GAE/g of the dry drug. The highest value of the content of total flavonoids (as quercetin equivalent) was recorded in the root extract from the spring harvest of 15.2 mg QE/g and in the root extract from the autumn harvest of 7.8 mg QE/g of the dry drug. The highest antioxidant activity determined as % reduction of the DPPH radical was 6.699 % in the root extract from the spring harvest and 1.911% in the autumn harvest when converted to 1 µl of the extract. Using the ABTS⁺ method, we determined the total antioxidant activity converted to Trolox equivalent (TEAC) of 22.758 mg TEAC/g in the root extract from the spring harvest and 5.595 mg TEAC/g of the dry drug in the root extract from the autumn harvest. The results showed that the amount of total

polyphenols, flavonoids and antioxidant activity is significantly affected by the location, year and date of collection. The results showed that the location, year and date of harvest significantly affect the content of total polyphenols, flavonoids and antioxidant activity, and therefore we recommend growers to collect roots in the third year of cultivation and in the spring. The roots of *Rhodiola rosea* L. are a source of polyphenols, flavonoids, have antioxidant activity and can be used in the prophylaxis and treatment of diseases caused by oxidative stress.

Key words: antioxidant activity; flavonoids; phenols; *Rhodiola rosea*; rosenroot

ÚVOD

Liečivé rastliny sa na farmaceutické účely pestujú v monokultúre na ornej pôde. Obsah účinných látok v rastlinách významne ovplyvňujú klimatické a pôdne faktory, výživa, zaradenie v oševnom postupe, ochrana proti škodlivým činiteľom, zber, sušenie a skladovanie (Eftimová a Habán, 2012). Rastlina *Rhodiola rosea* L. sa pestuje a zbiera na získanie podzemných orgánov (koreň a podzemok) na medicínske použitie. Drogou je koreň a podzemok – *rhizoma et radix* (EMA/HMPC/289537/2012).

Rozchodnica ružová (*Rhodiola rosea* L.), čeľaď *Crassulaceae*, je dvojdomá trvalá, polymorfná, adaptogénna rastlina, ktorá má koreň s valcovitým dužinatým podzemkom a ružovou vôňou (Jahodár, 2006; Valíček, Kokoška, Holubová, 2016). Rastie vo vyšších horských oblastiach severnej Európy, Ázie (Rusko, Kazachstan, Mongolsko, Čína, Japonsko, Kórea), na severovýchode S. Ameriky, v Pyrenejách, Alpách, Karpatoch a v zriedkavých v Tatrách (Vildová, Kubeš, Tůmová, 2013). Z 90 druhov *Rhodiola* vo svete sa v Číne nachádza viac ako 60 % (55 druhov), z toho je 16 druhov, ktoré sa nachádzajú iba v Číne (Cunningham a kol., 2020).

V oblastiach Ázie patria druhy *Rhodiola* k tradičným, dlhodobo využívaným liečivým rastlinám,

hlavne pri poruchách nervového systému (Coors a kol., 2019). *Rhodiola rosea* L. obsahuje flavonoidy, glykozidy, kumaríny, zlúčeniny organických kyselín a polysacharidové zlúčeniny a iné (Qi a kol., 2021).

Panossian a kol. (2010) uvádzajú, že korene s podzemkami obsahujú monoterpenické alkoholy a ich glykozidy, kyanogénne glykozidy, arylové glykozidy, fenyletanoidy, fenylypropanoidy a ich glykozidy, flavonoidy, flavonolignany, proantokyani-díny a deriváty kyseliny galovej. Za vôňu koreňa sú zodpovedné geraniol, geranyl formát, geranyl acetát, benzylalkohol a fenylalkohol. Podzemky a korene majú vysoký obsah fenylypropanoidu rosavínu a glukozidového škoricového alkoholu. Z fenylypropanoidov sú v *Rhodiola rosea* L. významné aktívne rosavíny: rosín, rosavín, rosarín a fenyletanoidy salidrozyd (Yousef a kol., 2006; Panossian a kol., 2010).

Za biologickú aktivitu drogy sú zodpovedné glykozidy: rodiosid, rosiridín, rodionín, triandrín (Panossian a kol., 2010; Valíček, Kokoška, Holubová, 2016). V *Rhodiola sachalinensis* je prítomný terpenoid rosiridín, ktorý je inhibítorom monoaminoxidázy A a B, a má potencionalný význam pri liečbe depresie a demencie (Van Diermen a kol., 2009). Extrakt z koreňa *Rhodiola rosea* L. vykazoval účinky adaptogénne s výrazným účinkom na chronický únavový syndróm, pôsobil protistresovo, antidepresívne, anxiolyticky, stimulačne na CNS, antioxidantne a kardioprotektívne (Panossian, Wagner, 2005; Yousef a kol., 2006; Panossian a kol., 2007; Olsson a kol., 2009; Panossian a kol., 2010). Hlavnou účinnou látkou *Rhodiola rosea* L. je salidrozyd, ktorý má antioxidantný a protizápalový účinok, pôsobí proti fibróze pečene, zmiernil hlavné klinické príznaky cukrovky a mohol by sa využiť na prevenciu a liečbu diabetickej nefropatie (Qi a kol., 2021). Korene a podzemky *Rhodiola rosea* L. a extrakty z nich sa používajú ako výživové doplnky na dočasné zmiernenie príznakov stresu ako je únava, pocit slabosti, a na zlepšenie duševných a kognitívnych funkcií (Da a kol., 2018). Výbor pre

rastlinné lieky (HMPC) na základe dlhodobého používania podzemku a koreňa *Rhodiola rosea* L. odporúča používať drogu na dočasné zmiernenie príznakov stresu (únava a pocit slabosti). Lieky, ktoré obsahujú podzemok a koreň môžu používať ľudia starší ako 18 rokov, avšak nemajú ich užívať dlhšie ako dva týždne bez konzultácie s lekárom (EMA/HMPC/289537/2012).

Cieľom experimentu bolo stanoviť a porovnať obsah celkových polyfenolov, flavonoidov a antioxidantnú aktivitu metanolových extraktov koreňa *Rhodiola rosea* L. z jesenného a jarného zberu v treťom roku ekologického pestovania.

MATERIÁL A METÓDY

Biologický materiál

Na experimenty sme použili vzorky sušeného koreňa rozhodnice ružovej (*Rhodiola rosea* L.). Rastlina bola pestovaná v pôdno-klimatickej oblasti Levoča, na ekologickej farme Zuzany Homolovej AFRA Levoča. Prvú vzorku (V1) tvoril koreň zbieraný v treťom roku pestovania v jesennom termíne (november 2018). Druhú vzorku (V2) tvoril koreň zbieraný v treťom roku pestovania v jarnom termíne (marec 2019).

Postup prípravy extraktov

Vzorky koreňov sme sušili v sušičke pri 60 °C a následne sme ich rozomleli do práškovej formy pomocou elektrického mlynčeka. Extrakty sme pripravili z 1 g práškovej drogy, ktorú sme extrahovali v 20 ml metanolu 15 minút pomocou ultrazvukového kúpeľa (Kraintek, Slovensko). Potom sme extrakt prefiltrovali cez filtračný papier. Filtračný zvyšok sme druhýkrát extrahovali v 20 ml extrakčného činidla po dobu 15 minút a extrakt bol prefiltrovaný. Tretíkrát bol filtračný zvyšok extrahovaný s 10 ml extrakčného činidla po dobu 15 min a extrakt bol prefiltrovaný. Filtráty sme uchovávali v chladničke až do doby experimentu.

Stanovenie obsahu celkových polyfenolov s Folin-Ciocalteu činidlom

Na stanovenie obsahu celkového množstva polyfenolov sme použili kolorimetrickú metódu s Folin-Ciocalteu (FC) činidlom a absorbanciu sme merali pri vlnovej dĺžke $\lambda = 750$ nm (Cvetanović a kol., 2015).

Príprava zásobného roztoku kyseliny galovej na kalibračnú krivku

Do odmernej banky s objemom 50 ml sme si navážili 0,051 g kyseliny galovej a doplnili na objem 50 ml. Získali sme roztok s molárnou koncentráciou 0,006 M a M_r (kyselina galová) = 170,12 g.mol⁻¹.

Príprava vzorky

Zmiešali sme 0,1 ml extraktu s 7,9 ml destilovanej vody a pridali sme sa 0,5 ml Folin-Ciocalteu činidla a 1,5 ml 20 % Na₂CO₃. Reakčnú zmes nechali inkubovať 1 hodinu. Absorbanciu sme merali pri $\lambda = 750$ nm. Ako blank sme použili vodu. Pri zostrojení kalibračnej krivky sme ako štandard použili 0,006 M vodný roztok kyseliny galovej (Cvetanović a kol., 2015).

Celkový obsah polyfenolov sme vyjadrili ako ekvivalent kyseliny galovej (mg GAE/g). Hodnota nám udáva koľko miligramov skúmanej látky sa nachádza v hmotnostnej jednotke suchej drogy. Keďže bol extrakt z jarného zberu koreňa štyrikrát riedený, výslednú hodnotu hmotnostnej koncentrácie sme vynásobili štyrmi.

$$TPC = \frac{c \cdot V}{m} \cdot 1000 \left(mg \frac{GAE}{g} \right)$$

TPC – The total phenolic contents – celkový obsah polyfenolov

c – hmotnostná koncentrácia neriedenej vzorky (g.dm⁻³)

V – objem vzorky (dm³)

m – hmotnosť suchej drogy (g)

Stanovenie obsahu celkových flavonoidov s chloridom hlinitým

Obsah celkových flavonoidov sme stanovili za použitia spektrofotometrickej metódy založenej na tvorbe farebných chelátových komplexov s chloridom hlinitým v kyslom prostredí kyseliny octovej. Absorbanciu sme merali pri vlnovej dĺžke $\lambda = 425$ nm (Pourmorad a kol., 2006).

Príprava zásobného roztoku kvercetínu na kalibračnú krivku

Do 50 ml odmernej banky sme navážili 0,1511 g kvercetínu a doplnili metanolom na objem 50 ml. Získali sme roztok s molárnou koncentráciou 0,01 M a M_r (kvercetín) = 302,236 g.mol⁻¹.

Príprava vzorky

Zmiešali sme 0,5 ml neriedeného rastlinného extraktu s 1,5 ml metanolu. Pridali sme 0,1 ml 10 % chloridu hlinitého; 0,1 ml 1M octanu sodného a 2,8 ml destilovanej vody. Vzorky sme inkubovali 30 minút a následne sme odmerali absorbanciu pri vlnovej dĺžke 415 nm. Ako blank sme použili metanol (Pourmorad a kol., 2006).

Obsah celkových flavonoidov sme vyjadrili ako ekvivalent kvercetínu (mg QE/g). Výsledná hodnota udáva koľko miligramov skúmanej látky sa nachádza v hmotnostnej jednotke suchej drogy. Keďže bol jarný extrakt 2-krát riedený, výslednú hodnotu hmotnostnej koncentrácie jarného extraktu sme po odčítaní z grafu vynásobili dvoma.

$$TFC = \frac{c \cdot V}{m} \cdot 1000 \left(mg \frac{QE}{g} \right)$$

TPC – The total phenolic contents – celkový obsah flavonoidov

c – hmotnostná koncentrácia neriedenej vzorky (g.dm⁻³)

V – objem vzorky (dm³)

m – hmotnosť suchej drogy (g)

Stanovenie antioxidačnej aktivity metódou pomocou ABTS⁺ katión radikálu

Príprava ABTS⁺ katión radikálu

Navážili sme 192,1 mg 7 mM ABTS do 50 ml odmernej banky a doplnili sme destilovanou vodou na objem 50 ml. Následne sme navážili 940 mg 140 mM peroxodisíranu draselného do 25 ml odmernej banky a doplnili na objem 25 ml. Potom sme zmiešali 10 ml ABTS a 178 µl peroxodisíranu draselného a nechali sme inkubovať 16 hodín na tmavom mieste pri laboratórnej teplote. Po 16 hodinách sme zmerali absorbanciu reakčnej zmesi ABTS⁺ pri vlnovej dĺžke 734 nm a upravili koncentráciu na hodnotu $A = 0,7$ pomocou roztoku metanol : voda v pomere 1 : 1. Ako blank sme použili roztok metanol : voda v pomere 1 : 1. Pripravili sme 50 ml reakčnej zmesi do banky a uložili do tmy (Wojdyło a kol., 2007).

Príprava zásobného roztoku Troloxu na kalibračnú krivku

Do odmernej banky s objemom 25 ml sme navážili 2,8 mg Troloxu. Nechali sme ho rozpustiť v malom objeme zmesi metanol : voda = 1 : 1 a následne sme doplnili odmernú banku na objem 25 ml. Získali sme tak roztok s molárnou koncentráciou $c = 0,45 \text{ mM}$ a $M_r(\text{Trolox}) = 250,29 \text{ g.mol}^{-1}$.

Príprava vzorky

Zmiešali sme 62 µl nariadenej vzorky a 2418 µl zmesi ABTS⁺. Do vzorky sme pridali ABTS⁺. Vzniknutú zmes sme nechali inkubovať v tme 6 minút pri izbovej teplote. Absorbanciu sme merali pri $\lambda = 734 \text{ nm}$. Ako blank sa použije zmes metanol : voda = 1 : 1. Meranie bolo vykonané tripletne. Percento inhibície katión radikálu ABTS⁺ sa vypočíta zo vzorca:

$$\% \text{ inhibície} = \frac{A(\text{ABTS}) - A(\text{VZORKA})}{A(\text{ABTS})} \cdot 100$$

$A(\text{ABTS})$ – hodnota absorbancie roztoku katión radikálu ABTS⁺ na začiatku merania bez prídavku antioxidantu

$A(\text{VZORKA})$ – nameraná absorbancia po pridaní skúmanej vzorky a 10-minútovej inkubácii.

Výsledky boli prepočítané na základe kalibračnej krivky Troloxu a vyjadrené ako mg TEAC/l vzorky. Keďže jesenné extrakty koreňov a podzemkov v jari sme rôzne riedili, výslednú hodnotu neriedenej vzorky sme vynásobili podľa riedenia.

$$TEAC = \frac{c \cdot V}{m} \cdot 1000 [mg \text{ TEAC}/g]$$

c – hmotnostná koncentrácia neriedenej vzorky (g.dm^{-3})

V – objem vzorky (dm^3)

m – hmotnosť suchej drogy (g)

Stanovenie antiradikálovej aktivity metódou pomocou DPPH[•] radikálu

Príprava DPPH[•] radikálu

Do 50 ml odmernej banky sme si navážili 0,0026 g DPPH a doplnili metanolom na objem 50 ml. Získali sme roztok s molárnou koncentráciou $c = 0,132 \text{ mM}$ a $M_r(\text{DPPH}) = 394,32 \text{ g.mol}^{-1}$.

Príprava vzorky

Rastlinné extrakty v rôznych objemoch sme zmiešali so 600 µl metanolového roztoku DPPH a doplnili metanolom na objem 6 ml. Roztok sme inkubovali v tme pri laboratórnej teplote 15 minút. Absorbanciu sme merali pri vlnovej dĺžke $\lambda = 517 \text{ nm}$. Ako blank sme použili metanol. Po zmeraní absorbancie sme si vypočítali kapacitu vychytávania DPPH radikálov (% RSC) podľa vzorca (Cvetanović a kol., 2015):

Absorbancia metanolového roztoku DPPH[•] (600 µl metanolový roztok DPPH + 5400 µl metanol) bola 0,114.

Tab. 1: Obsah celkových polyfenolov v droge a prepočet na ekvivalent GAE/g

Termín zberu	Hmotnosť drogy [g]	Objem extraktu [dm ³]	Obsah polyfenolov v neriedenej vzorke [mg.dm ⁻³]	*TPC [mg *GAE/g]
*V1	1	0,05	6,664	333,1
*V2	1	0,05	28,192	1410

*GAE – gallic acid equivalent – kyselina galová, *TPC – The total phenol content – celkový obsah polyfenolov, *V1 – koreň zbieraný v jesennom termíne (november 2018), *V2 – koreň zbieraný v jarom termíne (marec 2019).

Tab. 2: Obsah celkových flavonoidov vo vzorke a prepočet na ekvivalent QE/g

Doba zberu	Hmotnosť drogy [g]	Objem extraktu [dm ³]	Obsah flavonoidov v neriedenej vzorke [mg.dm ⁻³]	*TFC [mg *QE/g]
*V1	1	0,05	0,156	7,8
*V2	1	0,05	0,304	15,2

*QE – quercetin equivalent – ekvivalent kvercetínu, *TFC – The total flavonoid contents – celkový obsah flavonoidov, *V1 – koreň zbieraný v jesennom termíne (november 2018), *V2 – koreň zbieraný v jarom termíne (marec 2019).

$$\% RSC = \frac{A_{DPPH} - A_{extrakt}}{A_{DPPH}} \cdot 100$$

% RSC – radical scavenging capacity – kapacita vychytávania radikálov

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

A_{DPPH} – absorbancia roztoku DPPH

VÝSLEDKY

Stanovenie obsahu celkových polyfenolov Folin-Ciocalteu činidlom

Obsah celkových polyfenolov v metanolvých extraktoch koreňov *Rhodiola rosea* L. sme prepočítavali na ekvivalent kyseliny galovej (GAE). Obsah celkových polyfenolov sme vypočítali na základe kalibračnej priamky kyseliny galovej $y = 0,1043x + 0,0149$, $R^2 = 0,9929$. V tabuľke 1 uvádzame stanovené hodnoty koncentrácií celkových polyfenolov v neriedenej vzorke (mg.dm⁻³), prepočítané na ekvivalent GAE/g suchej drogy koreňov zbieraných v dvoch termínoch zberu V1 a V2.

Z výsledkov vyplynulo, že v metanolom extrakte koreňov rozchodnice ružovej z jarého zberu obsah celkových polyfenolov dosahoval 1410 mg GAE/g suchej drogy koreňov. V droge koreňa zo zberu v jeseni sme zistili obsah celkových polyfenolov 333,1 mg GAE/g suchej drogy koreňov. Porovnaním získaných hodnôt sme zistili, že droga vzorky koreňa v jarom termíne zberu obsahovala 4,23-krát vyšší obsah celkových polyfenolov ako droga z jesenného zberu.

Obsah celkových flavonoidov

Namerané hodnoty koncentrácií flavonoidov v neriedenej vzorke (mg.dm⁻³) a obsah celkových flavonoidov prepočítaných na ekvivalent QE (mg QE/g suchej drogy) uvádzame v tabuľke 2. Celkový obsah flavonoidov (ako ekvivalent kvercetínu) sme vypočítali pomocou kalibračnej priamky kvercetínu $y = 0,73119x - 0,0039$, $R^2 = 0,9609$.

V metanolovom extrakte vzorky koreňa rozchodnice ružovej z jarého zberu sme zaznamenali obsah celkových flavonoidov 15,2 mg QE/g suchej drogy koreňov. V extrakte vzorky koreňa zo zberu v

Tab. 3: Percento inhibície DPPH radikálu

Objem vzorky (μ l)	Absorbancia vzorky [nm]	Absorbancia DPPH [nm]	Inhibícia DPPH *RSC [%]
*V1			
20	0,187 $\pm$ 0,008	0,114	–
25	0,118 $\pm$ 0,017	0,114	–
30	0,051 $\pm$ 0,008	0,114	55,55 %
35	0,035 $\pm$ 0,003	0,114	69,01 %
*V2			
5	0,068 $\pm$ 0,006	0,114	40,64 %
10	0,022 $\pm$ 0,006	0,114	80,41 %
15	0,012 $\pm$ 0,004	0,114	89,47 %
20	0,007 $\pm$ 0,002	0,114	94,15 %

*DPPH – 2,2-difeny-1-pikrylhydrazyl, *RSC – radical scavenging capacity *V1 – koreň zbieraný v jesennom termíne (november 2018), *V2 – koreň zbieraný v jarnom termíne (marec 2019)

jeseni bol obsah celkových flavonoidov 7,8 mg QE/g suchej drogy koreňov, čo je 1,9-krát nižšia hodnota ako v extrakte koreňa z jarného zberu.

Antioxidačná aktivita meraná pomocou DPPH radikálu

Namerané hodnoty absorbancií metanolvých extraktov vzoriek koreňov jarného a jesenného termínu zberu a percento inhibície DPPH radikálu uvádzame v tabuľke 3.

Z tabuľky 3 vyplýva, že metanolvý extrakt koreňa z jarného zberu mal vyššiu kapacitu vychytávania DPPH radikálu. Pri prepočte % RSC na μ l extraktu bola priemerná hodnota pri jarnom zbere 6,699 %; čo je 3,51-krát viac ako pri jesennom zbere 1,911 % na 1 μ l extraktu.

Antioxidačná aktivita meraná pomocou ABTS⁺ radikálu

V závislosti od stupňa riedenia vzorky sme vypočítali percento inhibície radikálu ABTS⁺. Výsledky hodnoty sme zistili pomocou kalibračnej krivky Troloxu $y = -0,5591x - 0,7132$, $R^2 = 0,9608$

a vyjadrili ako mg TEAC/g suchej drogy. Výslednú antioxidačnú aktivitu vzorky sme porovnávali s antioxidačnou aktivitou syntetickej látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8, tetrametylchroman-2-karboxylová kyselina).

Z tabuľky 4 vyplynulo, že v metanolvom extrakte drogy koreňa z jarného zberu riedenom (1 : 36) sme stanovili najvyššiu celkovú antioxidačnú aktivitu 30,15 mg TEAC/g suchej drogy. V extrakte vzorky drogy koreňa z jesenného zberu v riedení (1 : 7) sme zaznamenali celkovú antioxidačnú aktivitu 6,88 mg TEAC/g suchej drogy. Porovnaním získaných hodnôt sme zistili, že v metanolvom extrakte koreňov z jarného zberu bola stanovená vyššia antioxidačná aktivita ako z drogy z jesenného zberu.

DISKUSIA

Koreň s podzemkami a extrakty rozchodnice ružovej (*Rhodiola rosea* L.) patria k zdrojom bioaktívnych látok a môžu sa využívať ako adaptogén, zlepšujú náladu (Darbinyan a kol., 2009), kognitívne funkcie a odstraňujú únavu (Olsson a kol., 2009). V

Tab. 4: Celková antioxidačná kapacita vyjadrená ako ekvivalent Troloxu

Vzorka : rozpúšť. [ml]	m [g]	Objem extraktu [dm ³]	Hmotnostná koncentrácia antioxidantov v neriedenej vzorke [mg.dm ⁻³]	Celková AOK [mg TEAC/g]
*V1				
1:3	1	0,05	0,0712	3,56
1:5	1	0,05	0,1038	5,19
1:7	1	0,05	0,1376	6,88
1:8	1	0,05	0,1350	6,75
*V2				
1:16	1	0,05	0,3009	15,045
1:36	1	0,05	0,6031	30,155
1:46	1	0,05	0,4677	23,385
1:66	1	0,05	0,4489	22,445

TEAC – trolox equivalent antioxidant capacity, AOK – antioxidačná kapacita, *V1 – koreň zbieraný v jesennom termíne (november 2018), *V2 – koreň zbieraný v jarnom termíne (marec 2019)

štúdiách na zvieratách boli potvrdené neuro-, kardio- a hepatoprotektívne (Qi a kol., 2021), antivírusové (Wang a kol., 2009), antiflogistické (Pooja a kol., 2009), antibakteriálne (Zdanowska a kol., 2009) a imunostimulačné účinky (Siwicki a kol., 2007).

Klimatické podmienky, lokalita, podmienky zberu a spracovania liečivých rastlín ovplyvňujú koncentráciu obsahových látok v rastline (Eftimová, Habán, 2012). Preto cieľom nášho experimentu bolo vyhodnotiť ako ovplyvňuje lokalita (Levoča), termín zberu (jar, jeseň) a rok zberu (2018, 2019) množstvo obsahových látok v koreni s podzemkami *Rhodiola rosea* L. Stanovili sme a porovnali obsah celkových polyfenolov, flavonoidov a antioxidačnú aktivitu v metanolových extraktoch vzorky koreňov s podzemkami v treťom roku pestovania z jesenného (V1) a jarného zberu (V2). Obsah celkových polyfenolov sme stanovili v metanolovom extrakte koreňa zbieraného na jar (V2) 1410 mg GAE/g a extrakte koreňa zbieraného na jeseň (V1) 333,1 mg GAE/g suchej drogy. Pri porovnávaní stanovených

hodnôt sme zistili, že v metanolovom extrakte koreňa z jarného zberu boli hodnoty 4,23-krát vyššie ako z jesenného zberu.

K podobným výsledkom dospeli Peschel a kol. (2016), ktorí sledovali vplyv roku a termínu zberu na obsah polyfenolov v koreni s podzemkami. Uvedení autori zistili, že obsah fenylypropanoidov (rosavín, rosarín, rosín) a fenyletanoidov (salidrozyd), ktoré patria ku polyfenolom, bol najvyšší (3692 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) v treťom roku pestovania a zbieraný v jarnom termíne (marec). Stanovené hodnoty z jarného zberu boli dvakrát vyššie ako hodnoty z jesenného zberu (október) (1452 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). Zároveň zistili, že obsah polyfenolov v ďalších rokoch klesal. Vo štvrtom roku predstavovali polyfenoly v koreňoch s podzemkami z marcového zberu 2654 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a z októbrového zberu 1667 $\mu\text{g ng.ml}^{-1}$. V piatom roku pestovania poklesla hodnota v marci na 2248 $\mu\text{g.ml}^{-1}/\text{ml}$ a v októbri na 990 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

K opačným výsledkom dospeli Kołodziej a kol. (2013), ktorí zistili, že obsah fenylypropanoidov

bol najvyšší v podzemku v piatom roku pestovania a zbieraného v septembri ($14\,240\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a až v ďalších rokoch sa ich obsah znižoval. Tomsen a kol. (2012) sledovali obsah fenylpropanoidov počas rôznych fenofáz *Rhodiola rosea* L. Najvyšší obsah polyfenolov (salidrozyd, rosavín, rosarín, rosín) stanovili v koreňoch, ktoré sa zbierali na jar pred pučaním rastliny.

Olennikov a kol. (2020) zaznamenali vyšší obsah celkových polyfenolov v podzemku ($140,6\ \text{mg GAE/g}$) ako v koreňoch ($44,87\ \text{mg GAE/g}$) suchej drogy zbieranej v septembri. V koreni zbieranom na jeseň sme zaznamenali vyšší obsah polyfenolov ($333,1\ \text{mg GAE/g}$ suchej drogy) ako autori.

Peschel a kol. (2013) porovnávali obsah fenylpropanoidov v koreni a podzemkoch, ktoré boli extrahované v rôznych rozpúšťadlách (etanol 45 %, etanol 70 %, metanol) a zistili, že v podzemku bol obsah fenylpropanoidov 2,5 – 3,5-krát vyšší ako v koreňoch. Zároveň spozorovali, že koncentrácia fenylpropanoidov stúpala v poradí etanol 45 %, etanol 70 %, metanol.

Ivanišová a kol. (2018) stanovili obsah polyfenolov v etanolovom (80 %) extrakte drogy koreňa v koreni *Rhodiola rosea* L. zakúpeného v obchode $176,64\ \text{mg GAE/g}$ suchej drogy.

Chen a kol. (2013) porovnávali obsah polyfenolov v etanolovom (50 %) extrakte drogy koreňa a fermentovanú drogu, ktorá bola po fermentácii extrahovaná etylacetátom a zistili, že vyšší obsah polyfenolov mala fermentovaná droga ($241,58\ \text{mg GAE/g}$ suchej drogy). Obsah polyfenolov v etanolovom extrakte predstavoval $142,12\ \text{mg GAE/g}$ suchej drogy.

Tasheva a Kosturkova (2012) porovnávali obsah polyfenolov, flavonoidov a antioxidačnú aktivitu drogy koreňa a podzemkov vypestovanej v skleníku a drogy získanej z horskej oblasti. Vyššie hodnoty boli zistené v droge z horskej oblasti. Obsah polyfenolov dosahoval $56,11\ \text{mg GAE/g}$ a flavonoidov $12,48\ \text{mg QE/g}$ suchej drogy. Pri porovnávaní našich hodnôt s hodnotami/údajmi uvedených autorov sme v našich analýzach zaznamenali vyššie hodnoty polyfenolov

aj flavonoidov.

V našom experimente obsah celkových flavonoidov v metanolovom extrakte vzorky drogy koreňa z jarného zberu bol $15,2\ \text{mg QE/g}$ suchej drogy; čo je 1,9-krát vyšší obsah ako z jesenného zberu ($7,8\ \text{mg QE/g}$ suchej drogy). Tieto hodnoty sú vyššie v porovnaní s údajmi Olennikova a kol. (2020), ktorí uvádzajú obsah celkových flavonoidov v podzemku $0,75\ \text{mg QE/g}$ a v koreňoch $1,89\ \text{mg QE/g}$ suchej drogy.

Rovnako pri porovnaní našich hodnôt obsahu flavonoidov s hodnotami Ivanišovej a kol. (2018) sme zistili v metanolovom extrakte z homogenizovaného koreňa s podzemkami vyššie hodnoty flavonoidov ako uvedení autori ($2,64\ \text{mg QE/g}$ suchej drogy) v etanolovom extrakte zo zakúpeného koreňa *Rhodiola rosea* L.

Antioxidačnú aktivitu sme stanovili metódou ABTS a DPPH. Metódou pomocou ABTS^{•+} radikálu sme v metanolovom extrakte koreňa z jarného zberu zistili celkovú antioxidačnú aktivitu v priemere $22,758\ \text{mg TEAC/g}$ a z jesenného zberu $5,595\ \text{mg TEAC/g}$ suchej drogy. Pri porovnaní stanovených hodnôt sme zistili, že v extrakte z koreňov z jarného zberu bola až 4,07-krát vyššia hodnota antioxidačnej aktivity ako z drogy z jesenného zberu.

Ivanišová a kol. (2018) stanovili metódou ABTS antioxidačnú aktivitu v etanolovom (80 %) extrakte drogy koreňa v koreni *Rhodiola rosea* L. zakúpeného v obchode $315,37\ \text{mg TEAC/g}$ suchej drogy, čo je podstatne vyššia hodnota antioxidačnej aktivity v porovnaní s našimi metanolovými extraktmi.

Pri stanovení antioxidačnej aktivity pomocou metódy s DPPH radikálom sme zistili, že metanolový extrakt z koreňa z jarného zberu mal vyššiu kapacitu vychytávania radikálov. Pri prepočte % RSC na $1\ \mu\text{l}$ extraktu bola priemerná hodnota pri jarnom zbere $6,699\ \%$ a pri jesennom zbere $1,911\ \%$. Na základe porovnania uvedených hodnôt môžeme konštatovať, že v extrakte koreňov z jarného zberu bola 3,51-krát vyššia hodnota kapacity/aktivity vychytávania radikálov ako z drogy z jesenného zberu.

Olennikov a kol. (2020) stanovili antioxidačnú aktivitu metódami (DPPH[•], ABTS^{•+}, O₂^{-•}, .OH) v podzemných častiach drogy zbieranej v septembri a zistili, že vyššie hodnoty zaznamenali v extraktoch koreňov ako podzemkov.

Pri porovnávaní nami zaznamenaných hodnôt polyfenolov, flavonoidov, antioxidačnej aktivity v extraktoch koreňa *Rodiola rosea* L. a hodnôt, ktoré stanovili iní autori, sme zistili rozdiely v závislosti od lokality, termínu, roku zberu, použitej časti podzemného orgánu a použitého extrakčného činidla.

ZÁVER

V experimentálnej štúdii sme sledovali vplyv lokality (Levoča), termínu (jar – marec, jeseň – november) a roku zberu (2018, 2019) na množstvo obsahových látok v koreni *Rhodiola rosea* L. v treťom roku ekologického pestovania. V metanoloých extraktoch koreňov z jarného a jesenného termínu zberu sme stanovili obsah celkových polyfenolov, flavonoidov a antioxidačnú aktivitu. Na základe našich experimentov môžeme povedať, že najviac hlavných obsahových látok a najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazovali extrakty z koreňa zbieraného na jar, pred pučaním. Uskutočnené experimenty potvrdili vyšší obsah polyfenolov v koreni z jarného zberu (1410 mg GAE/g) ako v koreni z jesenného zberu (333,1 mg GAE/g suchej drogy). Podobne sme zaznamenali vyšší obsah flavonoidov v koreni z jarného zberu (15,2 mg QE/g) ako v koreni z jesenného zberu (7,8 mg QE/g suchej drogy). Aj antioxidačná aktivita, stanovená pomocou radikálu ABTS^{•+}, vykazovala vyššie hodnoty v koreni z jarného zberu (22,758 mg TEAC/g) ako v koreni z jesenného zberu (5,595 mg TEAC/g suchej drogy). Pomocou DPPH[•] radikálu sme stanovili v metanolovom extrakte koreňa z jarného zberu 3,51-krát vyššiu hodnotu antioxidačnej aktivity. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že metanolový extrakt koreňa *Rhodiola rosea* L. z jarného zberu vykazoval niekoľkonásobne vyššie hodnoty sledovaných parametrov ako extrakt koreňa z jesenného zberu. Keďže koncentráciu

obsahových látok v rastline ovplyvňujú aj iné faktory prostredia ako lokalita, termín a rok zberu, bolo by potrebné v daných experimentoch pokračovať. Zároveň by bolo vhodné použiť extrakčné metódy a extrakčné činidlá. Podzemná časť rastliny *Rhodiola rosea* L. je významným zdrojom polyfenolov, flavonoidov a antioxidačnej aktivity a má uplatnenie v profylaxii a liečbe ochorení spôsobených oxidačným stresom.

ZOZNAM LITERATÚRY

Coors, A., Brosch, M., Kahl, E., Khalil, R., Michels, B., Laub, A., Franke, K., Gerber, B., Fendt, M.: *Rhodiola rosea* root extract has antipsychotic-like effects in rodent models of sensorimotor gating. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, 235, 320 – 328.

Cvetanović, A., Švarc-gajić, J., Mašković, P., Savić, S., Nikolić, L.: Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: perspective of using superheated water for isolation of biologically active compounds. *Industrial Crops and Products*, 2015, 65, 582 – 591. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.09.044.

Cunningham, A. B., Li, H. L., Luo, P., Long, X. C., Brinckmann, J. A. 2020: There “ain’t no mountain high enough”? The drivers, diversity and sustainability of China’s *Rhodiola* trade. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 252, 112 379. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112379>. Accessed May 20, 2020.

Da, J., Yang, L., Wu, W. Y., Guoa, D. A., Panossian, A. G.: The pseudoendogenous anabolic steroid 1,4-androstadiene-3,17-dione does not occur naturally in *Rhodiola rosea* L. radix and rhizome. *Phytochemistry Letters*, 2018, 23, 155 – 163. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.12.007>. Accessed August 4, 2020.

Darbinyan, V., Aslanyan, G., Amroyan, E., Gabrielyan, E., Malmström, C., Panossian, A.: Clinical trial of *Rhodiola rosea* L. extract SHR-5 in the treatment of mild to moderate depression.

Nordic Journal of Psychiatry, 2009, 61 (5), 343 – 348. DOI: 10.1080/08039480701643290.

Eftimová, J., Habán, M.: *Produkcia liečivých rastlín* [Production of medicinal plants]. Košice: Edičné stredisko a predajňa literatúry UVLF, 2012, 90 s.

EMA/HMPC/289537/2012. *Výbor prerastlinné lieky (HMPC)*. Podzemok a koreň rozchodnice ružovej *Rhodiola rosea* L., *rhizoma et radix*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-summary/arctic-root-summary-public_sk.pdf. Accessed May 16, 2021.

Chen, Y. S., Liou, H. Ch., Chan, Ch. F.: Tyrosinase inhibitory effect and antioxidative activities of fermented and ethanol extracts of *Rhodiola rosea* and *Lonicera japonica*. *The Scientific World Journal*, 2013, 612 739. <https://doi.org/10.1155/2013/612739>. Accessed August 4, 2020.

Ivanišová, E., Farkaš, A., Frančáková H., Kačániová, M. 2018: Antioxidant activity and total polyphenol content of medicinal herbs with adaptogenic effect to Human Body. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 2018, 51 (1), 119 – 123. Accessed May 16, 2021.

Jahodář, L.: *Farmakobotanika, semenné rostliny* [Pharmacobotany, seed plants]. Praha: Karolinum, 2006, 264 s.

Kołodziej, B., Sugier, D.: Influence of plants age on the chemical composition of roseroot (*Rhodiola rosea* L.). *Acta scientiarum Polonorum*, 2013, 12 (3), 147 – 160. https://www.researchgate.net/publication/286884370_Influence_of_plants_age_on_the_chemical_composition_of_roseroot_Rhodiola_rosea_L. Accessed June 6, 2021.

Olennikov, D. N., Chirikova, N. K., Vasilieva, A. G., Fedorov, I. A.: LC-MS profile, gastrointestinal and gut microbiota stability and antioxidant activity of *Rhodiola rosea* herb metabolites: a comparative study with subterranean organs. *Antioxidants*, 2020, 9 (6). DOI: 10.3390/antiox9060526.

Olsson, E., Von Schéele, B., Panossian, A. G.: Randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study of the standardised extract SHR-

5 of the roots of *Rhodiola rosea* in the treatment of subjects with stress-related fatigue. *Planta Medica*, 2009, 75 (2), 105 – 112. DOI: 10.1055/s-0028-1088346.

Qi, S. S., Shao, M. L., Ze, S., Zheng, H. X.: Salidroside from *Rodiola rosea* L. attenuates diabetic nephropathy in STZ induced diabetic rats via anti-oxidative stress, anti-inflammation, and inhibiting TGF- β 1/Smad pathway. *Journal of Functional Foods*, 2021, 77, 104 329. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104329>. Accessed May 16, 2021.

Panossian, A., Hambardzumyan, M., Hovanissian, M., Wikman, G.: The adaptogens rhodiola and schizandra modify the response to immobilization stress in rabbits by suppressing the increase of phosphorylated stress-activated protein kinase, nitric oxide and cortisol. *Drug target insights*, 2007, 2, 39 – 54. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21901061/>. Accessed August 4, 2020.

Panossian, A., Wagner, H.: Stimulating effect of adaptogens: an overview with particular reference to their efficacy following single dose administration. *Phytotherapy Research*, 2005, 19 (10), 819 – 838. <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.1751>. Accessed August 4, 2020.

Panossian, A., Wikman, G., Sarris, J.: Ro- senroot (*Rhodiola rosea*): Traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. *Phytomedicine*, 2010, 17 (7), 481 – 493. DOI: 10.1016 / j.phymed.2010.02.002.

Peschel, W., Kump, A., Horváth, A., Csopor, D.: Age and harvest season affect the phenylprope- noid content in cultivated European *Rhodiola rosea* L. *Industrial Crops and Products*, 2016, 83, 787 – 802. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.037>.

Peschel, W., Prieto, J. M., Karkour, C., Williamson, E. M.: Effect of provenance, plant part and processing on extract profiles from cultivated European *Rhodiola rosea* L. for medicinal use. *Phytochemistry*, 2013, 86, 92 – 102. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.10.005>. Accessed Au- gust 4, 2020.

- Pooja, A., Bawa, S., Khanum, F.: Anti-inflammatory activity of *Rhodiola rosea* – „a second-generation adaptogen”. *Phytotherapy Research*, 2009, 23 (8), 1099 – 1102. DOI: 10.1002/ptr.2749.
- Pourmorad, F., Hosseini-mehr, S. J., Shahabimajd, N.: Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5 (11), 1142 – 1145. <http://www.academicjournals.org/AJB>. Accessed August 4, 2020.
- Siwicki, A., Skopińska-Różewska, E., Hartwich, M., Wojcik, R., Bakula, T., Furmanowa, M., Bałan, B., Sommer, E., Mielcarek, S., Buchwald, W., Krajewska-Patan, A., Mścisz, A., Mrozkiewicz, P. M., Bany, J.: The influence of *Rhodiola rosea* extracts on non-specific and specific cellular immunity in pigs, rats and mice. *Central-European Journal of Immunology*, 2007, 32, 84 – 91. DOI 10.1515/pjvs-2016-0073.
- Tasheva, K., Kosturkova, G., Trendafilova, A.: Antioxidant activities of bulgarian golden root – endangered medicinal species. *Acta Horticulturae*, 2012, 955, 149 – 154. DOI:10.17660/ActaHortic.2012.955.20.
- Thomsen, M. G., Galambosi, B., Galambosi, Z., Uusitalo, M., Mordal, R., Heinonen, A.: Harvest time and drying temperature effect on secondary metabolites in *Rhodiola rosea*. *Acta Horticulturae*, 2012, 955, 243 – 252. DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.955.35.
- Van Diermen, D., Marston, A., Bravo, J., Reist, M., Carrupt P. A., Hostettmann, K.: Monoamine oxidase inhibition by *Rhodiola rosea* L. roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 122 (2), 397 – 401. DOI: 10.1016/j.jep.2009.01.007.
- Yousef, G. G., Grace, M. H., Cheng, D. M., Belolipov, I. V., Raskin, I., Lila, M. A.: Comparative phytochemical characterization of three *Rhodiola* species. *Phytochemistry*, 2006, 67 (21), 2380 – 2391. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.07.026.
- Valíček, P., Kokoška, L., Holubová, K., 2016: Léčivé rostliny třetího tisíciletí [Medicinal plants of the third millennium]. *Benešov: START*, 2016, 9 (75), 80 – 83.
- Vildová, A., Kubeš, J., Tůmová, L.: Léčivé rostliny s imunostimulačními účinky [Medicinal plants with immunostimulatory effect]. *Prakt. Lékáren.*, 2013, 9 (2), 90 – 94. <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2013/02/09.pdf>. Accessed August 4, 2020.
- Wang, H., Ding, Y., Zhou, J., Sun, X., Wang, S.: The *in vitro* and *in vivo* antiviral effects of salidroside from *Rhodiola rosea* L. against coxsackievirus B3. *Phytomedicine*, 2009, 16 (2 – 3), 146 – 155. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.07.013.
- Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R.: Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 2007, 105 (3), 940 – 949. DOI: 10.1016 / j.foodchem.2007.04.038.
- Zdanowska, D., Bany, J., Skopińska-Różewska, E., Sommer, E., Siwicki, A., Wasiutyński, A.: Experimental immunology. The effect of *Rhodiola rosea* extracts on the bacterial infection in mice. *Central European Journal of Immunology*, 2009, 34, 1, 35 – 37. https://www.academia.edu/17962572/The_effect_of_Rhodiola_kirilowii_extract_on_tumor_induced_angiogenesis_in_mice. Accessed August 4, 2020.



ANTIOXIDAČNÁ AKTIVITA HÚB RODU *CORDYCEPS* (FR.)

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FUNGI OF THE GENUS *CORDYCEPS* (FR.)

Poľančíková, Nikoleta; Uhrinová, Anna

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

anna.uhrinova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Huby sú zaujímavé svojou rozmanitosťou, o ktorej svedčí viac ako 1200 entomopatogénnych druhov húb. *Cordyceps* patrí medzi jeden z najväčších rodov, ktorý má viac ako 500 druhov a odrôd. Medzi najviac preskúmané druhy tohto rodu patrí *militaris*, *liangshamensis*, *gunnii*, *sobolifera*, *cicadicola*, ktoré vykazujú liečivé a medicínske vlastnosti.

Jedným z najznámejších druhov je *Cordyceps sinensis* (CS). Patrí medzi jedlé exotické huby. Jeho rast a vývoj prebieha na hmyze, na ktorom parazituje. Vďaka svojim všestranným a blahodarným účinkom na organizmus sa *Cordyceps sinensis* radí medzi najrozšírenejšie prostriedky čínskej medicíny. Liečba prostredníctvom CS našla časom svoje uplatnenie aj v západnej medicíne.

Cieľom našej štúdie bolo preskúmať a vzájomne porovnať antioxidačnú aktivitu (AA) húb *Cordyceps sinensis* pestovaných na dvoch rozdielnych médiách, a to konkrétne hrach siaty (*Pisum sativum*) a kukurica siata (*Zea mays*). Extrakcia prebiehala v štyroch rozdielnych rozpúšťadlách (voda, metanol, etanol a etylacetát) dvoma rozdielnymi extrakciami (macerácia a extrakcia). U vybraných vzoriek sa sledovala antimikrobiálna aktivita a v nameraných IČ spektrách prítomnosť charakteristických funkčných skupín látok zodpovedných za antioxidačnú aktivitu.

Najvyššia antioxidačná aktivita bola stanovená u vzorky, ktorej médiom bola kukurica, najvhodnejším rozpúšťadlom bol metanol a extrakcia, ktorou sa izolovali obsahové látky, bola macerácia. Najnižšiu hodnotu strednej inhibičnej koncentrácie (IC_{50}^{DPPH}) a tým najvyššiu

antioxidačnú aktivitu vykazoval metanolvý extrakt získaný maceráciou vzorky húb pestovaných na kukurici siatej (2,94 mg.ml⁻¹). Antimikrobiálna aktivita v získaných extraktoch nebola pozorovaná.

Kľúčové slová: antioxidačná aktivita; *Cordyceps sinensis*; DPPH radikál; hrach siaty; kukurica siata

ABSTRACT

Mushrooms are interesting for their diversity, as evidenced by more than 1200 species of entomopathogenic fungi. *Cordyceps* is one of the largest genera, with more than 500 species and varieties. Other known species of this genus with healing properties and medicinal effects include *militaris*, *liangshamensis*, *gunnii*, *sobolifera*, *cicadicola*.

One of the best known species is *Cordyceps sinensis* (CS). It belongs to the edible exotic mushrooms. Its growth and development takes place on insects, on which it parasitizes. Due to its versatile and beneficial effects on the body, *Cordyceps sinensis* is one of the most widespread remedies in Chinese medicine. Over the time, the treatment through CS has also found application in Western medicine.

The aim of our study was to investigate and influence the antioxidant activity (AA) of *Cordyceps sinensis* fungi grown on two different media, namely sweet peas (*Pisum sativum*) and maize (*Zea mays*). The extraction was carried out in four different solvents (water, methanol, ethanol and ethylacetate) by two different extractions (maceration and extraction). Antimicrobial activity and the presence of characteristic functional groups of substances responsible for antioxidant activity in the measured IR spectra were monitored in the selected samples.

The highest antioxidant activity was determined in a sample whose medium was maize,

the most suitable solvent was methanol and the extraction by which the constituents were isolated was maceration. The lowest value of the mean inhibitory concentration (IC₅₀^{DPPH}) and thus the highest antioxidant activity was shown by the methanol extract obtained by maceration of a sample of mushrooms grown on sown maize (2.94 mg.ml⁻¹). Antimicrobial activity was not observed in the obtained extracts.

Key words: antioxidant activity; *Cordyceps sinensis*; DPPH radical; maize; pea

ÚVOD

Tradičná čínska medicína, ktorá prežíva dodnes, je pre vedcov a lekárov záhadná do dnešných čias. Základ tejto čínskej medicíny nepredstavuje šamanizmus, respektíve určitú formu okultizmu, ale zber a využívanie liečivých rastlín, ich častí, zber húb a iných darov prírody. Mnohé dávne bylinné recepty upadli do zabudnutia aj negatívnym vplyvom vtedajšej a aj súčasnej spoločnosti. Treba však poznamenať, že ani tradičná čínska medicína nie je všeliekom na každé existujúce ochorenie. V prípade ochorení, ako sú onkologické a autoimunitné ochorenia, vie však výrazne ovplyvniť kvalitu ľudského života.

Jedným z malých „zázrakov“ tejto tradičnej čínskej medicíny je rod parazitujúcich húb *Cordyceps*. Rod *Cordyceps* (Sung, 2007) má svoju bohatú históriu. Tá sa začala písať pred viac ako 2000 rokmi. K objaveniu tohto rodu došlo netradičným a zaujímavým spôsobom. Základom sa stala vitalita, energia a sila chovaného dobytku na tibetských pastvinách.

Huby rodu *Cordyceps* rastú vo vysokých nadmorských výškach od 2000 až po 6000 metrov nad morom v Číne a Nepále (Zhu, 1998). Patria do skupiny exotických a špecifických liečivých húb. Špecifickosťou tejto huby je predovšetkým rast a spôsob rozmnožovania sa, ktorý začína na cudzom hostiteľovi (Hobbs, 1995). U každého druhu *Cordyceps* je hostiteľom iný hmyz.

Jedným z najviac preskúmaných druhov je *Cordyceps sinensis*. Vďaka širokospektrálnym účinkom je predmetom záujmu aj v západnej medicíne. Pozitívne účinky *Cordyceps* boli zaznamenané pri liečbe pečene, obličiek (Holliday, 2008) a imunitného systému (Yamaguchi, 1990). Literatúra popisuje zapojenie húb do podpornej liečby pri civilizačných ochoreniach, ako sú nádorové ochorenia (Xu, 1992), metabolické ochorenia a kardiovaskulárne ochorenia (Xiang, 2016). Nezanedbateľné sú taktiež antibakteriálne, antifungálne, protizápalové (Kim, 2003) a antioxidačné účinky (Jiang, 1995). Aj na základe týchto vedeckých zistení sa tak dopyt po *Cordyceps* neprimerane zvýšil.

Medzi najvýznamnejšie zložky, ktoré sú zodpovedné za väčšinu pozitívnych účinkov, patrí kyselina cordycepová (Tuli, 2014). Ďalšími bioaktívnymi zložkami sú esenciálne aminokyseliny, steroly, nukleozidy (Li, 2006), vitamíny a tiež chemické prvky (Zhou, 2009).

MATERIÁL A METÓDY

Huby boli dodané Technickou univerzitou vo Zvolene. Ich kultiváciu uskutočnila firma Mykoforest Velčice. Kultivácia húb prebiehala formou pevnej fermentácie na dvoch typoch substrátu: kukurica siata a hrach siaty. Rozpúšťadlá, ktoré sa použili na extrakciu, boli destilovaná voda, metanol, etanol a etylacetát. Antioxidačná aktivita sa stanovila DPPH metódou.

Vzorka P – kmeň *Cordyceps sinensis*, substrát hrach siaty

Vzorka C – kmeň *Cordyceps sinensis*, substrát kukurica siata

Na maceráciu sa navážilo 5 g sušiny húb. Po pridaní 50 ml rozpúšťadla (voda, metanol, etanol a etylacetát) boli tieto roztoky extrahované 24 hodín pri laboratórnej teplote v tme. Následne sa vzniknuté extrakty prefiltrovali a zahustili na rotačnej vákuovej odparke (IKA RV 10 digital, Nemecko).

Extrakcia ultrazvukom sa uskutočnila identicky s 5 g sušiny a 50 ml rozpúšťadla, pri teplote 65 °C po dobu jednej hodiny. Extrakcia sa uskutočnila prostredníctvom ultrazvuku Bandelin Sonorex Digitec s frekvenciou 35 kHz, P 140/560 W a DT 103 H, Nemecko, 2013. Vzniknuté extrakty sa po extrakcii prefiltrovali a zahustili vo vákuovej odparke.

U takto pripravených extraktov húb bola stanovená antioxidačná aktivita DPPH metódou. Pripravené extrakty boli pred meraním riedené v pomere 1 : 1. Merania prebiehali pri laboratórnej teplote a pri vlnovej dĺžke 517 nm pomocou UV-VIS spektrofotometra (Libra S12, Nemecko). Antioxidačná aktivita meraných vzoriek sa vypočítala zo vzťahu $I (\%) = (A_{SL} - A_{VZ})/A_{SL} \times 100$, kde $I (\%)$ predstavuje inhibíciu aktivity radikálu DPPH, A_{SL} je absorbanca slepého roztoku DPPH a A_{VZ} je absorbanca vzorky po 30 minútovej inkubácii v tme pri laboratórnej teplote od prídania roztoku DPPH.

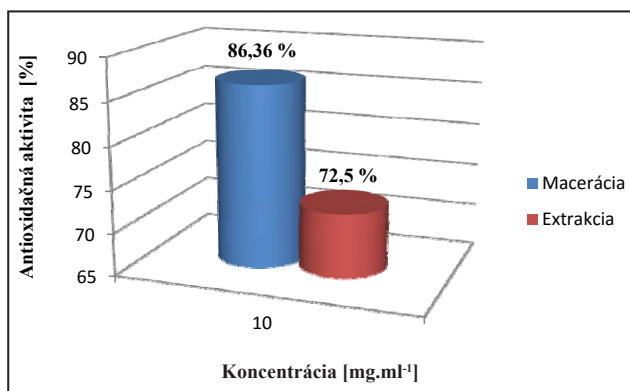
U vzoriek, ktoré vykazovali najvyššiu hodnotu antioxidačnej aktivity, sa stanovila antimikrobiálna aktivita na Katedre mikrobiológie a imunológie Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach. Stanovenie prebiehalo na agarových platniach naočkovaných dvoma bakteriálnymi kmeňmi *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*.

Infračervené spektrá pripravených extraktov boli merané na Univerzite Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach (IČ spektrofotometer – Thermo Scientific Nicolet 6700 FTIR, Nemecko).

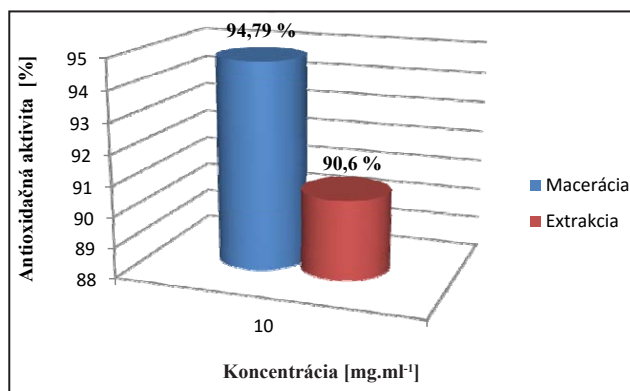
VÝSLEDKY

V súčasnosti existuje viacero metód na stanovenie antioxidačnej aktivity vzoriek. Jednou z najviac používanějších a súčasne pomerne jednoduchých metód je stanovenie antioxidačnej aktivity pomocou DPPH radikálu (Sigma Aldrich) (Sharma, 2009). Táto metóda je založená na eliminácii kyslíkových a syntetických radikálov. Absorbanca vzoriek sa merala pri vlnovej dĺžke 517 nm. Tejto hodnote vlnovej dĺžky zodpovedala najvyššia hodnota absorbancie pripraveného roztoku DPPH radikálu

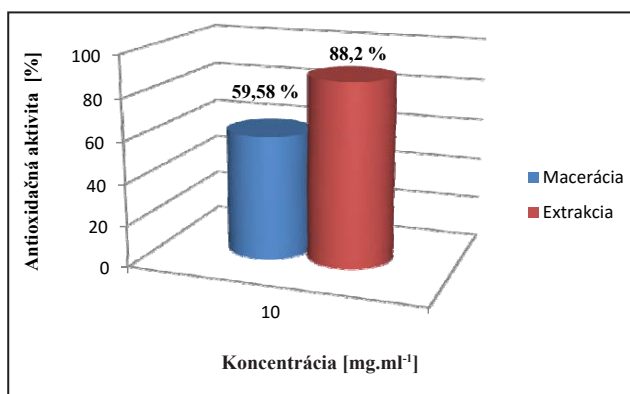
Graf 1: Porovnanie antioxidačnej aktivity extraktov vzoriek húb v rozpúšťadle destilovaná voda (C1)



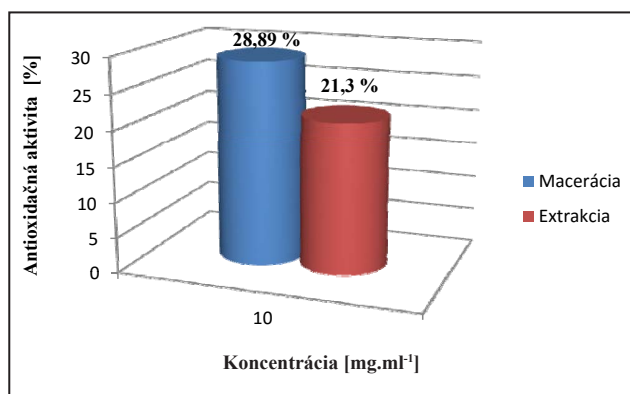
Graf 2: Porovnanie antioxidačnej aktivity extraktov vzoriek húb v rozpúšťadle metanol (C2)



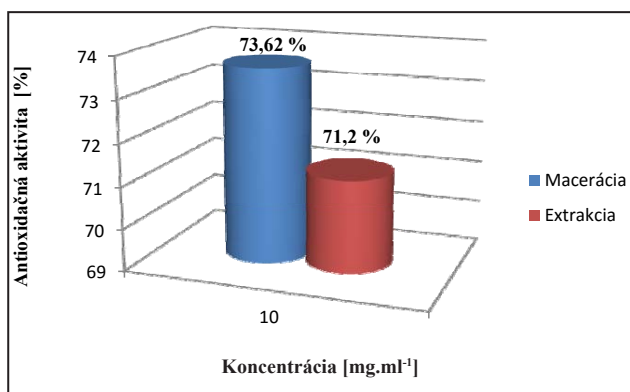
Graf 3: Porovnanie antioxidačnej aktivity extraktov vzoriek húb v rozpúšťadle etanol (C3)



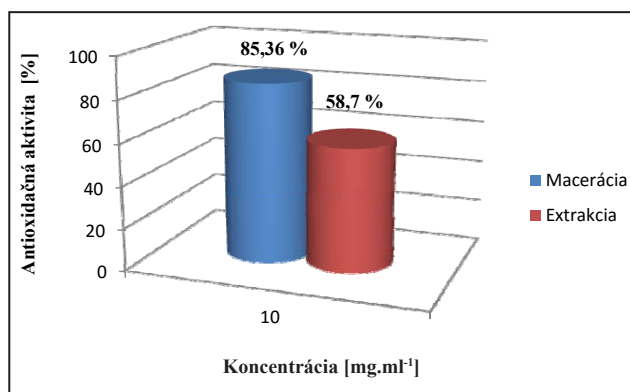
Graf 4: Porovnanie antioxidačnej aktivity extraktov vzoriek húb v rozpúšťadle etylacetát (C4)



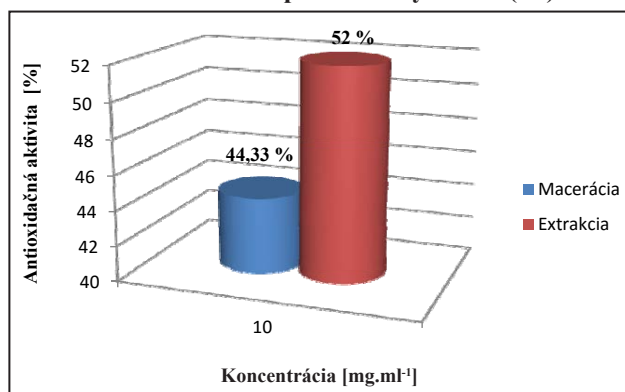
Graf 5: Porovnanie antioxidačnej aktivity extraktov vzoriek húb v rozpúšťadle metanol (P2)



Graf 6: Porovnanie antioxidačnej aktivity extraktov vzoriek húb v rozpúšťadle etanol (P3)



Graf 7: Porovnanie antioxidačnej aktivity extraktov vzoriek húb v rozpúšťadle etylacetát (P4)



a bola použitá pri všetkých meraniach. Celková absorbancia sa vypočítala ako priemer absorbancií troch po sebe idúcich meraní. Výsledky sú zhrnuté v grafoch 1 až 7.

Na základe stanovenej antioxidačnej aktivity (viď grafy 1 – 7) sa vypočítala stredná inhibičná koncentrácia (IC_{50}^{DPPH}) (viď tab. 1). Táto stredná inhibičná koncentrácia je definovaná ako koncentrácia extraktu, pri ktorej bolo 50 % radikálov zachytených za daných podmienok. Vypočítané hodnoty IC_{50}^{DPPH} , prostredníctvom rovnice $y = ax + b$, vykazovali lineárnu závislosť (Shimamura, 2014). Zároveň sa určila spoľahlivosť (R^2). Z meraní vyplýva, že čím je nižšia hodnota IC_{50}^{DPPH} , tým je vyššia hodnota antioxidačnej aktivity (Kumawat, 2012).

U piatich vzoriek sa sledovala antimikrobiálna aktivita. Ako vzorky boli vybraté extrakty húb, ktoré vykazovali najvyššie hodnoty antioxidačnej aktivity. U týchto extraktov sa predpokladalo, že môžu vykazovať antibakteriálnu aktivitu. Jednalo sa predovšetkým o všetky štyri metanolové extrakty získané extrakciou ultrazvukom a maceráciou (extrakty C2 a P2) a jeden etanolový extrakt (P3, macerácia). Antibakteriálne účinky sa testovali na agarových platniach agarovou metódou (Rojas, 2006), na dvoch bakteriálnych kultúrach *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Dané baktérie boli kultivované pri teplote 37 °C, a to po dobu dvadsiatich hodín v BHI bujóne. Ich

následné riedenie sa realizovalo prostredníctvom fosfátového fyziologického roztoku. Samotná kultivácia prebiehala pri teplote 37 °C po dobu 24 hodín.

Z infračervených spektier je možné zistiť vlnočty prislúchajúce vybraným funkčným skupinám látok. Tieto pásy sa pozorovali vo všetkých nameraných spektrách extraktov a poukazujú na prítomnosť zlúčenín zodpovedných za antioxidačnú aktivitu.

DISKUSIA

Huby patria do skupiny heterotrófnych organizmov, pričom ich fylogenetický pôvod bol dlho neznámy. Medzi jedny z najznámejších a v súčasnosti aj najviac skúmaných húb patria huby rodu *Cordyceps* (Kim, 2003; Blackman, 2004; Sung, 2007; Muslim, 2010). Ich náročný zber a nepostačujúci dopyt na trhu podnecuje vedcov hľadať vhodné spôsoby umelej kultivácie. Z doterajších výsledkov vyplýva, že spôsob kultivácie s vhodne zvoleným substrátom zohráva významnú úlohu pri zastúpení účinných látok v konečnom produkte. Ukazuje sa, že svoju úlohu pri izolácii účinných látok z húb má aj samotné rozpúšťadlo, v ktorom prebieha extrakcia. Toto tvrdenie vychádza zo zistenia, že antioxidačná aktivita v rozdielnych rozpúšťadlách pri tej istej extrakcii a rovnakých podmienkach je rozdielna.

Výťažnosť pripravených extraktov sa pohybovala v rozmedzí od 1,41 % (P4, macerácia) do 10,41 % (P1, macerácia). Porovnateľné hodnoty daných výťažností boli porovnateľné s výťažnosťami uvedenými v literatúre (Ungvarská-Maľučká, 2018). Tá uvádza výťažnosti v rozmedzí od 1,7 % do 10 %.

Antioxidačná aktivita extraktov húb pestovaných na kukurici satej získaných maceráciou sa pohybovala v rozmedzí od 94,79 % (rozpúšťadlo metanol) do 28,89 % (rozpúšťadlo etylacetát) (viď graf 1 – 4). Po zriedení daných roztokov táto aktivita postupne klesala. V daných roztokoch nebol prítomný zákal, roztoky boli číre a dobre merateľné. V prípade vodných extraktov zo vzoriek

Tab. 1: Výpočet IC_{50}^{DPPH}

IC_{50}^{DPPH} [mg.ml ⁻¹]						
	Macerácia	Extrakcia ultrazvukom		Macerácia	Extrakcia ultrazvukom	Rozpúšťadlo
C1	4,22	4,80	P1	*	*	Destilovaná voda
C2	2,94	2,78	P2	3,40	5,30	Metanol
C3	7,64	4,81	P3	5,58	7,44	Etanol
C4	17,02	66,68	P4	11,21	10,67	Etylacetát

* vznik zákalu, hodnota neurčená

húb pestovaných na substráte hrachu siateho (P1), sa stretávame s problémom zakalenia roztokov. Tento problém sme sa snažili odstrániť centrifugáciou pripravených roztokov, avšak ani po centrifugovaní roztoky nedosahovali požadovanú čírosť. Prejavom prítomnosti zákalu v roztokoch bola neprimerane vysoká hodnota absorbancie. Zákal vodných extraktov bol natoľko rušivý, že stanovenie antioxidačnej aktivity sa nepodarilo. Predpokladáme však, že dané roztoky mohli mať výraznú antioxidačnú aktivitu, nakoľko po pridaní DPPH radikálu dochádza k výraznej zmene zafarbenia roztokov. Tento problém sa odstránil po zmene rozpúšťadla za metanol, etanol a etylacetát. V prípade extraktov húb, ktorých substrátom bol hrach siaty, najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazovali etanolové roztoky (85,36 %; P3) (vid' graf 6) a najnižšiu etylacetátové roztoky (44,33 %, P4) (vid' graf 7). Z uvedeného vyplýva, že voda a etylacetát nie sú najvhodnejšie rozpúšťadlá použité na izolácie účinných látok z húb rodu *Cordyceps sinensis* pestovaných na substrátoch kukurica siata a hrach siaty.

Antioxidačná aktivita extraktov húb pestovaných na kukurici siatej získaných extrakciou ultrazvukom sa pohybovala v rozmedzí od 90,60 % (C2, metanolový roztok) po 21,30 % (C4, etylacetátový roztok) (vid' graf 1 – 4). Zákal v prípade týchto rozpúšťadiel nebol prítomný. Najvyššie stanovená hodnota antioxidačnej aktivity však dosahuje nižšiu hodnotu (90,60 %; C2) v porovnaní s

maceráciou (94,79 %; C2) pre najvyššie koncentrácie metanolových roztokov (vid' graf 2). Predpokladáme, že svoju úlohu tu môže zohrávať aj vyššia teplota ultrazvukovej extrakcie (65 °C) oproti macerácii, ktorá prebieha pri laboratórnej teplote.

U pripravených extraktov húb ultrazvukovou extrakciou pestovaných na hrach siatom opäť pozorujeme problém vzniku zákalu vodných roztokov. Vzniknutý zákal sa neodstránil ani opakovanou filtráciou, ani opakovanou centrifugáciou. Preto tieto vodné roztoky nie sú zahrnuté do celkového vyhodnotenia. Najvyššia antioxidačná aktivita bola zaznamenaná v prípade metanolových roztokov (71,20 %; P2) (vid' graf 5) a najnižšia v prípade etylacetátových roztokov (52 %, P4) (vid' graf 7). Tá však v porovnaní s maceráciou výrazne stúpla (vid' graf 7). Z daných meraní vyplývalo, že použité rozpúšťadlá ovplyvnili prítomnosť účinných látok v meraných extraktoch zodpovedných za antioxidačnú aktivitu. Rozpúšťadlo etylacetát sa javí ako najmenej vhodné rozpúšťadlo, nakoľko antioxidačná aktivita všetkých pripravených extraktov bola značne nízka. Problém destilovanej vody a vzniku neželaného zákalu nemusí hneď znamenať nevhodnosť destilovanej vody ako rozpúšťadla, musí sa však hľadať vhodný spôsob jeho odstránenia. Vhodne zvolené rozpúšťadlá sú predovšetkým metanol a etanol.

Stredná inhibičná koncentrácia IC_{50}^{DPPH} je parametrom využívaným na porovnanie antioxidačnej aktivity. Jej nižšia hodnota znamená lepšiu

aktivitu zachytávania radikálov (Kumawat, 2012). Celkové hodnoty IC_{50}^{DPPH} sú uvedené v tabuľke 1. Extrakty húb extrahovaných v metanole a etanole vykazovali dobrú schopnosť zachytávať DPPH radikál. Hodnoty IC_{50}^{DPPH} extraktov získaných maceráciou z húb pestovaných na kukurici siatej sa pohybovali v rozmedzí od 2,94 mg.ml⁻¹ (metanolvý roztok) do 17,02 mg.ml⁻¹ (etylacetátový roztok). Rovnaké zistenie sa pozorovalo aj v prípade extrakcie ultrazvukom, kedy metanolvý extrakt dosahoval najnižšiu hodnotu IC_{50}^{DPPH} (2,78 mg.ml⁻¹), kým extrakt húb s použitým rozpúšťadlom etylacetát dosahoval neporovnateľne vyššiu hodnotu.

Extrakty húb *Cordyceps sinensis* pestované na substráte hrach siaty vykazovali paralelné zistenia. Hodnoty IC_{50}^{DPPH} metanolvých roztokov pri macerácii a súčasne aj pri extrakcii ultrazvukom dosahovali najnižšie hodnoty; a to 3,40 mg.ml⁻¹ a 5,30 mg.ml⁻¹. Extrakty húb v rozpúšťadle etylacetát dosahovali najvyššie hodnoty, poukazujúc na značne nižšiu antioxidačnú aktivitu oproti etanolovým a metanolovým extraktom. Stanoviť hodnotu IC_{50}^{DPPH} vodných roztokov nebolo možné z dôvodu zakalenia roztokov. Literatúra Tuli, 2014 uvádza, že za antioxidačnú aktivitu zodpovedajú predovšetkým polysacharidy, ktoré sa zúčastňujú odstraňovania voľných radikálov. Vzhľadom na prítomnosť cordycepínu a D-manitolu (Li, 2006) v týchto hubách predpokladáme, že ich prítomnosť v metanolvých extraktoch ovplyvnila zistené hodnoty antioxidačnej aktivity.

U piatich vzoriek sa sledovala antimikrobiálna aktivita. Vybraté boli vzorky s najvyššou hodnotou antioxidačnej aktivity. Jednalo sa o všetky štyri metanolvé extrakty získané extrakciou ultrazvukom a maceráciou (extrakty C2 a P2) a jeden etanolový extrakt (P3, macerácia). Ani jedna z týchto vzoriek nevykazovala antimikrobiálnu aktivitu. Odborná literatúra uvádza, že za antimikrobiálnu aktivitu zodpovedajú zlúčeniny patriace do skupiny peptidov, glykoproteínov a v nemalej miere aj samotný cordycepín (Manjunatha, 2009).

U všetkých pripravených vzoriek extraktov

húb sa odmerali IČ spektrá. Z analýzy odmeraných spektier je možné priradiť vlnočty vybraným funkčným skupinám látok. V prvom rade ide o silné pásy symetrickej a rovnako aj asymetrickej vibrácie karboxylovej skupiny. Literatúra popisuje prítomnosť týchto pásov v oblasti od 1500 cm⁻¹ do 1630 cm⁻¹ pre asymetrickú vibráciu a v oblasti od 1300 cm⁻¹ do 1400 cm⁻¹ pre symetrickú vibráciu (Nakamoto, 1963; Oldham, 1987). Tieto pásy sa pozorovali vo všetkých nameraných spektrách extraktov a poukazujú na prítomnosť zlúčenín obsahujúcich karboxylovú skupinu. V nameraných IČ spektrách sa pozorovali aj intenzívne a široké pásy prislúchajúce valenčným vibráciám v (O-H) skupín v oblasti okolo 3400 cm⁻¹. Hodnoty vlnočtov vibrácií v (O-H) môžu byť v dôsledku prítomností vodíkových väzieb posunuté k nižším hodnotám vlnočtov. Prítomnosť pásov v oblasti ~ 3000 cm⁻¹ je možné priradiť vibráciám väzieb C-H. Tieto pásy majú síce malú intenzitu, avšak v spektrách je ich poloha charakteristická, a teda aj ľahko identifikovateľná. Vibrácia C-H na alifatickom uhľiku sa objavuje tesne pod hodnotou vlnočtu 3000 cm⁻¹. Nad 3000 cm⁻¹ sa daná vibrácia objavuje v prípade, ak atóm uhlíka je viazaný v aromatickom kruhu. Absorpčné pásy valenčných vibrácií v (C=C) sú v nameraných spektrách pomerne slabé. Objavujú sa v okolí približne 1650 cm⁻¹. Problém pri charakterizácii týchto pásov je spôsobený tým, že v ich okolí sa nachádzajú aj intenzívnejšie pásy. Identifikácia týchto pásov v nameraných spektrách bola zložitá. V oblasti ~ 1625 cm⁻¹ sa nachádzajú absorpčné pásy prislúchajúce valenčným vibráciám v (C_{ar}-N).

ZÁVER

V súčasnosti sa *Cordyceps sinensis* dostáva do popredia verejnosti predovšetkým ako výživový doplnok. Zaujímavý je nielen z hľadiska svojho zloženia, ale rovnako aj preukázateľnými priaznivými účinkami. Nakoľko je záujem o prírodný *Cordyceps* značne veľký a jeho zber nie je jednoduchý, hľadajú sa riešenia jeho umelej kultivácie.

Bola stanovená a porovnaná antioxidačná aktivita daných extraktov. Ako najvhodnejšie rozpúšťadlo pre uvedené extrakcie sa ukazuje metanol, naproti tomu najmenej vhodným rozpúšťadlom je etylacetát. Voda ako použité rozpúšťadlo nemusí zákonite vystupovať ako nevhodné rozpúšťadlo. Je potrebné však nájsť vhodný spôsob odstránenia zákalu. Dané extrakty húb nevykazovali antimikrobiálnu aktivitu.

Zo zistení je možné usúdiť, že vhodnejším médiom na kultiváciu je kukurica siata oproti hrachu siatemu. Ako metóda získavania obsahových látok bola v tomto prípade vhodnejšia macerácia a rozpúšťadlo metanol.

ZOZNAM LITERATÚRY

Blackman, M. R. et al.: *Encyclopedia of Dietary Supplement*. New York: Marcel Dekker, 2004. 920.

Hobbs, C.: *Medicinal Mushrooms: an Exploration of Tradition, Healing, and Culture*. Santa Cruz (CA): Botanica Press, 1995, 251.

Holliday, J., Cleaver, M.: Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2008, 10 (3), 219.

Humber, R. A. et al.: *Fungal pathogens and parasites of insects*. New York: Springer Dordrecht, 2000, 479 p.

Jiang, J. C., Gao, Y. F.: Summary of treatment of 37 chronic renal dysfunction patients with JinShuiBao. *Journal Administration Traditional Chinese Medicine*, 1995, 5, 23.

Kim, K. M., Kwon, Y. G., Chung, H. T., Yun, Y. G., Pae, H. O., Han, J. A., Ha, K. S., Kim, W. T., Kim, Y. M.: Methanol extract of *Cordyceps pruinosa* inhibits *in vitro* and *in vivo* inflammatory mediators by suppressing NF- κ B activation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003, 190 (1), 1.

Kumawat, B. K., Gupta, M., Sinh, Y.: Free radical scavenging effect of various extracts of leaves of *Balanite aegyptica* (L.) delile by DPPH method. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2012,

2 (3), 323.

Li, S. P., Yang, F. Q., Tsim, K. W. K.: Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41 (5), 1571.

Manjunatha, U., Boshoff, H. I., Barry, C. E.: The mechanism of action of PA824: Novel insights from transcriptional profiling. *Communicative & Integrative Biology*, 2009, 2, 215.

Muslim, N., Rahman, H.: A possible new record of *Cordyceps* species from Ginseng Camp. *Journal of Tropical Biology and Conservation*, 2010, 6, 39.

Nakamoto, K.: Infrared spectra of inorganic and coordination compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1963, 52 (8), 818.

Oldham, C.: *Carboxylates, Squarates and Related Species in Coordination Compounds*. Oxford: MC Clevery Pergamon Press, 1987, 435 p.

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

Sharma, O. P., Bhat, T. K.: DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 2009, 113 (4), 1202.

Shimamura T., Shimamura T., Sumikura Y., Yamazaki, T., Tada, A., Kashiwagi, T., Ishikawa, H., Matsui, T., Sugimoto, N., Akiyama, H., Uked, H.: Applicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidant capacity of food additives-inter-laboratory evaluation study. *Analytical Sciences*, 2014, 30 (7), 717.

Sung, G. H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J. M., Luangsa, J. J., Shrestha, B., Spatafora, J. W.: Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in mycology*, 2007, 57, 5.

Tuli, H. S., Sandhu S. S., Sharma, A. K.: Pharmacological and therapeutic potencial of cordyceps with special reference to cordycepin. *3 Biotech.*, 2014, 4 (1), 1.

Ungvarská-Maľučká, L., Harvanová, J., Uhrinová, A., Salayová, A., Pavlík, M., Rajtár, M.: Antioxidant activity and infrared spectroscopy analysis of alcoholic extracts obtained from *Paecilomyces hepiali* (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2018, 20 (6), 11.

Xiang, F., Lin, L., Hu, M., Qi, X.: Therapeutic efficacy of a polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis* on hypertensive rats. *International journal of biological macromolecules*, 2016, 82, 308.

Xu, R. H., Peng, X. E., Chen, G. Z., Chen, G. L.: Effects of *Cordyceps sinensis* on natural killer activity and colony formation of B16 melanoma. *Journale Chinese Medical*, 1992, 105 (2), 97.

Yamaguchi, N., Yoshida, J., Ren, L. J., Chen, H., Miyazawa, Y., Fujii, Y., Huang, Y. X., Takamura, S., Suzuki, S., Koshimura, S.: Augmentation of various immune reactivities of tumor-bearing hosts with an extract of *Cordyceps sinensis*. *Biotherapy*, 1990, 2 (3), 199.

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

Zhu, J. S., Halpern, G. M., Jones, K.: The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: Part I. *The journal of alternative and complementary medicine*, 1998, 4 (3), 289.



ANTIBIOFILMOVÁ ÚČINNOSŤ VYBRANÝCH SILÍC NA BIOFILM-TVORIACE KVASINKY *CANDIDA ALBICANS* A *CANDIDA KRUSEI*

ANTIBIOFILM EFFICIENCY OF SELECTED ESSENTIAL OILS ON BIOFILM-FORMING YEASTS *CANDIDA ALBICANS* AND *CANDIDA KRUSEI*

Hornýák, Gabriella; Čonková, Eva

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

eva.conkova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Rastlinné silice predstavujú významný zdroj prírodných látok, ktoré sa vyznačujú rôznou biologickou aktivitou. Zloženie silíc je variabilné a špecifické pre každý rastlinný druh. Testovaná bola antifungálna a antibiofilmová účinnosť 8 komerčných rastlinných silíc z čajovníka citrónového, dúšky materinej, kôry gáfrovníka lekárskeho, z listu gáfrovníka lekárskeho (Hoshu), šalvie lekárskej, šalvie muškátovej (muškát), rosaliny a klinčekovca vôňavého na izolátoch *Candida albicans* a *Candida krusei*. Pre stanovenie citlivosti planktonických buniek a biofilm tvoriacich kvasiniek bola použitá štandardná mikrodilučná metóda M27-A2 (CLSI 2002). Planktonické bunky *Candida albicans*

vykazovali 100 % citlivosť na silice z čajovníka citrónového, gáfrovníka a dúšky materinej pri MIC 0,4 mg.ml⁻¹. Na planktonické bunky *Candida krusei* boli najúčinnějšíe silice z gáfrovníka a dúšky materinej (84,6 %); pri ktorých hodnoty MIC boli v rozpätí 0,4 – 0,8 mg.ml⁻¹. Pri testovaní 0 h a 48 h biofilmu *C. albicans* bola zistená 100 % efektívnosť silice z čajovníka citrónového v najnižšej testovanej koncentrácii 0,1 mg.ml⁻¹. Silica z dúšky materinej bola najúčinnějšía na 0 h biofilm *Candida krusei*, so 100 % aktivitou pri MIC 0,4 – 0,8 mg.ml⁻¹ a 88,9 % efektom na 48 h biofilm s MIC 0,1 – 0,8 mg.ml⁻¹.

Kľúčové slová: antibiofilmová aktivita; biofilm; *Candida albicans*; *Candida krusei*; rastlinné silice

ABSTRACT

Essential oils are important source of natural substances, impacting various biological activities. The composition of essential oils is variable and specific to each plant species. The antifungal and potencial antibiofilm efficiency of 8 commercial essential oils gained from lemon-scented tea tree, wild thyme, camphor tree bark, camphor tree leaf (Ho-sho), common sage, clary sage, swamp paperbark and cloves was tested on isolates of *Candida albicans* and *Candida krusei*. The standard microdilution method M27-A2 (CLSI 2002) was used to determine the susceptibility of planktonic and biofilm-forming cells.

Planktonic cells of *Candida albicans* were the most sensitive (100 %) to essential oils from lemon-scented tea tree, camphor tree bark and wild thyme at an MIC of 0.4 mg. ml⁻¹. Essential oils from camphor tree bark and wild thyme were the most effective for *Candida krusei* planktonic cells (84.6 %), with MIC values of 0.4 – 0.8 mg.ml⁻¹.

When testing 0 h and 48 h biofilm of *C. albicans*, 100 % efficacy of lemon-scented tea tree was found at the lowest tested concentration of 0.1 mg.ml⁻¹. Essential oil of wild thyme was the most effective on 0 h biofilm *Candida krusei*, with 100 % activity at MIC 0.4 – 0.8 mg.ml⁻¹ and 88.9 % effect on 48 h biofilm with MIC 0.1 – 0.8 mg.ml⁻¹.

Key words: antibiofilm activity; biofilm; *Candida albicans*; *Candida krusei*; plant essential oils

ÚVOD

Rod *Candida* zahŕňa približne 150 druhov, ktoré sú detegované väčšinou ako jednobunkové kvasinky, niektoré druhy však majú schopnosť vytvárať aj iné formy, ako sú pseudohýfy a hýfy (Moran a kol., 2012).

Medicínsky významných kandid, ktoré sú príčinou infekcií u ľudí, je osem druhov. Najčastejšími

pôvodcami mykotických ochorení sú *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dublinensis*, *C. glabrata*, *C. brumptii*, *C. catenolata*, *C. intermedia*. Kandidové infekcie postihujú hlavne povrch slizníc a ich prejavom je najmä vulvovaginálna a orofaryngeálna kandidóza. Vulvovaginitída, ktorých pôvodcom je *Candida* spp., sú najčastejšou kandidózou v Európe a druhou najrozšírenejšou mykózou v USA (Votava, 2003).

C. albicans sa vyznačuje najvyššou patogenitou a z klinického materiálu je izolovaná najčastejšie. *Candida krusei* je v poradí piatym najbežnejším izolátom rodu *Candida* spôsobujúcim infekcie u ľudí na celom svete. Postihuje najmä pacientov s neutropéniou. Vyznačuje sa multirezistenciou na liečivá, a to kvôli prirodzenej rezistencii na flukonazol a zníženej citlivosti na flucytozín a amfotericín B (Pfaller, 2008).

Jedným z prejavov patogenity mikroorganizmov je tvorba biofilmu. Biofilm predstavuje spoločenstvo mikroorganizmov, ktoré žije v extracelulárnej polymérnej matici pripojenej k pevnému živému alebo neživému povrchu. Mikroorganizmy v biofilme, na rozdiel od planktonických buniek, sú schopné meniť svoj fenotyp, preto sú rezistentnejšie voči antimykotikám a priebeh infekcií spôsobených biofilmami môže byť podstatne závažnejší (Garrett a kol., 2008).

Vzhľadom na odolnosť biofilmu voči antimikrobiálnym liečivám je potrebné hľadať alternatívne liečivé látky s potenciálnym antimykotickým účinkom. Cieľom tejto štúdie bolo otestovať antifungálnu a antibiofilmovú aktivitu vybraných komerčných rastlinných silíc.

MATERIÁL A METÓDY

Tvorba biofilmu bola otestovaná na 11 klinických izolátoch *Candida albicans* a 13 izolátoch *Candida krusei*, ktoré poskytol Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie Univerzitnej nemocnice Louisa Pasteura v Košiciach a na referenčných kmeňoch *Candida albicans* CCM 8215 a *Candida krusei* CCM

Tab. 1: Interpretačné kritériá pre hodnotenie tvorby biofilmu

Priemerná hodnota OD	Produkcia biofilmu
OD < OD _c	Žiadna
OD _c < OD < 2x OD _c	Slabá
2x OD _c < OD < 4x OD _c	Mierna
OD > 4x OD _c	Silná

OD – optická densita vzorky; OD_c – priemerná hodnota negatívnej kontroly + 3x SD negatívnej kontroly

8271 (Česká sbírka mikroorganizmů, Brno, Česká republika). Na testovanie bola použitá metodika podľa Jina a kol. (2003), čiastočne modifikovaná. Intenzita tvorby biofilmu bola vyhodnotená podľa interpretačných kritérií (viď tab. 1), ktoré uvádzajú Ruchi a kol. (2011).

Citlivosť planktonických buniek a biofilm-tvoriacich kvasiniek *Candida albicans* a *Candida krusei* na rastlinné silice bola testovaná štandardnou mikrodilučnou metódou M27-A2 (CLSI, 2002).

Východzia koncentrácia (400 mg.ml⁻¹) rastlinných silíc z čajovníka citrónového – *Leptospermum petresonii aetheroleum*, dúšky materinej – *Serpylli aetheroleum*, klinčekovca voňavého – *Syzygi folii aetheroleum*, šalvie muškátovej (muškát) – *Salvia sclarea aetheroleum*, šalvie lekárskej – *Salviae officinalis aetheroleum*, rosaliny – *Melaleuca ericifoliae aetheroleum*, gábrovníka – *Cinnamomi camphorae aetheroleum* (silica Ho-sho, získaná z listov) a *Cinnamomi camphorae aetheroleum* – získanej z dreva a vetiev (PharmDr. Peter Hanus, HANUS – bylinné prípravky, Nitra, SR) bola pripravená nariedením parafínom. Sterilita roztokov bola zabezpečená filtráciou cez 0,22 µm sterilné striekačkové mikrofiltre (Frisenette ApS, Knebel, Dánsko). Jednotlivé koncentrácie testovaných silíc v rozpätí 400 – 0,8 mg.ml⁻¹ boli pripravené dvojkovým riedením priamo v mikrotitračnej platničke. Po pridaní inokula (10³ KTJ/ml) predstavovali výsledné koncentrácie 200 – 0,4 mg.ml⁻¹. Hodnoty MIC

(minimálna inhibičná koncentrácia) boli odčítané po 24-hodinovej inkubácii pri 35 °C.

Pri testovaní antibiofilmového účinku boli použité silice z čajovníka citrónového, gábrovníka a dúšky materinej, ktoré pri testovaní planktonických buniek vykazovali najlepší antifungálny účinok. Zisťovaná bola účinnosť silíc na adherované bunky (0 h biofilm) a zrelý (48 h) biofilm. K bunkám kvasiniek adherovaných na stenu mikrotitračnej platničky bolo pridané živné médium (100 µl SBG – Sabourad dextrózový bujón s prídavkom 100 mM glukózy; HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) a 100 µl jednotlivých koncentrácií silíc (50 – 0,1 mg.ml⁻¹). Platničky boli inkubované 24 h pri teplote 35 °C za kontinuálneho pretrepávania na orbitálnej trepačke pri 80 rpm.

Pri testovaní 48 h biofilmu (zrelý biofilm) bol k adherovaným bunkám pridaný SBG (200 µl) a za kontinuálneho pretrepávania na orbitálnej trepačke pri 80 rpm sa nechal tvoriť biofilm 48 hodín pri 35 °C. Po uplynutí 48 h boli platničky premyté 2x so 150 µl PBS a podobne ako pri 0 h biofilme boli do jamiek platničky aplikované SBG (100 µl) a jednotlivé koncentrácie silíc (50 – 0,1 mg.ml⁻¹; 100 µl). Antibiofilmový účinok silíc bol vyhodnotený po 24 hodinách inkubácie pri 35 °C a pretrepávaní platničiek na orbitálnej trepačke pri 80 rpm.

Kvôli lepšej vizualizácii bol do každej jamky v platničke, 4 h pred odčítaním výsledkov pridaný 0,15 % roztok resazurínu (10 µl), ktorý v prípade

Tab. 2: Intenzita tvorby biofilmu (%)

Intenzita tvorby biofilmu	<i>C. albicans</i> n/%	<i>C. krusei</i> n/%
žiadna	2/18,2	3/23,1
slabá	8/72,7	8/61,5
mierna	–	2/15,4
silná	1/9,1	–

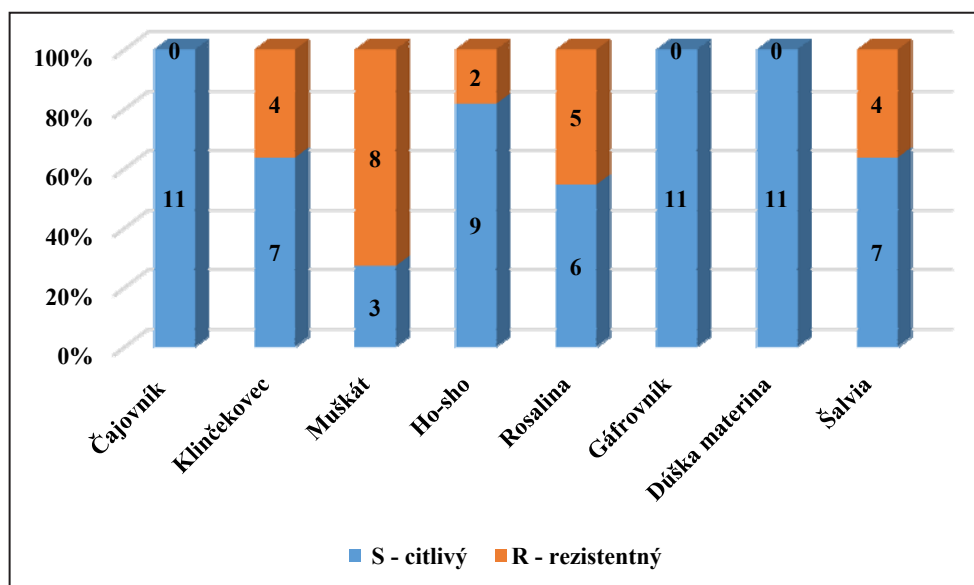
n – počet testovaných izolátov

Tab. 3: Štatistické vyhodnotenie MIC (mg.ml⁻¹) rastlinných silíc a ich efekt na planktonické bunky *C. albicans*

Parameter	Šalvia	Čajovník	Klinčekovec	Muškat	Ho-sho	Rosalina	Gáfrovník	Dúška materina
min. – max.	12,5 – 50	0,4	0,4 – 3,13	50 – 100	0,4 – 3,13	1,6 – 6,25	0,4	0,4
x	33,0	0,4	2,6	95,4	2,0	4,9	0,4	0,4
SD	14,0	0	3,4	41,5	0,7	2,0	0	0
Mo	25,0	0,4	0,8	100	0,8	6,3	0,4	0,4
Me	25,0	0,4	1,6	100	0,8	3,13	0,4	0,4
S (n/%)	7/63,6	11/100	7/63,6	3/27,3	9/81,8	6/54,5	11/100	11/100
R (%)	4/36,4	0	4/36,4	8/72,7	2/18,2	5/45,5	0	0

x – priemer, SD – smerodajná odchýlka, Mo – modus, Me – medián, S – citlivý, R – rezistentný

Graf 1: Účinnosť (%) rastlinných silíc na planktonické bunky *C. albicans*



negatívnej reakcie sfarbil roztok na fialovo a pri pozitívnej reakcii do svetlo ružova, čo svedčilo o tvorbe biofilmu.

Hodnoty MIC boli odčítané v jamke s negatívnou reakciou. Ako interpretačné kritérium pre vyhodnotenie citlivosti kvasiniek na silice boli použité hodnoty mediánu, pomocou ktorého boli izoláty hodnotené ako citlivé (S), resp. rezistentné (R) na testovanú silicu.

VÝSLEDKY

Intenzitu tvorby biofilmu izolátmi *Candida albicans* a *Candida krusei* dokumentuje tabuľka 2. Z 11 klinických izolátov *C. albicans* nebola pozorovaná žiadna tvorba biofilmu pri 2 kmeňoch (18,2 %). Osem izolátov (72,7 %) vykazovalo slabú tvorbu biofilmu a iba 1 kmeň (9,1 %) produkoval biofilm intenzívne. Z 13 testovaných kmeňov *C. krusei*, 3 izoláty (23,1 %) nevytvárali biofilm, pri 8 kmeňoch (61,5 %) bola zaznamenaná slabá produkcia biofilmu a 2 kmene (15,4 %) tvorili biofilm mierne.

Štatistické parametre vyhodnocujúce MIC testovaných rastlinných silíc a ich efektivitu na planktonické bunky *C. albicans* sú uvedené v tabuľke 3. Antifungálnu účinnosť jednotlivých silíc znázorňuje graf 1.

Všetky kmene *C. albicans* boli citlivé (100 %) na silice z čajovníka citrónového, gáfrovníka a dúšky materinej, pri najnižšej testovanej koncentrácii 0,4 mg.ml⁻¹. Nižšia účinnosť bola zistená pri silici Ho-sho, pri ktorej sa hodnoty MIC pohybovali od 0,4 do 3,13 mg.ml⁻¹. Na silicu Ho-sho bolo citlivých 9 izolátov (81,8 %). Rovnako silica z klinčekovca voňavého, na ktorú bolo citlivých 7 izolátov (63,6 %); bola účinná v koncentráciách 0,4 – 3,13 mg.ml⁻¹. Na silicu zo šalvie lekárskej s MIC 12,5 – 50 mg.ml⁻¹ bolo tiež citlivých 7 kmeňov (63,6 %). Hodnoty MIC pri silici z rosality boli v rozpätí 1,6 – 6,25 mg.ml⁻¹. Na túto silicu bola zistená citlivosť 5 izolátov (54,5 %). Najnižšiu účinnosť vykazovala silica zo šalvie muškátovej (muškát), s hodnotami MIC 50 – 100 mg.ml⁻¹, pričom citlivosť bola zaznamenaná iba pri 3 kmeňoch (27,3 %).

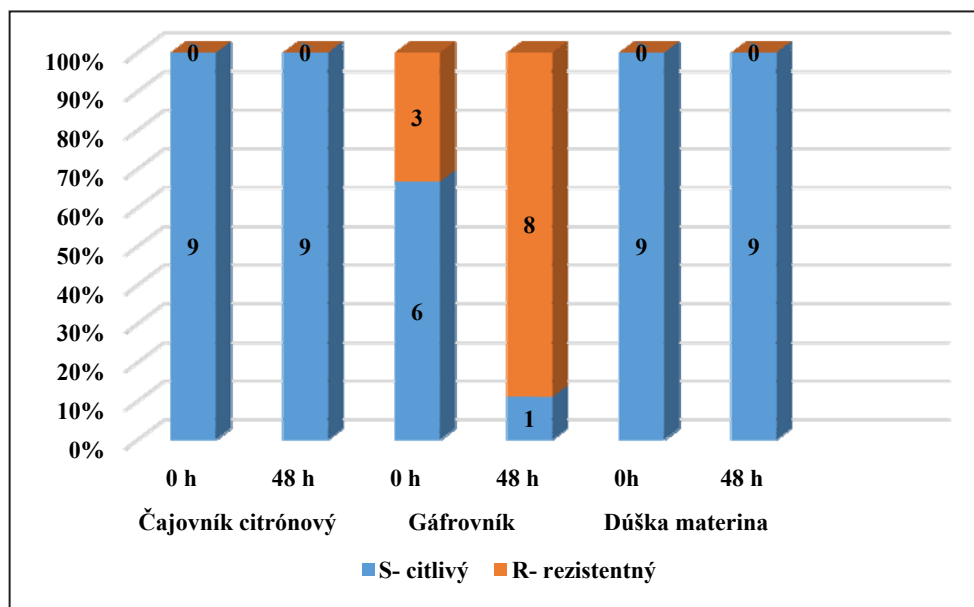
Tabuľka 4 prezentuje štatistické vyhodnotenie MIC rastlinných silíc účinných na 0 h a 48 h biofilm produkovaný kmeňmi *C. albicans*. Silica z čajovníka citrónového inhibovala tvorbu 0 h aj 48 h biofilmu všetkých testovaných kmeňov pri MIC 0,1 mg.ml⁻¹. Silica z gáfrovníka pôsobila na 0 h biofilm v koncentráciách 0,2 – 1,6 mg.ml⁻¹ a na 48 h biofilm v koncentráciách od 0,4 do 6,25 mg.ml⁻¹. Silica z dúšky materinej bola účinná na 0 h biofilm v koncentráciách 0,1 – 0,4 mg.ml⁻¹ a na 48 h biofilm pri MIC 0,1 – 0,2 mg.ml⁻¹.

Tab. 4: Štatistické vyhodnotenie MIC (mg.ml⁻¹) rastlinných silíc na 0 h a 48 h biofilm *C. albicans*

Parameter	Čajovník citrónový		Gáfrovník		Dúška materina	
	biofilm		biofilm		biofilm	
	0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h
min.-max.	0,1	0,1	0,2 – 1,6	0,4 – 6,25	0,1 – 0,4	0,1 – 0,2
x	0,1	0,1	0,6	1,9	0,3	0,1
SD	0	0	0,6	1,7	0,1	0,1
Mo	0,1	0,1	0,2	1,6	0,2	0,1
Me	0,1	0,1	0,5	1,6	0,3	0,1
S (n/%)	9/100	9/100	6/66,7	1/11,11	9/100	9/100
R (n/%)	0	0	3/33,3	8/88,89	0	0

x – priemer, SD – smerodajná odchýlka, Mo – modus, Me – medián, S – citlivý, R – rezistentný

Graf 2: Účinnosť (%) rastlinných silíc na 0 h a 48 h biofilm *C. albicans*



Tab. 5: Štatistické vyhodnotenie MIC (mg.ml⁻¹) rastlinných silíc na planktonické bunky *C. krusei*

Parameter	Šalvia	Čajovník	Klinčekovec	Muškát	Ho-sho	Rosalina	Gáfrovník	Dúška materina
min. – max.	12,5 – 100	0,4 – 3,13	0,4 – 3,13	50 – 100	0,4 – 3,13	3,13 – 12,5	0,4 – 0,8	0,4 – 0,8
x	49,0	1,1	0,9	96,2	1,0	7,9	0,5	0,5
SD	43,1	1,0	0,9	13,9	0,7	3,3	0,2	0,2
Mo	12,5	0,4	0,4	100	0,8	6,3	0,4	0,4
Me	12,5	0,4	1,6	100	0,8	6,3	0,4	0,4
S (n/%)	7/53,9	7/53,9	6/46,2	1/7,7	3/23,1	0	11/84,6	11/84,6
R (%)	6/46,2	6/46,2	7/53,9	12/92,3	10/76,9	11/100	2/15,4	2/15,4

x – priemer, SD – smerodajná odchýlka, Mo – modus, Me – medián, S – citlivý, R – rezistentný

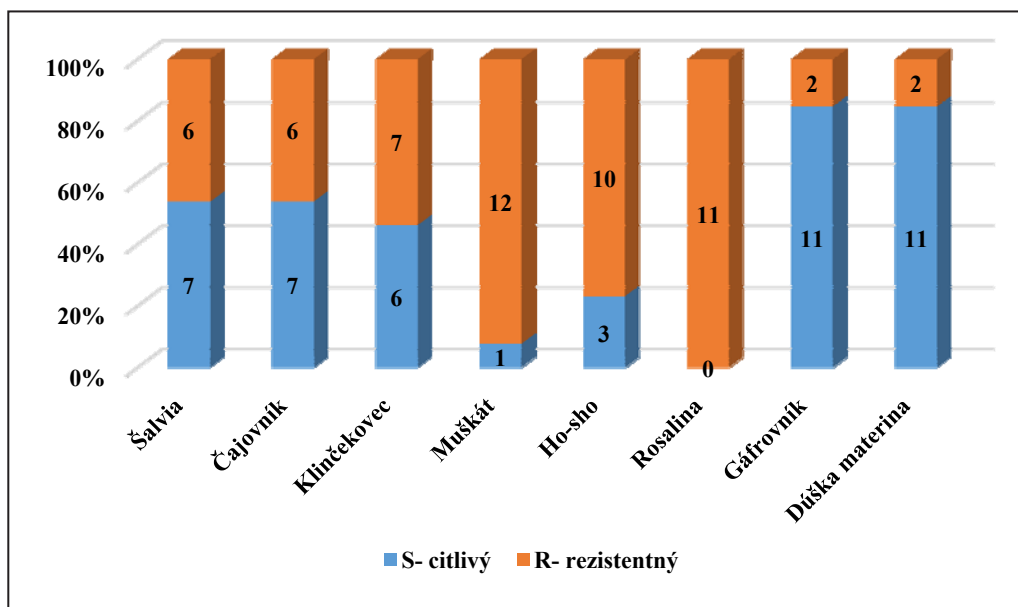
Antibiofilmovú aktivitu silíc znázorňuje graf 2. Silice z čajovníka citrónového a dúšky materinej vykazovali 100 % účinnosť pri 0 h aj 48 h biofilme. Na silicu z gáfrovníka bolo citlivých 6 kmeňov (66,7 %) 0 h biofilmu a iba 1 izolát (11,1 %) 48 h biofilmu.

Štatistické vyhodnotenie MIC silíc pôsobiacich na planktonické bunky *Candida krusei* uvádza tabuľka 5, a ich antifungálnu aktivitu ilustruje graf 3.

Z 13 izolátov *C. krusei* bolo 11 kmeňov (84,6 %) citlivých na silice z gáfrovníka a dúšky materinej, ktorých MIC boli v rozpätí 0,4 – 0,8 mg.ml⁻¹. O niečo nižšia antifungálna aktivita bola zistená pri siliciach

z čajovníka citrónového a šalvie lekárskej, na ktoré bolo citlivých 7 izolátov (53,9 %). Hodnoty MIC pri silici z čajovníka citrónového predstavovali 0,4 – 3,13 mg.ml⁻¹ a pri silici zo šalvie lekárskej dosahovali 12,5 – 100 mg.ml⁻¹. Na silicu z klinčekovca voňavého bolo citlivých 6 izolátov (46,2 %); hodnoty MIC sa pohybovali od 0,4 do 3,13 mg.ml⁻¹. Rovnako MIC silice Ho-sho boli v rozpätí 0,4 – 3,13 mg.ml⁻¹, avšak na túto silicu boli citlivé iba 3 izoláty (23,1 %). Hodnoty MIC pri silici zo šalvie muškátovej (muškát) dosahovali 50 – 100 mg.ml⁻¹ a citlivosť bola zaznamenaná iba pri jednom kmeni (7,7 %). Pri

Graf 3: Účinnosť (%) rastlinných silíc na planktonické bunky *C. krusei*



Tab. 6: Štatistické vyhodnotenie MIC (mg.ml⁻¹) rastlinných silíc na 0 h a 48 h biofilm *C. krusei*

Parameter	Čajovník citrónový		Gábrovník		Dúška materina	
	biofilm		biofilm		biofilm	
	0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h
min.-max.	0,1 – 1,6	0,1	0,2 – 1,6	0,2 – 1,6	0,4 – 0,8	0,1 – 0,8
x	0,6	0,1	1,2	0,7	0,7	0,2
SD	0,7	0	0,5	0,6	0,2	0,2
Mo	0,2	0,1	1,6	0,2	0,8	0,1
Me	0,2	0,1	1,6	0,8	0,8	0,2
S	6/66,7	9/100	4/44,4	7/77,8	9/100	8/88,9
R	3/33,3	0	5/55,6	2/22,2	0	1/11,1

x - priemer, SD - smerodajná odchýlka, Mo - modus, Me - medián, S - citlivý, R- rezistentný

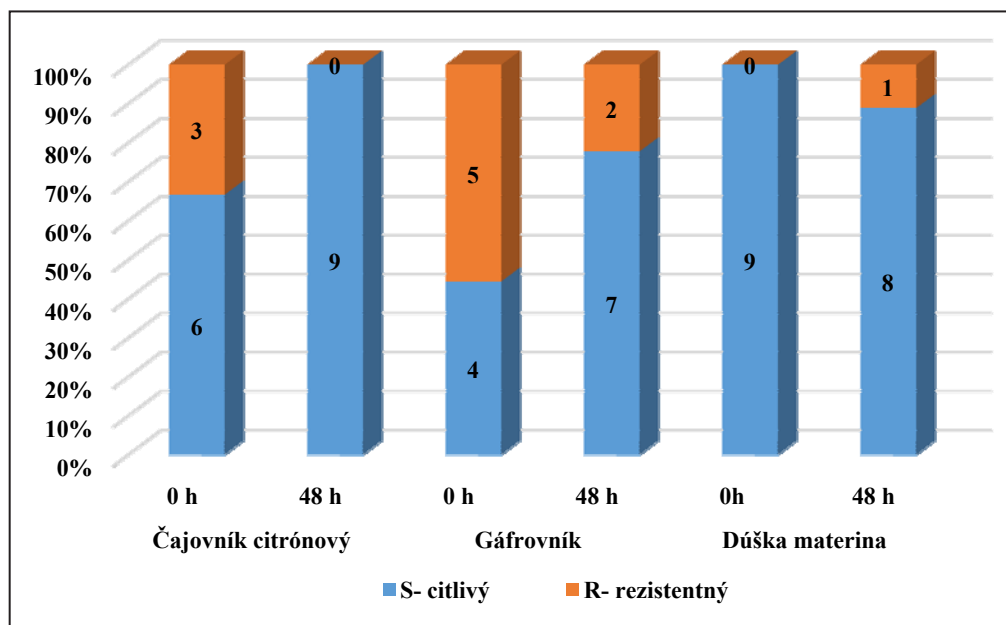
silici z rosaliny sme zistili 100 % rezistenciu všetkých izolátov *C. krusei*, hodnoty MIC sa pohybovali od 3,13 – 12,5 mg.ml⁻¹.

Tabuľka 6 prezentuje štatistické vyhodnotenie MIC rastlinných silíc účinných na 0 h a 48 h biofilm *C. krusei*. Ich antibiofilmová aktivita je znázornená grafom 4.

Silica z čajovníka citrónového inhibovala tvorbu 0 h biofilmu v koncentráciách 0,1 – 1,6 mg.ml⁻¹ a 48 h biofilmu v koncentrácii 0,1 mg.ml⁻¹. Na túto silicu bolo citlivých 6 izolátov (66,7 %) 0 h biofilmu a 9

izolátov (100 %) 48 h biofilmu. Hodnoty MIC silice z gábrovníka boli pri 0 h aj 48 h biofilme v rozpätí od 0,2 – 1,6 mg.ml⁻¹. Na silicu z gábrovníka boli citlivé 4 izoláty (44,4 %) 0 h biofilmu a 7 izolátov (77,8 %) 48 h biofilmu. Silica z dúšky materinej pôsobila na 0 h biofilm v koncentráciách od 0,4 do 0,8 mg.ml⁻¹ a na 48 h biofilm od 0,1 do 0,8 mg.ml⁻¹, pričom potlačila tvorbu 0 h biofilmu všetkých testovaných kmeňov (100 %) *C. krusei* a 8 izolátov (88,9 %) 48 h biofilmu.

Graf 4: Účinnosť (%) rastlinných silíc na 0 h a 48 h biofilm *C. krusei*



DISKUSIA

Kvasinky rodu *Candida* patria v súčasnosti k najčastejším pôvodcom mykotických infekcií ľudí. Jedným z hlavných faktorov virulencie *C. albicans*, ktorý prispieva k vysokej miere úmrtnosti spojenej s kandidózou, je tvorba biofilmu. Viaceré vedecké články potvrdzujú rezistenciu fungálnych biofilmov na azolové a polyénové liečivá, ktoré sú v klinickej praxi najviac používané (Uppuluri a kol., 2009).

Vzhľadom na túto skutočnosť, objavuje sa potreba hľadania vhodnej alternatívnej liečby. Rastlinné silice sa stávajú predmetom záujmu viacerých výskumníkov zaoberajúcich sa ich antibakteriálnymi a antifungálnymi účinkami, čo súvisí pravdepodobne s ich chemickým zložením (Manoharam a kol., 2017).

V našich experimentoch sme sa zamerali na testovanie antibiofilmového efektu vybraných komerčných rastlinných silíc. Pri testovaní planktonických buniek *C. albicans* bola zistená 100 % účinnosť silíc z čajovníka citrónového, gábrovníka

a dúšky materinej pri MIC 0,4 mg.ml⁻¹. Rovnako na 0 h a 48 h biofilm boli účinné pomerne nízke koncentrácie silice z čajovníka citrónového a dúšky materinej (MIC 0,1 – 0,4 mg.ml⁻¹) a z gábrovníka (0,2 – 6,25 mg.ml⁻¹). Mandras a kol. (2016), ktorí otestovali účinnosť viacerých rastlinných silíc na 46 izolátoch *Candida* spp., pričom *C. albicans* predstavovala 26 izolátov, uvádzajú podobné výsledky. Nimi testované izoláty *C. albicans* boli citlivé na silicu z dúšky materinej v koncentráciách 0,03 – 0,25 %. Pri testovaní planktonických buniek bola v našom experimente zaznamenaná citlivosť pri 7 izolátoch (63,6 %) na silicu z klinčekovca voňavého, ktorá pôsobila v koncentráciách 0,4 – 3,13 mg.ml⁻¹ (0,04 – 0,313 %). V porovnaní so štúdiou Mandrasa a kol. (2016), ktorí zistili antimykotickú aktivitu silice z klinčekovca v koncentráciách 0,25 – 1 %, nami testovaná silica vykazovala lepšiu účinnosť. Aj podľa Pinta a kol. (2009) silica z klinčekovca bola účinná na *Candida albicans* vo vyššej koncentrácii; 0,64 %. Kým v našich experimentoch hodnoty MIC pri silici zo šalvie lekárskej, pôsobiacej na

izoláty *Candida albicans*, boli v rozpätí 12,5 – 100 mg.ml⁻¹ (1,25 – 10 %), podľa Mandrasa a kol. (2016) a Almeida a kol. (2019) sú izoláty citlivé už na koncentrácie 0,5 – 1 %, resp. 1 %. Pomerne dobrú antifungálnu aktivitu vykazovala silica Ho-sho, s hodnotami MIC od 0,4 – 3,13 mg.ml⁻¹ (0,04 – 0,313 %), na ktorú bolo citlivých 9 izolátov (81,8 %). Materskou rastlinou silíc Ho-sho a gáfrovníkovej je gáfrovník lekárske – škoricovník gáfrovník (*Cinnamoni camphora* Ness). Silice sa líšia iba pôvodom získavania, a to destiláciou vodnou parou z listov (Ho-sho) alebo z kôry (gáfrovníková silica) (Ho-sho silica, www.hanus.sk). Gáfrovník patrí do čeľade Lauraceae (vavrínovité), podobne ako škoricovník cejlónsky (*Cinnamomum zeylanicum* J. Presl.), ktorý podľa niektorých autorov (Castro a Lima, 2013) vykazuje veľmi dobré antimykotické účinky na rôzne druhy kandid už v nízkych koncentráciách (312,5 – 625 µg.ml⁻¹).

Hodnoty MIC pri silici z rosality (*Melaleuca ericifoliae aetheroleum*) boli v rozpätí 1,6 – 6,25 mg.ml⁻¹ (0,16 – 0,625 %). Na túto silicu bola zaznamenaná citlivosť pri 5 kmeňoch (54,5 %). Účinky tejto silice na *Candida albicans* vyskúšali diskovou difúznou metódou Wilkinsona a Cavanagh (2005), ktorí pri použití 10 % koncentrácie zaznamenali veľkosť inhibičnej zóny 7,3 – 8,6 mm. Silica zo šalvie muškátovej (muškát) vykazovala v našom experimente najnižšiu antifungálnu aktivitu. Hodnoty MIC predstavovali 50 – 100 mg.ml⁻¹ (5 – 10 %) a citlivosť bola na ňu zaznamenaná pri 3 kmeňoch (27,3 %).

ZÁVER

Vykonané experimenty poukazujú na veľmi dobrú antifungálnu a antibiofilmovú aktivitu testovaných silíc, ako aj na možnosť ich perspektívneho využitia v podpornej terapii mykotických infekcií spôsobených biofilm tvoriacimi kvasinkami. Rovnako sa môžu uplatniť v adjuvantnej terapii pri kandidách rezistentných na konvenčné antimykotiká.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-15-0377.

ZOZNAM LITERATÚRY

Almeida, C. M., de Sousa Sales, E. A. L., Alves, É. P., de Freitas Lima, R., Cavalcanti, Y. W., Gomes, R. C. B., de Brito Costa, E. M. M.: *In vitro* evaluation of the antimicrobial potential of *Salvia officinalis* L. against oral pathogens. *J. Health. Sci.*, 2019, 21 (2), 129 – 133.

Castro, D. D. R., Lima, O. E.: Anti-candida activity and chemical composition of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 2013, 56, 749 – 755.

Garrett, T. V., Bhakoo, M., Zhang, Z.: Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog. Nat. Sci.*, 2008, 18 (9), 1049 – 1056.

Ho sho silica. <https://www.adc.sk/databazy/produkty/detail/gynophilus-restore-822977.html>. [cit.27-03-2020].

Jin, Y., Yip, H. K., Samaranayake, Y. H., Yau, J. Y., Samaranayake, L. P.: Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41, 2961 – 2967.

M27-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard – second edition. NCCLS document, USA, 2002, 17, 9, 29 p.

Mandras, N., Nostro, A., Roana, J., Scalas, D., Banche, G., Ghisetti, V., Tullio, V.: Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida*. *BMC Complement. Altern. Med.*, 2016, 16 (1), 1 – 7.

Manoharan, R. K., Lee, J. H., Lee, J.: Antibiofilm and antihyphal activities of cedar leaf essential oil, camphor, and fenchone derivatives against *Candida albicans*. *Front. Microbiol.*, 2017, 8,

1 – 12.

Moran, P. G., Coleman, C., Sullivan, J. D.: *Candida albicans* versus *Candida dunlinsii*: Why is *C. albicans* more pathogenic?“. *Inter. J. Microbiol.*, 2012, ID 205921, 7 p.

Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Nagy, E., Dobiasova, S., Rinaldi, M., Barton, R., Veselov, A.: *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the Artemis Disk Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, 46 (2), 515 – 521.

Pinto E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., Salgueiro, L.: Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.*, 2009, 58 (Pt 11), 1454 – 1462.

Ruchi, T., Sujata, B., Anuradha, D.: Comparison of phenotypic methods for the detection of biofilm production in uro-pathogens in a tertiary care hospital in India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2015, 4 (9), 840 – 49.

Uppuluri, P., Pierce, CH. G., López-Ribot, J. L.: *Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences. *Future Medicine*, 2009, 4 (10), 1235 – 1237.

Votava, M.: *Lékařská mikrobiologie speciální* [Special medical microbiology]. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003, 495 s.

Wilkinson, J. M., Cavanagh, M. A.: Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytother. Res.*, 2005, 19 (7), 643 – 646.

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 nesplňa pokyny pre autorov, redakčná rada si vyhradzuje právo vrátiť rukopis autorom pred jeho posúdením recenzentmi.

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

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

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

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

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

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

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

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

Príklady: paracetamol (nie acetaminofén), bisfosfonát (nie bifosfonát), adrenalin/liekopis (nie epinefrín/INN), hydroxykarbamin (nie hydroxyurea), kromoglykán (nie chromoglykán), cholestyramín (nie colestyramín, kolestyramín), lítium (lithium), manitol (nie mannitol).

Latinské termíny sa píšú kurzívou.

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

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

Fotografie, obrázky, grafy. Aby sa vyhlo

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

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

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

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

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

ŠTRUKTÚRA PRÍSPEVKOV

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

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

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

ABSTRAKT

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

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

ÚVOD

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

MATERIÁL A METÓDY

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

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

VÝSLEDKY

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

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

DISKUSIA

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

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

ZÁVERY

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

POĎAKOVANIE

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

ZOZNAM LITERATÚRY

Všetky zdroje uvedené v zozname musia byť citované v texte.

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

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

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

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

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

v štandardnom ISO zozname skrátených názvov časopisov. ISSN číslo sa nevyžaduje:

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

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

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

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

Kniha (editovaná, needitovaná):

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

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

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

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

Canganella, F., Balsamo, R.: Isolation and selection of probiotic microorganisms with antagonistic activity against *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.

PREHLADOVÉ ČLÁNKY

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

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

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

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

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

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

ZÁVER – Zodpovedanie otázok pre výskum, položených v úvode.

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

KAZUISTIKY

Publikujú sa aj články, ktoré prezentujú správy o výnimočnom prípade určitého liečiva, resp. substancie či zmesi a jej neobvyklého účinku alebo

opis zaujímavého klinického prípadu, choroby a pod. Odporúčaná štruktúra kazuistik 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 rozborové odborného diela (napr. knihy, články), 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