

FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis
UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609

ISSN 2729-790X



3
IV • 2022



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. (Damanshour, 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. (Bratislava, 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
IV., 3, 2022

PUBLISHED BY
THE UNIVERSITY OF VETERINARY MEDICINE AND PHARMACY IN KOŠICE
2022

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, IV., 3, 2022

O B S A H

Žigová, Lucia; Kosírová, Stanislava; Foltánová, Tatiana; Vranecová, Katarína; Massarová, Petra; Hrubá, Orsolya; Faixová, Dominika; Faixová, Zita; Gažová, Andrea:	
VYUŽITIE STOPP KRITÉRIÍ PRI HODNOTENÍ TERAPIE GERIATRICKÝCH PACIENTOV NA SLOVENSKU USE OF STOPP CRITERIA IN THE EVALUATION OF GERIATRIC PATIENT THERAPY IN SLOVAKIA	5
Gaľová, Miriam; Falis, Marcel:	
STANOVENIE TOXICITY METYLYXANTÍNOV DETERMINATION OF METHYLYXANTHINES TOXICITY.....	15
Šuleková, Monika; Škvareková, Andrea:	
VYUŽITIE SPE EXTRAKCIE PRI STANOVENÍ LIEČIVA METÓDOU RP-HPLC V KRVNOM SÉRE USE OF SPE EXTRACTION IN THE DETERMINATION OF DRUG BY RP-HPLC IN BLOOD SERUM	24
Oravec, Martin; Eftimová, Jarmila:	
OBSAH APIGENÍN-7-GLUKOZIDU V NADZEMNÝCH ČASTIACH <i>MATRICARIA RECUTITA</i> L. CONTENT OF APIGENIN-7-GLUCOSIDE IN THE ABOVEGROUND PARTS OF <i>MATRICARIA RECUTITA</i> L.....	38
Wolaschka, Tomáš; Rohaľová, Simona; Křoc, Dominik; Fečkaninová, Adriána; Guman, Matúš:	
FORMULATION OF TRANSDERMAL SYSTEM WITH NON-SELECTIVE BETA-BLOCKER PROPRANOLOL	48
Tomiq, Vlora; Eftimová, Jarmila; Petrovič, Vladimír:	
VPLYV RÔZNYCH EXTRAČNÝCH ČINIDIEL NA CELKOVÝ OBSAH POLYFENOLOV, ANTIOXIDAČNÚ AKTIVITU A TOXICITU EXTRAKTU <i>AGRIMONIA EUPATORIA</i> L. INFLUENCE OF DIFFERENT EXTRACTION AGENTS ON THE TOTAL POLYPHENOL CONTENT, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOXICITY OF <i>AGRIMONIA EUPATORIA</i> L. EXTRACTS	62
Fedorová, Monika; Pokrivčáková, Ivana; Štempeľová, Iveta:	
AKTUÁLNE MOŽNOSTI FARMAKOTERAPIE MIGRÉNY NA SLOVENSKU CURRENT OPTIONS OF MIGRAINE PHARMACOTHERAPY IN SLOVAKIA	73
Drabová, Jarmila; Piešová, Elena:	
ANALÝZA PRESKRIPCIE ANXIOLYTÍK V TERAPII ÚZKOSTNÝCH PORÚCH ANALYSIS OF ANXIOLYTIC PRESCRIPTION IN THE TREATMENT OF ANXIETY DISORDERS.....	81
Jarabová, Mária; Váczi, Peter:	
INTERVENČNÉ METÓDY V LIEČBE CHRONICKEJ BOLESTI INTERVENTION METHODS IN CHRONIC PAIN TREATMENT.....	91
Dubjelová, Elena; Kostecká, Zuzana:	
MOŽNOSTI TERAPIE LYMSKEJ BORELIÓZY THERAPY OPTIONS FOR LYME BORRELIOSIS	103
Pokyny pre autorov	114



VYUŽITIE STOPP KRITÉRIÍ PRI HODNOTENÍ TERAPIE GERIATRICKÝCH PACIENTOV NA SLOVENSKU

USE OF STOPP CRITERIA IN THE EVALUATION OF GERIATRIC PATIENT THERAPY IN SLOVAKIA

Žigová, Lucia¹; Kosírová, Stanislava²; Foltánová, Tatiana²; Vranecová, Katarína¹; Massarová, Petra¹; Hrubá, Orsolya¹; Faixová, Dominika³; Faixová, Zita⁴; Gažová, Andrea¹

¹Ústav farmakológie a klinickej farmakológie

Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Špitalská 24, 813 72, Bratislava

²Katedra farmakológie a toxikológie

Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava

³Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky

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

⁴Katedra biológie a fyziológie

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

lucia.zigova38@gmail.com

ABSTRAKT

Farmakoterapia starších pacientov je často sprevádzaná polyfarmáciou, ktorú definujeme ako užívanie piatich a viacerých liečiv denne. Pokiaľ sa u pacienta vyskytuje polyfarmácia predovšetkým vo vyššom veku, je pravdepodobné, že v množstve liečiv užívaných kvôli polymorbidite sa vyskytne aj užívanie potenciálne nevhodných liečiv (potentially inappropriate medication – PIM).

Cieľom našej štúdie bolo zhodnotiť farmakoterapiu ambulantných pacientov a pacientov v starostlivosti domovov sociálnych služieb (DSS) a

následne identifikovať PIM podľa vybraných STOPP kritérií (Screening Tool of Older People's potentially inappropriate Prescriptions), ktoré sa využívajú na hodnotenie vhodnosti liečby geriatrických pacientov. Do hodnotenia boli zaradení pacienti vo veku 65 rokov a vyššie, ktorých definujeme ako seniorov. Zozbierané údaje boli vyhodnotené deskriptívnou štatistikou v programe SPSS v. 19.

Sledovaný súbor tvorilo 908 pacientov. Priemerný počet liečiv/deň u všetkých pacientov predstavoval $7,81 \pm 0,13$ liečiv/deň. Signifikantne vyšší počet liečiv užívali pacienti v starostlivosti DSS

v porovnaní s ambulantnými pacientmi (DSS $8,89 \pm 0,18$ liekov/deň vs. AMB $6,72 \pm 0,16$ liekov/deň, $p < 0,001$). Po analýze užívania potenciálne nevhodných liečiv sme zistili, že vyššie počty užívaných liečiv u DSS pacientov korelovali aj s užívaním vyšších počtov PIM. Z možných 80 STOPP kritérií sme sa zamerali na identifikáciu 12, a preto je veľmi pravdepodobné, že skutočný počet PIM u pacientov môže byť oveľa vyšší, pričom najrozšírenejšie bolo kritérium K1, nasledovalo kritérium K4 a K2.

Z výsledkov štúdie je zjavné, že polyfarmácia geriatrických pacientov predstavuje závažný problém vo farmakoterapii, predovšetkým kvôli užívaniu aj liečiv, ktoré nie sú prospešné ich zdravotnému stavu.

Kľúčové slová: geriatrickí pacienti; potenciálne nevhodné liečivá; starnutie; STOPP kritériá

ABSTRACT

Pharmacotherapy of elderly patients is often followed by polypharmacy, which is defined as the usage of five or more drugs per day. If polypharmacy occurs in a patient, especially at an older age, it is likely that potentially inappropriate drugs (potentially inappropriate medication – PIM) will also occur in the amount of drugs used due to polymorbidity.

The aim of our study was to evaluate the pharmacotherapy of outpatients (AMB) and patients in the nursing homes care (NHM) and subsequently identify PIMs according to selected STOPP criteria (Screening Tool to Older People's Prescriptions), which are used to evaluate the suitability of geriatric patients. Patients aged 65 years and older, whom we define as seniors, were included in the study. The collected data were evaluated by descriptive statistics in the program SPSS v. 19.

The study group consisted of 908 patients. The average number of drugs in all patients was 7.81 ± 0.13 drugs/day. Significantly higher numbers of

drugs were used by nursing homes' patients compared to outpatients (NHM 8.89 ± 0.18 drugs/day vs. AMB 6.72 ± 0.16 drugs/day, $p < 0.001$). After analysing the usage of potentially inappropriate drugs, we identified that higher numbers of drugs used in nursing homes' patients were also reflected in the use of higher numbers of PIMs. We focused on identifying 12 of the possible 80 STOPP criteria, and therefore we can assume that the actual number of patients' PIMs may be much higher, criterion K1 was the most common, followed by criteria K4 and K2.

From the results it is clear that polypharmacy of geriatric patients represents a serious problem in pharmacotherapy, while patients also use drugs that are not beneficial to their health.

Key words: aging; geriatric patients; potentially inappropriate medication; STOPP criteria

ÚVOD

Trend celosvetového starnutia populácie sa stáva čoraz viac akútnej a aktuálny. S touto témou je úzko spätá otázka správnej farmakoterapie a správneho užívania liečiv u seniorov. Kvôli zmeneným funkciám eliminačných orgánov v dôsledku starnutia sa užívanie niektorých liečiv so zvyšujúcim vekom pacienta stáva potenciálne nevhodné. Bežná dávka liečiva pre dospelého pacienta môže byť pre geriatrického pacienta nebezpečná a môže zvyšovať riziko vzniku nežiaducich účinkov. Okrem už spomínaných zmien vo funkciách jednotlivých orgánov je optimalizácia farmakoterapie geriatrického pacienta veľmi náročná pre častú polyfarmáciu, ktorá je definovaná ako užívanie 5 a viacerých liečiv denne (Linjakumpu a kol., 2002).

Terapia veľkým počtom liečiv môže zvyšovať pravdepodobnosť užívania potenciálne nevhodného liečiva a môže zhoršiť zdravotný stav pacienta kvôli zvýšenému riziku liekových interakcií. Je dôležité, aby bola farmakoterapia geriatrického pacienta nastavená správne, vzhľadom na fyziologické zmeny v organiz-

Tab. 1: Zoznam vybraných STOPP kritérií

Typ systému		Typ kritéria
A	Indikácie liečiv	A3: Akákoľvek duplikácia liečiv triedy NSAIDs, SSRI, ACEs inhibítorov, slučkových diuretik a antikoagulancií
B	Kardiovaskulárny systém	B3: Kombinácia β -blokátora a verapamilu/diltiazemu
C	Koagulačný systém	C1: Dlhodobé užívanie kyseliny acetylsalicylovej v dávkach vyšších ako 160 mg denne
		C7: Užívanie tiklopidínu
		C10: Akákoľvek kombinácia NSAIDs, antagonistov vitamínu K, priamych inhibítorov trombínu, inhibítorov faktora Xa
		C11: Kombinácia NSAIDs a antiagregans bez profylaxie PPIs
D	Centrálny nervový systém	D14: Užívanie antihistaminík 1. generácie
F	Gastrointestinálny systém	F4: Perorálne dávky elementárneho železa vyššie ako 200 mg denne
H	Muskuloskeletárny systém	H8: Kombinácia NSAID a kortikosteroidu bez profylaxie inhibítorom protónovej pumpy
K	Liečivá zvyšujúce pravdepodobnosť pádov	K1: Užívanie benzodiazepínov
		K2: Užívanie antipsychotík 1. generácie
		K4: Užívanie hypnotík 3. generácie

NSAID – nesteroidné protizápalové lieky, SSRI – selektívne inhibítory spätného vychytávania serotonínu, ACE inhibítory – inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu, PPI inhibítory – inhibítory protónovej pumpy

Zdroj: upravené podľa O'Mahony a kol., 2015

me, ktoré ovplyvňujú farmakokinetiku a farmakodynamiku liečiv. K optimalizácii farmakoterapie môžu prispievať STOPP kritériá (Screening Tool to Older People's Prescriptions), ktoré boli vytvorené na vyhodnotenie užívania potenciálne nevhodného lieku.

Polyfarmácia a identifikácia potenciálne nevhodných liečiv

Starnutie organizmu je charakterizované anatomickými a fyziologickými zmenami, ktoré vedú k dekompenzácií príslušného systému a poškodeniu funkcie regulačných procesov (Mangoni a Jackson, 2004). Tieto zmeny spolu s komorbiditami a polyfarmáciou zvyšujú náročnosť správneho užívania liekov. Racionálne predpisovanie liečiv môže zvýšiť účinnosť liečby a znížiť frekvenciu nežiaducich vedľajších reakcií spôsobených polypragmáciou, aj napriek prítomnej polyfarmácii (Singh a Bajorek, 2015).

Na hodnotenie vhodnosti liečby geriatrických pacientov sa využívajú rôzne kritériá, prispôbené preskripcii danej krajiny. Medzi najpoužívanejšie patria Beersove kritériá (Beers, 1997), kritériá EÚ (7) (Renom-Guiteras a kol., 2015) a STOPP/START kritériá (O'Mahony a kol., 2015). Napriek tomu, že Beersove kritériá majú rozsiahle využitie, ich implementácia v Európe je limitovaná kvôli obsiahnutým liečivám, ktoré sú u nás nedostupné alebo len zriedkavo predpisované (O'Connor a kol., 2012). Príkladom kritérií, ktoré sa môžu využívať v Európe, je zoznam STOPP/START, ktorý zohľadňuje farmakoterapiu seniorov v rámci celej Európy. Kritériá sú usporiadané podľa fyziologických systémov a berú do úvahy najčastejšie chyby pri medikácii pacienta. Po aktualizácii tvorí zoznam 114 kritérií, z ktorých 34 prislúcha časti START (užívanie sa považuje za prospešné) a 80 STOPP (užívanie sa považuje skôr za neprospešné)

kritériám. Ku každému STOPP kritériu je pripojený stručný výrok a vysvetlenie, prečo je daný predpis potenciálne nevhodný (O'Mahony a kol., 2015). V tab. 1 sú znázornené STOPP kritériá, podľa ktorých sme sledovali prítomnosť potenciálne nevhodného liečiva v anamnéze pacientov.

Osoby nad 65 rokov sú často vystavené zvýšenému riziku duplikácie liečiv vzhľadom na väčšie množstvo užívaných liečiv, pritom zdvojenie liečiv rovnakej skupiny nemá žiadny klinický prínos (Kim a kol., 2015). Pri nevhodnej kombinácii β -blokátora a verapamilu alebo diltiazemu rastie riziko vzniku závažných nežiaducich účinkov na atrioventrikulárne vedenie, srdcovú frekvenciu a srdcovú kontraktilitu (Saedder a kol., 2019).

Pre geriatrických pacientov sú veľmi rizikové aj nevhodné kombinácie nesteroidných antiflogistík (NSAID) alebo kyseliny acetylsalicylovej a iných liečiv. Kyselina acetylsalicylová, vďaka svojím antitrombotickým účinkom, predstavuje kľúčovú úlohu sekundárnej prevencie kardiovaskulárnych komplikácií. Krátkodobá terapia kyselinou acetylsalicylovou výrazne znižuje úmrtnosť a výskyt opakovaného infarktu u pacientov s nestabilnou angínou pectoris. Dlhodobá terapia je indikovaná ako sekundárna prevencia kardiovaskulárnych príhod a práve s dlhodobým užívaním sa spája riziko gastrointestinálneho krvácania. Z tohto dôvodu by sa u geriatrických pacientov malo zvážiť užívanie nižších dávok liečiva (Awtry a Loscalzo, 2000). STOPP kritériá definujú užívanie kyseliny acetylsalicylovej v dávke vyššej ako 160 mg denne ako potenciálne nevhodné (O'Mahony a kol., 2015).

Zvýšené riziko vzniku vredov a gastrointestinálneho krvácania sa môže objaviť aj pri súbežnom užívaní kyseliny acetylsalicylovej a antikoagulantov a pri kombináciách NSAIDs s kortikosteroidmi (Scott a kol., 2014). Tieto kombinácie by sa mali užívať len pri správnej indikácii a pacienti by mali súčasne užívať aj inhibítor protónovej pumpy (Bhatt a kol., 2008).

Užívanie antikoagulantov tiklopidínu v akejkoľvek dávke je pre starších pacientov tiež škodlivé. Najčas-

tejšie nežiaduce účinky tiklopidínu sú hnačka, nauzea, GIT ťažkosti a kožné vyrážky. Pri užívaní sa môžu vyskytnúť aj život ohrozujúce nežiaduce účinky, napríklad trombocytopenická purpura a neutropénia. Klopidoogrel, ktorého chemická štruktúra a účinky sú podobné tiklopidínu, má menej nežiaducich účinkov, nespôsobuje neutropéniu ani trombocytopenickú purpuru. V porovnaní s tiklopidínom je nástup účinku klopidoogrelu rýchlejší, preto sa preferuje užívanie klopidoogrelu pred tiklopidínom (Saltiel a Ward, 1987).

Kritérium gastrointestinálneho systému je definované ako užívanie perorálnych dávok elementárneho železa vyšších ako 200 mg denne. V gastrointestinálnom systéme sa absorbuje približne 1 % až 50 % železa. U niektorých pacientov sa môžu vyskytnúť nežiaduce gastrointestinálne príznaky, ktoré sú pravdepodobne dávkovo závislé. Odporúčaný denný príjem železa u starších pacientov je 10 mg. Pri liečbe nedostatku železa sa odporúčaná denná dávka pohybuje medzi 150 mg až maximálne 200 mg elementárneho železa denne (Rimon a kol., 2005). STOPP kritériá ustanovujú maximálnu dennú dávku elementárneho železa u geriatrických pacientov na 200 mg denne, ale napríklad Beersove kritériá až na maximálne 325 mg denne (Fick a kol., 2003).

Osobitnou kategóriou liečiv a skupín liečiv, ktoré seniorských pacientov zvlášť ohrozujú, sú liečivá ovplyvňujúce CNS a liečivá, ktoré zvyšujú pravdepodobnosť pádov. Medzi medikamenty ovplyvňujúce CNS sa zaraďujú H1-antihistaminiká prvej generácie. Prvogeneračné H1-antihistaminiká prechádzajú hematoencefalickou bariérou a môžu zvyšovať riziko vzniku nežiaducich účinkov práve v CNS. U starších pacientov sa tieto nežiaduce účinky spájajú s kognitívnymi poruchami, zhoršením psychomotorických funkcií a so zvýšeným rizikom pádov vyplývajúcich z ich anticholinergických vlastností (Simon a Simons, 2008).

Užívanie sedatív, hypnotík a benzodiazepínov preukázalo významnú súvislosť s výskytom pádov (Woolcott a kol., 2009). Benzodiazepínové liečivá zvyšujú riziko pádov a dopravných nehôd v dôsled-

ku psychomotorického útlmu. Zmeny na receptoroch CNS sú vekovo podmienené a zvýšená citlivosť benzodiazepínových liečiv u starších pacientov súvisí práve so zmenami na týchto receptoroch (Bogunovic a Greenfield, 2004).

Nebenzodiazepínové hypnotiká (zolpidem a zopiklón) pôsobia s benzodiazepínmi na rovnaký receptor a majú približne rovnaké účinky. Zolpidem navodzuje sedáciu bez ovplyvnenia iných častí benzodiazepínového receptora. Zopiklón je na rozdiel od zolpidemu menej selektívny a ovplyvňuje aj iné podtypy receptora. U geriatrických pacientov môže dôjsť v dôsledku zníženého klírensu k predĺženiu eliminačných polčasov a k zvýšeniu rizika vzniku kognitívnych a motorických porúch, preto sa odporúča znížiť dávkovanie na polovicu (Hajak a kol., 2003).

Antipsychotiká prvej generácie sú u starších pacientov často indikované na kontrolu behaviorálnych problémov pri demencii. Je známe, že neuroleptiká svojím účinkom na funkciu dopamínnergických neurotransmiterov v CNS môžu spôsobovať extrapyramídové nežiaduce účinky, medzi ktoré patrí aj parkinsonizmus. Pacienti s parkinsonizmom sú náchylnejší na zvýšený výskyt zlomenín, hlavne krčku stehennej kosti (Vestergaard a kol., 2007).

Pri farmakoterapii geriatrických pacientov je dôležité, aby sa lekár vyhýbal liečivám či kombinácii liečiv práve podľa STOPP kritérií, pričom množstvo naplnených STOPP kritérií koreluje s výskytom nežiaducich účinkov, nežiaducich udalostí a má vplyv na celkovú kvalitu života pacienta.

Cieľom našej analýzy bolo zhodnotiť farmakoterapiu ambulantných pacientov a pacientov žijúcich v domovoch sociálnych služieb (DSS) starších ako 65 rokov na území Slovenskej republiky podľa vybraných STOPP kritérií z liekových záznamov pacientov. Na analýzu sme si vybrali 12 STOPP kritérií, ktoré nie sú viazané ku konkrétnej diagnóze a dajú sa sledovať podľa prítomnosti liečiva v liekovej anamnéze pacienta.

MATERIÁL A METÓDY

Dáta o farmakoterapii pacientov vo veku 65 rokov a vyššom na území Slovenskej republiky v starostlivosti ambulantných lekárov a DSS pacientov slúžili pri identifikácii užívania potenciálne nevhodných liečiv. Všetky údaje boli anonymizované a nedošlo k porušeniu Všeobecného nariadenia o ochrane osobných údajov.

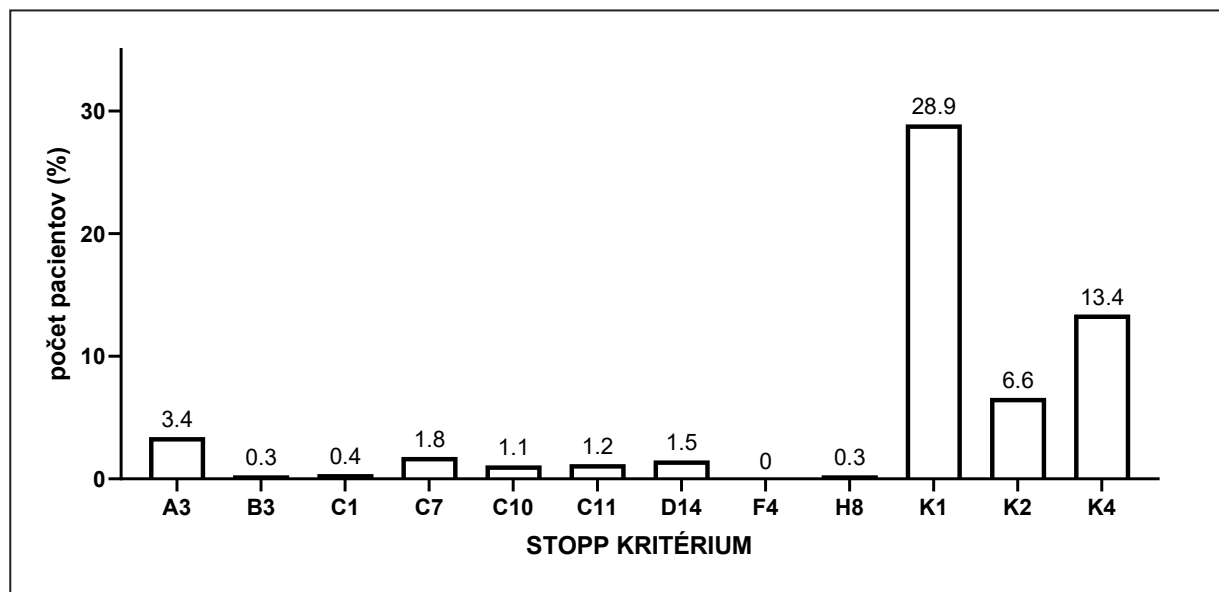
Dizajn štúdie bol schválený Etickou komisiou Farmaceutickej fakulty UK v Bratislave. Celkový súbor zahŕňal dáta získané od 908 pacientov. Údaje boli vyhodnotené v štatistickom programe SPSS v. 19 pomocou deskriptívnej štatistiky. Výsledky sú uvádzané ako aritmetický priemer $\pm$ SEM (min – max). Metódou ANOVA s Bonferroniho *post hoc* testom boli vyhodnotené zistené rozdiely medzi jednotlivými skupinami. Prítomnosť vzťahov medzi sledovanými parametrami bol určený pomocou Spearmanovho korelačného koeficientu a binárnou logistickou regresiou.

VÝSLEDKY

Sledovaný súbor tvorilo 908 pacientov s priemerným vekom $79,57 \pm 0,28$ rokov (66 – 101 rokov) a pacienti užívali v priemere $7,81 \pm 0,13$ liekov denne (1 – 19 liečiv). V súbore bolo celkovo zaznamenaných 580 potenciálne nevhodných liečiv (PIM) a priemerný počet PIM na pacienta predstavoval $0,64 \pm 0,03$ PIM/deň (0 – 5 PIM). Z celého súboru 78 % pacientov bolo vystavených polyfarmácii, z toho 33 % užívalo 10 a viac liečiv. Pravdepodobnosť užívania PIM rástla so zvyšujúcim sa počtom liečiv, ktoré pacienti denne užívali. Tento vzťah charakterizuje Spearmanov korelačný koeficient ako stredný stupeň závislosti ($\rho = 0,34$; $p < 0,01$; $R^2 = 0,8103$) počtu PIM od počtu liečiv (viď graf 1).

Najvyšší počet PIM bol zistený pri kritériu K1 – benzodiazepíny (28,9 %); nasledovalo kritérium K4 – neuroleptiká (13,4 %) a kritérium K2 – hypnotiká 3. generácie (6,6 %) (viď tab. 1). Najmenej vyskytujúce sa PIM boli zaznamenané pri kritériu H8 medzi NSA-

Graf 1: Závislosť počtu PIM od počtu liečiv



A3: Akákoľvek duplikácia liečiv triedy NSAIDs, SSRIs, ACEs inhibítorov, slučkových diuretik a antikoagulancií, **B3:** Kombinácia β -blokátoru a verapamilu/diltiazemu, **C1:** Dlhodobé užívanie kyseliny acetylsalicylovej v dávkach vyšších ako 160 mg denne, **C7:** Užívanie tiklopidínu, **C10:** Akákoľvek kombinácia NSAIDs, antagonistov vitamínu K, priamych inhibítorov trombínu, inhibítorov faktora Xa, **C11:** Kombinácia NSAIDs a antiagregans bez profylaxie PPIs, **D14:** Užívanie antihistaminík 1. generácie, **F4:** Perorálne dávky elementárneho železa vyššie ako 200 mg denne, **H8:** Kombinácia NSAID a kortikosteroidu bez profylaxie inhibítorom protónovej pumpy, **K1:** Užívanie benzodiazepínov, **K2:** Užívanie antipsychotík 1. generácie, **K4:** Užívanie hypnotík 3. generácie

IDs v kombinácii s kortikosteroidom bez profylaxie inhibítorom protónovej pumpy a kritériu B3 – betablokátor v kombinácii s verapamilom alebo diltiazemom – obidve po 0,3 %. PIM pri kritériu F4 – dávka elementárneho železa vyššia ako 250 mg – nebolo zaznamenané ani u jedného pacienta z celého súboru (vid' graf 2).

Z celého súboru pacientov bolo 49 % pacientov dispenzarizovaných ambulantne a 51 % bolo žijúcich v zariadeniach DSS. Priemerný vek ambulantných pacientov predstavoval $77,12 \pm 0,33$ rokov (66 – 95 rokov), u pacientov v DSS bol vek signifikantne vyšší – $81,98 \pm 0,38$ rokov (67 – 101 rokov), $p < 0,001$. Priemerný počet liečiv, ktoré užívali pacienti v starostlivosti DSS bol signifikantne vyšší v porovnaní s ambulantnými pacientmi [AMB $6,72 \pm 0,16$ liekov denne (1 – 19 liekov)] vs. DSS $8,89 \pm 0,18$ liekov denne (1 – 19 liekov), $p < 0,001$; čo sa premietlo aj v

rozdiely užívania PIM [DSS $0,87 \pm 0,04$ (0 – 4 PIM)] vs. AMB $0,40 \pm 0,03$ (0 – 5 PIM), $p < 0,05$. U AMB pacientov bolo identifikované užívanie 180 PIM, kým u pacientov v DSS až 400 PIM. Viac ako 31 % pacientov v ambulantnej starostlivosti denne užívalo aspoň 1 PIM, zatiaľ čo v DSS to bolo viac ako 58 % pacientov.

Z 12 STOPP kritérií, ktoré boli skúmané, bol výskyt PIM v troch kritériách vyšší u pacientov v ambulantnej starostlivosti. Ostatné STOPP kritériá prevažovali u pacientov v DSS (vid' tab. 2). Užívanie antipsychotík 1. generácie (K2) prevládalo u pacientov v DSS viac ako 17-násobne v porovnaní s ambulantnými pacientami (0,7 % AMB vs. 12,4 % DSS). Pacienti v DSS užívali aj benzodiazepíny (K1) viac ako 2,5-násobne. V prípade ambulantných aj DSS pacientov sa v prípade benzodiazepínov jedná o najčastejšie predpisované potenciálne nevhodné liečivá pre

Tab. 2: Vyhodnotenie PIM zaradených do jednotlivých kritérií (n = 908 pacientov)

Kritérium	Zastúpenie v súbore (%)	Počet AMB pacientov (%)	Počet DSS pacientov (%)
A3	3,4	3,8	3,1
B3	0,3	0,2	0,4
C1	0,4	0	0,9
C7	1,8	1,1	2,4
C10	1,1	1,6	0,7
C11	1,2	0,9	1,5
D14	1,5	2,0	1,1
F4	0	0	0
H8	0,3	0,2	0,4
K1	28,9	16,1	41,4
K2	6,6	0,7	12,4
K4	13,4	12,9	13,9

– hrubo zvýraznené percentuálne hodnoty prevažovali u ambulantných pacientov (AMB) alebo u pacientov v domovoch sociálnych služieb (DSS)

seniorov. Najviac preskribované liečivo zo skupiny benzodiazepínov bolo anxiolytikum alprazolam (42,2 %) a hypnotikum cinolazepam (17,3 %).

Z 19 pacientov, ktorí užívali len jedno liečivo denne, to bolo v dvoch prípadoch práve potenciálne nevhodné liečivo. Naopak, u jedného pacienta, ktorý denne užíval 18 liekov, nebolo zaznamenané ani jedno PIM.

DISKUSIA

Naša analýza hodnotí užívanie potenciálne nevhodných liečiv – PIM u pacientov v ambulantnej starostlivosti a DSS. Pri akceptovaní definície polyfarmácie ako užívanie 5 a viac liečiv denne (Linjakumpu a kol., 2002) bolo zistené, že ambulantní aj DSS pacienti boli vystavovaní polyfarmácii, ktorá vo zvýšenej miere vedie k nežiaducim účinkom a predpokladá aj užívanie potenciálne nevhodných liečiv. Len u 22,5 % sledovaných pacientov sme neidentifikovali polyfarmáciu. Nadmerná polyfarmácia u starších obyvateľov

Európy je bežná, pričom takmer každý štvrtý starší človek v DSS užíva 10 a viac liečiv denne (Onder a kol., 2012). V sledovanom súbore 908 pacientov každý tretí užíval 10 a viac liečiv denne (33 %). U ambulantných pacientov to bolo 22 % pacientov, kým u DSS až 44 % pacientov. Prevalencia polyfarmácie je vyššia v zariadeniach DSS, kvôli veľmi často vyskytujúcej sa polymorbidite (Onder a kol., 2012).

Stanovili sme si za cieľ zistiť prítomnosť jedného alebo viacerých nami vybraných STOPP kritérií, ktoré nie sú naviazané na poznanie diagnózy. Došli sme k záveru, že najčastejšie predpisované PIM patrili do kritérií časti K, konkrétne K1, teda liečivá typu benzodiazepínov a K4 (zopiklón a zolpidem). Pacienti v ambulantnej starostlivosti a v starostlivosti DSS síce užívali pomerne rovnaké množstvo hypnotík 3. generácie (12 % AMB vs. 13 % DSS), zaznamenali sme ale výrazný rozdiel v užívaní benzodiazepínov, ktoré majú podobnú pôsobnosť, ale viac nežiaducich účinkov (16,1 % AMB vs. 41,4 % DSS). Pacienti v starostlivosti DSS užívali 2,5-násobne viac liečiv zo

skupiny benzodiazepínov ako pacienti v starostlivosti ambulantných lekárov, čo môže súvisieť s poruchami duševného zdravia, ako sú depresia, demencia spojená s behaviorálnymi problémami, psychózy, úzkosť a nespavosť, ktorými geriatrickí pacienti v starostlivosti DSS často trpia (Bourgeois a kol., 2012). Tretia najčastejšie predpisovaná skupina liečiv v súbore boli antipsychotiká prvej generácie (neuroleptiká). Táto skupina liečiv patrila pod kritérium K2, teda liečivá, ktoré svojimi nežiaducimi účinkami môžu spôsobiť extrapyramídové príznaky. Pri porovnaní predpisovania antipsychotík 1. generácie medzi jednotlivými zariadeniami bolo zistené, že predpis tohto typu liečiva u ambulantných pacientov nepresiahol 1 %, zatiaľ čo u pacientov v starostlivosti DSS to bolo viac ako 12 %. U deviatich pacientov sa vyskytla dvojkombinácia a u troch pacientov dokonca trojkombinácia predpisu neuroleptík. Všetci títo pacienti patrili do starostlivosti DSS.

Výsledky našej štúdie ukazujú, že pacienti s polyfarmáciou užívajú aj PIM a sú veľmi často ohrození nežiaducimi účinkami vyplývajúcimi z užívania nevhodných liečiv. Osobitná kategória liečiv, ktoré pacientov zvlášť ohrozujú, sú liečivá, ktoré zvyšujú riziko pádov. Do kategórie takýchto liečiv sa podľa STOPP kritérií zaraďujú tri najviac predpisované nevhodné skupiny liečiv – benzodiazepíny, Z-hypnotiká a neuroleptiká. Z ázijskej populačnej štúdie Yu a kol. (2017) vyplýva, že užívanie benzodiazepínov je spojené so zvýšeným rizikom hospitalizácie starších pacientov bez ohľadu na dávku a eliminačný polčas benzodiazepínu. Naopak, užívanie nebenzodiazepínových hypnotík zvyšuje riziko hospitalizácie, hlavne ak sa liečivá užívali vo vysokých dávkach. Užívanie viac ako jedného typu benzodiazepínu významne zvyšuje riziko hospitalizácie. Najväčšie riziko bolo zaznamenané pri užívaní dvoch alebo viacerých benzodiazepínových liečiv v kombinácii s hypnotikami 3. generácie (Yu a kol., 2017). Z údajov o farmakoterapii pacientov bolo zistené, že až 46 pacientov (5 %) užíva súčasne kombináciu benzodiazepínu a nebenzodiazepínového hypnotika, z toho traja pacienti užívajú dvojkombináciu benzodiazepínových liečiv

spolu s hypnotikami 3. generácie. Dlhodobá alebo nesprávne kombinovaná medikácia týmto typom liečiv môže vyústiť k výskytu pádov a hospitalizácií. Imobilita sa pre staršieho fragilného pacienta v dôsledku pádu a následnej zlomeniny neraz končí fatálne.

Riešením nadužívania potenciálne nevhodných liečiv by mohla byť optimalizovaná farmakoterapia so zapojením lekárov, lekárnikov a klinických farmaceutov. V Českej republike sa uskutočnil regionálny projekt SENIOR, ktorý bol zameraný na optimalizáciu farmakoterapie pacientov v domovoch dôchodcov (<https://www.pruvodcepacienta.cz/senior/>). Z výsledkov vieme povedať, že práve pacienti v DSS boli náchylnejší na riziko užívania PIM v porovnaní s ambulantnými pacientmi a optimalizácia ich terapie by znížila riziko nežiaducich účinkov a ďalších komplikácií.

ZÁVER

Polyfarmácia je spájaná s užívaním väčšieho počtu liečiv, pričom sa môže zvyšovať aj riziko užívania potenciálne nebezpečných liečiv. Užívanie potenciálne nevhodných liečiv predstavuje zásadný problém vo farmakoterapii seniorov. Z výsledkov štúdie môžeme konštatovať, že polyfarmácia a užívanie PIM sa skôr dotýka pacientov v starostlivosti DSS. Čím viac liečiv pacient užíval, tým vyššie bolo riziko, že bude užívať práve potenciálne nebezpečné liečivo. My sme sa v našej analýze zamerali na identifikáciu 12 z 80 možných STOPP kritérií, a teda sa môžeme domnievať, že prítomnosť PIM môže byť u pacientov oveľa vyššia, poprípade identifikácia hlavnej či vedľajšej diagnózy by nám odpovedala na niektoré neracionálne kombinácie liečiv, či ich nadmerné kombinovanie.

Lekárnik je zdravotnícky pracovník, s ktorým sa geriatrický pacient dostáva do posledného kontaktu pred tým, ako začne užívať svoje lieky. Poučenie pacienta o tom, ako ich má užívať správne, prispieva k adherencii k liečbe a tým aj k zlepšeniu zdravotného stavu pacienta. Z našich výsledkov vyplýva, že pacienti by mohli byť častejšie ohrození zvýšeným

rizikom pádov v dôsledku užívania benzodiazepínov, hypnotík 3. generácie a antipsychotík. Jedna z najčastejších indikácií benzodiazepínov a hypnotík 3. generácie je insomnia, ktorá sa v zvýšenej miere vyskytuje práve u geriatrickej populácie. Je vhodné pacienta upozorniť, že dlhodobým užívaním alebo nadužívaním sa môžu vyskytnúť nežiaduce účinky, ktoré môžu vyústiť do pádov. Bezpečným krátkodobým užívaním môžeme predísť hospitalizáciám a imobilite vyplývajúcej z možných pádov, ktoré môžu byť u veľmi starých a fragilných pacientov smrteľné.

ZOZNAM LITERATÚRY

- Awtry, E. H., Loscalzo, J.: Aspirin. *Circulation*, 2000, 101 (10), 1206 – 1218. Doi:10.1161/01.CIR.101.10.1206.
- Beers, M. H.: Explicit criteria for determining potentially inappropriate medication use by the elderly: An update. *Archives of Internal Medicine*, 1997, 157 (14), 1531 – 1536. Doi:10.1001/archinte.1997.00440350031003.
- Bhatt, D. L., Scheiman, J., Abraham, N. S., Antman, E. M., Chan, F. K. L., Furberg, C. D., Johnson, D. A., Mahaffey, K. W., Quigley, E. M., American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents: ACCF/ACG/AHA 2008 expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008, 52 (18), 1502 – 1517. Doi:10.1016/j.jacc.2008.08.002.
- Bogunovic, O. J., Greenfield, S. F.: Practical geriatrics: Use of benzodiazepines among elderly patients. *Psychiatric Services*, 2004, 55 (3), 233 – 235. Doi:10.1176/appi.ps.55.3.233.
- Bourgeois, J., Elseviers, M. M., Azermi, M., Van Bortel, L., Petrovic, M., Vander Stichele, R.: Benzodiazepine use in Belgian nursing homes: a closer look into indications and dosages. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2012, 68 (5), 833 – 844. Doi:10.1007/s00228-011-1188-z.
- Fick, D. M., Cooper, J. W., Wade, W. E., Waller, J. L., Maclean, J. R., Beers, M. H.: Updating the Beers criteria for potentially inappropriate medication use in older adults: results of a US consensus panel of experts. *Archives of Internal Medicine*, 2003, 163 (22), 2716 – 2724. Doi:10.1001/archinte.163.22.2716.
- Hajak, G., Müller, W. E., Wittchen, H. U. et al.: Abuse and dependence potential for the non-benzodiazepine hypnotics zolpidem and zopiclone: a review of case reports and epidemiological data. *Addiction*, 2003, 98 (10), 1371 – 1378. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.2003.00491.x>.
- Kim, D.-S., Je, N. K., Kim, G. J., Kang, H., Kim, Y. J., Sukhyang, L.: Therapeutic duplicate prescribing in Korean ambulatory care settings using the National Health Insurance claim data. *International Journal of Clinical Pharmacy*, 2015, 37 (1), 76 – 85. Doi:10.1007/s11096-014-0042-7.
- Linjakumpu, T., Hartikainen, S., Klaukka, T., Veijola, J., Kivelä, S.-L., Isoaho, R.: Use of medications and polypharmacy are increasing among the elderly. *Journal of Clinical Epidemiology*, 2002, 55 (8), 809 – 817. Doi:10.1016/S0895-4356(02)00411-0.
- Mangoni, A. A., Jackson, S. H. D.: Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2004, 57 (1), 6 – 14. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.02007.x>.
- O'Connor, M. N., Gallagher, P., O'Mahony, D.: Inappropriate prescribing: criteria, detection and prevention. *Drugs & Aging*, 2012, 29 (6), 437 – 452. Doi:10.2165/11632610-000000000-00000.
- O'Mahony, D., O'Sullivan, D., Byrne, S., O'Connor, M. N., Ryan, C., Gallagher, P.: STOPP/START criteria for potentially inappropriate prescribing in older people: version 2. *Age and Ageing*, 2015, 44 (2), 213 – 218. Doi:10.1093/ageing/afu145.
- Onder, G., Lipert, R., Fialova, D., Topin-

ková, E., Tosato, M., Danese, P., Gallo, P. F., Carpenter, I., Finne-Sover, H., Gindin, J., Bernabei, R., Landi, F., SHELTER Project: Polypharmacy in nursing home in Europe: Results from the SHELTER study. *The Journals of Gerontology: Series A*, 2012, 67A (6), 698 – 704. Doi:10.1093/gerona/glr233.

Průvodce pacienta [Patient Guide]. Projekt Senior/Průvodce pacienta. <https://www.pruvodcepacienta.cz/senior/>. [cit. 9.11.2021].

Renom-Guiteras, A., Meyer, G., Thürmann, P. A.: The EU(7)-PIM list: a list of potentially inappropriate medications for older people consented by experts from seven European countries. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2015, 71 (7), 861 – 875. Doi:10.1007/s00228-015-1860-9.

Rimon, E., Kagansky, N., Kagansky, M., Mechnick, L., Mashiah, T., Namir, N., Schmucl, L.: Are we giving too much iron? Low-dose iron therapy is effective in octogenarians. *The American Journal of Medicine*, 2005, 118 (10), 1142 – 1147. Doi:10.1016/j.amjmed.2005.01.065.

Saедder, E. A., Thomsen, A. H., Hasselstrøm, J. B., Jornil, J. R.: Heart insufficiency after combination of verapamil and metoprolol: A fatal case report and literature review. *Clinical Case Reports*, 2019, 7 (11), 2042 – 2048. Doi: <https://doi.org/10.1002/ccr3.2393>.

Saltiel, E., Ward, A.: Ticlopidine. *Drugs*, 1987, 34 (2), 222 – 262. Doi:10.2165/00003495-198734020-00003.

Scott, S. A., Obeng, A. O., Hulot, J.-S.: Antiplatelet drug interactions with proton pump inhibitors. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2014, 10 (2), s. 175–189. Doi:10.1517/17425255.2014.856883.

Simon, F. E. R., Simons, K. J.: H1 antihistamines: Current status and future directions. *World Allergy Organization Journal*, 2008, 1 (9), 145 – 155. Doi:10.1186/1939-4551-1-9-145.

Singh, S., Bajorek, B.: Pharmacotherapy in the ageing patient: The impact of age *per se* (A review). *Ageing Research Reviews*, 2015, 24, 99 – 110. Doi:10.1016/j.arr.2015.07.006.

Vestergaard, P., Rejnmark, L., Mosekilde, L.: Fracture risk associated with parkinsonism and anti-parkinson drugs. *Calcified Tissue International*, 2007, 81 (3), 153 – 161. Doi:10.1007/s00223-007-9065-6.

Woolcott, J. C., Richardson, K. J., Wiens, M. O., Patel, B. Marin, J., Khan, K. M., Marra, C. A.: Meta-analysis of the impact of 9 medication classes on falls in elderly persons. *Archives of Internal Medicine*, 2009, 169 (21), 1952 – 1960. Doi:10.1001/archinternmed.2009.357.

Yu, N.-W., Chen, P.-J., Tsai, H.-J., Huang, Ch.-W., Chiu, Y. W., Tsay, W.-I., Hsu, J., Chang, Ch.-M.: Association of benzodiazepine and Z-drug use with the risk of hospitalisation for fall-related injuries among older people: a nationwide nested case-control study in Taiwan. *BMC geriatrics*, 2017, 17 (1), 140. Doi:10.1186/s12877-017-0530-4.



STANOVENIE TOXICITY METYLYXANTÍNOV

DETERMINATION OF METHYLYXANTHINES TOXICITY

Gaľová, Miriam; Falis, Marcel

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

marcel.falis@uvlf.sk

ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo stanoviť toxicitu metylyxantínov alternatívnym biotestom II. generácie na modelovom organizme *Artemia franciscana*. Sledované látky v tomto bioteste tvoria skupinu farmakologických látok, ktoré našli klinické využitie vďaka bronchodilatačným a psychostimulačným účinkom. Žiaľ, kvôli svoju úzkemu terapeutickému indexu vedú k častým intoxikáciám. V našej štúdii sme počas 10 dní sledovali úhyn artémií po aplikácii rôzne koncentrovaných látok. Ten sme zaznamenávali v stanovených 24-hodinových intervaloch, kde sme na základe výsledkov zistili letálnu koncentráciu liečiv LC_{50} . Konkrétne sme ju vyhodnotili pomocou dvojďávkovej inerpolačnej metódy a následne aj pomocou programu ToxRat. Naše výsledky boli porovnávané s morskou vodou, čiže kontrolou. Zistili sme, že LC_{50} kofeínu pri dvojďávkovej inerpolačnej metóde po 240 hodinách bola 50,00 mg.l⁻¹ (interval spoľahlivosti 37,37 – 66,90 mg.l⁻¹). Hodnota LC_{50} teofylínu po 240 ho-

dinách bola 10,00 mg.l⁻¹ (interval spoľahlivosti 4,38 – 22,82 mg.l⁻¹). Hodnota LC_{50} teobromínu po 240 hodinách bola 143,58 mg.l⁻¹ (interval spoľahlivosti 103,15 – 199,87 mg.l⁻¹), kde pomocou programu ToxRat bola hodnota LC_{50} kofeínu 90,431 mg.l⁻¹, pre teofylín 11,100 mg.l⁻¹ a pre teobromín 146,166 mg.l⁻¹. Z výsledkov vyplýva, že teofylín má najvyššiu toxicitu oproti kofeínu a teobromínu. Tieto poznatky môžu prispieť k presnejšiemu určaniu toxických účinkov na modely *Artemia franciscana*. Zároveň môžu pomôcť k väčšiemu záujmu o experimentálne štúdium zvieracích modelov.

Kľúčové slová: *Artemia franciscana*; biotest; metylyxantíny; toxicita

ABSTRACT

The aim of the study was the determination of toxicity of methylxanthines by an alternative bioassay II. generation on the model organism *Artemia franciscana*. The monitored substances in this bio-

assay form a group of pharmacological substances which have found clinical use due to bronchodilator and psychostimulatory effects. Unfortunately, due to their narrow therapeutic index, it leads to frequent intoxications. In our study, we monitored the death of various concentrated substances for 10 days. We recorded it at specified 24-hour intervals and determined the lethal concentration of drugs LC_{50} based on the results. Specifically, we evaluated it using a two-dose interpolation method, and according to ToxRat program. Our results were compared with seawater, which served as our control. We found that the LC_{50} of caffeine in the two-dose interpolation method after 240 hours was 50.00 mg.l⁻¹ (confidence interval 37.37 – 66.90 mg.l⁻¹). The value LC_{50} of theophylline after 240 hours was 10.00 mg.l⁻¹ (confidence interval 4.38 – 22.82 mg.l⁻¹). And the value LC_{50} of theobromine after 240 hours was 143.58 mg.l⁻¹ (confidence interval 103.15 – 199.87 mg.l⁻¹). While using the ToxRat program, the LC_{50} value of caffeine was 90.431 mg.l⁻¹, for theophylline 11.100 mg.l⁻¹ and for theobromine 146.166 mg.l⁻¹. The results show that theophylline has the highest toxicity compared to caffeine and theobromine. These findings may contribute to a more accurate determination of toxic effects in *Artemia franciscana* models. At the same time, they can help to increase interest in the experimental study of animal models.

Key words: *Artemia franciscana*; bioassay; methylxanthines; toxicity

ÚVOD

Človek prichádzal do styku s jedmi už v dávnej dobe. Nebezpečie, ktorému je vystavený v súčasnom období, sa výrazne zväčšilo a stále rastie, pretože technicko-civilizačný pokrok je nezadržateľný a chémia, technika a génové manipulácie stále viac prenikajú do bežného života (Lüllmann, Mohr, Wehling, 2004).

Multidisciplinárny odbor zaoberajúci sa účinkami

jedov na živé organizmy vrátane človeka je toxikológia. Účinky chemických látok sú výsledkom vzájomnej interakcie organizmu a samotnej zlúčeniny (Osina a Sadloňová, 2016).

Metylxantíny majú úzke terapeutické rozmedzie, a preto majú vysoký výskyt intoxikácií (Gottwalt a Tadi, 2020). Medzi terapeuticky najviac využívané liečivá z tejto skupiny patrí teofylín (Legáth a kol., 2016). Na farmaceutickom trhu v celosvetovom meradle stále patrí medzi najviac predpisovaný liek na liečbu astmy a chronickej obštrukčnej choroby pľúc (CHOCHP), (Barnes, 2010)..

Pacienti, ktorí ho užívajú, by mali byť starostlivo sledovaní skúseným odborníkom. Dôkladná odborná pomoc a sledovanie zmien u pacienta môžu mať výrazný vplyv pri včasnom rozpoznaní príznakov intoxikácie, ku ktorým patrí nauzea, srdcové arytmie, rabdomyolýza, kŕče a zástava srdca (Gottwalt a Tadi, 2020).

Smernice Rady Európy požadujú zníženie počtu laboratórnych stavovcov v biologických pokusoch. Jednou z možností je použitie biotestu II. generácie, medzi ktoré patrí aj test na *Artemia franciscana*. Tento experiment je využívaný prevažne na stanovenie akútnej, prípadne subakútnej toxicity chemických látok. Taktiež je určený pre kľudové štádiá ako sú cysty alebo larvy. Takýto spôsob kultivácie živých organizmov nie je časovo náročný a priestorové nároky na jej vykonanie sú minimálne. V sledovanej skupine chemických látok hodnotíme letalitu a toxické efekty, vyjadrené ako hodnoty LC_{50} (Dvořák a kol., 2004).

V tejto práci bola urobená štúdia, ktorá sa zaoberala stanovením toxicity metyloxantínov pomocou alternatívneho biotestu II. generácie na modelovom organizme *Artemia franciscana*. Reprezentantami sú kofeín, teofylín a teobromín. Po zahájení testu nasledovalo štatistické spracovanie a výpočet hodnôt LC_{50} . To sme vykonali pomocou dvojdvávkovej interpolačnej metódy a programu ToxRat.

MATERIÁL A METODY

Cieľom štúdie bolo na modelovom organizme *Artemia franciscana* stanoviť toxicitu vybraných látok zo skupiny metylxantínov, alternatívnym biotestom II generácie. Dôležitým začiatkom biotestu bola príprava morskej vody. Pripravili sme si vodu o salinite 4,7 ‰ s nasledovným zložením: NaCl 23,9 g.l⁻¹; MgCl₂ · 6 H₂O 10,83 g.l⁻¹; CaCl₂ · 6 H₂O 2,25 g.l⁻¹, KCl 0,68 g.l⁻¹; Na₂SO₄ · 10 H₂O 9,06 g.l⁻¹; NaHCO₃ 0,2 g.l⁻¹; SrCl₂ · 6 H₂O 0,04 g.l⁻¹; KBr 0,099 g.l⁻¹; H₃BO₃ 0,027 g.l⁻¹. Do banky s touto vodou sme pridali vákuovo balené cysty *A. franciscana* od spoločnosti Sanders (South Ogden, Utah, USA). V štúdiu bola použitá teplota 25 °C, ktorá bola udržiavaná termostatom. Týmto spôsobom sme potom dobu liahnutia ustálili na 24 hodín. Trvalý pohyb cýst a dostatok kyslíka bol zaistený použitím vibračného membránového kompresora. Desiat kusov čerstvo vyliahnutých naupliových štádií sme potom umiestnili pomocou pipety do jednorazových Petriho misiek, pri celkovom objeme morskej vody 10 ml vrátane vzorky a príkrmu 3 ‰ roztoku glukózy. Vzorky sme si pripravili v deň pokusu tak, že sme rozpustili navážené liečivá v pripravenej morskej vode. V pokuse sme použili kofeín, teofylín a teobromín, ktoré boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich (Mannheim, Nemecko). Konečné koncentrácie kofeínu použité a štúdiu boli 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 mg.l⁻¹. Pre teofylín 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 mg.l⁻¹ a pre teobromín 1 000; 500; 250; 125; 62,5.

V pokusoch bolo použitých 50 homogénnych jedincov. Tých sme rozdelili do 5 misiek po 10 jedincov. V časových intervaloch 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 hodín sme vykonávali odčítavanie mŕtvych jedincov. Neživé artémie sme nemuseli odstrániť, keďže nenarušujú priebeh testu. Test na *Artemia franciscana* musí spĺňať požiadavky neprekročenia letality kontrolných skupín nad 10 % pri 96 hodinách a 20 % pri 240 hodinách.

Vypočítané a testované hodnoty boli následne zostavené do tabuľky 1, tabuľky 2 a tabuľky 3, kde letalita je označená „x“, počet testovaných skupín je n a smerodajná odchýlka je s. Výsledky sme porovnávali

oproti kontrolnej vzorke (K). Štatisticky významné hodnoty sme potom označili hviezdikou (*).

Následne sme výsledky štatisticky vyhodnotili. Na vylúčenie odľahlých hodnôt u jednotlivých misiek sme použili Dean-Dixov test. Rozdiely medzi jednotlivými koncentraciami boli testované pomocou signifikantných rozdielov preukázateľnosti.

VÝSLEDKY

Pri stanovovaní letality nebol úhyn v kontrolných vzorkách nad 20 %, preto sme test realizovali do času 240 h. Letalita kofeínu v tabuľke 1 bola po dobu 120 hodín bez štatisticky významných hodnôt v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Po 144 hodinách pri koncentrácii 50 mg.l⁻¹ došlo k výraznému úhynu 16 %, ktorý sa postupne zvyšoval, po 192 hodinách dosahoval 24 % a po 240 hodinách už 50 %. Pri koncentraciách 25 mg.l⁻¹ a 12,5 mg.l⁻¹ bol štatisticky významný úhyn rovný 20 % po 216 hodinách. Ten sa po 240 hodinách už líšil, e pri koncentrácii 25 mg.l⁻¹ dosiahol hodnotu 36 %, a pri koncentrácii 12,5 mg.l⁻¹ 32 %.

Teofylín v tabuľke 2 mal významný úhyn po 192 hodinách, kde mal hodnotu 20 % pri koncentraciách 10 a 5 mg.l⁻¹. Percento uhynutých artémií sa zvyšovalo, po 240 hodinách koncentrácia 10 mg.l⁻¹ spôsobila úhyn 50 % a koncentrácia 5 mg.l⁻¹ 42 %.

V tabuľke 3 bol pri teobromíne pozorovaný štatisticky významný úhyn až po 192 hodinách. Pri koncentrácii 1000 mg.l⁻¹ predstavoval hodnotu 22 %. Koncentrácie 500 mg.l⁻¹ a 250 mg.l⁻¹ vykazovali letalitu 20 %. Počet uhynutých žiabronôžok dosiahol po 240 hodinách oveľa vyššiu úmrtnosť. Pri koncentrácii 1000 mg.l⁻¹ bola letalita na úrovni 84 %. O niečo nižšia letalita bola pri koncentrácii 500 mg.l⁻¹ (70 %).

Keďže sme u všetkých pozorovaných látok sledovali štatisticky významné hodnoty a dosiahli sme úmrtnosť žiabronôžok nad 50 %, bolo možné stanoviť LC₅₀. Hodnoty boli vyhodnotené dvojdvádkovou interpolačnou metódou a pomocou programu ToxRat.

LC₅₀ pre kofeín z tabuľky 4 mala hodnotu pri 240 hodinách 50,00 mg.l⁻¹, spodná hranica intervalu spoľahlivosti bola 37,37 mg.l⁻¹ a horná hranica intervalu

Tab. 1: Letalita kofeínu

KOFEÍN		ČAS (hod)									
		24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
50 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	2	12	16*	22*	24*	40*	50*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	4,3	8,6	12,9	12,9	17,2	12,9	21,5
25 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	4	6	12	14	20*	36*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	4,3	8,6	8,6	4,3	8,6	8,6
12,5 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	2	8	10	20*	32*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	4,3	4,3	0	8,6	8,6
6,25 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	2	8	10	14	30*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	4,3	8,6	8,6	8,6	0
3,125 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	0	6	8	12	28*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	0	4,3	4,3	4,3	8,6
K	x	0	0	0	0	0	0	4	6	6	6
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	0	4,3	4,3	4,3	4,3

Tab. 2: Letalita teofylínu

TEOFYLÍN		ČAS (hod)									
		24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
10 mg.l ⁻¹	x	0	0	2	2	6	8	16	20*	40*	50*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	4,3	4,3	4,3	4,3	12,9	12,9	0	17,2
5 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	2	6	8	14	20*	36*	42*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	4,3	4,3	4,3	4,3	0	4,3	8,6
2,5 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	2	6	6	16	26*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	4,3	4,3	4,3	8,6	4,3
1,25 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	0	4	4	12	24*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	0	4,3	4,3	4,3	8,6
0,625 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	0	2	4	8	20*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	0	4,3	4,3	4,3	8,6
K	x	0	0	0	0	0	0	4	6	6	6
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	0	4,3	4,3	4,3	4,3

Tab. 3: Letalita teobromínu

TEOBROMÍN		ČAS (hod)									
		24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
1 000 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	2	8	14	22*	46*	84*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	4,3	8,6	4,3	8,6	4,3	4,3
500 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	4	12	20*	38*	70*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	4,3	4,3	8,6	12,9	21,5
250 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	4	12	20*	38*	66*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	8,6	4,3	0	8,6	30,1
125 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	2	10	18	36*	54*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	4,3	8,6	4,3	4,3	17,2
62,5 mg.l ⁻¹	x	0	0	0	0	0	2	4	6	18	26*
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	4,3	4,3	8,6	12,9	8,6
K	x	0	0	0	0	0	0	4	6	6	6
	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	s	0	0	0	0	0	0	4,3	4,3	4,3	4,3

spoľahlivosti bola 66,90 mg.l⁻¹. Avšak pri stanovení letálnej koncentrácie pomocou programu ToxRat v tabuľke 7 dosiahla hodnotu 90,431 mg.l⁻¹.

Podľa tabuľky 5 predstavuje LC₅₀ pre teofylín po 216 hodinách 17,81 mg.l⁻¹. Spodná hranica intervalu spoľahlivosti je 5,51 mg.l⁻¹ a horná je 57,57 mg.l⁻¹. Po 240 hodinách mala LC₅₀ 10,00 mg.l⁻¹. Spodná hranica intervalu spoľahlivosti dosiahla 4,38 mg.l⁻¹ a horná 22,82 mg.l⁻¹. Použitím programu ToxRat je LC₅₀ po 216 hodinách rovná 15,492 mg.l⁻¹ a LC₅₀ po 240 hodinách je 11,100 mg.l⁻¹.

LC₅₀ teobromínu po 216 hodinách vychádzajúca z tabuľky 6 má 1414,21 mg.l⁻¹. Spodná hranica intervalu spoľahlivosti je 202,05 mg.l⁻¹ a horná hranica intervalu spoľahlivosti je 9898,08 mg.l⁻¹. Po 240 hodinách bola hodnota 143,58 mg.l⁻¹. Interval spoľahlivosti mal pri hornej hranici 103,15 mg.l⁻¹ a pri hornej 199,87 mg.l⁻¹. Porovnaním pomocou programu ToxRat došlo

k miernej zmene. LC₅₀ po 216 hodinách je 1352,312 mg.l⁻¹ a po 240 hodinách 146,166 mg.l⁻¹.

Z uvedeného vyplýva, že látka je tým toxicejšia, čím má nižšiu hodnotu LC50. Z našich výsledkov prezentovaných v tabuľkách 4 – 9 je zrejmé, že s pomiedzi nami testovaných látok má najnižšiu toxicitu teobromín, vyššiu toxicitu má kofeín a najtoxickejší je teofylín.

DISKUSIA

Najaktuálnejšie obavy súvisia s konzumáciou metylxantínov. Absorbujú sa hlavne z kávy, čaju a kakaových výrobkov, ako sú kolové nápoje a čokoládové tyčinky. Vzhľadom na ich transport cez placentárnu bariéru môže neobmedzené prijímanie týchto látok viesť k výraznejším biologickým účinkom počas tehotenstva a popôrodného obdobia. Štúdia ukázala, že

Tab. 4: Hodnoty LC_{50} kofeínu vyhodnotené dvojďávkovou interpolačnou metódou

ČAS (hod)	LC_{50} (mg.l ⁻¹)	Interval spoľahlivosti (mg.l ⁻¹)
168	348,22	9,51 – 12 754,13
192	303,14	8,88 – 10 348,36
216	70,71	33,26 – 150,31
240	50,00	37,37 – 66,90

Tab. 5: Hodnoty LC_{50} teofylínu vyhodnotené dvojďávkovou interpolačnou metódou

ČAS (hod)	LC_{50} (mg.l ⁻¹)	Interval spoľahlivosti (mg.l ⁻¹)
216	17,81	5,51 – 57,57
240	10,00	4,38 – 22,82

Tab. 6: Hodnoty LC_{50} teobromínu vyhodnotené dvojďávkovou interpolačnou metódou

ČAS (hod)	LC_{50} (mg.l ⁻¹)	Interval spoľahlivosti (mg.l ⁻¹)
216	1414,21	202,05 – 9898,08
240	143,58	103,15 – 199,87

Tab. 7: Letálne koncentrácie kofeínu vyhodnotené pomocou programu ToxRat

ČAS (hod)	LC_{10} (mg.l ⁻¹)	LC_{20} (mg.l ⁻¹)	LC_{50} (mg.l ⁻¹)
24	> 50	> 50	> 50
48	> 50	> 50	> 50
72	> 50	> 50	> 50
96	> 50	> 50	> 50
120	50,859	> 50	> 50
144	33,894	67,603	> 50
168	11,616	56,108	> 50
192	7,304	43,589	> 50
216	3,071	12,331	> 50
240	ndef.	ndef.	90,431

Tab. 8: Letálne koncentrácie teofylínu vyhodnotené pomocou programu ToxRat

ČAS (hod)	LC ₁₀ (mg.l ⁻¹)	LC ₂₀ (mg.l ⁻¹)	LC ₅₀ (mg.l ⁻¹)
24	> 10	> 10	> 10
48	> 10	> 10	> 10
72	> 10	> 10	> 10
96	> 10	> 10	> 10
120	> 10	> 10	> 10
144	11,348	> 10	> 10
168	4,131	12,580	> 10
192	2,849	8,367	> 10
216	0,943	2,466	15,492
240	ndef.	0,808	11,100

Tab. 9: Letálne koncentrácie teobromínu vyhodnotené pomocou programu ToxRat

ČAS (hod)	LC ₁₀ (mg.l ⁻¹)	LC ₂₀ (mg.l ⁻¹)	LC ₅₀ (mg.l ⁻¹)
24	> 1 000	> 1 000	> 1 000
48	> 1 000	> 1 000	> 1 000
72	> 1 000	> 1 000	> 1 000
96	> 1 000	> 1 000	> 1 000
120	> 1 000	> 1 000	> 1 000
144	> 1 000	> 1 000	> 1 000
168	246,962	> 1 000	> 1 000
192	51,639	461,773	> 1 000
216	ndef.	35,436	1 352,312
240	ndef.	ndef.	146,166

metylxantíny sú významnými inhibítormi produkcie angiogénnych rastových faktorov a samotnej angiogenézy. Predpokladáme, že zvýšené vychytávanie týchto látok môže ovplyvniť embryonálnu angiogénzu a neskôr v postnatálnom období dozrievanie a funkčnú aktivitu potomstva (Skopiński a kol., 2011).

Toxicita metyloxantínov sa môže veľmi líšiť v závislosti od konkrétnej zlúčeniny a príslušného zvieratá. U potkanov je LD₅₀ pre kofeín 200 mg.kg⁻¹, pre teofylín 206 mg.kg⁻¹ a pre teobromín 950 mg.kg⁻¹ (Tarka, 1982). U ľudí sú hodnoty relatívne blízke hodnotám u potkanov s LD₅₀ – 192 mg.kg⁻¹ pre kofeín a 1 000 mg.kg⁻¹ pre teobromín. Akútna toxicita pre ľudí voči metyloxantínom je veľmi nízka. Napríklad pre kofeín

by mala byť akútna toxická hladina asi 10 g/deň, čo by bolo porovnateľné s vypitím 100 šálok instantnej kávy (Cappelletti a kol., 2015). Teobromín má ešte vyššie orálne smrteľné dávky u ľudí ako kofeín (Franco, Oñatibia-Astibia, Martínez-Pinilla, 2013). Štúdie poskytujú dôkaz o jeho všeobecnej neškodnosti (Baggott a kol., 2013).

Toxický účinok teofylínu skúmali aj Hendeles a Weiberger v roku 1985. Konkrétne sa zaoberali vzťahom medzi sérovou koncentráciou a toxicitou. Tento vzťah sledovali u 50 dospelých pacientov. Podávali konštantné intravenózne infúzie teofylínu v množstve 0,9 mg/kg/hod.

U pacientov so sérovými hladinami teofylínu medzi 8 a 22 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sa nevyskytli žiadne toxické prejavy. Mierna toxicita vrátane nauzey, vracania, bolesti hlavy, nervozity a nespavosti bola pozorovaná u ľudí s hodnotami sérového teofylínu v rozmedzí 22 až 34 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Sínusová tachykardia, príležitostne predčasné komorové kontrakcie a iné príznaky miernej toxicity boli zistené u ďalších pacientov s koncentraciami teofylínu od 27 do 51 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pacienti v ťažkom stave s príznakmi závažných arytmií až smrťou mali sérové koncentrácie teofylínu v rozmedzí 39 a 53 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Kvôli častému výskytu nežiaducich účinkov v závislosti na dávke sa dávkovanie začína čo najnižšou dávkou a titruje sa až do dosiahnutia terapeutického účinku (Gottwalt a Tadi, 2020).

Štúdia Douglas a kol. z roku 1996 hodnotí vývojovú toxicitu teofylínu a jej metabolitov na organizme *Xenopus*, kde hodnota LC_{50} pre teofylín po 96 hodinách bola 0,29 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pre kyselinu 1,3-metylxantínovú bola LC_{50} po 96 hodinách $> 1,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ďalej pri 1-metylxantíne za rovnaký čas bola LC_{50} rovná 0,25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Posledný sledovaný metabolit 3-metylxantín dosiahol LC_{50} po 96 hodinách 0,20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z výsledkov vyplýva, že konkrétne metabolická dráha detoxikácie teofylínu na kyselinu 1,3 dimetylxantínovú bola podstatne menej toxická ako N-demetylácia na 1-metylxantín a 3-metylxantín. Neschopnosť teofylínu vyvolať vývojovú toxicitu môže byť priamym výsledkom rýchlej detoxikácie na kyselinu 1,3-metylxantínovú, ktorá tvorí primárnu metabolickú dráhu u potkanov a ľudí. N-demetylácia teofylínu zvyšuje vývojovú toxicitu teofylínu. Preto predstavuje vedľajšiu cestu. Typy charakteristík malformácie vyvolané 1-metylxantínom a 3-metylxantínom boli podobné. Koncentrácie $> 0,05 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ indukovali nesprávny vývoj čreva. Zlý vývoj oka, kraniofaciálne defekty a mikroencefália boli indukované u embryí vystavených koncentráciám $> 0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Zalomenie chvosta a krvácanie bolo zaznamenané u embryí vystavených koncentráciám $> 0,18 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Podľa Safety Data Sheet spoločnosti Sigma-Aldrich je LC_{50} kofeínu po 48 hodinách na modeli

Daphnia magna rovné 182 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Safety Data Sheet, 2018). Pri teofylíne ide o hodnotu 178 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, 2014). Naše výsledky sú porovnateľné s prácami iných autorov. V našej štúdii boli použité vyššie koncentrácie.

ZÁVER

Naša štúdia sa zaoberala stanovením letálnych koncentrácií metylxantínov na modeli *Artemia franciscana* v časovej závislosti od aplikácie.

Hodnota LC_{50} kofeínu pomocou dvojdávkovej interpolačnej metódy bola 50,00 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ po 240 hodinách, zatiaľ čo pri teofylíne 10,00 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a pri teobromíne 143,58 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Použitím programu ToxRat dosahovala hodnota LC_{50} kofeínu 90,431 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, pri teofylíne 11,100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a nakoniec pri teobromíne 146,166 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Látka je tým toxickejšia, čím má nižšiu hodnotu LC_{50} . Z našich výsledkov je zrejmé, že s pomedzi nami testovaných látok má najnižšiu toxicitu teobromín, vyššiu toxicitu má kofeín a najtoxickejší je teofylín.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia sa uskutočnila za podpory Národného referenčného laboratória pre pesticídy UVLF-KE.

ZOZNAM LITERATÚRY

- Baggott, M. J., Childs, E., Hart, A. B., de Bruin, E., Palmer, A. A., Wilkinson, J. E., de Wit, H.: Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, 2013, 228 (1), 109 – 118.
- Barnes, P. J.: Theophylline. *Pharmaceuticals*, 2010, 3 (3), 725 – 747.
- Cappelletti, S., Piacentino, D., Sani, G., Aromatario, M.: Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug? *Current neuropharmacology*, 2015, 13 (1), 71 – 88.
- Douglas, J. F., Enos, L. S., Timothy, P., Mendi, A. H., John, A. B.: Evaluation of the deve-

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie* [Pharmacology and Toxicology]. 15. vyd. Praha: Grada Avicenum, 2004. 577.

Tarka, S. M.: The toxicology of cocoa and methylxanthines: a review of the literature. *Critical Reviews in Toxicology*, 1982, 9 (4), 275 – 312.



VYUŽITIE SPE EXTRAKCIE PRI STANOVENÍ LIEČIVA METÓDOU RP-HPLC V KRVNOM SÉRE

USE OF SPE EXTRACTION IN THE DETERMINATION OF DRUG BY RP-HPLC IN BLOOD SERUM

Šuleková, Monika; Škvareková, Andrea

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

monika.sulekova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Štúdia sa zaoberá stanovením liečiva naproxén v krvnom sére metódou UHPLC. Vzorka bola pred analýzou upravená zakoncentrovaním analytu SPE extrakciou. Elúcia naproxénu prebiehala v izokratickom móde. Mobilná fáza bola zložená z acetonitrilu a fosfátového tlmivého roztoku s pH = 3 v pomere 70 : 30 (v/v). Na kolónu, ktorá bola temperovaná na 25 °C, sa dával 1 µl vzorky, prietok mobilnej fázy bol 1 ml.min⁻¹ a elučný čas naproxénu 1,917 min. Kolónový priestor bol temperovaný na teplotu 25 °C. DAD detektor bol nastavený na vlnovú dĺžku 229 nm a fluorescenčný detektor pracoval pri vlnových dĺžkach $\lambda_{\text{ex}} = 270$ nm a $\lambda_{\text{em}} = 340$ nm. V biologickej vzorke krvného séra sa po optimalizácii chromatografických podmienok podarilo identifikovať a následne stanoviť naproxén spektrofotometrickou a fluorescenčnou detekciou.

Kľúčové slová: krvné sérum; naproxén; RP-HPLC; SPE extrakcia

ABSTRACT

The study deals with the determination of the drug naproxen in blood serum by the UHPLC method. The sample was adjusted by concentrating the SPE analyte by extraction before analysis. Elution of naproxen was performed in isocratic mode with the components of the mobile phase, which consisted of acetonitrile and phosphate buffer at pH = 3 in a ratio of 70 : 30 (v/v) with a flow rate of 1 ml.min⁻¹. The feed to the column was 1 µl and the naproxen analyte eluted at a retention time of 1.917 min. The column space was tempered to 25 °C. The DAD detector was set to a wavelength of 229 nm and the fluorescence detector operated at wavelengths of $\lambda_{\text{ex}} = 270$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 340$ nm. Following the optimization of

the chromatographic conditions, in the biological sample of blood serum it was possible to identify and subsequently determine naproxen by spectrophotometric and fluorescence detection.

Key words: blood serum; naproxen; RP-HPLC; SPE extraction

ÚVOD

Rozvoj stanovenia liečiv v biologických tekutinách sa vďaka vývoju laboratórnych metód v posledných dvadsiatich rokoch zintenzívnil. Prínos nových postupov sa pozitívne odzrkadlil aj na zlepšení manažmentu liečby (Magulová, 2001). V súčasnej dobe sú intenzívne študované nanopórovité materiály na báze oxidu kremičitého (MCM-41), ktoré ako alternatívny typ biokompatibilných nosičov liečiv patria k štruktúrne stabilným, netoxickým materiálom s vhodnými chemickými vlastnosťami a biokompatibilitou. Nanočastice majú vďaka pórovitosti zväčšený povrch a umožňujú tak prijatie pomerne vysokých dávok liečiva. Navyše povrchovou modifikáciou nanopórovitej siliky špecifickými funkčnými skupinami možno liečivo v póroch siliky uzavrieť a následne vplyvom rôznych fyzikálnych a chemických faktorov póry otvoriť a zabezpečiť tak ciele uvoľnenie liečiva do prostredia. Na základe tejto skutočnosti bola potkanom podaná jednorazová *i.v.* dávka nanopórovitej siliky MCM-41 s liečivom naproxén o koncentrácii 10 mg.kg⁻¹, ktorý sme následne v experimentálnej časti štúdie stanovovali na základe analýzy telových tekutín (krvného séra) pomocou metódy vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie v systéme s reverznými fázami (RP-HPLC). Pred samotnou chromatografickou analýzou sme na predúpravu vzorky zvolili extrakciu na pevnej fáze (SPE) (Verette, 2000). Princíp SPE spočíva v disperzii analytu medzi kvapalnú a pevnú fázu, ktoré sú navzájom nemiešateľné. Jednotlivé kroky zabezpečujú na základe malého objemu rozpúšťadla prečistenie analytu pre následnú chromatografickú analýzu (Keçili a kol., 2020). Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia je dnes vo farmaceu-

tickom priemysle široko využívaná, najmä pri identifikácii a kvantifikácii liečiv, preto sme na základe tejto skutočnosti v experimentálnej časti využili metódu RP-HPLC, ktorá spĺňa všetky predpoklady a ponúka veľké množstvo výhod (Lindon a kol., 2003).

MATERIÁL A METÓDY

Izolácia krvného séra z pokusných zvierat bola uskutočnená v spolupráci s Ústavom biologických a ekologických vied, PF UPJŠ v Košiciach. Vybrané experimentálne postupy na zvieratách, ako aj samotné HPLC stanovenie liečiva naproxénu boli súčasťou grantovej úlohy APVV-15-0520 „Inteligentné nanopórovité systémy ako nosiče liečiv“ pod vedením prof. RNDr. Vladimíra Zelenáka, DrSc. z Ústavu chemických vied, PF UPJŠ v Košiciach. Všetky experimenty na potkanoch prebehli v súlade s pravidlami Etickej komisie Prírodovedeckej fakulty UPJŠ v Košiciach a na základe povolenia Štátnej veterinárnej a potravinovej správy. Na izoláciu krvného séra bola v experimente použitá skupina zvierat, ktorým bola navodená terminálna anestéza tiopentalom sodným. Po cervikálnej dekapitácii bola zo zvierat izolovaná artériovenózna krv, z ktorej bolo po zrazení a následnej centrifugácii izolované krvné sérum. Spracovanie získaného krvného séra a jeho úprava spočívali v zakoncentrovaní analytu liečiva SPE extrakciou. Následne sme získaný extrakt použili pre HPLC analýzu, ako aj kvantifikáciu naproxénu v krvnom sére.

Chemikálie a reagenty

- metanol HPLC grade (Thermo Fisher Scientific, UK)
- ultračistá voda pre chromatografiu (Merck, Nemecko)
- kyselina octová ľadová 100 % (Merck, Nemecko)
- kyselina orto-fosforečná 85 % p. a. (Merck, Nemecko)
- etylacetát p. a. (Mikrochem, Slovensko)
- naproxén (Merck, Nemecko)
- acetonitril HPLC grade (Merck, Nemecko).

Prístrojové vybavenie

- HPLC chromatograf ULTIMATE 3000, 2014 Thermo Fischer Scientific
 - kolóna Thermo Scientific ODS HYPERSIL 150 mm x 4,6 μm ; 3 μm
 - kolóna Kinetex 150 mm x 4,6 μm ; 2,6 μm
 - predkolóna zložená zo sorbentu C18 s etánovými mostíkmi SecurriyGuard™ guard Cartridge Kit
 - fluorescenčný detektor, FLD – 3400RS 2 PMT
 - spektrofotometrický detektor s diódovým prístrojom, DAD – 3000RS
- SPE manifold CHROMABOND®, MACHEREY-NAGEL
- membránová pumpa KNF LABLABOPORT
- SPE kolónky Strata C18 – E (55 μm , 40A), 500 mg/6 ml
- tlaková fľaša s dusíkom
- vortex Vývojové dílny, ČSAV LTM2
- ultrazvuková vaňa Bandelin, SONOREX DIGITEC
- analytické váhy Kern, ABT 220-5DM
- pH meter WTW Series, inoLab, pH 720
- magnetické miešadlo HI-190M, HANNAH INSTRUMENTS
- striekačky CHIRANA, T. Injecta; VITREX, CHIRMAX, 2 ml
- striekačkový filter Q-Max® RR 25 mm 0,22 μm PVDF – Frisenette
- mikropipety Eppendorf PhysioCare Concept® Research plus
- laboratórne sklo
- chladnička INDESIT s mrazničkou
- parafilm
- softvér Chromeleon 7, Chromatography data System.

Príprava roztokov štandardu

Príprava kalibračných roztokov štandardu naproxénu spočívala v príprave zásobného a pracovného roztoku uvedeného štandardu. Na prípravu zásobného roztoku sme si navázili na analytických váhach 0,0501 g štandardu a rozpustili v čistom acetonitrile.

Následne bol rozpustený naproxén kvantitatívne prenesený do 50 ml odmernej banky a doplnený po rysku rozpúšťadlom. Výsledná koncentrácia získaného zásobného roztoku bola 1 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$. Z takto pripraveného zásobného roztoku sme pripravili pracovný roztok štandardu naproxénu nariedením 1000 μl zásobného roztoku naproxénu do 10 ml odmernej banky a doplnením po rysku čistým acetonitrilom. Koncentrácia pracovného roztoku štandardu bola 0,1 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Príprava kalibračných roztokov

Na zostrojenie kalibračného grafu sme pred začiatkom SPE extrakcie pripravili sadu kalibračných roztokov odpipetovaním 10, 40, 100, 500 a 1000 μl pracovného roztoku štandardu naproxénu s koncentráciou 0,1 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ k 1000 μl izolovaného krvného séra a 3 ml 100 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ CH_3COOH v kónickej skúmavke. Táto zmes bola premiešaná na vortexe 1 min. Extrakčné kolónky s nepolárnou fázou sa vopred premyli 3 ml metanolu, 3 ml destilovanej vody a 1 ml 100 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ CH_3COOH tak, aby sa povrch sorbentu nevysušil. Po kondicionovaní SPE kolónky a ekvilibracii sa na aktivovanú kolónku aplikovala pripravená premiešaná vzorka so štandardmi naproxénu. SPE kolónka bola premytá 3 ml destilovanej vody a 3 ml 100 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ CH_3COOH a následne bol sorbent sušený vákuom po dobu 5 min pri tlaku 10 inch Hg. V ďalšej fáze sa analyt naproxén eluoval 3 ml zmesi etylacetátu a metanolu v pomere 90 : 10 (v/v) s prietokom 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Eluát bol následne zachytávaný do skúmavky a vysušený plynným dusíkom pri laboratórnej teplote. K získanému odparku bolo pridaných 1000 μl acetonitrilu a získaný acetonitrilový roztok bol po jednominútovom premiešaní na vortexe a päťminútovom ultrazvukovaní prefiltrovaný pomocou striekačkového PVDF filtra (0,22 μm), a následne sme číry roztok preniesli do vialky, ktorú sme umiestnili do karusela pre HPLC analýzu. Pre HPLC analýzu z takto získaných štandardov s koncentraciami v rozmedzí od 1 až 100 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ bol dávkovaný objem na kolónu 1 μl .

Tab. 1: Optimalizácia HPLC podmienok pre mobilnú fázu metanol a voda

Znázornenie píku	Mobilná fáza A : B (v/v)	Teplota [°C]	Prietoková rýchlosť [ml.min ⁻¹]
čierny	60 : 40	30	0,8
zelený	50 : 50	30	1,5
hnedý	50 : 50	30	1,0
ružový	20 : 80	30	1,0
modrý	30 : 70	30	1,0

Úprava vzorky pred HPLC analýzou

Krvné sérum je zložitý biologický materiál, ktorý si pred analýzou vyžaduje predúpravu. Na úpravu bola použitá metóda extrakcie na tuhej fáze s oktadecylou fázou C18 na SPE manifolde. Extrakčné kolónky s nepolárnou fázou [Strata C18 – E (55 µm, 40A), 500 mg/6 ml] sa vopred premyli 3 ml metanolu, 3 ml destilovanej vody a 1 ml 100 mmol.dm⁻³ CH₃COOH tak, aby sa povrch sorbentu nevysušil. Do kónickej skúmavky bolo odpipetovaných 1000 µl izolovaného krvného séra a 3 ml 100 mmol.dm⁻³ CH₃COOH. Táto zmes bola premiešaná na vortexe 1 min. Po kondicionovaní SPE kolónky (zmáčaní) a ekvilibracii sa na aktivovanú kolónku aplikovala pripravená premiešaná vzorka. SPE kolónka bola premytá 3 ml destilovanej vody a 3 ml 100 mmol.dm⁻³ CH₃COOH a následne bol sorbent sušený vákuom po dobu 5 min pri tlaku 10 inch Hg. V ďalšej fáze sa analyt naproxén eluoval 3 ml zmesi etylacetátu a metanolu v pomere 90 : 10 (v/v) s prietokom 1 ml.min⁻¹. Eluát bol následne zachytávaný do skúmavky a vysušený plyným dusíkom pri laboratórnej teplote. K získanému odparku bolo pridaných 1000 µl acetonitrilu a získaný acetonitrilový roztok bol po jednominútovom premiešaní na vortexe a päťminútovom ultrazvukovaní prefiltrovaný pomocou striekačkového PVDF filtra (0,22 µm), a následne sme číry roztok preniesli do vialky, ktorú sme umiestnili do karusela pre HPLC analýzu. Z takto pripravenej vzorky bolo dávkovaných na HPLC analýzu 1 µl.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pred samotnou analýzou vzoriek bolo potrebné pomocou štandardného roztoku nájsť optimálne podmienky merania. V rámci experimentálnej časti bolo optimalizované zloženie mobilnej fázy, ako napr. pomer, rýchlosť prietoku, teplota kolóny, ale aj samotná stacionárna fáza.

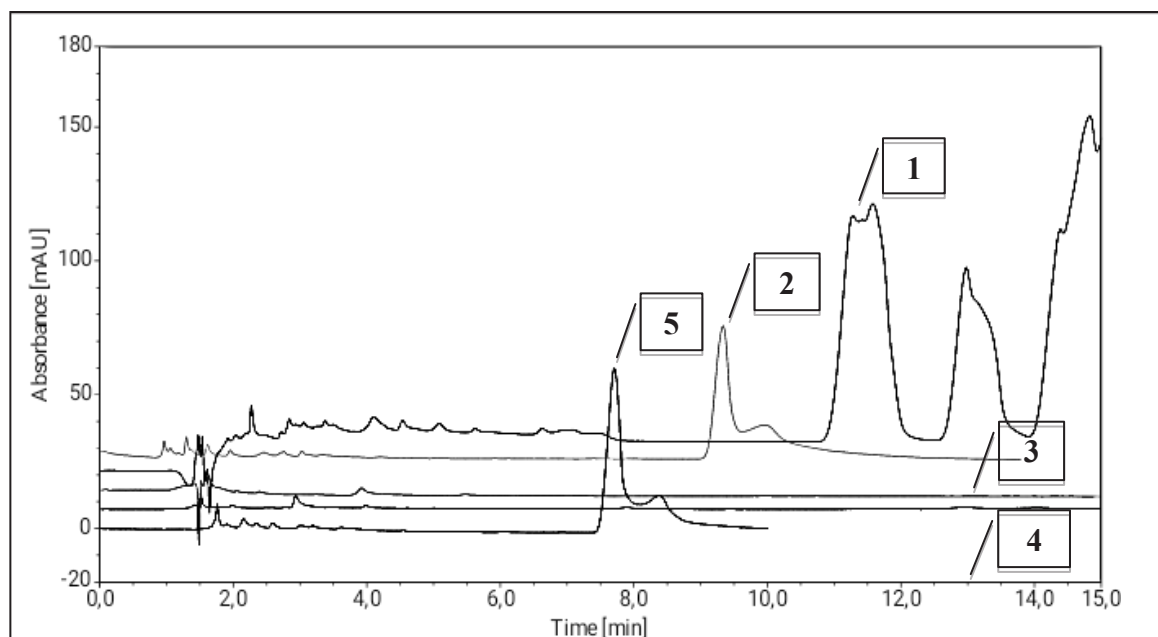
1. Mobilná fáza o zložení metanol a voda

Na základe literárnej rešerše sme v úvode našich experimentov pristúpili k mobilnej fáze so zložkami metanol (komponent A) a ultračistá voda (komponent B). Zložku A, čistý metanol sme menili v rozsahu od 20 až 60 %. Separácia prebiehala pri stálej teplote kolóny 30 °C a rýchlosť prietoku mobilnej fázy bola variabilná od 0,8 do 1,5 ml.min⁻¹ za použitia kolóny Kinetex 150 mm x 4,6 µm; s veľkosťou častíc 2,6 µm (viď tab. 1).

Po chromatografickej analýze sme zo záznamov znázornených na obr. 1 zhodnotili, že píky nie sú dostatočne oddelené a poskytujú nevyhovujúce podmienky pre kvantifikáciu liečiva.

Na treťom a štvrtom znázornenom chromatograme sa pri daných podmienkach pík prislúchajúci liečivu vôbec nevyskytuje, to znamená, že k elúcii naproxénu vôbec nedošlo. Na rozdiel od toho pri ostatných podmienkach (prvý, druhý a piaty záznam) k elúcii naproxénu dochádzalo, avšak tieto podmienky sú tak tiež nevyhovujúce z dôvodu zlej separácie, kde píky

Obr. 1: HPLC-DAD chromatogramy vzorky krvného séra s naproxénom za použitia mobilnej fázy metanol a voda



Tab. 2: Optimalizácia HPLC podmienok pre mobilnú fázu acetonitril a voda

Pík	Mobilná fáza A : B (v/v)	Teplota [°C]	Prietoková rýchlosť [ml.min ⁻¹]
1.	80 : 20	25	0,8
2.	75 : 25	25	1,0
3.	85 : 15	25	1,0
4.	70 : 30	25	1,0
5.	90 : 10	30	0,8

prislúchajúce liečivu sú štiepené a nezodpovedajú gausovskému normálnemu rozdeleniu. Po zhodnotení získaných výsledkov možno považovať túto mobilnú fázu za nevhodnú.

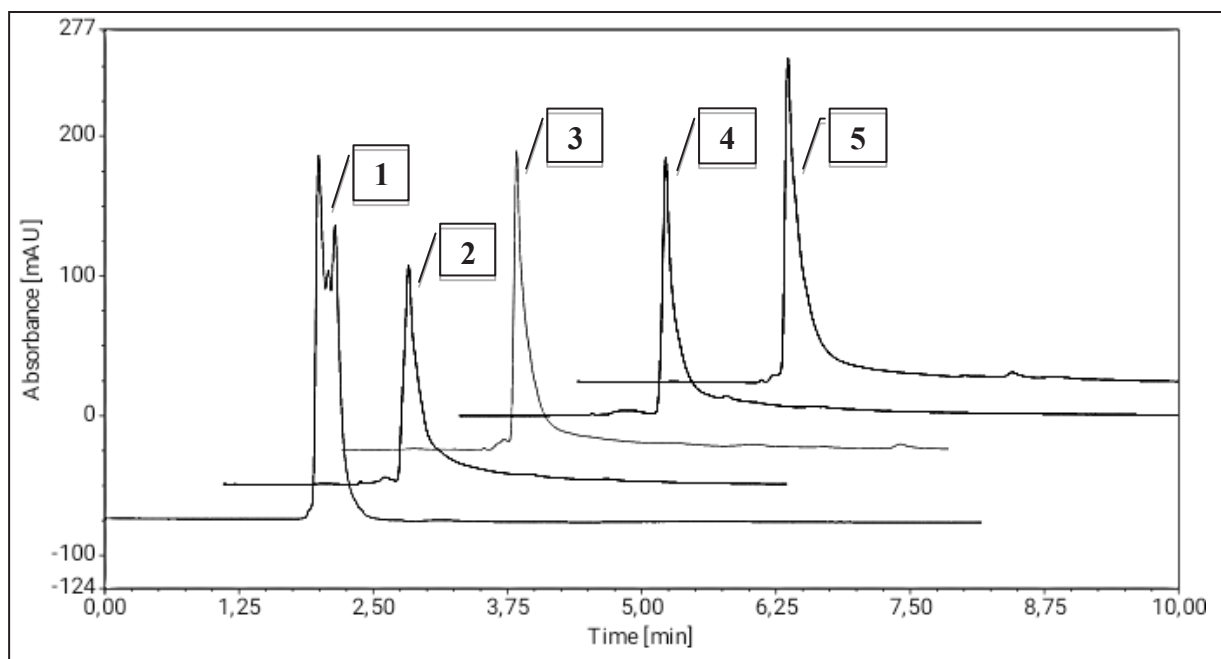
2. Mobilná fáza zložená z acetonitrilu a vody

Nakoľko v prípade prvej odskúšanej mobilnej fázy so zložkami metanol a voda bola separácia nedostatočná, pristúpili sme k ďalšej mobilnej fáze za použitia rovnakej kolóny Kinetex 150 mm x 4,6 µm, s veľkosťou častíc 2,6 µm. Druhou predpokladanou mobilnou fázou bola zmes acetonitrilu (komponent A) a ultračistej vody (komponent B). Pri hľadaní op-

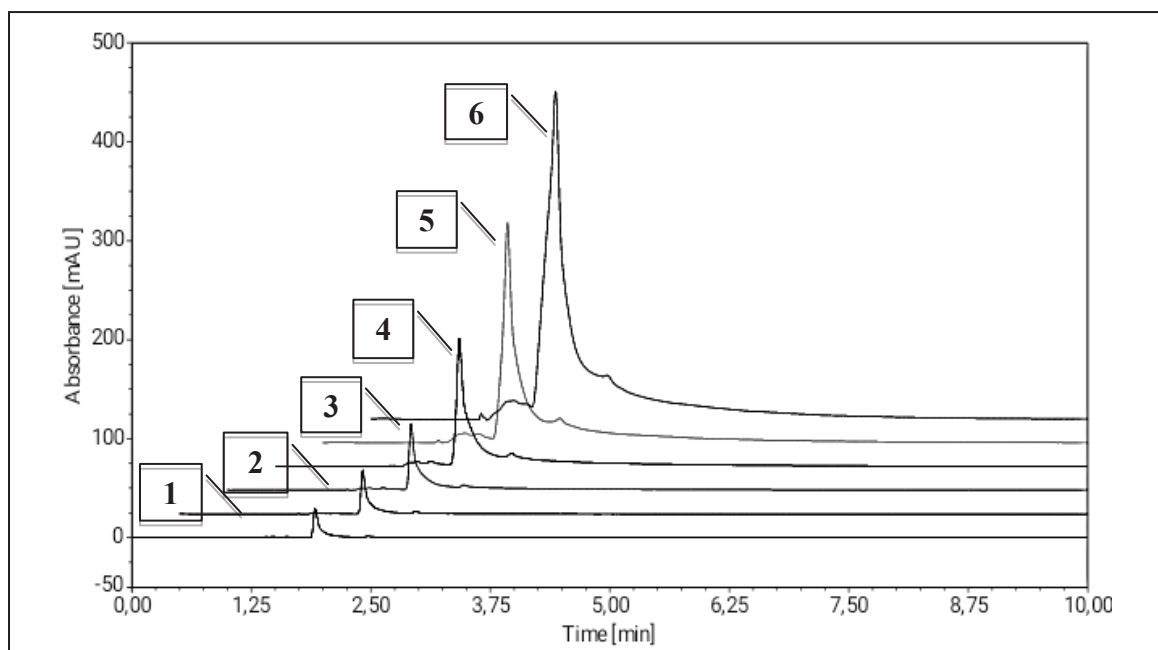
timálnych podmienok sme obsah acetonitrilu menili v intervale 70 – 90 % pri teplote 25 a 30 °C a pri rýchlosti prietoku 0,8 – 1,0 ml.min⁻¹, ako je možné vidieť v tab. 2.

Na obr. 2 sú znázornené HPLC-DAD chromatogramy izolovaného krvného séra získané pri podmienkach zodpovedajúcich optimalizácii jednotlivých zložiek mobilnej fázy ako aj prietokovej rýchlosti pri konštantnej teplote na kolóne 25 °C. Na rozdiel od predchádzajúcej mobilnej fázy pozostávajúcej z metanolu a vody, v prípade druhej odskúšanej mobilnej fázy o zložení acetonitril a voda, liečivo naproxén bolo eluované v prípade všetkých pomerov jednotli-

Obr. 2: HPLC-DAD chromatogramy vzorky krvného séra s naproxénom pri optimalizácii pomerov zložiek mobilnej fázy acetonitril a voda

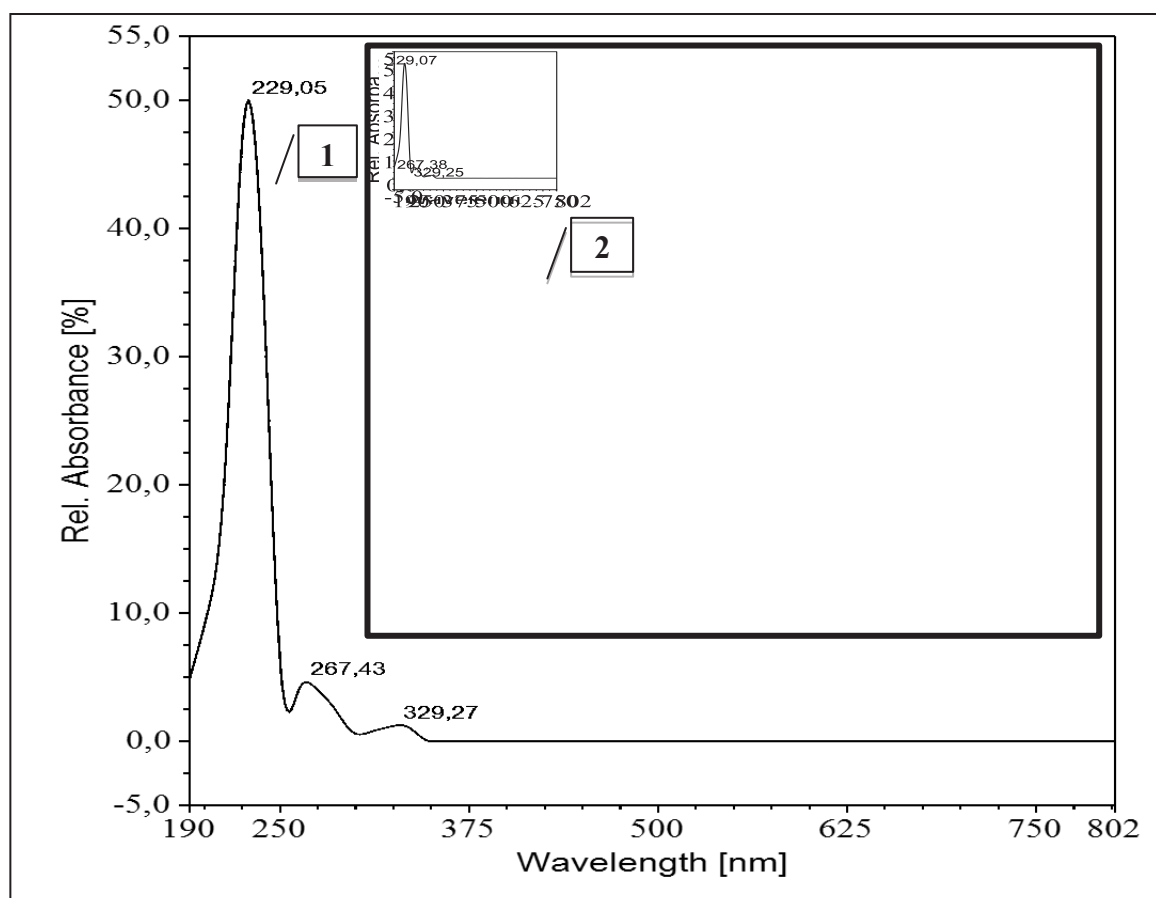


Obr. 3: HPLC-DAD chromatogramy pri rôznych nástrekoch vzorky od 0,5 do 20 μ l pri optimálnych podmienkach DAD detektora



prvý pík = 0,5 μ l; druhý pík = 1,0 μ l; tretí pík 2,5; štvrtý pík = 5 μ l; piaty pík = 10 μ l; šiesty pík = 20 μ l

Obr. 4: Absorpčné spektrum štandardu naproxénu (prvý záznam) a absorpčné spektrum vzorky krvného séra (druhý záznam) (50 ug.ml⁻¹)



vých zložiek, avšak ako je zrejmé z týchto záznamov, nedochádzalo k jeho dostatočnej separácii.

Prvý pík odpovedajúci podmienkam A : B = 80 : 20 (v/v) a 0,8 ml.min⁻¹ je rozštiepený a nie je vhodný pre kvantifikáciu naproxénu. Píky na ostatných záznamoch (druhý až piaty) nám indikujú, že eluujúce liečivo nie je dostatočne separované, čo sa prejavilo frontujúcimi, resp. chvostujúcimi píkmi a zostupná časť píku nie je až na základnej línii, čo je nevyhnutné pri vyhodnotení a integrácii jednotlivých píkov. Preto sme tieto podmienky nemohli použiť pre kvantifikáciu naproxénu.

3. Mobilná fáza zložená z acetonitrilu a fosfátového tlmivého roztoku

Ako ďalšou mobilnou fázou bola zmes acetonitrilu a fosfátového tlmivého roztoku s pH = 3 za použitia

kolóny Kinetex 150 x 4,6 mm s veľkosťou častíc 2,6 μm a predkolóny SecurriyGuard™ guard Cartridge Kit zložená zo sorbentu C18.

Z HPLC-DAD záznamov na obr. 3 vyplynulo, že s narastajúcim nástrekom vzorky na kolónu je pík v zostupnej časti viac deformovaný a nie je separovaný až na základnú líniiu. Najlepšie výsledky sme pozorovali pri dávkovanom objeme 1 μl. Optimálne podmienky HPLC analýzy boli získané pri izokratickej elúcii so zložkami mobilnej fázy acetonitril a fosfátový tlmivý roztok (pH = 3) v pomere 70 : 30 (v/v) s prietokom 1 ml.min⁻¹ pri teplote kolóny 25 °C s nástrekom na kolónu 1 μl. Separácia prebiehala na kolóne s predkolónkou. V prípade tejto mobilnej fázy sme získali najlepšie výsledky separácie liečiva, a preto sme tieto podmienky použili aj pre kvantifikáciu naproxénu v krvnom sére.

Tab. 3: Parametre kalibračnej závislosti

Koncentrácia štandardu [µg.cm ³]	Plocha píku [mAU.min]	t _R [min]	Koncentrácia stanovená metódou kalibračnej priamky [µg.ml ⁻¹]
1	0,1324	1,917	1,0721
	0,1272	1,917	1,0297
4	0,4876	1,917	3,9480
	0,5186	1,917	4,1989
10	1,1857	1,920	9,6013
	1,2072	1,917	9,7747
50	6,0875	1,920	49,2920
	6,1483	1,920	49,7849
100	12,4745	1,917	101,0092
	12,2890	1,920	99,50779

Určenie vhodných vlnových dĺžok pre spektrofotometrickú a fluorescenčnú detekciu

Na detekciu analytu liečiva naproxén sme použili spektrofotometrický DAD detektor s diódovým poľom (DAD – Diode Array Detector), ktorý sníma celé absorpčné spektrum a možno s ním vyhodnotiť viacero analytov súčasne pri ľubovoľnom počte vlnových dĺžok, ako aj fluorescenčný detektor, ktorý je založený na princípe fluorescencie, resp. schopnosti látok absorbovať ultrafialové žiarenie a následne vysielať žiarenie o vyššej vlnovej dĺžke. Fluorescenčný detektor je vysoko selektívny a dá sa vhodne kombinovať so spektrofotometrickým detektorom. Detekcia pomocou UV/VIS je často využívaná, nakoľko štruktúra liečiva naproxénu obsahuje aromatické jadro, ktoré účinne absorbuje UV žiarenie. Na obr. 4 sú znázornené absorpčné spektrá samotného štandardu naproxénu, ako aj analyzovanej vzorky krvného séra.

Kalibračná závislosť pre stanovenie naproxénu

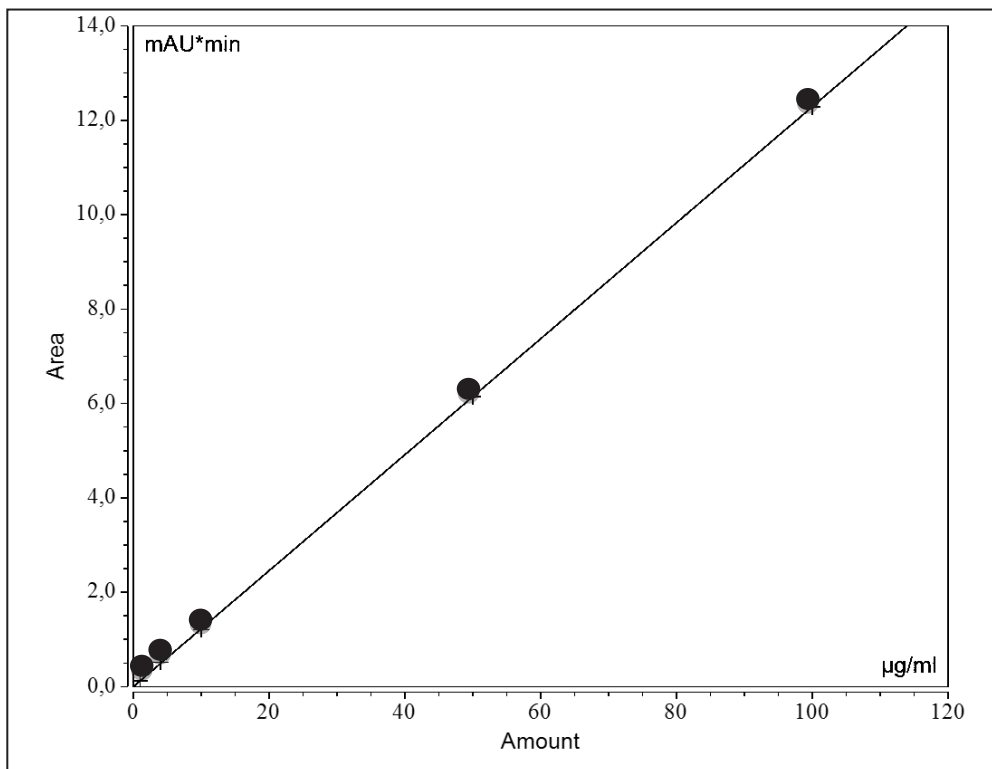
V kvapalinovej chromatografii dominujú v oblasti detekcie spektrofotometrické metódy v ultrafialovej

a viditeľnej oblasti svetla a fluorescenčné spektrometrické metódy, pretože detekčné možnosti sú často ovplyvnené prítomnosťou chromofóru, resp. fluorofóru. Pre kvantitatívne hodnotenie liečiva bola zostrojená programom Chromeleon kalibračná priamka ako závislosť plochy pod píkom, ktorú sme získali z odozvy DAD, respektíve FLD detektora a koncentrácie liečiva. Pripravili sme sériu kalibračných roztokov v koncentračnom intervale od 1 až 100 µg.cm⁻³, pričom každý jeden bod kalibračnej priamky sme premerali dvakrát. Namerané parametre píku uvádzame v tab. 3.

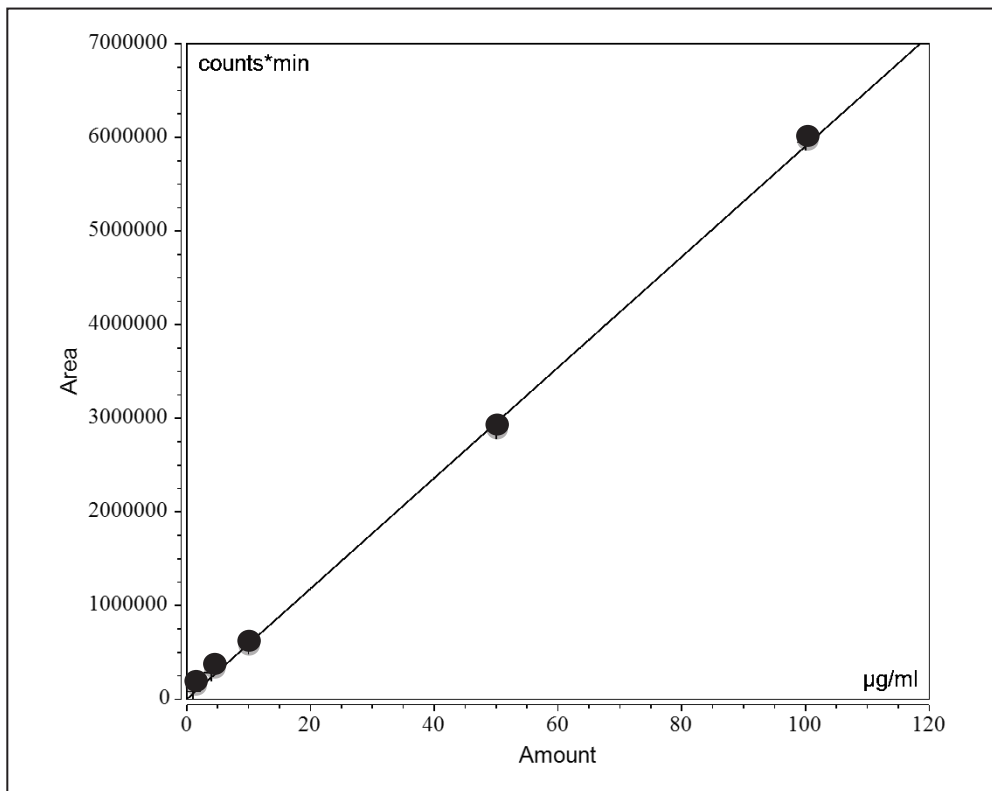
Kalibračné priamky s oboma typmi detekcie boli zostrojené z piatich bodov a sú znázornené na obr. 5 a 6. Rovnica lineárnej regresie pre obe kalibračné závislosti má tvar $y = 0,1229x$ s hodnotou korelačného koeficienta $R^2 = 0,99999$; ktorého hodnota blízka jednotke odpovedá, že priamka je lineárna v danom koncentračnom rozsahu.

Na obr. 7 a 8 sú ilustrované záznamy štandardu liečiva za optimálnych podmienok, kde môžeme vidieť, že pri využití oboch detektorov je eluovaný

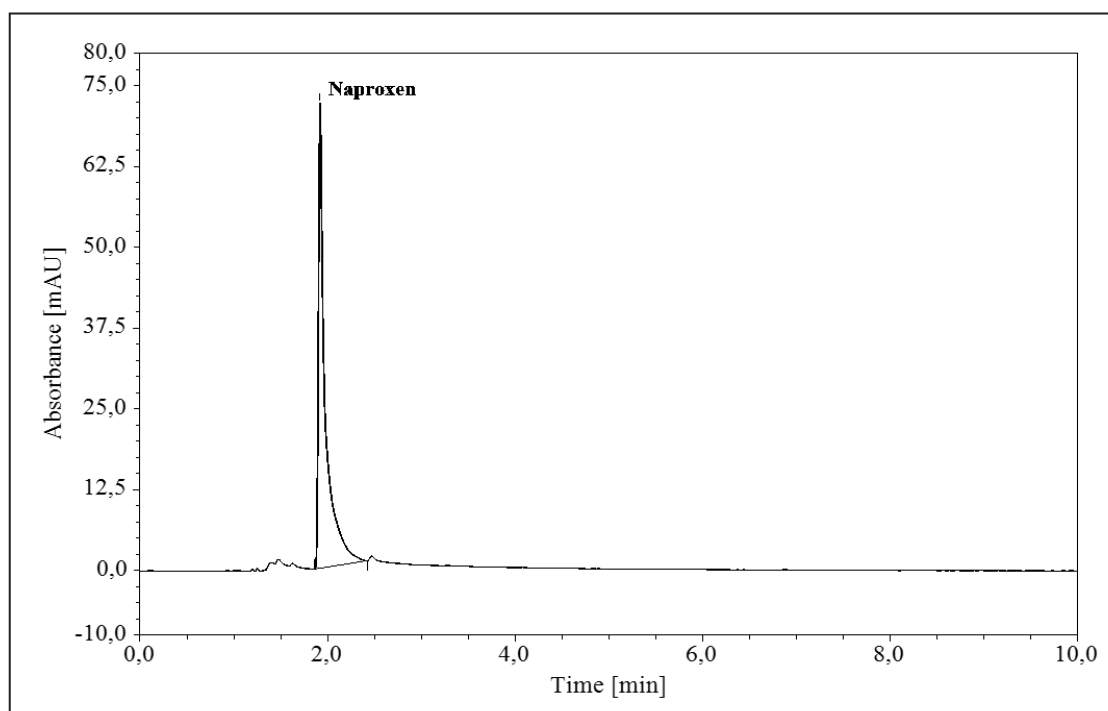
Obr. 5: Kalibračná závislosť naproxénu získaná DAD detektorom



Obr. 6: Kalibračná závislosť naproxénu získaná s FLD detektorom



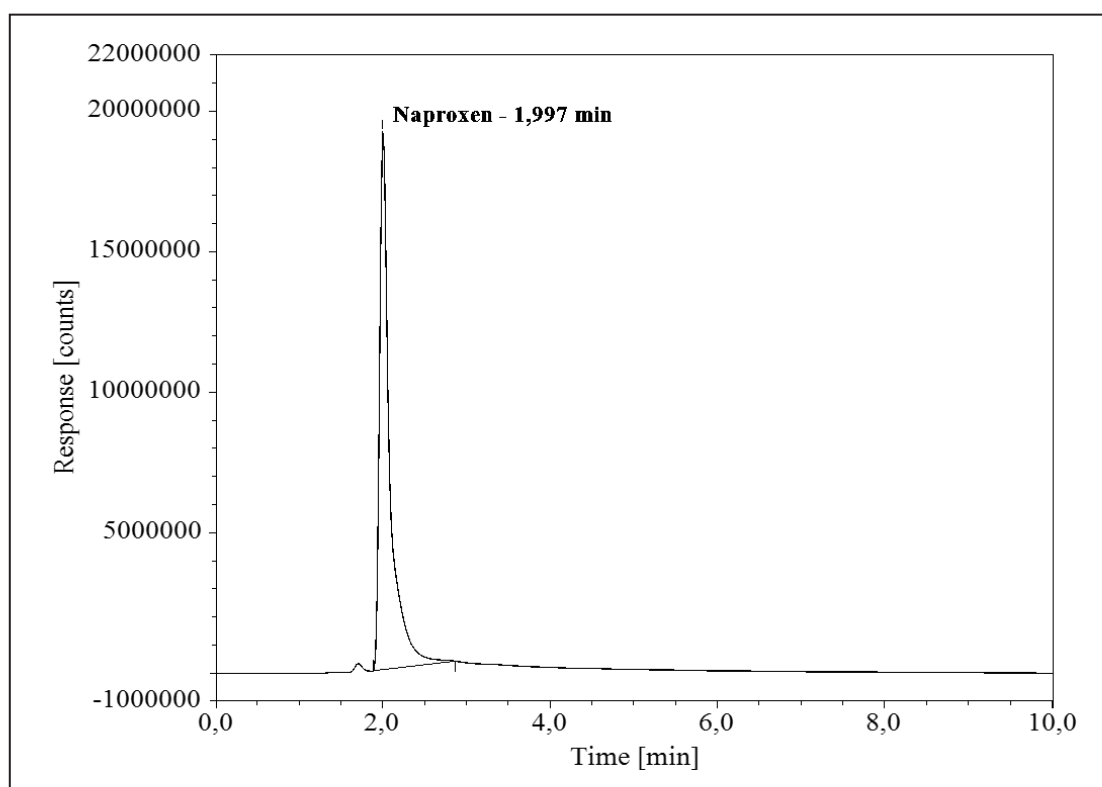
Obr. 7: Chromatogram štandardu naproxénu 50 ug.ml⁻¹ pri optimálnych podmienkach UHPLC-DAD



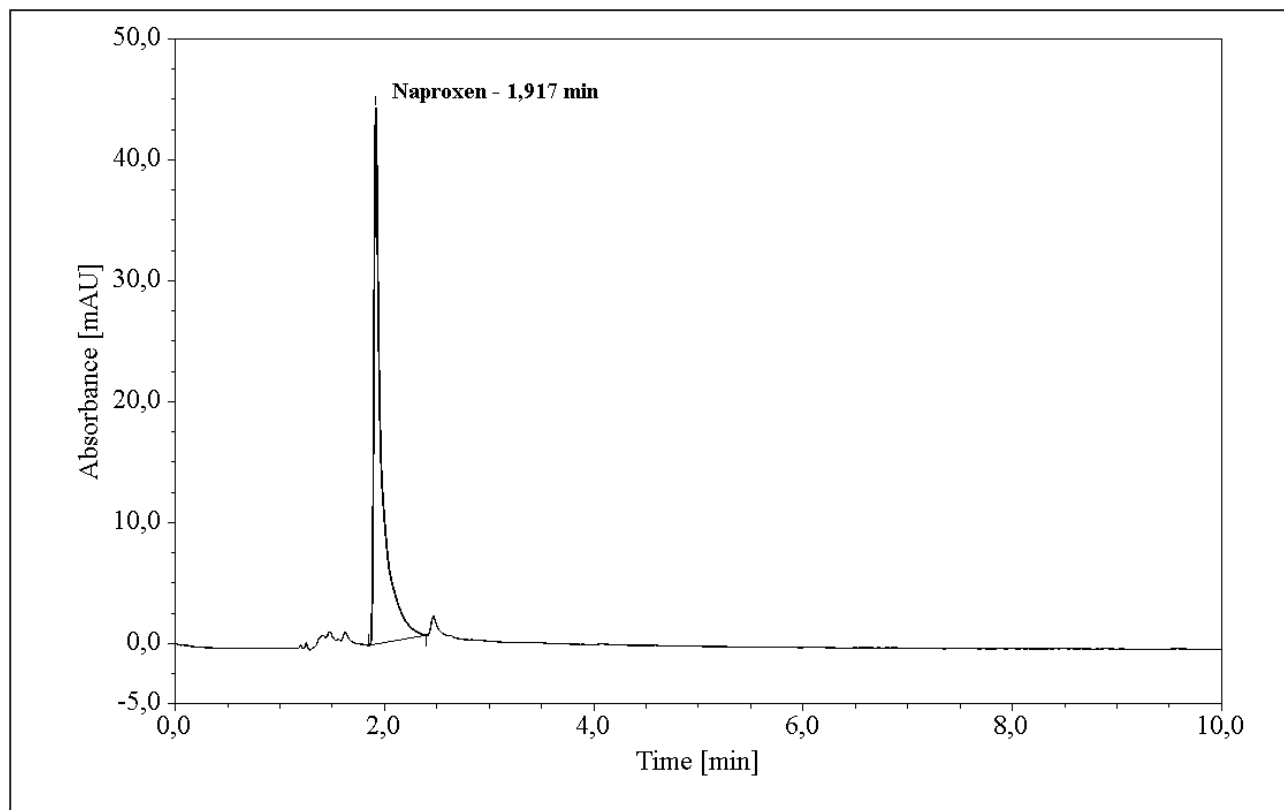
Tab. 4: Najvhodnejšie podmienky RP-UHPLC stanovenia naproxénu v krvnom sére

Teplota kolóny	25 °C
Rýchlosť prietoku	1 ml.min ⁻¹
Zloženie mobilnej fázy	acetonitril : fosfátový tlmivý roztok s pH = 3; 70 : 30 (v/v)
Čas analýzy	10 minút
Dávkovaný objem	1 µl
DAD detektor	229 nm
FLD detektor	excitačná vlnová dĺžka: $\lambda_{exc} = 270$ nm emisná vlnová dĺžka: $\lambda_{em} = 340$ nm
Stacionárna fáza	kolóna Kinetex 150 mm x 4,6 µm s veľkosťou častíc 2,6 µm a predkolóna zložená zo sorbentu C18 s etánovými mostíkmi SecurityGuard™ guard Cartridge Kit

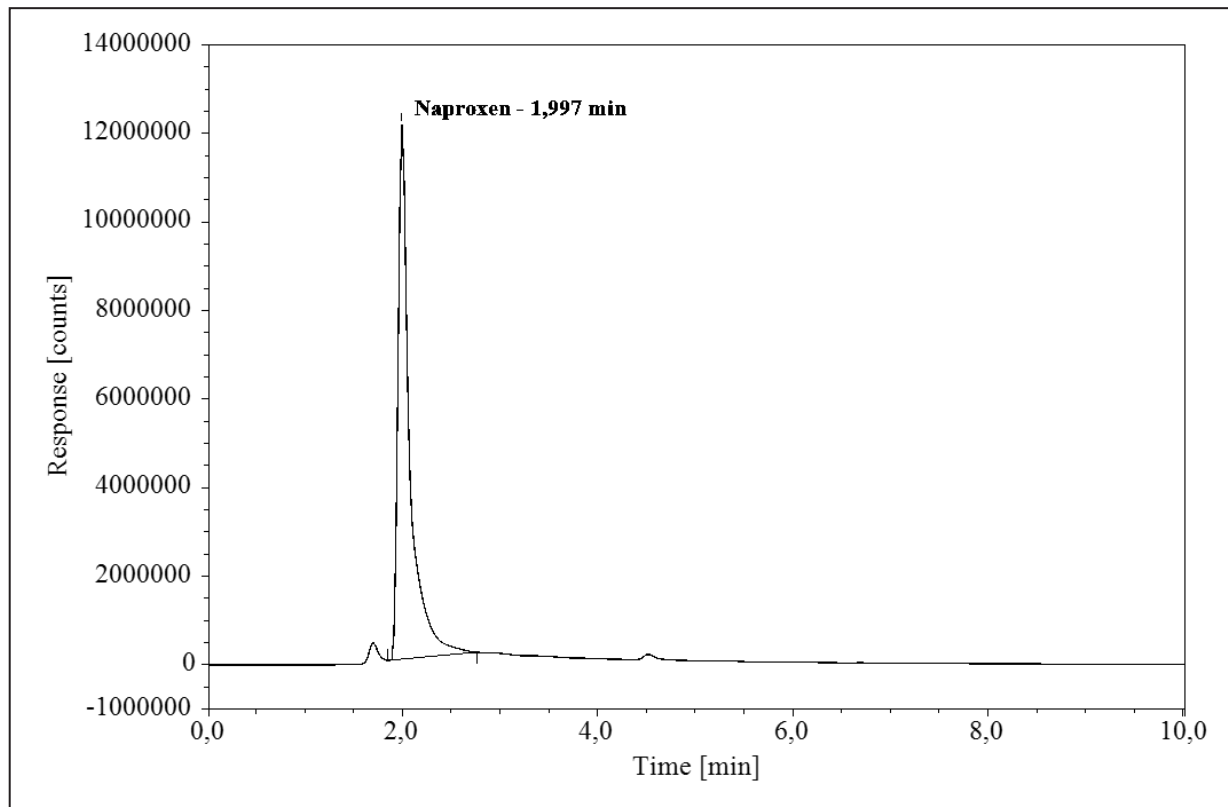
Obr. 8: Chromatogram štandardu naproxénu 50 ug.ml⁻¹ pri optimálnych podmienkach UHPLC-FLD



Obr. 9: UHPLC-DAD chromatogram vzorky krvného séra pri optimálnych podmienkach



Obr. 10: UHPLC-FLD chromatogram vzorky séra pri optimálnych podmienkach



pík naproxénu dostatočne separovaný až na základnú líniu. Štandard liečiva eluoval pri retenčnom čase *cca* 1,9 min.

Stanovenie liečiva naproxénu v krvnom sére UH-PLC metódou s DAD a FLD detektorom

Optimálne podmienky HPLC analýzy boli získané pri izokraticej elúcii so zložkami mobilnej fázy acetonitrilu a fosfátového tlmivého roztoku (pH = 3) v pomere 70 : 30 (v/v) s prietokom $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ pri teplote kolóny 25°C a nástrek na kolónu bol $1 \mu\text{l}$. Stacionárnou fázou bola kolóna Kinetex 150 x 4,6 mm s veľkosťou častíc $2,6 \mu\text{m}$ chránená predkolónkou zloženou zo sorbentu C18. Podmienky HPLC analýzy uvádzame v tab. 4.

Na obr. 9 a 10 sú ilustrované UHPLC-DAD a UHPLC-FLD chromatografické záznamy reálnej vzorky, kde analyt naproxénu eluoval pri retenčnom čase

1,917 min, resp. 1,997 min. Separácia naproxénu prebiehala pri spektrofotometrickej a fluorescenčnej detekcii. DAD detektor bol nastavený po premeraní absorpčných spektier na vlnovú dĺžku 229 nm a FLD detektor bol nastavený na vlnové dĺžky pre excitáciu $\lambda_{\text{exc}} = 270 \text{ nm}$ a pre emisiu $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$. V priebehu HPLC analýzy bol tlak 152 barrov. Po porovnaní UH-PLC-DAD a UHPLC-FLD chromatogramov vzorky krvného séra pri optimálnych podmienkach sme zhodnotili, že lepšia separácia analytu prebehla pri fluorescenčnej detekcii, kde eluovaný pík bol lepšie separovaný až na základnú líniu a menej chvostoval. Pri využití spektrofotometrickej detekcie pík pomerne viac chvostoval, ale aj tento výsledok je celkom vyhovujúci, preto bola kvantitatívna analýza usku-točnená za použitia aj spektrofotometrickej aj fluo-rescenčnej detekcie.

Kvantifikáciu naproxénu sme realizovali metódou

Tab. 5: HPLC analýza reálnej vzorky

Vzorka	t_R [min]	Plocha píku [mAU.min]	Koncentrácia naproxénu [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]
1.	1,917	3,7299	30,35
2.	1,917	3,7794	30,75
3.	1,917	3,7753	30,72
4.	1,917	3,7839	30,79
5.	1,917	3,7787	30,75
Aritmetický priemer	1,917	3,7694	30,67

Tab. 6: Základné údaje o zvierati

Hmotnosť potkana [g]	450
Podaná dávka naproxénu [mg.kg^{-1}]	10
Hmotnosť nosiča s naproxénom	11,25
Typ nosiča	otvorené póry
Výsledná koncentrácia [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	30,67

kalibračnej čiary, ktorú sme získali na základe údajov odčítaných z chromatografických záznamov roztokov štandardov s koncentraciami v rozmedzí od 1 až 100 $\mu\text{g.cm}^{-3}$, pričom každý jeden bod kalibračnej priamky sme premerali dvakrát. Pri najvhodnejších podmienkach chromatografickej analýzy sme uskutočnili analýzu reálnej vzorky naproxénu, ktorú sme premerali päťkrát. Retenčné časy, plochy píku a koncentrácie pre vzorku sme uviedli v tab. 5. Na základe získaných plôch píkov sme vypočítali koncentráciu naproxénu vo vzorke krvného séra a následne priemernú koncentráciu naproxénu v krvnom sére, ktorej hodnota bola 30,67 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

V rámci prvej časti experimentu, ktorý prebiehal na UPJŠ, nám boli poskytnuté základné údaje o zvierati, ktoré sme uviedli do tab. 6.

ZÁVER

SPE extrakcia bola uskutočnená pomocou SPE ma-

nifoldu CHROMABOND® od firmy MACHEREY-NAGEL za použitia SPE kolóniek Strata C18 – E (55 μm , 40A); 500 mg/6 ml, čo nám na základe malej spotreby rozpúšťadiel zaručilo dôkladné prečistenie a zakoncetrovanie vzorky ešte pred samotnou chromatografickou analýzou. Po nájdení optimálnych podmienok HPLC analýzy sme došli k záveru, že najvhodnejšia HPLC separácia prebiehala pri izokratickej elúcii za použitia acetonitrilu a fosfátového tlmivého roztoku ako mobilnej fázy s pH = 3 v pomere 70 : 30 (v/v) pri prietoku 1 ml.min^{-1} . Teplota kolóny bola 25 °C, injektovaný objem na kolónu bol 1 μl a celkový čas analýzy predstavoval 10 minút. Pri týchto podmienkach sa nám podarilo získať Gaussovský pík prislúchajúci liečivu naproxén. V našom prípade separácia prebiehala za použitia kolóny Kinetex 150 mm x 4,6 μm ; s veľkosťou častíc 2,6 μm a s predkolónou SecurixGuard™ guard Cartridge Kit. DAD detektor bol po premeraní absorpčných spektier nastavený na vlnovú dĺžku 229 nm a FLD detektor

bol nastavený na vlnové dĺžky pre excitáciu $\lambda_{\text{exc}} = 270 \text{ nm}$ a pre emisiu $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$. Tlak bol 152 barr a po porovnaní chromatogramov sme zhodnotili, že lepšia separácia analytu prebehla pri fluorescenčnej detekcii, kde eluovaný pík bol separovaný až na základnú líniu. Na kvantitatívne zhodnotenie stanovenia naproxénu v krvnom sére sme si pripravili sadu kalibračných roztokov v koncentračnom rozmedzí od 1 až 100 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Rovnica lineárnej regresie má tvar $y = 0,1229x$ s hodnotou korelačného koeficientu 0,99999; ktorého hodnota blízka jednotke napovedá, že priamka je lineárna v danom koncentračnom rozsahu. Po premeraní reálnej vzorky, ktorú sme premerali päťkrát, sme po odčítaní plôch pík vypočítali koncentrácie a následne priemernú koncentráciu, ktorej hodnota bola 30,67 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

ZOZNAM LITERATÚRY

Çelebier, M., Nenni, M., Altinöz, S.: Ultrafiltration-based extraction and HPLC analysis of naproxen sodium in human plasma samples: an innovative approach to pharmaceutical analysis. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2016, 50 (4), 275 – 279.

Dong, M. W.: *Modern HPLC for Practicing Scientists*. United States of America: John Wiley & Sons, 2006. 286 p.

Jardins, T. D.: *The Anatomy and Physiology of the Circulatory System*. https://media.lanecce.edu/users/driscolln/RT127/ppt_pdfDJ/DJChapter_05.pdf. Updated February 19, 2020. Accessed February 19, 2020.

Kazakevich, Y., Lobrutto, R.: *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. 3 – 6. Updated May 19, 2020. Accessed May 19, 2020.

Keçili, R a kol.: *Chapter 5 – The use of magnetic nanoparticles in sample preparation devices and tools*. <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/solid-phase-extraction>. Updated May 19, 2020. Accessed May 19, 2020.

Lindon, J. C. a kol.: *Chapter 10 – Biomedical applications of directly-coupled chromatography – nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS)*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567719203800116>. Updated May 19, 2020. Accessed May 19, 2020.

Magulová, L.: Terapeutické monitorovanie hladín liečiv [Therapeutic monitoring of drug levels]. *Metodický list racionálnej farmakoterapie č. 15 – 16*, 2001, 5 (1 – 2). <https://www.herba.sk/index.php/odborne-casopisy/metodicke-listy/8-metodicke-listy-racionalnej-farmakoterapie>. [cit. 2020-02-08].

Muneer, S., Muhammad, I. N., Abrar, M. A., Munir, I., Kaukab, I., Sagheer, A., Zafar, H., Sultana, K.: High performance liquid chromatographic determination of naproxen in prepared pharmaceutical dosage form and human plasma and its application to pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, 2017, 8 (3), 1 – 5. <https://www.longdom.org/open-access/high-performance-liquid-chromatographic-determination-of-naproxen-in-prepared-pharmaceutical-dosage-form-and-human-plasma-and-its-2157-7064-1000369.pdf>. Updated May 24, 2020. Accessed May 24, 2020.

Tashtoush, B. M., Al-Tanni, B. M.: HPLC determination of naproxen in plasma. *Pharmazie*, 2003, 58 (9), 614 – 615.

Verette, E.: *Chromatography*. France: Academic Press, 2000. 343 – 352. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/solid-phase-extraction/pdf>. Updated May 19, 2020. Accessed May 19, 2020.



OBSAH APIGENÍN-7-GLUKOZIDU V NADZEMNÝCH ČASTIACH *MATRICARIA RECUTITA* L.

CONTENT OF APIGENIN-7-GLUCOSIDE IN THE ABOVEGROUND PARTS OF *MATRICARIA RECUTITA* L.

Oravec, Martin; Eftimová, Jarmila

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

jamila.eftimova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Hlavným cieľom experimentálnej štúdie bolo stanoviť množstvo extrahovateľných látok, hlavne apigenín-7-glukozidu v sušine a v extrahovateľných látkach, ktoré pochádzali z nadzemných častí rastlín diploidnej (Bona) a tetraploidnej (Lutea) odrody rumančeka kamilkového (*Matricaria recutita* L.). Pri oboch odrodách sme z kvantitatívneho hľadiska hodnotili hmotnosť úrody. Stanovenie obsahu extrahovateľných látok do 60 % etanolu sme realizovali v dvoch opakovaníach. Pri prepočte množstva extrahovateľných látok sme zaznamenali minimálne rozdiely od 0,54 % do 5,52 % podľa jednotlivých ukazovateľov. Obsah extrahovateľných látok vo vzorkách odrody Bona a Lutea bol najvyšší v bielych jazykovitých kvetočoch a najnižší v zelenožltých rúrkovitých kvetočoch. Pri

porovnávaní odrôd podľa obsahu apigenín-7-glukozidu v extrahovateľných látkach refluxnou metódou a HPLC metódou vo vzorkách (vňat' s kvetmi, kvetné úbory, zelenožlté rúrkovité kvety, biele jazykovité kvety) sme nezistili významné rozdiely medzi opakovaniami (od 1,19 % do 4,58 %). Retenčný čas analyzovaných vzoriek v porovnaní so štandardom (13,070 – 13,087) bol nameraný s relatívnou odchýlkou iba 0,26 %. Žlté rúrkovité kvety pri obidvoch odrodách neobsahovali takmer žiadne množstvo apigenín-7-glukozidu. Najvyššie hodnoty apigenín-7-glukozidu v extrahovateľných látkach 4,568 % boli získané z bielych jazykovitých kvetov odrody Lutea. Zistili sme, že obsah apigenin-7-glukozidu v bielych jazykovitých kvetočoch v sušine pri diploidnej odrode Bona bol 1,80 % a pri tetraploidnej odrode Lutea bol 2,10 %; čo znamená 7,2 a 8,4-krát vyšší podiel ako udáva

Európsky liekopis pri vysušenej droge (kvetnom úbore, minimálne množstvo 0,25 %). Reálne nameraný obsah apigenín-7-glukozidu prepočítaný na 100 % sušiny bol v kvetných úboroch pri diploidnej odrode Bona 0,27 %; čo je o 7,41 % vyššia hodnota ako udáva Ph. Eur. 10.3. Na základe týchto výsledkov odporúčame využívať biele jazykovité kvety ako zdroj apigenínu na výrobu rôznych nutraceutík.

Kľúčové slová: apigenín-7-glukozid; extrahovateľné látky; flavóny; *Matricaria recutita* L.

ABSTRACT

The main objective of the experimental study was to determine the amount of extractable substances, mainly apigenin-7-glucoside in dry matter and in extractable substances, which were derived from aerial parts of diploid (Bona) and tetraploid (Lutea) plants of camomile (*Matricaria recutita* L.) cultivar. We used samples of the varieties “Bona” (diploid type) and “Lutea” (tetraploid type) for chemical analysis from the locations of Plavnica (Agrokarpáty s. r. o.) and Východná (Bio Tatry H&B). We performed the determination of the content of extractable substances up to 60 % ethanol in two repeated sequences. When re-calculating the content of extractable substances, we noticed only minor differences according to individual indicators in repeated sequences from 0.54 % to 5.52 %. The content of extractable substances in samples of the Bona and Lutea varieties was highest in white lingual flowers and lowest in green-yellow tubular flowers. When comparing varieties by apigenin-7-glucoside content in extractables by reflux method and measurement by HPLC method with both repeated sequences in samples (flowers with flowers, flower capes, green-yellow tubular flowers, white lingual flowers), we did not find any significant differences (from 1.19 % to 4.58 %). The retention time of the analyzed samples compared to the standard (13.070 – 13.087) was meas-

ured with a relative deviation of only 0.26 %. The yellow tubular flowers in both varieties contained almost no amount of apigenin-7-glucoside. The highest values of apigenin-7-glucoside content in extractables of 4.568 % were obtained from white lingual flowers of the Lutea variety. We found out the content of apigenin-7-glucoside was 1.80 % in white lingual flowers in the dry matter in the diploid variety Bona and in the tetraploid variety Lutea it was 2.10 %, which means 7.2 and 8.4 times higher than stated by the European Pharmacopoeia in the dried drug (flower dress, minimum amount – 0.25 %). The real measured content of apigenin-7-glucoside, calculated on 100 % of dry matter, was 0.27 % in the floral dressings of the diploid variety Bona, which is 7.41 % higher than indicated by Ph. Eur. 10.3. Based on these results, we recommend the use of white tongue flowers as a source of apigenin for the production of various nutraceuticals.

Key words: apigenin-7-glucoside; extractable substances; flavones; *Matricaria recutita* L.

ÚVOD

Rumanček kamilkový (*Matricaria recutita* L.) je jednoročná, prípadne ozimná liečivá rastlina s výraznou aromatickou vôňou z čeľade *Asteraceae* (astrovité) (Srivastava a Gupta 2009; URL1, 2022). Najčastejšie sa pestuje na hlinito-piesočnatých, dostatočne vlhkých pôdach s neutrálnou až slabou zásaditou pôdnou reakciou, výnimočne pH 9 – 9,2 (Singh a kol., 2011; Eftimová a Habán, 2012). Rumanček kamilkový patrí medzi liečivé rastliny, ktoré sa dlhodobo využívajú v tradičnej medicíne pri gastrointestinálnych ochoreniach, liečbe infekcií, zápalových ochoreniach kože a dýchacích problémoch (Otto a kol., 2017). Má multiterapeutické, kozmetické a nutričné využitie, ktoré bolo overené rokmi tradičného používania ako aj vedeckého výskumu (Singh a kol., 2011).

V rumančeku kamilkovom bolo identifikovaných viac ako 120 chemických skupín sekundárnych meta-

bolitov, 28 terpenoidov, 36 flavonoidov a 52 ďalších zlúčenín s potenciálnou farmakologickou aktivitou (Miguel a kol., 2015; Gomes a kol., 2018).

Podľa Európskeho liekopisu (Ph. Eur. 10.3) by mali kvety rumančeka kamilkového (*Matricariae flos*) obsahovať minimálne množstvo modrej silice 4 ml.kg⁻¹ vysušenej drogy a obsah celkového apigenín-7-glukozidu (C₂₁H₂₀O₁₀; Mr : 432,4) by mal byť minimálne 0,25 %. V silici je prítomný do 2 % α-bisabolol (podiel do 50 %), chamazulén (podiel do 15 %), bisabololoxidy A až C, farnezen a cis a trans spiroétery. Obsah α-bisabololu a chamazulénu závisí od genetického potenciálu, klimatických, pôdnych, topografických a iných faktorov (Eftimová a Habán, 2012). Existujú dva typy silice: s vysokým obsahom bisabololoxidov 29 – 81 % a chamazulénu je ≥ 1 % alebo α-bisabololový typ (liekopisné limity v % pre typické zložky silice) je obsah α-bisabololu 10 – 65 % a chamazulénu je ≥ 1 % a všetky bisabololoxidy a α-bisabolol ≥ 20 % (Nagy, Mučaji, Grančai, 2015; Nagy, Mučaji, Grančai, 2017).

Obsahové látky *Matricariae flos* vykazujú antiflogistické, spazmolytické, antibakteriálne, karminatívne a imunostimulačné účinky (Nagy, Mučaji, Grančai, 2017). Chamazulén sa vyznačuje protizápalovým, antibakteriálnym a antioxidačným účinkom a α-bisabolol protizápalovým účinkom v oblasti tráviacej sústavy. Významný je protizápalový, analgetický, antineoplastický účinok apigenínu (Sarifi a kol., 2014).

Apigenín-7-O-glukozid je aktívna fenolová zlúčenina, ktorá sa nachádza v kvetoch čeľade *Asteraceae* (Wang a kol., 2018). Izolácia z prírodných zdrojov je však pre svoju nízku koncentráciu a zlú biologickú dostupnosť veľmi ťažká (Cvetanović a kol., 2017). V prírodnej forme je prítomný väčšinou ako glukozidový konjugát. Konjugovaná forma môže byť dôležitým determinantom pre jej biologickú dostupnosť a absorpciu. Čistá forma apigenínu je nestabilná, ale v prírodnej forme je prítomná väčšinou ako glukozidový konjugát, ktorý sa nazýva apigetrín (Hadrich a Sayadi, 2018).

Hlavným cieľom experimentálnej štúdie bolo stanoviť množstvo extrahovateľných látok, hlavne api-

genín-7-glukozidu v sušine rumančeka kamilkového a v extrahovateľných látkach, pochádzajúcich z nadzemných častí rastlín diploidnej a tetraploidnej odrody.

MATERIÁL A METÓDY

Biologický materiál

Na chemickú analýzu sme použili vzorky rumančeka kamilkového (*Matricaria recutita* L.) odrody „Bona“ (diploidná bisabololová odroda) a odrody „Lutea“ (tetraploidná bisabololová odroda). Odrody boli pestované v biorežime, v klimatických a pôdnych podmienkach lokality Plavnica (Agrokarpáty s. r. o.) a lokality Východná (BioTatry H&B). Základom biopestovania v ekologicky nezaťaženom prostredí Pienin a Vysokých Tatier je šetrné hospodárenie s pôdou, udržiavanie trvalej pôdnej úrodnosti a rovnováha celého ekosystému. Botanické rozdiely medzi týmito odrodami sú uvedené vo všetkých číselných znakoch Medzinárodnej únie pre ochranu nových odrôd rastlín. Najväčšie rozdiely medzi odrodami sú v stupni polyploidizácie, vo veľkosti kvetov a v čase začiatku kvitnutia a plnom kvitnutí.

Zber vzoriek sme vykonávali ručne. Vzorky tvorili vegetatívne nadzemné časti (vňat') desiatich rastlín (s odnožami) z diploidnej odrody „Bona“ a tetraploidnej odrody „Lutea“. Z odrôd Bona a Lutea sme zbierali kvetné úbory, samostatné kvetné úbory, ktoré sme separovali na zelenožlté rúrkovité kvety a biele jazykovité kvety (100 kusov). Vzorky tvorili základ pre ďalšie chemické analýzy, ktoré sa vykonávali v certifikovanom laboratóriu firmy Calendula a. s., Nová Lubovňa.

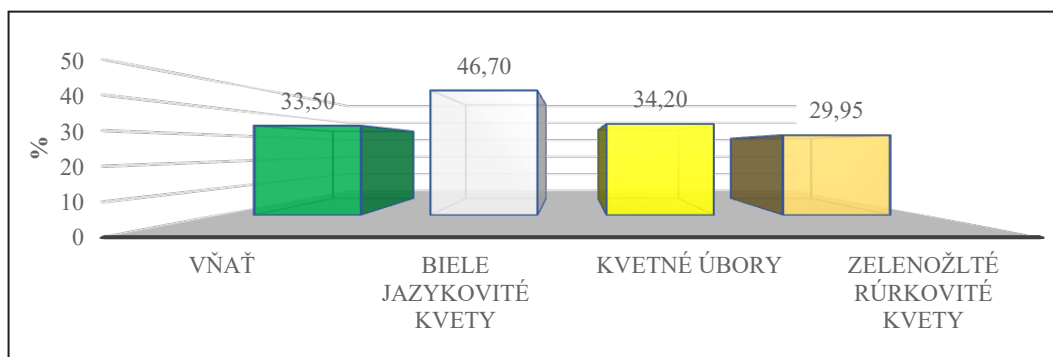
Váženie a príprava surovej vzorky na sušenie

Čerstvo nazbierané vzorky sme osobitne zvážili na analytických váhach. Odvážené vzorky sa sušili prirodzeným spôsobom pri teplote 25 – 30 °C a následne sme stanovili úbytok hmotnosti vzorky. Po ručnom zbere a vysušení sme odobrali vzorky o hmotnosti 2 g a pripravili na analýzy.

Tab. 1: Kvantitatívne meranie úrody rumančeka kamilkového v gramoch

Vzorky	Hmotnosť v g Bona	Hmotnosť v g Lutea
Vňať (čerstvá)	133,15	166,65
Vňať (vysušená)	27,42	32,19
Kvetné úbory (čerstvé)	16,93	23,54
Kvetné úbory (vysušené)	3,29	3,99
Zelenožlté rúrkovité kvety (čerstvé)	14,54	23,00
Zelenožlté rúrkovité kvety (vysušené)	2,18	2,59
Biele jazykovité kvety (čerstvé)	2,67	3,74
Biele jazykovité kvety (vysušené)	0,50	0,76

Obr. 1: Obsah extrahovateľných látok v 50 ml 60 %-ného etanolu v odrode Bona



Postup pri stanovení percentuálneho obsahu extrahovateľných látok

Pri stanovení extrahovateľných látok v sušine sme si navážili 2 g danej nadzemnej časti drogy, vložili do 250 ml varnej banky a pridali 50 ml 60 %-ného etanolu. Extrahovali sme pomocou refluxnej extrakcie po dobu 25 – 30 minút. Po uplynutí tejto doby sme nechali produkt vychladnúť a doextrahovať približne 30 minút. Následne prebiehala filtrácia extraktu cez

filtračný papier. Približne 10 ml prefiltrovaného extraktu sme odliali a zvyšný podiel sa použil na stanovenie sušiny a analýzy vykonané pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC). Pri každej vzorke sme vykonávali 2 opakovania. HPLC pracuje pri vysokých tlakoch na rozdiel od kvapalinovej chromatografie a používa náplň s nízkou zrnitosťou a pórovitosťou, čo prispieva k zvýšeniu účinnosti separácie (Nováková a Douša, 2013; Klimeš, 2015).

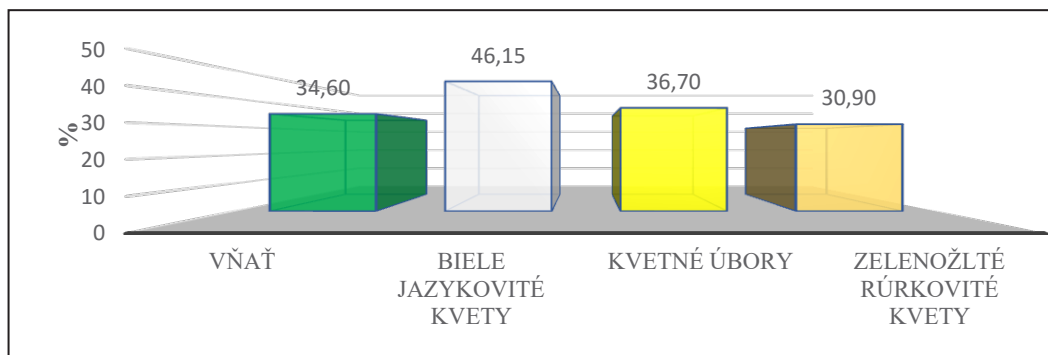
Výpočet obsahu extrahovateľných látok do 60 % etanolu:

$$x = \frac{\text{objem extrahovadla} \cdot \text{hustota extrahovadla} \cdot \text{hmotnostný zlomok sušiny extraktu}}{\text{navážka drogy} \cdot \text{hmotnostný zlomok sušiny drogy}} \cdot 100$$

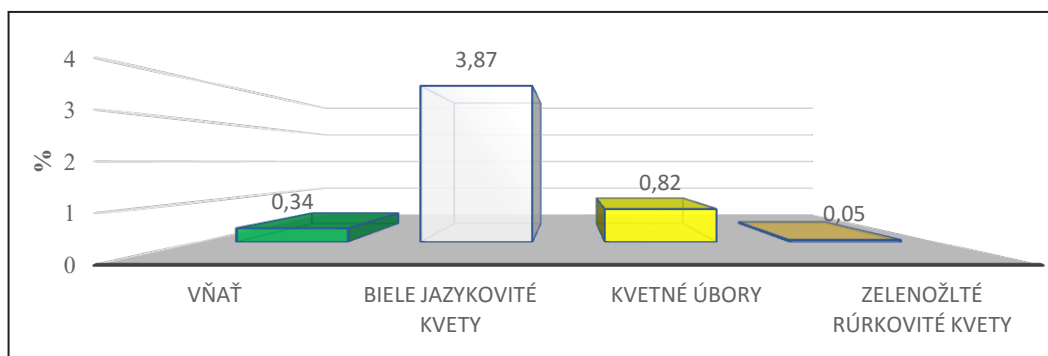
Výpočet obsahu apigenín-7-glukozidu v extrahovateľnej látke:

$$x = \frac{\text{plocha} - \text{vzorka} \left(\frac{\text{mAU} \cdot \text{min}}{\text{mg}} \right)}{\text{plocha} - \text{štandard} \left(\frac{\text{mAU} \cdot \text{min}}{\text{mg}} \right)} \cdot \frac{\text{koncentrácia} - \text{štandard} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}{\text{sušina extraktu} - \text{vzorka} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)} \cdot 10 \text{ (riedenie)} \cdot 100 \text{ (\%)}$$

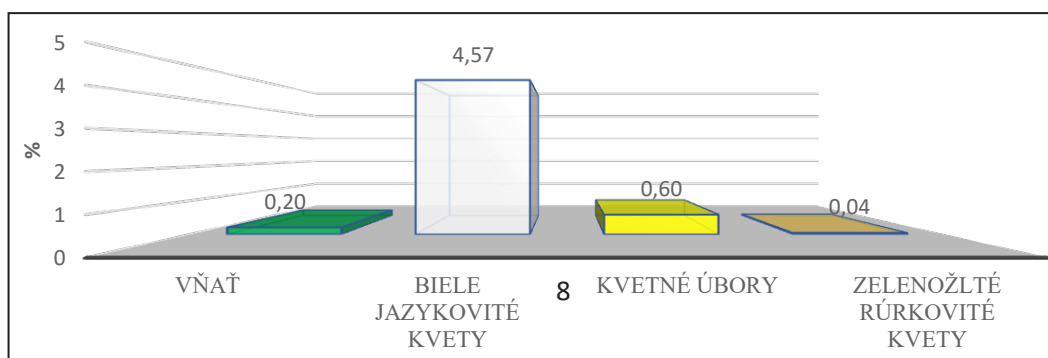
Obr. 2: Obsah extrahovateľných látok v 50 ml 60 %-ného etanolu v odrode Lutea



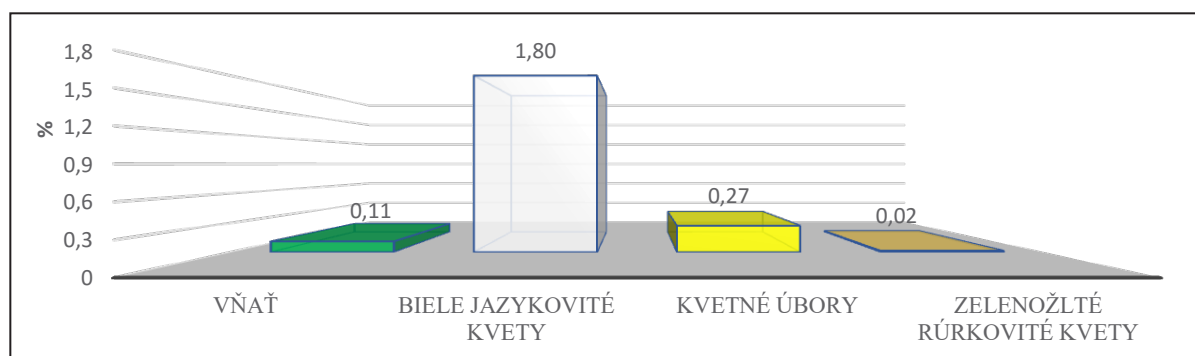
Obr. 3: Obsah apigenín-7-glukozidu v extrahovateľných látkach odrody Bona



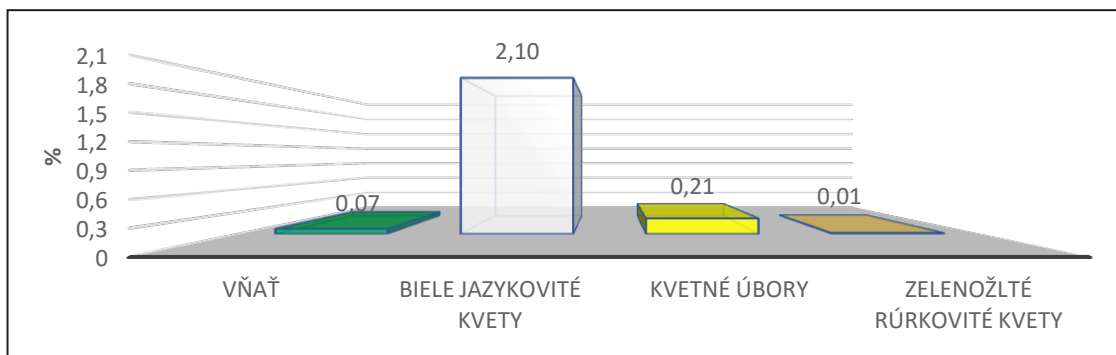
Obr. 4: Obsah apigenín-7-glukozidu v extrahovateľných látkach odrody Lutea



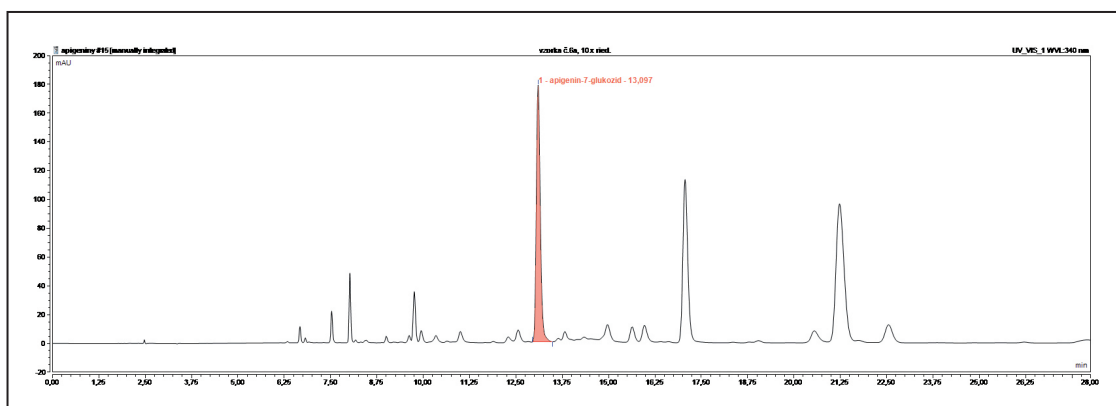
Obr. 5: Obsah apigenín-7-glukozidu v rastline prepočítanej na 100 % sušiny odrody Bona



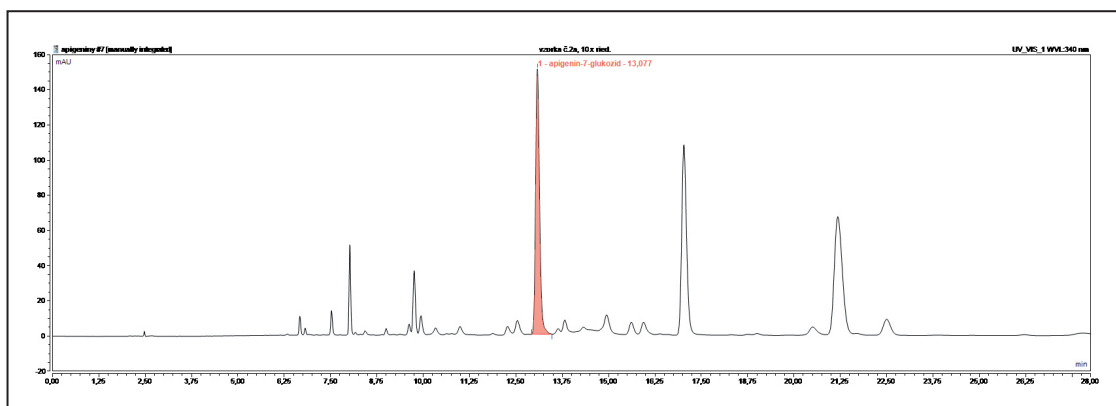
Obr. 6: Obsah apigenín-7-glukozidu v rastline prepočítanej na 100 % sušiny odrody Lutea



Obr. 7: Chromatogram odrody Lutea (biele jazykovité kvety) – apigenín-7-glukozid, 1. opakovanie



Obr. 8: Chromatogram odrody Bona (biele jazykovité kvety) – apigenín-7-glukozid, 1. opakovanie



Pri vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii boli použité extrahované látky získané pri refluxnej extrakcii, ktoré sa riedili 10-krát mobilnou fázou.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Nadzemné časti (10 ks), kvetné úbory (100 ks) *Matricaria recutita* L. odrody Bona a Lutea sme zva-

žili v čerstvom a vysušenom stave. Výsledky váženia sme zaznamenali do tabuľky (viď tab. 1).

Z tabuľky 1 vyplýva, že najväčší pomer zosušenia sme zaznamenali pri hodnotení zelenožltých kvetov pri oboch odrodách (Bona 6,66 : 1) a (Lutea 8,88 : 1). Zároveň sme zistili, že medzi odrodami Bona a Lutea sú značné morfológické rozdiely. Z kvetného úboru odrody Lutea tvorilo vyššie hmotnostné percento lôž-

ko so zelenožltými rúrkovitými kvetmi v porovnaní s bielymi jazykovitými kvetmi na rozdiel od diploidnej odrody Bona. Hmotnosť zelenožltých rúrkovitých kvetov odrody Lutea v čerstvom stave bola o 8,46 g vyššia ako pri odrode Bona.

Obsah extrahovateľných látok vo vzorkách odrody Bona bol najvyšší v bielych jazykovitých kvetoch (46,70 %) a najnižší v zelenožltých rúrkovitých kvetoch (29,95 %); rozdiel hodnôt bol 16,75 (viď obr. 1).

Obsah extrahovateľných látok vo vzorkách odrody Lutea bol najvyšší v bielych jazykovitých kvetoch (46,15 %) a najnižší v zelenožltých rúrkovitých kvetoch (30,90 %); rozdiel hodnôt medzi odrodami bol 15,25 (viď obr. 2).

Obsah apigenín-7-glukozidu v extrahovateľných látkach vo vzorkách odrody Bona bol najvyšší v bielych jazykovitých kvetoch (3,87 %) a najnižší v zelenožltých rúrkovitých kvetoch (0,05 %); čo je 73-krát viac ako v rúrkovitých kvetoch (viď obr. 3).

Obsah apigenín-7-glukozidu v extrahovateľných látkach vo vzorkách odrody Lutea bol najvyšší v bielych jazykovitých kvetoch (4,57 %) a najnižší v zelenožltých rúrkovitých kvetoch (0,04 %); čo je 102-krát viac ako v rúrkovitých kvetoch (viď obr. 4).

Obsah apigenín-7-glukozidu v rastline prepočítanej na 100 % sušiny vo vzorkách odrody Bona bol najvyšší v bielych jazykovitých kvetoch (1,80 %) a najnižší v zelenožltých rúrkovitých kvetoch (0,02 %); čo je 112-krát viac ako v rúrkovitých kvetoch (viď obr. 5).

Obsah apigenín-7-glukozidu v rastline prepočítanej na 100 % sušiny vo vzorkách odrody Lutea bol najvyšší v bielych jazykovitých kvetoch (2,10 %) a najnižší v zelenožltých rúrkovitých kvetoch (0,014 %); čo je 150-krát viac ako v rúrkovitých kvetoch (viď obr. 6).

Apigenín-7-glukozid v bielych jazykovitých kvetoch odrôd Lutea a Bona udávajú chromatogramy (viď obr. 7 a 8).

Matricaria chamomilla L. je známa liečivá rastlina, ktorá je rozšírená po celom svete. V tradičnej medicíne sa veľmi často využíva na liečbu rôznych druhov infekcií, neuropsychiatrických, respiračných, gas-

trointestinálnych a pečňových porúch, taktiež ako sedatívum, spazmolytikum, antiseptikum a antiemetikum. Najpoužívanším rastlinným orgánom rastliny sú kvety. V rumančeku kamilkovom a extraktoch z neho boli stanovené terpenoidy, fenolové zlúčeniny, flavonoidy a kumaríny (Mihyaou a kol., 2022).

Z výsledkov našej štúdie sme zistili, že namerané hodnoty obsahových látok vo vňati s kvetmi, kvetných úboroch, zelenožltých rúrkovitých kvetoch a bielych jazykovitých kvetoch v extrahovateľných látkach do objemu 60 %-ného etanolu boli pri obidvoch odrodách vyrovnané v štandardných hodnotách. Prepočtom množstva extrahovateľných látok podľa jednotlivých ukazovateľov boli zaznamenané minimálne rozdiely pomerov (medzi dvoma opakovaniami rovnakého ukazovateľa tej istej odrody) od 0,54 % do 5,52 %.

Švehlíková a Repčák (2008) uvádzajú, že celkový apigenín sa nachádza v celom úbore diploidného alebo tetraploidného jedinca *Matricaria recutita* L. Autori stanovili vyššie percento apigenínu v jazykovitých kvetoch diploidnej odrody. Autori zistili výrazne vyšší obsah apigenínu v úbore tetraploidných jedincov.

HPLC analýzou sme v nadzemných častiach (vňati s kvetmi, kvetných úboroch, zelenožltých kvetoch a bielych jazykovitých kvetoch) diploidnej odrody Bona a tetraploidnej odrody Lutea zistili rozdiely pri apigenín-7-glukozide v extrahovateľných látkach rovnakého ukazovateľa tej istej odrody od 1,19 % do 4,58 %; to znamená s presnosťou porovnateľné.

Namerané hodnoty obsahových látok vo vňati s kvetmi, kvetných úboroch a bielych jazykovitých kvetoch apigenín-7-glukozidu v percentuálnej hmotnosti v extrahovateľných látkach boli v štandardných alebo mnohonásobne vyšších hodnotách ako udáva Európsky liekopis (Ph. Eur. 10.3). Avšak zelenožlté rúrkovité kvety u obidvoch odrôd nedosahovali požadovanú hodnotu.

Miguel a kol. (2015) podrobili počas 4 hodín Soxhletovej extrakcii 1,50 g sušených kvetných úborov *Matricaria recutita* v 100 ml 70 % etanolu. Hodnota získaného apigenín-7-glukozidu bola v rozpätí hod-

nôť od 6,66 do 7,01 mg.g⁻¹. Podobne McKay a Blumberg (2006) stanovili v kvetoch rumančeka od 4,72 do 7,85 mg.g⁻¹ apigenín-7-glukozidu.

Naopak Guzelmeric, Vovk, Yesilada (2015) stanovili v kvetoch *Matricaria recutita* (Istanbul – Turecko) iba 1,90 ± 0,16 mg.g⁻¹ apigenín-7-glukozidu.

Najväčšie rozdiely v apigenín-7-glukozide sme zaznamenali v extrahovateľných látkach tetraploidnej odrody Lutea v bielych jazykovitých kvetoch (4,66 %) a odrody Lutea v zelenožltých rúrkovitých kvetoch (0,04 %) (viď obr. 4).

Reálne nameraný obsah apigenín-7-glukozidu v rastline prepočítanej na 100 % sušiny bol v kvetných úboroch u diploidnej odrody Bona 0,27 %; to znamená o 7,41 % vyšší ako udáva Európsky liekopis. Pri tetraploidnej odrode Lutea bol nameraný obsah 0,21 %. Pravdepodobným dôsledkom nižších stanovených hodnôt apigenín-7-glukozidu bol termín vykonaného zberu v plnom kvitnutí, čo potvrdzujú aj Švehlíková a Repčák (2006). Autori uvádzajú, že najvyššie hodnoty celkového obsahu apigenínu zaznamenali v suchom kvetnom úbore na začiatku a v priebehu kvitnutia, avšak v neskorších fázach plného kvetu sa znižuje.

Retenčný čas analyzovaných vzoriek v porovnaní so štandardom (13,070 – 13,087) bol nameraný s relatívnou odchýlkou iba o 0,26 %; to znamená takmer totožný.

Pereira a kol. (2018) sledovali vplyv teploty extrakcie, pomeru množstva rastliny a rozpúšťadla, koncentrácie etanolu na obsahové látky v extrakte.

Zistili, že všetky tieto faktory mali najväčší vplyv na extrakt. Pri použití optimálnych podmienok autori zistili, že extrakt bol bohatý na flavonoidy, apigenín a apigenín-7-glykozid a mal vysokú antioxidačnú aktivitu.

Z výsledkov našich analýz vyplynulo, že najvyššie stanovené množstvo apigenín-7-glukozidu obsahujú biele jazykovité kvety tetraploidnej odrody Lutea – 2,10 %, čo je o 8,4-krát vyššia hodnota ako udáva Európsky liekopis (Ph. Eur. 10.3). Tieto výsledky sú povzbudivé pre pestovateľov rumančeka kamilkového, pretože separením rastliny môžu doceliť jej lepšie

ekonomické zhodnotenie. Taktiež pre farmaceutický priemysel, ktorý môže využívať biele jazykovité kvety ako zdroj apigenínu na výrobu rôznych nutraceutík.

ZÁVER

Cieľom experimentálnej štúdie bolo stanoviť množstvo extrahovateľných látok, apigenín-7-glukozid v sušine rumančeka kamilkového a v extrahovateľných látkach z nadzemných častí rastlín diploidnej a tetraploidnej odrody. Najvyššie hodnoty apigenín-7-glukozidu v extrahovateľných látkach (4,57 %) boli stanovené v bielych jazykovitých kvetoch odrody Lutea. Zistili sme, že obsah apigenín-7-glukozidu v bielych jazykovitých kvetoch v sušine pri diploidnej odrode Bona bol 1,80 % a pri tetraploidnej odrode Lutea bol 2,10 %; čo znamená 7,2 a 8,4-krát vyšší podiel ako udáva Európsky liekopis (Ph. Eur. 10.3) pri vysušenej droge (kvetnom úbore, minimálne množstvo 0,25 %). Reálne nameraný obsah apigenín-7-glukozidu prepočítaný na 100 % sušiny bol v kvetných úboroch pri diploidnej odrode Bona 0,27 %; čo je o 7,41 % vyššia hodnota ako udáva Ph. Eur. 10.3. Preto odporúčame využívať biele jazykovité kvety ako zdroj apigenínu na výrobu rôznych nutraceutík.

ZOZNAM LITERATÚRY

Eftimová, J. a Habán, M.: *Produkcia liečivých rastlín* [Production of Medicinal Plants]. 1. vyd. Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, 2012, 90 s.

El-Shammari, T., Šalamon, I., Eliašová, A., Bujňáková, P.: The large-scale cultivation of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) with accet to essential oil content and its composition. *Sborník XVI. Odborného semináře s mezinárodní účastí – Aktuální otázky pěstování, zpracování a využití léčivých, aromatických a kořeninových rostlin*. Praha: Czech University of Life Sciences, Katedra rostlinné výroby, November 25 – 26, 2010, 170 – 177.

European Pharmacopoeia 10.3.: Published in accordance with the Convention on the elaboration of a European Pharmacopoeia. Strasbourg: European Directorate for Quality of Medicines & Healthcare. *Council of Europe*, 2020.

Gomes, V. T. S, Gomes, R. N. S, Gomes, M. S, Joaquim, W. M., Lago, E. C., Niculau, R. A.: Effects of *Matricaria recutita* (L.) in the treatment of oral mucositis. *The Scientific World Journal*, 2018, 8. DOI: 10.1155/2018/4392184.

Guzelmeric, E., Vovk, I., Yesilada, E.: Development and validation of an HPTLC method for apigenin 7-O-glucoside in chamomile flowers and its application for fingerprint discrimination of chamomile-like materials. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2015, 107, 108 – 118. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.12.021.

Cvetanović, A., Svarc-Gajić, J., Gasijić, U., Tešić, Z., Zengin, G., Zekovic, Z., Đurovicet, S.: Isolation of apigenin from subcritical water extracts: Optimization of the process. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2017, 120 (1), 32 – 42. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.10.012>. Accessed May 5, 2020.

Hadrich, F., Sayadi, S.: Apigenin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells by downregulating PPAR γ and CEBP- α . *Lipids in health and disease*, 2018, 17 (1), 95. <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-018-0738-0>. Accessed May 5, 2020.

Klimeš, J.: *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami* [Control-analytical assessment of drugs by pharmaceutical methods]. Univerzita Karlova v Praze: Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2015, 265 s.

McKay, D., Blumberg, J. F.: A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy research: PTR*, 2006, 20, 519 – 530. DOI: 10.1002/ptr.1900.

Miguel, F. G., Cavalheiro, A. H., Spinola, N. F., Ribeiro, D. L., Barcelos, G. R. M., Antunes, L. M. G, Hori, J. I., Marquele-Oliveira, F., Rocha, B. A, Berretta, A. A.: Validation of a RP-HPLC-DAD method for Chamomile (*Matricaria recutita*) preparations

and assessment of the marker, apigenin-7-glucoside, safety and anti-inflammatory effect. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2015, 9. <https://doi.org/10.1155/2015/828437>. Accessed July 5, 2022.

Munir, N., Iqbal, A. S., Altaf, I., Bashir, R., Sharif, N., Saleem, F., Naz, S.: Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of two endangered plant species *Atropa belladonna* and *Matricaria chamomilla*. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, 2014, 11, 111 – 117.

Nagy, M., Mučaji, P., Grančai, D.: *Farmakognózia: Biologicky aktívne rastlinné metabolity a ich zdroje* [Pharmacognosy: Biologically active plant metabolites and their sources]. Bratislava: Herba, 2017, 399 s.

Nováková, L., Douša, M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I* [Modern HPLC separation in theory and practice]. Praha: Lucie Nováková, 2013, 300 s.

Pereira, S. V., Reis, R. A. S. P., Garbuio, D. C., De Freitas, L. A. P.: Dynamic maceration of *Matricaria chamomilla* inflorescences: Optimal conditions for flavonoids and antioxidant activity. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 2018, 28, 111 – 117.

Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., Srivastava, M. K.: Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacogn Rev.*, 2011, 5 (9), 82 – 95. DOI: 10.4103/0973-7847.79103.

Sharifi, F., Simbar, M., Mojab, F., Majd, H. A.: Comparison of the effects of *Matricaria chamomila* (Chamomile) extract and mefenamic acid on the intensity of premenstrual syndrome. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 2014, 20 (1), 81 – 88. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2013.09.002>. Accessed May 15, 2020.

Srivastava, J. K., Gupta, S.: Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2007, 55, 9470 – 9478. DOI: 10.1021/jf071953k.

Švehlíková, V., Repčák, M.: Apigenin chemotypes of *Matricaria chamomilla* L. *Biochemical*

Systematics and Ecology, 2006, 34, 654 – 657.

Švehlíková, V., Repčák, M.: Variation of Apigenin quantity in diploid and tetraploid *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. *Plant Biology*, 2008, 2, 403 – 407.

Wang, Y., Xu, Z., Huang, Y., Wen, X., Wu, Y., Zhao, Y., Ni, Y.: Extraction, purification, and hydrolysis behavior of apigenin-7-O-glucoside from *Chrysanthemum Morifolium* tea. *Molecules*, 2018, 23 (11), 2933. DOI: 10.3390/molecules23112933.

URL 1. WFO, 2022. <http://www.worldflora-online.org/taxon/wfo-0000106468>. Accessed August 14, 2020.



FORMULATION OF TRANSDERMAL SYSTEM WITH NON-SELECTIVE BETA-BLOCKER PROPRANOLOL

**Wolaschka, Tomáš; Rohaľová, Simona; Kľoc, Dominik; Fečkaninová, Adriána;
Guman, Matúš**

Department of Pharmaceutical Technology, Pharmacognosy and Botany
University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice
The Slovak republic

tomas.wolaschka@uvlf.sk

ABSTRACT

Cardiovascular diseases have become a major cause of death, morbidity, and hospitalization over the last decades. These diseases require long-term treatment and excessive costs associated with hospitalization. Due to their physico-chemical properties, beta-blockers have become the subject of interest in the possibility of applying them as transdermal patches. Transdermal drug delivery is considered to be the ideal therapeutic approach, involving a simple and non-invasive painless drug delivery system and providing long-term therapeutic drug levels. We focused on the preparation of transdermal patches containing the active pharmaceutical ingredient (API) propranolol as a representative of beta-blockers. The aim of the study was to prepare and evaluate a suitable composition and ratio of excipients that meet the requirements for the preparation of transdermal patches such as stability, flatness, moisture con-

tent and absorption, as well as the effect of excipients on the drug and interactions. Propranolol was added to two types of patches, containing hydroxypropyl-methylcellulose (HPMC) as a hydrophilic polymer and a natural halloysite (Ha) material, which controlled the release process by their specific structure. The best folding force (400 number of folds) showed patch with composition of 0.36 g ethyl-cellulose and 0.162 g castor oil, which was used as a basic composition. Addition of Ha decreased the rate of propranolol, whereas the addition of HPMC increased the rate of propranolol. The calculated Higuchi release constant for the formulations HPMC45, HPMC22.5, E, Ha45, Ha22.5 were 0.964 ± 0.195 , 0.958 ± 0.174 , 0.741 ± 0.051 , 0.523 ± 0.086 , 0.744 ± 0.115 sorted from fastest release to slowest. The lower amount of Ha in the composition led to slower propranolol release, therefore for a detail knowledge of the relation between patch composition and release rate, more samples with different concentration of Ha would be needed.

Key words: β -blockers; halloysite; hydroxypropyl-methylcellulose; propranolol; transdermal system

INTRODUCTION

The most common cardiovascular diseases in the world include hypertension, arrhythmias, ischemic heart disease, and stroke (Mezger et al., 2019). Today, around 4.1 million people in Europe die each year from cardiovascular disease. Cardiovascular diseases cause a higher proportion of deaths in women (51 %) than in men (42 %) (Singh et al., 2014). In 2016, 119.4 per 100,000 people died of coronary heart disease in the EU. In 2017, the EU27 Member States with the highest standardized mortality rate for coronary heart disease were Lithuania, Hungary, Slovakia, and Latvia. Beta-blockers are among the most important basic drugs that are administered in diseases of the cardiovascular system. Since their discovery in 1960, they have become one of the pillars of cardiac pharmacotherapy (Janota, 2010). Due to their physico-chemical properties, they began to be tested in new application possibilities, such as in the form of transdermal patches. The transdermal system allows to prolong the therapeutic effect, improve bioavailability, reduce the number of side effects, and provide easy termination of therapy, which leads to better patient compliance. β -receptor blockers are among the drugs indicated as antihypertensives suitable for monotherapy of mild to moderate hypertension and at the same time for the combined treatment of severe hypertension. The world of healthcare is changing, and so is the population of cardiovascular diseases. With this, the possibility of innovative treatment and the discovery of new therapeutic possibilities of application for the treatment of these diseases increases (Mirrosay et al., 2009).

Propranolol (PRO) has been used as a model active substance from the beta-blocker group. PRO, as a non-selective hydrophobic beta-blocker without internal sympathomimetic activity, blocks the action of

catecholamines on both adrenergic receptors β_1 and β_2 (Jagdale et. al, 2009). In medicine, PRO has become an option for many doctors in the treatment of diseases such as hypertension, cardiac arrhythmias, myocardial infarction (MI), migraine, portal hypertension, anxiety conditions, hyperthyroidism and pheochromocytoma (Sklenář et al., 2012).

In this study, we wanted to point out the possible use of a beta-blocker in another dosage form, a transdermal patch. The aim of the study was to determine the appropriate composition, then to prepare and evaluate a patch containing the API propranolol and substances affecting the course of release.

MATERIALS AND METHODS

Materials

To prepare transdermal patches, we used the following materials:

Drug: propranolol (PRO), (Fagron, Czech republic)

Fillers: ethyl-cellulose (EC), (Acros Organics, United States); hydroxypropyl-methylcellulose (HPMC), (Dr. Kulich Pharma, Slovak republic); halloysite nano-clay (Ha), (Aldrich Chemistry, Germany)

Plasticizers: glycerol (GLY), (Centralchem, Slovak republic), castor oil (CaOil) (Dr. Kulich Pharma, Slovak republic), polyethylene glycol (PEG) (Lachema, Czech republic)

Solvents: ethanol p. a. 96.3 % (EOH), (Salvus, Slovak republic)

To prepare a dissolution media, we used the following materials:

acetic acid (Salvus, Slovak republic), sodium acetate (Salvus, Slovak republic), sodium chloride (Salvus, Slovak republic)

Spectrophotometric analysis of propranolol

Initially, we investigated the possible interference of substances in the absorbance of UV radiation. Absorption spectra were measured using a spectro-

Tab. 1: Composition of patches

Formulation	EC (g)	EOH (g)	castor oil (μl)
a₀	0.20	10	0
b₀	0.24	10	0
c₀	0.28	10	0
d₀	0.32	10	0
e₀	0.36	10	0
a_r	0.20	10	63
b_r	0.24	10	63
c_r	0.28	10	63
d_r	0.32	10	63
e_r[*]	0.36	10	63

* the best composition of the patch when drying with a funnel for 12 hours
a₀ – e₀ castor oil-free formulations, a_r – e_r castor oil formulations

Tab. 2: Composition of patches evaluated by flatness and folding force

Formulation	EC (g)	EOH (g)	GLY (μl)	PEG (μl)	CaOil (μl)
1g	0.2	10	43.2	0	0
2g	0.2	10	86.4	0	0
3g	0.2	10	129.6	0	0
1p	0.2	10	0	48.6	0
2p	0.2	10	0	95.4	0
3p	0.2	10	0	144	0
1r	0.2	10	0	0	31
2r	0.2	10	0	0	63
3r	0.2	10	0	0	94
1G	0.36	10	43.2	0	0
2G	0.36	10	86.4	0	0
3G	0.36	10	129.6	0	0
1P	0.36	10	0	48.6	0
2P	0.36	10	0	95.4	0
3P	0.36	10	0	144	0
1R	0.36	10	0	0	55.8
2R	0.36	10	0	0	113.4
3R	0.36	10	0	0	169.2

photometer Cary 60 (Agilent Technologies, United States), and software Cary WinUV (Agilent Technologies, United States) in a cuvette with an optical length of 1 cm, where the sample was measured in the range 180 – 350 nm. To determine the calibration line, we prepared a solution of acetate buffer (consisting of 2.99 g sodium acetate and 14.0 ml 2M acetic acid) with PRO and a solution of acetate buffer with PRO and excipients (EC, CaOil). We weighed the PRO on the analytical scales Adventurer Pro (Ohaus, Switzerland) and dissolved it in acetate buffer, added EC and CaOil, and transferred to a 25 ml volumetric flask. The shaken solution was stored in a refrigerator for 24 hours. Using linear correlation, we then determined the excipients interference on PRO absorbance and build the calibration lines of the two solutions.

Preparation of transdermal patches

In the first step, we determined the appropriate procedure and proportion of excipients suitable for the preparation of the patch. We weighed 10 g of EOH into the beaker and gradually added the specified amounts of EC and CaOil while mixing (see Tab. 1). The individual samples were stirred various times for 30 min, 60 min, 120 min, 180 min at 750 rpm and then poured into Petri dishes. The prepared patches were dried in three ways, at room temperature for 4 hours, in a dryer UNB 400 (Mettler, Germany) without a funnel for 4 hours and in a dryer with a funnel for 12 hours at 60 °C to ensure homogeneous drying. Thirty prepared patches were subjected to drying.

Evaluation of physico-chemical properties of prepared patches

We performed tests of flatness (percentage of constriction), folding force (resistance), moisture content and moisture absorption.

Constriction and flatness

Eighteen patches in various proportions and compositions of excipients EOH, EC, CaOil, GLY and PEG were prepared for the flatness and folding strength test (see Tab. 2). At least three measurements

were performed. The prepared patches were cut into squares of size 1 cm x 1cm, size (l_0). After cutting, we measured the second length of the squares (l_t), where a change could occur due to the non-uniformity of the area. Squares from the center but also from the sides of the patch were measured. Constriction percentage and flatness percentage were calculated according to the formulas:

$$\text{Constriction (\%)} = \frac{l_0 - l_t}{l_t} \times 100$$

$$\text{Flatness (\%)} = 100 - \left(\frac{l_0 - l_t}{l_t} \times 100 \right)$$

0 % constriction means 100 % surface flatness (Ravicumar et al., 2018).

Folding force

The patch was folded in one place until there was visible damage, which was a rupture or tear. We evaluated the folding force by the number of folds that did not damage the film. We considered a suitable film to be one that was without obvious damage after a 100-fold bending (Nair et al., 2013).

Moisture content

Patches of various compositions were prepared (see Tab. 3). The prepared patches were accurately weighed (m_0) and placed in a silica gel desiccator for 24 hours at 24 °C. After drying, the patches were weighed again (m_t). The moisture content was calculated according to the formula (Arora and Mukherjee, 2002):

$$\text{Moisture content (\%)} = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \times 100$$

Moisture absorption

Patches of various compositions were prepared (see Tab. 3). The moisture absorption was calculated according to the formula:

$$\text{Moisture absorption (\%)} = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100$$

Tab. 3: Composition of patches evaluated by moisture content and moisture absorption

Formulation	EC (g)	EOH (g)	CaOil (g)	Ha (g)	HPMC (g)
E	0.36	10	0.162	0	0
Ha1	0.36	10	0.162	0.0225	0
Ha2	0.36	10	0.162	0.0450	0
Hpmc1	0.36	10	0.162	0	0.0225
Hpmc2	0.36	10	0.162	0	0.0450

Tab. 4: Composition of patches evaluated by dissolution

Formulation	EC (g)	EOH (g)	CaOil (g)	PRO (g)	Ha (g)	HPMC (g)
E	0.36	10	0.162	0.02	0	0
Ha 22.5	0.36	10	0.162	0.02	0.0225	0
Ha 45	0.36	10	0.162	0.02	0.0450	0
HPMC 22.5	0.36	10	0.162	0.02	0	0.0225
HPMC 45	0.36	10	0.162	0.02	0	0.0450

The prepared patches were accurately weighed (m_0) and placed into a desiccator with saturated sodium chloride solution for 24 hours at 24 °C, which provided a relative humidity of 75 %. After hydration, the patches were weighed again (m_i) (Latif, 2021).

Dissolution test

We prepared five batches of patches with different composition (see

Tab. 4). Seven patches with PRO and one drug-free patch (placebo) were used for one batch dissolution. In the preparation of the patch, PRO was dissolved in ethanol. Paddle dissolution (USP II) was performed using SR8 Plus dissolution station (Hanson Research, United States) consisted of 8 vessels. Acetate buffer (pH 4.5) was used as a dissolution medium. We covered the patches stored in Petri dishes with a sieve and immersed them in the bottom of the dissolution vessels. The dissolution medium was heated to 32 °C $\pm$ 0.5 °C, the stirring speed was 50 rpm. The sampling times were as follows: 0, 5, 10, 15, 30, 45 minutes and 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 24 hours. 2 ml of the sample taken was supplemented with the same amount of dissolution medium.

Difference factor (f_1) and similarity factor (f_2)

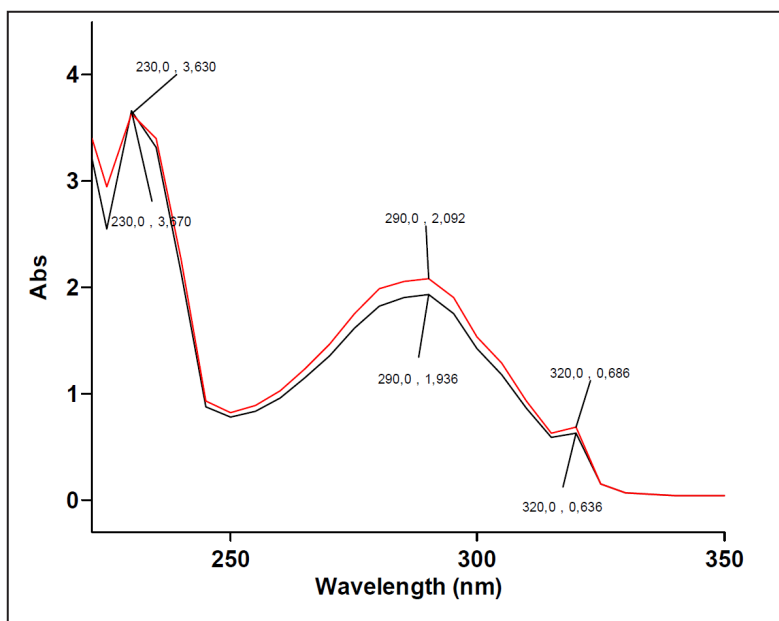
Difference factor (f_1) and similarity factor (f_2) are pair-wise dissolution comparison methods, which compare the drug release values of the reference and the test sample. The difference factor f_1 calculates the deviation percentage between two dissolutions at all their points. The similarity factor f_2 is a logarithmic function. These statistical methods are used to quantify similarity and difference. They play an important role in the pharmaceutical generics industry. According to EMEA and FDA recommendations, two dissolution profiles may be considered similar, when the difference factor f_1 is less than 15 and the similarity factor f_2 is higher than 50 (Wolaschka et al., 2022).

RESULTS AND DISCUSSION

Spectrophotometric analysis of propranolol

Within the absorption spectra we identified absorption maxima 230 nm, 290 nm, 320 nm (see Graph 1). In connection with the published studies by Marques et al. (2015), a 290 nm peak was selected for the calibration measurement.

Graph 1: Spectral analysis of propranolol (0.1 mg.ml⁻¹)

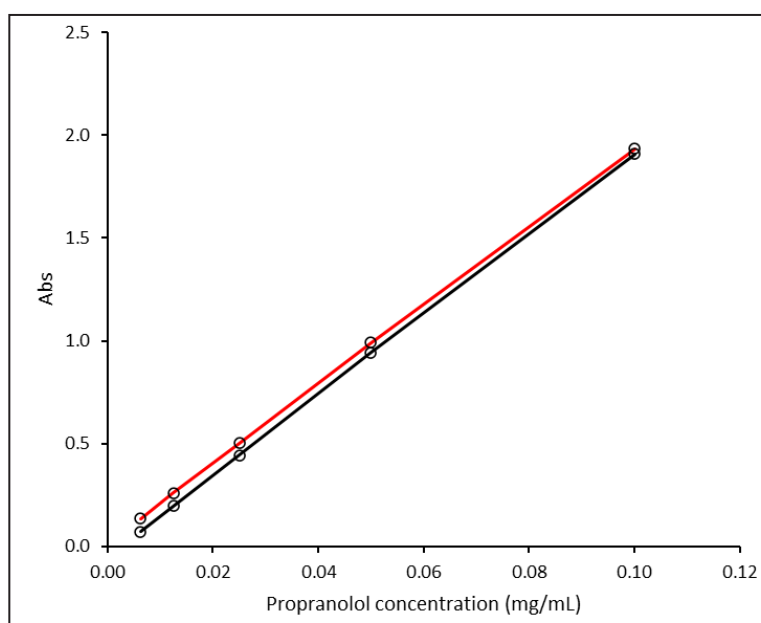


red curve – propranolol, black curve – propranolol with excipients

The absorbance values are given in Tab. 5. Calibration equations for PRO were: $\text{Abs} = 19.16221 \times \text{Conc.} + 0.02181$ ($R^2 = 0.99992$), and for PRO with excipients: $\text{Abs} = 19.59584 \times \text{Conc.} - 0.04744$ ($R^2 = 0.99994$).

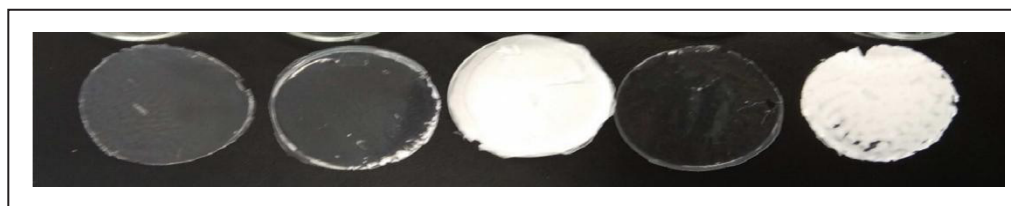
Using linear regression, we compared the absorbance values of PRO and PRO with the excipients and calculated the correlation coefficient $R^2 = 0.99999$. This indicates that the lines are similar, and there is no interference between excipients and PRO (see Graph 2).

Graph 2: Calibration lines of propranolol, wavelength 290 nm



red curve – propranolol, black curve – propranolol with excipients

Fig. 1: Patches containing castor oil, dried with a covered funnel



patches in order from left: a_r b_r c_r e_r d_r

Fig. 2: Patches containing castor oil, dried without a covered funnel



patches in order from left: a_r b_r c_r e_r d_r

Preparation of transdermal patches

The speed and mixing time of the solutions did not affect the stability and appearance of the prepared patches. CaOil containing patches were more flexible compared to films without it, but all patches were fragile and cracked when handled. With the increasing addition of EC, we have managed to prepare more compact patches. To prepare a homogeneous patch, drying was suitable together with a funnel, which ensured continuous drying (see Fig. 1). When drying without a funnel, agglomerates formed, and the patch was non-compact (see Fig. 2). The most suitable drying time for the preparation of the patch was 12 hours.

Evaluation of physico-chemical properties of prepared patches

Constriction and flatness

The constriction percentage was equal to 0 % for all samples, and the flatness percentage was equal to 100 % (see Tab. 6).

Folding force

The folding force test was an important indicator of the appropriate ratio of the amount of excipients in the patch formulation. The original patches containing only EC could be completely removed from the Petri dish, but they were opaque and burst as soon as they were first bent. Samples with the addition of GLY and PEG as plasticizers also showed the same properties. By adding CaOil as a plasticizer, the patches became more flexible, and they could be bent up to almost 100 times (see Tab. 6). Drying played a key role, where drying with a funnel in a dryer at 60 °C proved to be the most suitable. With increasing amount of EC, the patches have become thicker, more compact, more durable, and easier to handle. However, the number of folds was most significantly affected by the presence of CaOil. By increasing the amount of EC to 0.36 g, and by increasing the amount of CaOil to 0.162 g, the folding force increased to 400 bends. Therefore, we evaluated CaOil as the most suitable plasticizer for these polymers.

Tab. 6: Constriction, flatness, and folding force of different patch formulations

Formulation	Constriction (%)	Flatness (%)	Folding force (num. of folds)
1g	0	100	1
2g	0	100	1
3g	0	100	1
1p	0	100	1
2p	0	100	1
3p	0	100	1
1r	0	100	3
2r	0	100	4
3r*	0	100	100
1G	0	100	1
2G	0	100	1
3G	0	100	1
1P	0	100	1
2P	0	100	1
3P	0	100	1
1R	0	100	1
2R*	0	100	134
3R*	0	100	400

3r * – the most suitable patch in the number of bends in the composition of 0.2 g EC, 10 g EOH, 94 µl CaOil

3R* – the most suitable patch in the number of bends in the composition of 0.36 g EC, 10 g EOH, 0.162 g CaOil

Tab. 7: Moisture content and absorption of different patch formulations

Formulation	Moisture content (%)	SD	Moisture absorption (%)	SD
E	0.55	0.17	1.90	0.39
Ha1	0.60	0.76	5.93	1.57
Ha2	0.51	0.44	1.87	0.73
Hpmc1	2.83	0.11	1.39	0.09
Hpmc2	3.83	0.49	1.50	0.14

Moisture content and absorption

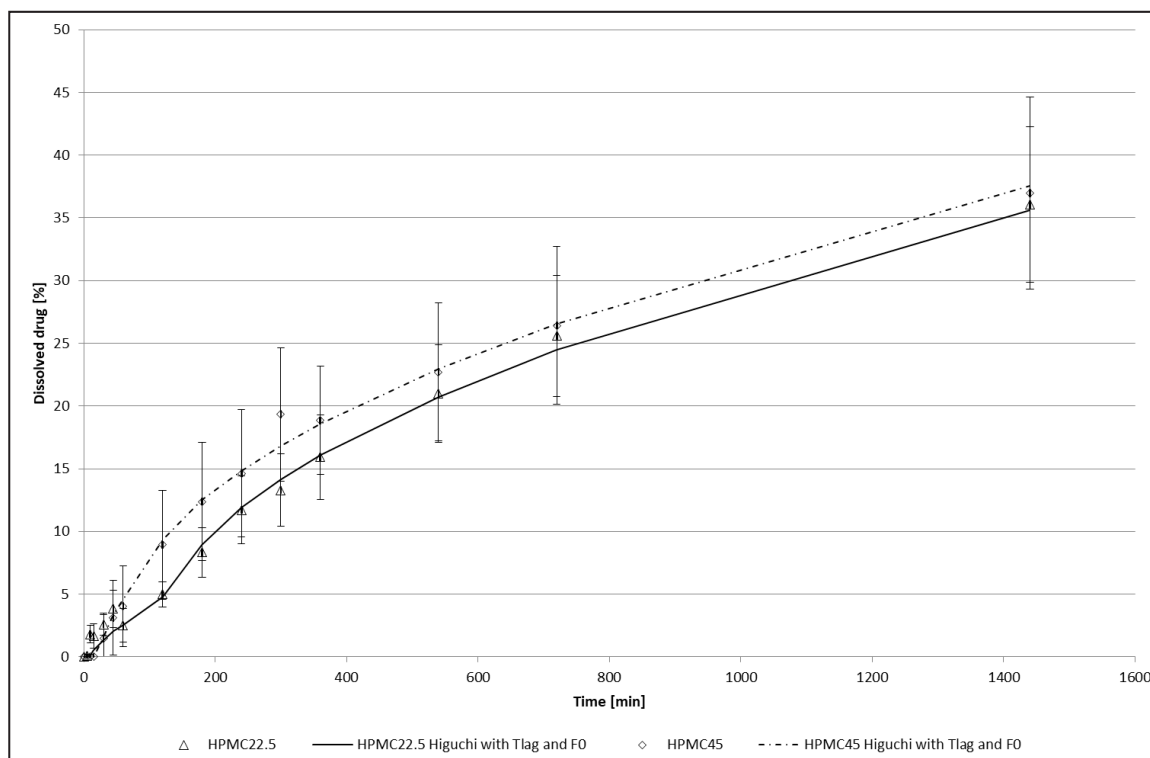
Patches containing HPMC showed a higher moisture content (2.83 ± 0.11 %, 3.83 ± 0.49 %) than other patches, which may be due to the higher hydrophilicity of HPMC (see Tab. 7). However, in an environment of 75 % relative humidity, these patches adsorbed the least moisture and, conversely, the Ha-containing patches the most.

Dissolution test

The dissolution test determines the release of the API from the dosage form under the prescribed conditions in the prescribed dissolution medium. The medium is collected at specified times and the amount of API released is subsequently determined. The result is a time dependence of the released drug amount.

The measured API release values were approxi-

Graph 3: Dissolution curves of samples HPMC22.5 and HPMC 45 mg



related to the mathematical models Higuchi and Korsmeyer-Peppas. Higuchi model and the zero-order model represent two limit cases in the phenomenon of transport and release of the drug, the Korsmeyer-Peppas model can better describe the API release taking place between the two models. Higuchi model is generally used in polymer matrix systems, while the zero-order model becomes ideal for describing coated dosage forms or membrane-controlled dosage forms. The most used parameter for choosing the appropriate model is the coefficient of determination R^2 . However, this value usually increases with the addition of several model parameters, which considers modified determination factor R^2_{adj} (Costa and Sousa, 2001). However, in our case, we chose the coefficient of determination R^2 for the selection of the dissolution model. The HPMC45 ($R^2 = 0.980 \pm 0.006$) and HPMC22.5 ($R^2 = 0.989 \pm 0.009$) transdermal patches

correlated more with the Higuchi model (see Tab. 8), while the Ha45 ($R^2 = 0.932 \pm 0.024$), Ha22.5 ($R^2 = 0.948 \pm 0.035$) and E ($R^2 = 0.970 \pm 0.011$) transdermal patches correlated slightly more with Korsmeyer-Peppas model (see Tab. 9).

The addition of HPMC to the patch resulted in a faster release of 25 % PRO compared to the sample E (923 min). In the HPMC45 sample by 22.5 % (715 min), and in the HPMC22.5 sample by 12.0 % (812 min). Higher Higuchi release constants of sample HPMC45 (0.964 ± 0.195) and sample HPMC22.5 (0.958 ± 0.174) compared to the sample E (0.744 ± 0.115) also correspond to this fact. The HPMC22.5 and HPMC45 patches released 36.05 % and 36.97 % PRO after 24 hours (see Graph 3).

HPMC as a hydrophilic polymer is widely used in dosage forms, including immediate-release and modified-release formulations. HPMC is also an effective

Tab. 8: Kinetic dissolution parameters of propranolol patches calculated according to the Higuchi model

Sample	HPMC45		HPMC22.5		Ha45		Ha22.5		E	
Parameters	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
Best fitted kinetic parameters										
k_H	0.964	0.195	0.958	0.174	0.741	0.051	0.523	0.086	0.744	0.115
T_{lag}	56	35	87	69	9	13	106	40	2	2
F_0	1.66	2.02	0.43	0.77	0.12	0.17	0	0	3.19	0.82
Time to release 25 % and 50 % of the drug										
T_{25}	715	384	812	294	1148	137	2553	907	923	358
T_{50}	2865	1430	3029	1175	4588	580	9897	3665	4266	1738
Correlation parameters										
N-observed	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0
SS	20	17	43	15	68	30	33	16	30	14
WSS	0.126	0.085	0.715	0.865	2.929	1.010	0.663	0.361	0.157	0.049
R^2	0.989	0.009	0.980	0.006	0.932	0.024	0.948	0.035	0.970	0.011
R^2_{adj}	0.988	0.010	0.977	0.007	0.921	0.028	0.939	0.041	0.965	0.013

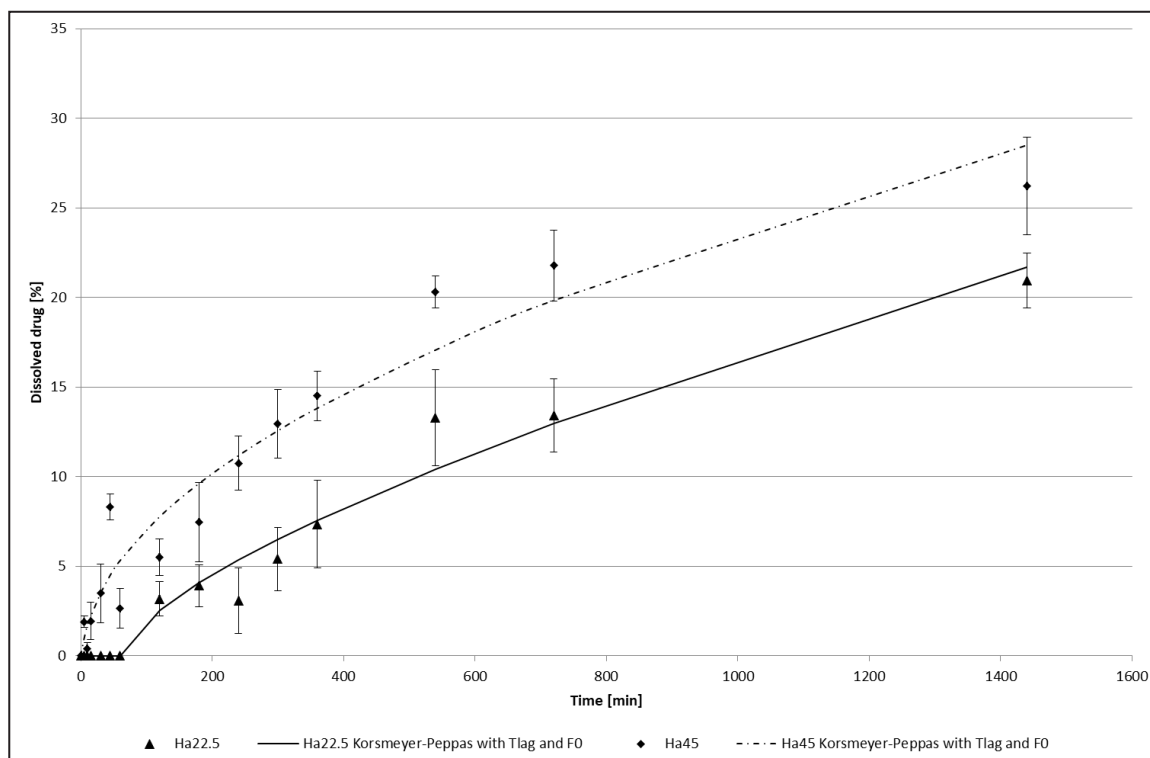
k_H – the Higuchi release constant, T_{lag} – the Lag time (min)*, F_0 – the initial amount of drug in the solution (%), T_{25} – the time to dissolve 25 % of the propranolol (min)*, T_{50} – the time to dissolve 50 % of the propranolol (min)*, N-observed – the number of samplings, SS – the sum of squares, WSS – the weighted sum of squares, R^2 – the coefficient of determination, R^2_{adj} – the adjusted coefficient of determination, * rounded to the nearest minute

Tab. 9: Kinetic dissolution parameters of propranolol patches calculated according to the Korsmeyer-Peppas model

Sample	HPMC45		HPMC22.5		Ha45		Ha22.5		E	
Parameters	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
Best fitted kinetic parameters										
k_{KP}	1.221	1.023	0.405	0.166	0.660	0.229	0.196	0.174	1.984	0.314
n	0.505	0.101	0.631	0.061	0.524	0.070	0.706	0.147	0.374	0.031
T_{lag}	30	12	26	16	9	12	62	2	0	0
F_0	0.00	0.00	0.62	0.88	0.40	0.31	0.01	0.02	0.00	0.00
Time to release 25 % and 50 % of the drug										
T_{25}	710	372	813	248	1153	190	1758	165	983	484
T_{50}	2725	1008	2445	680	4547	1353	4831	1192	6660	4351
Correlation parameters										
N-obs	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0
SS	22	20	32	21	64	24	17	4	18	8
WSS	0.831	0.710	1.774	1.557	2.853	1.167	0.587	0.498	0.141	0.047
R^2	0.988	0.010	0.983	0.007	0.936	0.019	0.972	0.003	0.982	0.006
R^2_{adj}	0.985	0.013	0.979	0.009	0.919	0.024	0.964	0.004	0.977	0.008

k_{KP} – the Korsmeyer-Peppas release constant, T_{lag} – the Lag time (min)*, F_0 – the initial amount of drug in the solution (%), T_{25} – the time to dissolve 25 % of the propranolol (min)*, T_{50} – the time to dissolve 50 % of the propranolol (min)*, N-observed – the number of samplings, SS – the sum of squares, WSS – the weighted sum of squares, R^2 – the coefficient of determination, R^2_{adj} – the adjusted coefficient of determination, * rounded to the nearest minute

Graph 4: Dissolution curves of samples Ha22.5 and Ha45



inhibitor of recrystallization in stabilization of amorphous drugs, which may increase the bioavailability of poorly soluble compounds (Huang et al., 2015). The release of medicinal products (especially highly soluble in water) from the HPMC matrix takes place with an initial impact effect due to the rapid diffusion of the dissolved drug through a network of hydrophilic gel formed on the surface of the matrix (Mašková et al., 2019).

The addition of HPMC increased the release rate of PRO compared to the E patch. At the same time, there was no sudden release. In a study by Guyot et al. (2000), in which they evaluated adhesion matrices with PRO and HPMC for transdermal delivery, the recorded 18 – 39 % of the released PRO from the patches within 24 hours. They found that a faster release of the drug occurred after the addition of propylene glycol to the patch formulation. The diffusion rate of PRO was probably accelerated due to the formation of hydrophilic micropores in the adhesive film (Guyot et al., 2000).

The addition of Ha to the patch resulted in a slower release of 25 % PRO compared to the sample E (983 min). In the Ha45 sample by 17.3 % (1153 min), and in the Ha22.5 sample by 78.8 % (1758 min). Lower Korsmeyer-Peppas release constants of sample Ha45 (0.660 ± 0.229) and sample Ha22.5 (0.196 ± 0.174) compared to the sample E (1.984 ± 0.314) also correspond to this fact. The Ha22.5 and Ha45 patches released 20.94 % and 26.22 % PRO after 24 hours (see Graph 4).

Ha is a cost-effective and biocompatible natural mineral that prolongs the release of the drug and its bioavailability. Through its structure, it can react with drug molecules by surface adsorption or ion exchange. The rate of release of the drug is influenced by a cluster of Ha molecules (Bediako et al., 2018).

PRO itself as a 1,3-amino alcohol can form intramolecular hydrogen bonds, thereby increasing its stability and solubility and reducing alkalinity (Devinský et al., 2001). The interaction with the hydrogen bond plays crucial role in controlling drug release from the

Tab. 10: Dissolution comparison of experimental patches using difference factor f_1

Reference	Test				
	E	HPMC22.5	HPMC45	Ha22.5	Ha45
E	x	30.10	24.55	62.22	27.51
HPMC22.5	37.63	x	20.28	52.77	18.38
HPMC45	27.13	17.93	x	58.23	31.74
HA22.5	164.66	11.75	139.43	x	95,90
Ha45	37.17	19.86	38.79	48.95	x

Tab. 11: Dissolution comparison of experimental patches using similarity factor f_2

Reference	Test				
	E	HPMC22.5	HPMC45	Ha22.5	Ha45
E	x	67.49	69.71	52.76	69.14
HPMC22.5	67.49	x	77.20	57.26	73.85
HPMC45	69.71	77,20	x	52.40	66.44
HA22.5	52.76	57.26	52.40	x	62.51
Ha45	69.14	73.85	66.44	62.51	x

transdermal patch. Luo et al. (2020) found that the release of PRO was controlled by an amide group via hydrogen bonding and the extent of controlled release was positively correlated with the strength of hydrogen bonding.

Difference factor (f_1) and similarity factor (f_2)

It should be noted at the outset that these calculations are exemplary, as the measurements do not meet certain conditions, such as RSD below 10 %. Nevertheless, these results show a certain pattern that we see in the dissolution curves.

The highest value of the difference factor f_1 was calculated for Ha22.5 as reference sample against E as test sample ($f_1 = 164.66$, see Tab. 10). Quite enormous differences were calculated for Ha22.5 as reference sample against other samples as tests ($f_1 = 95.90 - 139.43$), which indicates that sample Ha22.5 showed significant different dissolution compared to other samples. The smallest difference factor f_1 was calculated for HPMC45 as reference sample vs.

HPMC22.5 as test sample ($f_1 = 17.93$), what is relatively close to the limit (0 – 15) set by the FDA for similar dissolution profiles (Franc et al., 2016).

We can see that the calculation of the difference factor f_1 is not symmetric and therefore it depends on which sample is considered as a reference and which as tested, although the order of these pairs would ultimately be the same.

As we can see in Tab. 11, the similarity factor f_2 is symmetric in contrast to the difference factor f_1 and it does not matter which sample is considered as reference and which is tested. The similarity factor, in contrast to the difference factor, is a logarithmic function and even small deviations in the comparison profiles lead to more significant differences in its value (Wolaschka et al., 2022). The largest value of similarity factor f_2 was calculated for comparison pair HPMC22.5 vs. HPMC45 ($f_2 = 77.20$), which confirms the previous finding that these two samples have the lowest difference factor f_1 .

CONCLUSIONS

Beta-blockers can be classified as effective cardiovascular drugs that improve the health of the cardiac patient and ensure a reduction in mortality. Their use in therapy has a wide application, from arterial hypertension to heart failure. They also find use to relieve some symptoms in non-cardiovascular indications such as migraine, tremor, or in pediatrics the treatment of infantile hemangioma. In general, both the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the drugs are influenced by the route of administration. Certain advantages are offered by the transdermal application of the drugs. On the one hand, this prevents premature drug metabolism by bypassing the effect of the first pass effect, on the other hand it offers easy application, with the possibility of modifying the duration of action of the drug itself. The safety of transdermal administration of PRO has been confirmed by skin irritation study for HPMC-compositional patches as a speed control polymer, glycerin as a plasticizer and PRO as active substance. The patch was applied to six volunteers. The test showed that neither the active substance nor the excipients caused skin irritation (Verma and Iyer, 2020).

It was precisely the practical part of the submitted study that focused on determining the release of the API PRO beta-blocker from the prepared patch in the acetate buffer dissolution medium with a pH of 4.5. Dissolution took place for 24 hours and the observed release of PRO in the samples occurred in the following order from slowest to fastest $\text{Ha22.5} < \text{Ha45} < \text{E} < \text{HPMC22.5} < \text{HPMC45}$. The samples with Ha addition slowed the dissolution of PRO, whereas the samples with HPMC addition enhanced the dissolution of PRO. As we can see, the greater amount of Ha45 did not lower the dissolution speed compared to Ha22.5, as might be expected, probably due to a disruption of the structure of EC. To gain a deeper understanding of the dependence of PRO release from the patches, it would be necessary to evaluate a larger range of patches with different proportions of excipients. We found that the most suitable composition for the patch

preparation in 90 mm Petri dish is EC 0.36 g, EOH 10 g CaOil 0.162 g. Also, we found that the most suitable plasticizer from the tested was castor oil.

Transdermal application makes it possible to ensure a certain comfort for the patient by reducing repeated administration of the drug. It is also suitable for a patient whose therapy is endangered due to various physical or mental disorders. Finally, education of the patient in the correct administration of the patch as well as increasing the credibility in the effect of the drug in the form of a patch also plays a vital role here.

ACKNOWLEDGEMENT

The study was also written thanks to the support of project from the Structural Funds “Renewal of research and development infrastructure and equipment at UVLF, ITMS 26210120028” and project VEGA 1/0731/21 “Substances of natural origin as part of sustainable aquaculture.”

REFERENCES

- Arora, P., Mukherjee, B.: Design, development, physicochemical, and in vitro and in vivo evaluation of transdermal patches containing diclofenac diethylammonium salt. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002, 91 (9), 2076 – 2089.
- Bediako, E. G., Nyankson, E., Dodoo-Arhin, D., Agyei-Tuffour, B., Lukowiec, D., Tomiczek, B., Yaya, A., Efavi, J. K.: Modified halloysite nanoclay as a vehicle for sustained drug delivery. *Heliyon*, 2018, 4, 7.
- Devinský, F. et al.: *Organická chémia* [Organic Chemistry]. 1. vyd. Martin: Osveta, 2001. 750 s.
- Franc, A., Muselík, J., Goněk, R., Vetchý, D.: Biphasic dissolution method for quality control and assurance of drugs containing active substances in the form of weak acid salts. *Acta Pharmaceutica*, 2016, 66 (1), 139 – 145.
- Costa, P., Lobo, J. M. S.: Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, 13 (2), 123 – 133.

- Guyot, M., Fawaz, F.: Design and *in vitro* evaluation of adhesive matrix for transdermal delivery of propranolol. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 204 (1 – 2), 171 – 182.
- Huang, S., O'Donnell, K. P., Keen, J. M., Rickard, M. A., McGinity, J. W., Williams III, R. O.: A New extrudable form of hypromellose: AFFINISOL™ HPMC HME. *AAPS PharmSciTech*, 2015, 17 (1), 106 – 119.
- Jagdale, S. C., Agavekar, A. J., Pandya, V. S., Kuchekar, B. S., Aniruddha R., Chabukswaret, A. R.: Formulation and evaluation of gastroretentive drug delivery system of propranolol hydrochloride. *AAPS PharmSciTech*, 2009, 10, 3.
- Janota, T.: Betablokátory v liečbe akútneho srdečného selhávania [Beta blockers in the treatment of acute heart failure]. *Interní medicína*, 2010, 12, 431 – 433. <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2010/09/09.pdf>. [cit. 2020-11-21].
- Latif, M. S., Azad, A. K., Nawaz, A., Rashid, S. A., Rahman, H., Al Omar, S. Y., Bungau, S. G., Aleya, L., Abdel-Daim, M. M.: Ethyl cellulose and hydroxypropyl methyl cellulose blended methotrexate-loaded transdermal patches: *in vitro* and *ex vivo*. *Polymers*, 2021, 13 (20), 3455.
- Luo, Z., Liu, CH., Quan, P., Yang, D., Zhao, H., Wan, X., Fang, L.: Mechanistic insights of the controlled release capacity of polar functional group in transdermal drug delivery system: the relationship of hydrogen bonding strength and controlled release capacity, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2020, 10 (5), 928 – 945.
- Marques Junior, J. M., Muller, A. L. H., Foletto, E. L., Costa, A. B., Bizzi, C. A., Muller, E. I.: Determination of propranolol hydrochloride in pharmaceutical preparations using near infrared spectrometry with fiber optic probe and multivariate calibration methods. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015, 1 (6), 1 – 6.
- Mašková, E., Naiserová, M., Kubová, K., Mašek, J., Pavlovská, S., Urbanová, M., Brus, J., Vysloužil, J., Vetchý, D.: Highly soluble drugs directly granulated by water dispersions of insoluble Eu-dragit® polymers as a part of hypromellose K100M matrix systems. *BioMed. Research International*, 2019, 2019, 1 – 13.
- Mezger S. T. P., Mingels, A. M. A., Bekers, O., Pastor, B. C., Heeren, R. M. A.: Trends in mass spectrometry imaging for cardiovascular diseases. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411 (17), 3709 – 3720.
- Mirrosay, L., Mojžiš, J. a kol.: *Základná farmakológia a farmakoterapia* [Basic Pharmacology and Pharmacotherapy]. 2. vyd. Košice: Equilibria, s. r. o. 2009. 533 s.
- Nair, A. B., Kumria, R., Harsha, S., Attimarad, M., Al-Dhubiab, B. E., Alhaider, I. A.: *In vitro* techniques to evaluate buccal films. *Journal of Controlled Release*, 2013, 166 (1), 10 – 21.
- Singh, M., Stewart, R., White, H.: Importance of frailty in patients with cardiovascular disease. *European Heart Journal*, 2014, 35 (26), 1726 – 1731.
- Sklenář, Z., Horačková, K.: Nové léčivé látky v magistraliter receptuře XII – propranolol-hydrochlorid [New medicinal substances in extemporaneous prescription, part 12 – propranolol hydrochloride]. *Praktické lékařství*, 2012, 8 (1), 25 – 27.
- Verma, P. R. P., Iyer, S. S.: Controlled transdermal delivery of propranolol using HPMC matrices: Design and *in-vitro* and *in-vivo* evaluation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2020, 52 (2), 151 – 156.
- Ravikumar, R., Ganesh, M., Senthil, V., Ramesh, Y. V., Jakki, S. L., Choi, E. Y.: Tetrahydro curcumin loaded PCL-PEG electrospun transdermal nanofiber patch: Preparation, characterization, and *in vitro* diffusion evaluations. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2018, 44, 342 – 348.
- Wolaschka, T., Kl'oc, D., Rohaľová, S., Ruttkay, F.: Beta-blockers in the treatment of hypertension and tablet formulation. *Folia Pharmaceutica Cassoviensia*, 4 (2), 2022.



VPLYV RÔZNYCH EXTRAČNÝCH ČINIDIEL NA CELKOVÝ OBSAH POLYFENOLOV, ANTIOXIDAČNÚ AKTIVITU A TOXICITU EXTRAKTOV *AGRIMONIA EUPATORIA* L.

INFLUENCE OF DIFFERENT EXTRACTION AGENTS ON THE TOTAL POLYPHENOL CONTENT, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOXICITY OF *AGRIMONIA EUPATORIA* L. EXTRACTS

Tomíq, Vlora¹; Eftimová, Jarmila¹; Petrovič, Vladimír²

¹Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky

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

²Katedra farmakológie a toxikológie

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

Slovenská republika

jarmila.eftimova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Agrimonia eupatoria L. (repík lekársky) je významná, tradičná, trvácna bylina, ktorá obsahuje rôzne biologicky aktívne látky s pozitívnymi účinkami na zdravie človeka. Zodpovednosť za tieto pozitívne účinky na zdravie sa pripisuje hlavne polyfenolom. Hlavným cieľom experimentu bolo sledovať vplyv extrakčných činidiel (metanol, etanol, acetón a voda) na celkový obsah polyfenolov, antioxidačnú aktivitu a overiť toxicitu extraktov na sladkovodných dafniách. Najvyšší celkový obsah polyfenolov sme stanovili vo vodnom extrakte (18,54 mg GAE.100 g⁻¹ suchej vzorky). Najvyšší obsah flavonoidov (2,58 mg QE.100 g⁻¹ suchej vzorky) a polyfenolických kyselín (9,71 mg CGA.100 g⁻¹ suchej vzorky) bol prítomný v metanолоvom extrakte. Najnižšie množstvo obsahových látok sme stanovili v acetónovom extrakte

(polyfenoly – 0,199 mg GAE.100 g⁻¹ suchej vzorky; flavonoidy – 1,13 mg QE.100 g⁻¹ suchej vzorky; fenolické kyseliny – 4,18 mg CGA.100 g⁻¹ suchej vzorky). Všetky testované extrakty boli schopné chrániť bunky pred oxidačným poškodením cestou vychytávania voľných radikálov. Metanолоvý extrakt vykazoval najvyššiu aktivitu vychytávania DPPH radikálov (27,56 %); etanолоvý a vodný extrakt mali nižšiu antioxidačnú aktivitu (16,54 % a 14,17 %). Najnižšiu vychytávaciu schopnosť mal acetónový extrakt (13,39 %). Pri hodnotení toxicity jednotlivých extraktov na prežívanie dafní bol najbezpečnejším vodný a metanолоvý extrakt. Acetónový a etanолоvý extrakt preukázali toxicitu pri nízkych koncentráciách (7,9 mg.l⁻¹ a 15,2 mg.l⁻¹ pri 24-hodinovej; 3,5 mg.l⁻¹ a 3,8 mg.l⁻¹ pri 48-hodinovej expozícii). Získané výsledky poukazujú na potrebu ďalšieho výskumu pre použitie extraktov repíka lekárskeho v klinickej praxi, zistenie ich

optimálnej liečebnej koncentrácii a zhodnotenie ich potenciálnej toxicity.

Kľúčové slová: *Agrimonia eupatoria* L.; antioxidačná aktivita; celkový obsah polyfenolov; extrakčné činidlá; toxicita

ABSTRACT

Agrimonia eupatoria L. is an important, traditional, perennial herb that contains various biologically active substances with positive effects on human health. These positive health effects are mainly attributed to polyphenols. The main objective of the experiment was to observe the effect of extraction reagents (methanol, ethanol, acetone and water) on total polyphenol content, antioxidant activity, and to verify the toxicity of the extracts on freshwater daphnia. The highest total polyphenol content was determined in the aqueous extract (18.54 mg GAE.100 g⁻¹ dry sample). The highest content of flavonoids (2.58 mg QE.100 g⁻¹ dry sample) and polyphenolic acids (9.71 mg CGA.100 g⁻¹ dry sample) was present in the methanolic extract. The lowest content was determined in acetone extract (polyphenols – 0.199 mg GAE.100 g⁻¹ dry sample; flavonoids – 1.13 mg QE.100 g⁻¹ dry sample; phenolic acids – 4.18 mg CGA.100 g⁻¹ dry sample). All tested extracts were able to protect cells from oxidative damage by free radical scavenging pathway. Methanolic extract showed the highest DPPH radical scavenging activity (27.56 %), ethanol and aqueous extract had lower antioxidant activity (16.54 % and 14.17 %, respectively). Acetone extract had the lowest scavenging capacity (13.39 %). When the toxicity of the different extracts on daphnia survival was evaluated, the aqueous and methanolic extracts were the safest. The acetone and ethanol extracts showed toxicity at low concentrations (7.9 mg.l⁻¹ and 15.2 mg.l⁻¹ at 24 h exposure; 3.5 mg.l⁻¹ and 3.8 mg.l⁻¹ at 48 h exposure). The experimental results indicate the need for further research for the use

of common agrimony extracts in clinical practice, to determine their optimal therapeutic concentration and to evaluate their potential toxicity.

Key words: *Agrimonia eupatoria* L.; antioxidant activity; extractants; total polyphenol content; toxicity

ÚVOD

Agrimonia eupatoria L. (repík lekársky) patrí k trvácim bylinám z čeľade *Rosaceae*, rod *Agrimonia*, z ktorých bolo identifikovaných 16 druhov. Repík lekársky je vzpriamená bylina s valcovitou, ochlpenou, málo rozvetvenou až nerozvetvenou stonkou. Jej nadzemné časti sa zvyčajne zbierajú od začiatku júla do polovice augusta (Ivanova, 2011; Muruzović, 2016; Santos, 2017; Garcia-Oliveira, 2020; Karlińska, 2021). Fytochemická analýza *Agrimonia eupatoria* L. odhalila prítomnosť sacharidov, glykozidov, trieslovín, terpenoidov, fenolových zlúčenín (flavonoidov), olejov a mnohých ďalších bioaktívnych chemických látok, ktoré ovplyvňujú metabolizmus človeka (Al-Snafi, 2015).

Písomné zmienky o priaznivých účinkoch *Agrimonia eupatoria* L. siahajú až do 4. až 5. storočia n. l. Bylina bola spomenutá aj v staroanglickom herbári z 10. storočia (Meuss, 1977; Paluch, 2020). V tradičnej medicíne sa používajú na prípravu nálevov, odvarov a tinktúr nadzemné časti rastliny, ktoré vykazujú antioxidačné, protizápalové, adstringentné, diuretické a mnohé iné vlastnosti. Používali a používajú sa pri zápale pľúc, hnačke, hepatopatii, cholecystitíde, cholestáze, atónii čriev, močového mechúra, pyelonefritíde, poruchách krvácania, kožných defektoch a zápalových ochoreniach orálnej sliznice (Granica, 2015; Santos, 2017; Paluch, 2020; Pour, 2021).

Podľa EMA (2015) a ESCOP (2019) sa produkty s obsahom *Agrimonia eupatoria* L. môžu používať pri miernej, nešpecifickej, akútnej hnačke, miernych zápaloch orofaryngeálnej sliznice; a menších zápaloch kože a povrchových ranách.

Jednou z významných vlastností *Agrimonia eupatoria*

toria L. je jej baktericídny účinok proti *Staphylococcus aureus* v infikovaných ranách. Lokálna aplikácia masti s 10 % etanolovým extraktom *Agrimonia eupatoria* L. skrátila u potkanov čas hojenia rán na 10 – 16 dní. Aplikácia jej 10 % vodného extraktu redukovala dobu hojenia na 12 dní. K hojeniu rán môže prispieť aj fotosenzibilizujúci účinok repíka lekárskeho, a to zvýšením citlivosti lôžka rany alebo vredu na ultrafialové žiarenie (UV). Expozícia UV žiareniu indukuje bunkovú proliferáciu v rohovej vrstve kože (*stratum corneum*) a indukuje uvoľňovanie fibronektínu, ktorý podporuje migráciu buniek a sťahovanie rany. Pozitívny účinok repíka lekárskeho sa preukázal aj pri liečbe atopických ekzémov a psoriázy (Paluch, 2020).

Pravidelná konzumácia čaju z repíka lekárskeho počas 30 dní viedla k zníženiu prozápalového cytokínu IL-6 u zdravých dobrovoľníkov s normálnymi hodnotami BMI. Protizápalovú aktivitu repíkového čaju možno pripísať aj polyfenolom, keďže strava obohatená o polyfenoly je nepriamo úmerne spojená s markermi zápalu v krvi, ako sú CRP, IL-6 a TNF α . Ukázalo sa, že celková antioxidačná kapacita ľudskej krvnej plazmy sa po 30 dňoch konzumácie repíkového čaju významne zvýšila. Zároveň sa zistilo aj nesignifikantné zvýšenie FRAP o 11,7 % v porovnaní s dňom 0. Zistená antioxidačná kapacita korelovala s údajmi uvádzanými vo zvieracích modeloch a v modeloch bunkových kultúr (Ivanova, 2013).

Množstvo obsahových látok v extraktoch z rastlín ovplyvňujú mnohé faktory, ako je napr. termín zberu, spôsob úpravy drogy, extrakčné činidlo a extrakčné metódy. Preto sme si ako hlavný cieľ experimentu stanovili sledovať jeden z týchto faktorov, a to vplyv rôznych extrakčných činidiel na celkový obsah polyfenolov a antioxidačnú aktivitu. Keďže v literatúre nie je dostatočné množstvo relevantných štúdií skúmajúcich toxicitu repíka lekárskeho, zamerali sme sa aj na *in vitro* testovanie toxicity jednotlivých extraktov na biologických modeloch vodných kôrovcov.

MATERIÁL A METÓDY

Biologicky materiál

Na chemickú analýzu sme použili vzorky sušenej drogy *Agrimonia eupatoria* L. zbieranej v lokalite Malá Tŕňa vo vinohradníckej oblasti Tokaj.

Príprava extraktov repíka lekárskeho

Suchý rastlinný materiál *Agrimonia eupatoria* L. sme zhomogenizovali v elektrickom mlynčeku. Do Erlenmeyerových baniek sme na laboratórnych váhach navážili 1 g homogenizovanej rastlinnej vzorky, ktorú sme zaliali 100 ml rozpúšťadla (destilovaná voda, etanol, metanol a acetón). Pripravené roztoky sme prekryli ochranným filmom a extrahovali v ultrazvukovom kúpeli pri laboratórnej teplote po dobu 60 minút. Následne sme obsah každej Erlenmeyerovej banky prefiltrovali cez filtračný papier, čím sme získali čistý vodný, etanolový, metanolový a acetónový bylinný extrakt s objemom 100 ml.

Stanovenie celkového obsahu polyfenolov

Celkové množstvo polyfenolov prítomných v jednotlivých extraktoch *Agrimonia eupatoria* L. sme stanovili kolorimetrickou metódou s použitím činidla Folin-Ciocalteu. Pomocou spektrofotometra sme merali absorbanciu vzoriek oproti slepému pokusu pri vlnovej dĺžke 700 nm. Celkový obsah polyfenolov sme prepočítali pomocou rovnice kalibračnej priamky kyseliny galovej v mg GAE.l⁻¹ vzorky (Galic Acid Equivalent) (Singleton, 1965).

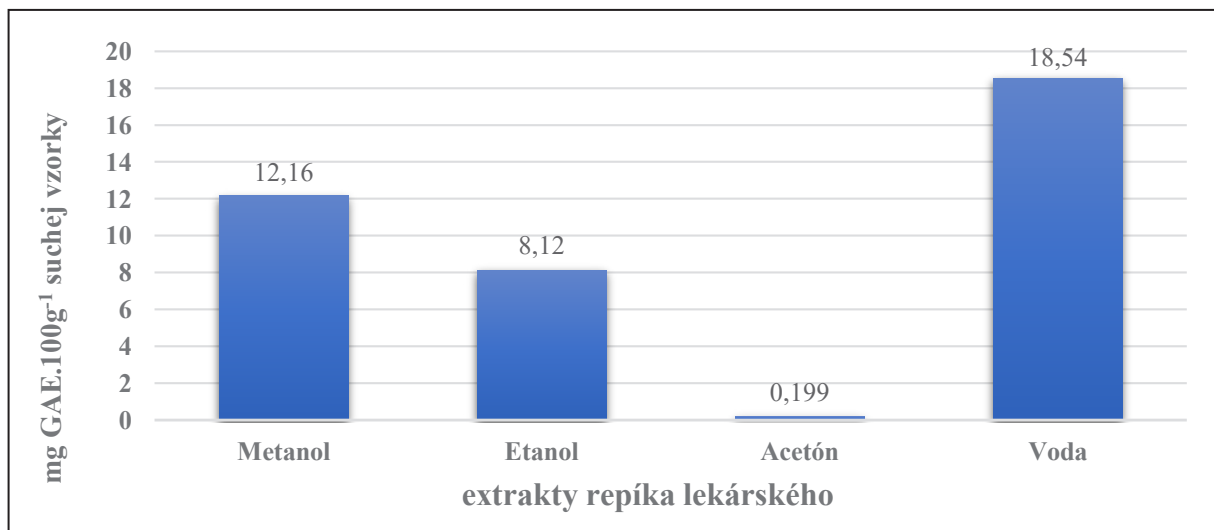
Stanovenie celkového obsahu flavonoidov

Celkový obsah flavonoidov sme prepočítali pomocou rovnice kalibračnej priamky kvercetínu v mg QE.l⁻¹ vzorky (Quercetin Equivalent). Spolu so vzorkami extraktov sme pripravili aj kalibračné štandardy kvercetínu (Lamaison, 1990).

Stanovenie celkového obsahu fenolických kyselín

Reakčnú zmes sme pripravili napipetovaním 1,0 ml extraktu repíka lekárskeho do skúmaviek a následným pridaním 1,0 ml 0,5 mol.dm⁻³ HCl; 1,0 ml Arno-

Obr. 1: Obsah celkových polyfenolov v extraktoch repíka lekárskeho



vej reagentie, 1,0 ml.l⁻¹ mol.dm⁻³ NaOH a 1,0 ml destilovanej vody. Celkový obsah fenolických kyselín sme vyjadrili rovnicou kalibračnej priamky kyseliny chlorogénovej v mg CGA.l⁻¹ vzorky (Chlorogenic Acid Equivalent) (Farmakopea Polska, 1999).

Stanovenie antioxidačnej aktivity

Antioxidačná aktivita bola stanovená metódou vychytávania voľných radikálov DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylvé radikály). Princíp použitého testu spočíva v tom, že pri kontakte DPPH s antioxidačnou látkou DPPH prijíma elektrón a dochádza k jeho redukcii na DPPH-H, čo sa prejaví zmenou výrazne fialového sfarbenia stabilného metanolového roztoku DPPH na roztok bleďožltej farby (Sadeer, 2020).

Aktivitu vychytávania voľných radikálov sme vy počítali podľa rovnice:

$$\text{Vychytávacia aktivita (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_c}{A_0} \right) \times 100$$

– kde A_0 je absorbancia porovnávacieho roztoku (blanku) a A_c je absorbancia roztoku vzorky s DPPH radikálom v metanole.

Vplyv rôznych extrakčných činidiel na toxicitu extraktov *Agrimonia eupatoria* L.

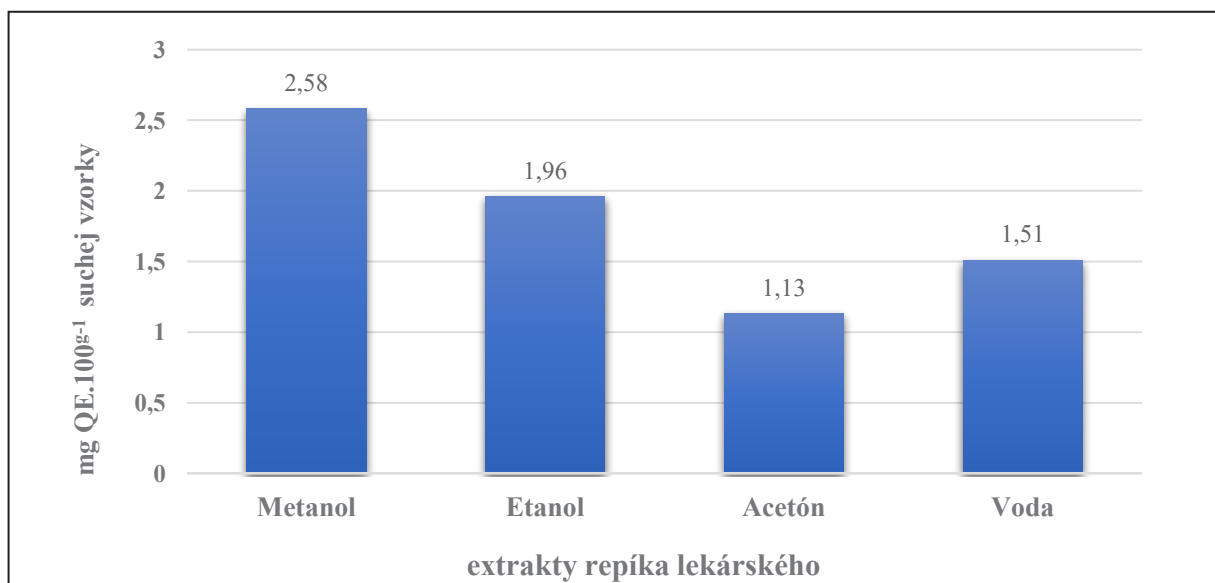
Pri vykonávaní testu akútnej imobilizácie a posudzovaní účinkov chemických látok na malé vodné kôrovce sme postupovali podľa najnovších usmerení OECD (Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj) z roku 2004. V imobilizačnom teste boli testovacím organizmom malé vodné kôrovce z rodu dafniotvaré (*Anomopoda*), konkrétne sladkovodné bezstavovce dafnie (*Daphnia* sp.), získané z prameňa Sv. Jána Nepomuckého na Hornom Bankove v Košiciach.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

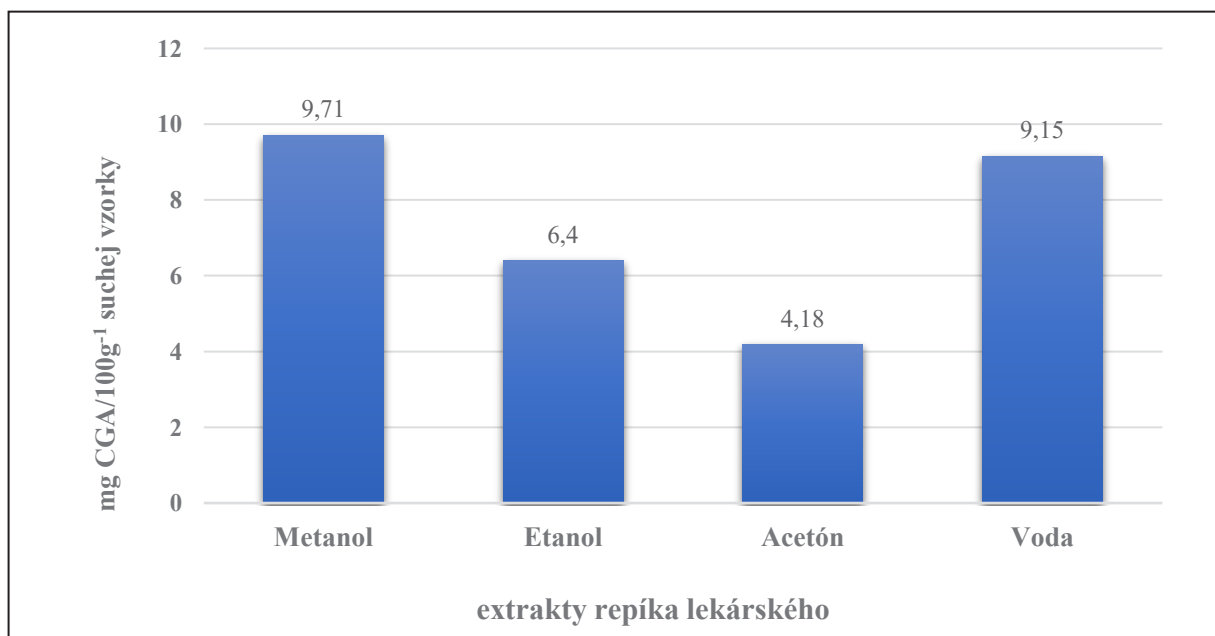
Obsah celkových polyfenolov

Obsah celkových polyfenolov bol vyjadrený na základe kalibračnej priamky kyseliny galovej (GAE) $y = 0,2007x + 0,033$ ($R^2 = 0,998$). Jednoznačne najvyšší obsah polyfenolov (18,54 mg GAE.100 g⁻¹ suchej vzorky) bol stanovený vo vodnom extrakte repíka lekárskeho. Naopak, len minimálny obsah polyfenolov (0,199 mg GAE.100 g⁻¹ suchej vzorky) sme stanovili v acetónovom extrakte repíka lekárskeho (viď obr. 1).

Obr. 2: Obsah celkových flavonoidov v extraktoch repíka lekárskeho



Obr. 3: Celkový obsah fenolických kyselín v extraktoch repíka lekárskeho



Obsah celkových flavonoidov

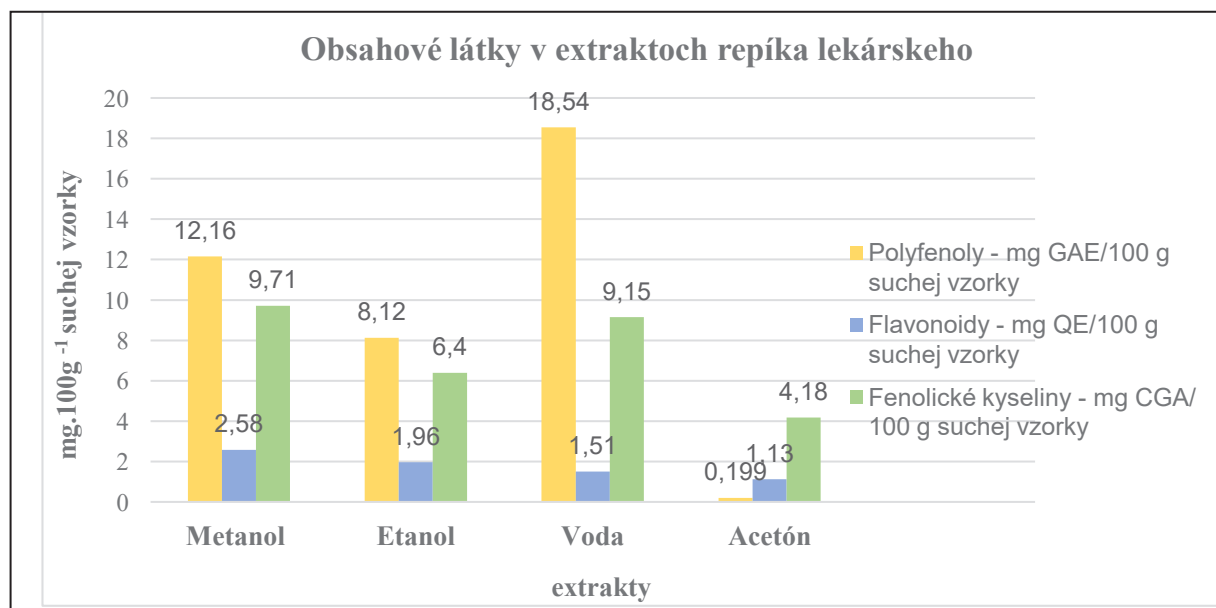
Obsah celkových flavonoidov ako ekvivalent kvercetínu (QE) sme vypočítali pomocou kalibračnej priamky kvercetínu $y = 2,3132x + 0,0059$ ($R^2 = 0,9989$). Najvyšší obsah flavonoidov (2,58 mg QE.100 g⁻¹ suchej vzorky) preukázal metanolový extrakt repíka lekárskeho. Naopak najnižší obsah (1,13

mg QE.100 g⁻¹ suchej vzorky) bol stanovený v acetónovom extrakte (vid' obr. 2).

Celkový obsah fenolických kyselín

Celkový obsah fenolických kyselín ako ekvivalent kyseliny chlorogénovej (CGA) sme vypočítali pomocou kalibračnej priamky CGA $y = 1,1744x +$

Obr. 4: Súborný graf o obsahových látkach v extraktoch repíka lekárskeho



0,0069 ($R^2 = 0,9991$). Najvyšší celkový obsah fenolických kyselín (9,71 mg CGA.100 g⁻¹ suchej vzorky) sme stanovili v metanолоvom extrakte. O niečo nižšie hodnoty (9,15 mg CGA.100 g⁻¹ suchej vzorky) sme namerali vo vodnom extrakte repíka lekárskeho. Najnižší celkový obsah fenolických kyselín preukázal acetónový extrakt (4,18 mg CGA.100 g⁻¹ suchej vzorky) (viď obr. 3).

Zo sumárneho obr. 4 vyplýva, že najvyššie hodnoty obsahových látok sme stanovili vo vodnom a metanолоvom extrakte a najnižšie v acetónovom extrakte. Zároveň môžeme vidieť, že z celkového množstva polyfenolov, ktoré sa podieľajú na antioxidačnej aktivite, sú flavonoidy zastúpené iba v malých množstvách.

Vyhodnotenie stanovenia antioxidačnej aktivity

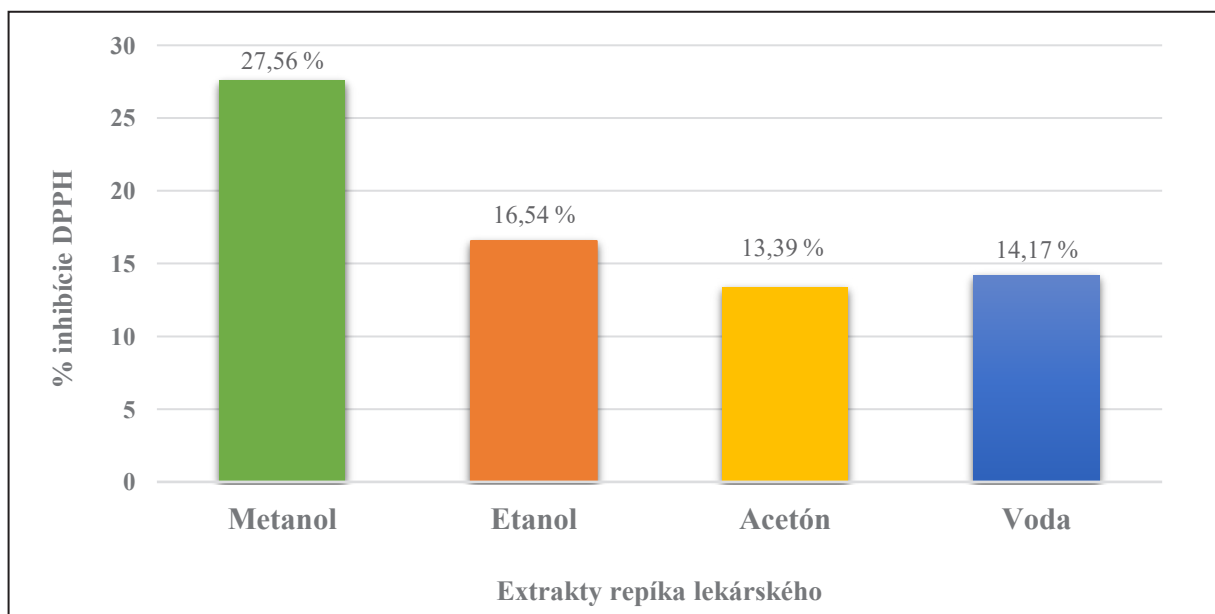
Pri stanovovaní antioxidačných schopností sme extrakty *Agrimonia eupatoria* L. museli niekoľkonásobne riediť. Dôvodom bola okamžitá redukcia DPPH radikálov neriedenými formami extraktov. Metanолоvý a etanолоvý extrakt sme riedili 10-krát, vodný extrakt bol riedený 25-krát. Účinok acetóno-

vého extraktu na antioxidačnú aktivitu sme testovali v nezriedenej forme. Vychytávaciu aktivitu štyroch extraktov repíka lekárskeho sme porovnávali so známou, radikály vychytávajúcou zlúčeninou Trolox (syntetický derivát vitamínu E). Antioxidačnú aktivitu sme vypočítali dosadením hodnôt absorbancie do rovnice kalibračnej priamky Troloxu $y = 0,3846x + 0,1276$ ($R^2 = 0,9991$).

Všetky testované extrakty v našom experimente preukázali antioxidačné účinky. Najvyššiu antiradikálovú (antioxidačnú) aktivitu stanovenú ako % redukcie DPPH preukázal metanолоvý extrakt repíka lekárskeho s vychytávacou aktivitou 27,56 %. Najnižšiu schopnosť vychytávania voľných radikálov DPPH mal acetónový extrakt – 13,39 % (viď obr. 5).

Ak porovnáваме vplyv extrakčných činidiel na výťažnosť extrakcie repíka lekárskeho s Muruzović a kol. (2016), potom zistíme, že autori preukázali najvyšší obsah flavonoidov (97,06 mg RUE.g⁻¹ – Rutin Equivalent) a polyfenolov (220,31 mg GA.g⁻¹) v acetónovom extrakte. Autori uvádzajú, že acetón je účinným extrakčným činidlom s nízkou toxicitou a má aj vysokú extrakčnú schopnosť. O po-

Obr. 5: Antioxidačná aktivita v extraktoch repíka lekárskeho



lovicu nižšie hodnoty obsahových látok stanovili v etanolovom a vodnom extrakte a najnižšie hodnoty v dietyléterovom extrakte. Naše výsledky sa nezhodujú s autormi ani pri porovnávaní antioxidačnej aktivity v jednotlivých extraktoch repíka lekárskeho. Kým autori potvrdili najvyššiu antioxidačnú aktivitu v acetónovom extrakte (od 27,73 % do 97,13 %); my sme preukázali hodnotu iba 13,38 %. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu sme preukázali v metanolovom extrakte (27,56 %).

Kubínová a kol. (2012) stanovovali antioxidačnú aktivitu 5 druhov z rodu *Agrimonia* (*A. coreana*, *A. japonica*, *A. procera*, *A. eupatoria*, *A. leucantha*). Najvyšší účinok pri inhibícii glukozidázy preukázali vo vodnom ($98,9 \pm 0,2$ %) a metanolovom extrakte ($94,2 \pm 1,7$ %). Metanolový extrakt obsahoval najvyššie hodnoty celkových flavonoidov. Naše namerané hodnoty sú zhodné s hodnotami autorov a potvrdzujú vzájomnú koreláciu medzi celkovým obsahom polyfenolov a antioxidačnou aktivitou.

Venskutonis, Škėmaitė, Ragažinskienė (2007) hodnotili antioxidačnú aktivitu vodného, acetónového, metanolového extraktu a ďalších rôznych kombinácií roztokov *Agrimonia eupatoria* L. a *Agrimonia proce-*

ra. Najvyššie percento vychytávania voľných radikálov DPPH (cca 65 %) preukázali vo vodnom roztoku repíka lekárskeho a najnižšiu aktivitu (cca 47 %) v metanolovom extrakte.

Keďže množstvo polyfenolických látok ovplyvňuje stupeň antioxidačnej aktivity, potom z našich zistení vyplýva, že na celkovom obsahu polyfenolov sa musia podieľať aj iné obsahové látky ako sme stanovili my. Rozdiely v antioxidačnej aktivite jednotlivých extraktov boli spôsobené odlišným zastúpením polyfenolov, ako aj ďalšími nepolyfenolickými antioxidačne pôsobiacimi látkami.

Z výsledkov ďalej vyplynulo, že na antiradikálovej aktivite extraktov vzoriek *Agrimonia eupatoria* L. sa z celkových polyfenolov podieľali flavonoidy iba malým percentom. Bolo by vhodné vo výskume pokračovať a identifikovať aj ďalšie skupiny fenolických látok v extraktoch. Na obsah celkových polyfenolov v rastline najviac vplýva odroda a agroekologické podmienky prirodzeného výskytu, termín zberu a spôsob úpravy drogy. Extrakciu drogy repíka lekárskeho a uvoľňovanie jednotlivých obsahových látok do extraktu ovplyvňuje okrem rozpúšťadla aj zloženie vzorky, ktorá je heterogénna a tvorili ju listy,

stonka a kvety v rôznom pomere. Schopnosť vychytávania radikálov je ovplyvnená polaritou rozpúšťadiel použitých v procese extrakcie. Vo všeobecnosti sú polárne rozpúšťadlá účinnejšie.

Spomedzi všetkých rastlín rodu *Agrimonia* má najvyššiu antioxidačnú kapacitu metanolový extrakt,

ktorý má najvyšší obsah bioflavonoidov (Paluch, 2020).

Súčasťou experimentu bolo *in vitro* testovanie toxicity extraktov na sladkovodné dafnie. Vplyv extraktov na prežívanie dafnií uvádzame v tabuľkách (viď tab. 1 – 4).

Vplyv vodného extraktu repíka lekárskeho na toxicitu

Tab. 1: Vplyv vodného extraktu repíka lekárskeho na prežívateľnosť dafnií

Koncentrácia (mg.l ⁻¹)	24 hodín		48 hodín	
	1,0	30,0	1,0	30,0
Nepohyblivé živé (%)	0	10	0	10
Mŕtve (%)	0	10	20	20
Negatívny vplyv (%)	0	20	20	30
Výsledok (mg.l ⁻¹)				
EC ₅₀	> 30,0 ^e		> 30,0 ^e	
LC ₅₀	> 30,0 ^e		> 30,0 ^e	
NOEC	1,0		< 1,0	

^e Probitova aj Potilovej interpolačná štatistická analýza odhadli toxicitu nad 1000 mg.l⁻¹

EC₅₀ – koncentrácia, ktorá spôsobila 50 % negatívne ovplyvnenie sledovanej populácie

LC₅₀ – koncentrácia, ktorá spôsobila 50 % úhyn v sledovanej populácii

NOEC – koncentrácia, ktorá spôsobila max.10 % negatívne ovplyvnenie sledovanej populácie

Vplyv acetónového extraktu repíka lekárskeho na toxicitu

Tab. 2: Vplyv acetónového extraktu repíka lekárskeho na prežívateľnosť dafnií

Koncentrácia (mg.l ⁻¹)	24 hodín		48 hodín	
	1,0	30,0	1,0	30,0
Nepohyblivé živé (%)	10	0	20	10
Mŕtve (%)	10	60	10	90
Negatívny vplyv (%)	20	60	30	100
Výsledok (mg.l ⁻¹)				
EC ₅₀	9,7 (CI: 0,6 – 147,3) ^ε 7,9 (CI: 0,7 – 94,7)*		3,5 (CI: 1,8 – 7,3) ^ε N.V.*	
LC ₅₀	15,2 (CI: 2,5 – 91,7) ^ε 17,1 (CI: 4,2 – 69,3)*		5,5 (CI: 3,0 – 9,9) ^ε 5,5 (CI: 2,2 – 14,8)*	
NOEC	< 1,0		< 1,0	

* Probitova štatistická analýza

^ε Potilovej interpolačná štatistická analýza

CI – interval spoľahlivosti (Confidential Interval)

N.V. – použitá štatistická metóda nedokáže vypočítať hodnotu

Vplyv etanolového extraktu repíka lekárskeho na toxicitu

Tab. 3: Vplyv etanolového extraktu repíka lekárskeho na prežívateľnosť dafnií

Koncentrácia (mg.l ⁻¹)	24 hodín		48 hodín	
	1,0	30,0	1,0	30,0
Nepohyblivé živé (%)	10	10	10	20
Mŕtve (%)	0	50	10	70
Negatívny vplyv (%)	10	60	20	90
Výsledok (mg.l ⁻¹)				
EC ₅₀	15,2 (CI: 2,5 – 91,7) [£] 17,1 (CI: 4,2 – 69,3)*		4,3 (CI: 1,8 – 10,1) [£] 3,8 (CI: 1,3 – 11,9)*	
LC ₅₀	29,9 (CI: 3,1 – 289,6) [£] N.V.*		9,7 (CI: 2,9 – 32,5) [£] 11,2 (CI: 3,3 – 37,8)*	
NOEC	1,0		< 1,0	

Vplyv metanolového extraktu repíka lekárskeho na toxicitu

Tab. 4: Vplyv metanolového extraktu repíka lekárskeho na prežívateľnosť dafnií

Koncentrácia (mg.l ⁻¹)	24 hodín		48 hodín	
	1,0	30,0	1,0	30,0
Nepohyblivé živé (%)	0	10	0	10
Mŕtve (%)	0	0	10	10
Negatívny vplyv (%)	0	10	10	20
Výsledok (mg.l ⁻¹)				
EC ₅₀	> 30,0 [£]		> 30,0 [£]	
LC ₅₀	> 30,0 [£]		> 30,0 [£]	
NOEC	30,0		1,0	

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať, že spomedzi štyroch testovaných extraktov *Agrimonia eupatoria* L. bol vodný a metanolový extrakt najbezpečnejší (nejavili známky toxicity) pre dafnie. Potenciálna toxicita týchto extraktov by sa na základe štatistického vyhodnotenia prejavila až pri vysokých koncentráciách (> 1000 mg.l⁻¹). Acetónový a etanolový extrakt toxicitu preukázal už pri nízkych koncentráciách (7,9 mg.l⁻¹ a 15,2 mg.l⁻¹ pri 24-hodínovej expozícii acetónovému a etanolovému extraktu repíka lekárskeho; 3,5 mg.l⁻¹ a 3,8 mg.l⁻¹ pri 48-hodínovej expozícii rovnakým extraktom).

V dostupnej literatúre je zmienka len o jednej cieľenej štúdií na zistenie toxicity extraktov rodov *Agrimonia* a *Filipendula*, a z výsledkov vyplynulo, že

extrakty možno v laboratórnych podmienkach klasifikovať ako nemutagénne a neklastogénne (Pukalskiene, 2018).

ZÁVER

V experimente sme potvrdili, že repík lekárskeho obsahuje polyfenoly, flavonoidy a fenolické kyseliny. Zistili sme, že extrakčné činidlá majú vplyv na celkový obsah polyfenolov, flavonoidov a fenolické kyseliny. Najvyšší celkový obsah polyfenolov sme stanovili vo vodnom extrakte repíka lekárskeho (18,54 mg GAE.100 g⁻¹ suchej vzorky). Najvyšší obsah celkových flavonoidov sme stanovili v metanolovom extrakte repíka lekárskeho (2,58 mg QE.100 g⁻¹

suchej vzorky). Najvyšší obsah fenolických kyselín bol prítomný v metanolovom extrakte repíka lekárskeho (9,71 mg CGA. 100 g⁻¹ suchej vzorky). Najnižšie hodnoty obsahových látok sme stanovili v acetónovom extrakte repíka lekárskeho (polyfenoly 0,199 mg GAE.100 g⁻¹ suchej vzorky, flavonoidy 1,13 mg QE.100 g⁻¹ suchej vzorky a fenolické kyseliny 4,18 mg CGA.100 g⁻¹ suchej vzorky). Všetky testované extrakty (metanolový, etanolový, vodný, acetónový) z repíka lekárskeho sú schopné chrániť bunky a tkanivá pred oxidačným poškodením cestou vychytávania voľných radikálov. Metanolový extrakt s obsahom 0,93 mg.100g⁻¹ suchej vzorky vykazoval najvyššiu aktivitu vychytávania DPPH radikálov (27,56 %). Najnižšiu vychytávaciu schopnosť mal acetónový extrakt repíka lekárskeho (13,39 %). Pri sledovaní toxicity jednotlivých extraktov *Agrimonia eupatoria* L. na malé sladkovodné kôrovce *Daphnia* sp. sme zistili, že najbezpečnejší je vodný a metanolový extrakt. Potenciálnu toxicitu by na základe štatistického vyhodnotenia prejavili až pri koncentráciách > 1000 mg.l⁻¹. Acetónový a etanolový extrakt preukázal toxicitu už pri nízkych koncentráciách (7,9 mg.l⁻¹ a 15,2 mg.l⁻¹ pri 24-hodinovej; 3,5 mg.l⁻¹ a 3,8 mg.l⁻¹ pri 48-hodinovej expozícii). Získané výsledky poukazujú na potrebu ďalšieho výskumu ohľadom hodnotenia toxicity extraktov repíka lekárskeho a naše výsledky môžu poslúžiť ako podklad k rozšírenějšímu skúmaniu. Napokon je potrebné zdôrazniť, že rastlinné drogy sú heterogénne látky, ktoré ovplyvňujú výťažnosť extrakcie. Okrem toho extrakčné činidlo a extrakčná metóda majú významný vplyv na množstvo prítomných extrahovaných obsahových látok z repíka lekárskeho.

ZOZNAM LITERATÚRY

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

Al-Snafi, A. E: The pharmacological and therapeutic importance of *Agrimonia eupatoria* – a review. *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, 2015, 5 (2), 112 – 117.

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

Garcia-Oliveira, P., Fraga-Corral, M., Pereira, A. G., Lourenço-Lopes, C., Jimenez-Lopez, C., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J.: Scientific basis for the industrialization of traditionally used plants of the *Rosaceae* family. *Food Chemistry*, 2020, 330, 1 – 16. Doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127197.

Karlińska, E., Romanowska, B., Kosmala, M.: The aerial parts of *Agrimonia procera* Wallr. and *Agrimonia eupatoria* L. as a source of polyphenols, and especially agrimoniin and flavonoids. *Molecules*, 2021, 26 (24), 1 – 21. Doi: 10.3390/molecules26247706.

Kubínová, R., Jankovská, D., Bauerová, V.: Antioxidant and α -glucosidase inhibition activities and polyphenol content of five species of *Agrimonia* genus. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 2012, 2, 38 – 41.

Lamaison, J. L., Carnat, A.: The amount of main flavonoids in flowers and leaves of *Crataegus Monogyna* Jacq. and *Crataegus Laevigata* (Poiret) DC. (*Rosacea*). *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 1990, 65, 315 – 320.

Muruzović, M. Ž., Mladenović, K. G., Stefanović, O. D., Vasić, S. M., Čomić, L. R.: Extracts of *Agrimonia eupatoria* L. as sources of biologically active compounds and evaluation of their antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activities. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2016, 24 (3), 539 – 547. Doi: 10.1016/j.jfda.2016.02.007.

Organisation For Economic Co-Operation And Development (OECD). *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*, 2004. 12 p. https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264069947_en.pdf?expires=1647363758&id=id&accname

=guest&checksum=77D50A2F77624456A68C0344F29F8337. Accessed March 15, 2022.

Paluch, Z., Biriczová, L., Pallag, G., Carvalho Marques, E., Vargová, N., Kmoníčková, E.: The therapeutic effects of *Agrimonia eupatoria* L. *Physiological Research*, 2020, 69 (4), S555 – S571. Doi: 10.33549/physiolres.934641.

Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R.: Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 2016, 5 (47), 1 – 15. Doi:10.1017/jns.2016.41.

Pour, M. G., Mirazi, N., Moradkhani, S., Rafieian-Kopaei, M., Rahimi-Madiseh, M. A.: Comprehensive review on phytochemical, pharmacological and therapeutic properties of *Agrimonia eupatoria* L. *Journal of Herbmed. Pharmacology*, 2021, 10 (1), 14 – 30. Doi: 10.34172/jhp.2021.02.

Pukalskienė, M., Slapšytė, G., Dedonytė, V., Lazutka, J. R., Mierauskienė, J., Venskutonis, P. R.: Genotoxicity and antioxidant activity of five *Agrimonia* and *Filipendula* species plant extracts evaluated by comet and micronucleus assays in human lymphocytes and Ames *Sallmonella* / microsome test. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 113, 303 – 313. Doi: 10.1016/j.fct.2017.12.031.

Sadeer, N. B., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., Mahomoodally, M. F.: The versatility of antioxidant assays in Food Science and Safety – Chemistry, applications, strenghts, and limitations. *Antioxidants*, 2020, 9 (8), 709. Doi: 10.3390/antiox9080709.

Santos, T. N, Costa, G., Ferreira, J. P., Liberal, J., Francisco, V., Paranhos, A., Cruz, M. T., Castelo-Branco, M., Figueiredo, I. V., Batista, M. T.: Antioxidant, anti-inflammatory, and analgesic activities of *Agrimonia eupatoria* L. infusion. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1 – 13. Doi: 10.1155/2017/8309894.

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

Venskutonis, P. R., Skemaite, M., Ragazinskiene, O.: Radical scavenging capacity of *Agrimonia eupatoria* and *Agrimonia procera*. *Fitoterapia*, 2007, 78, 166 – 168. Doi: 10.1016/j.fitote.2006.10.002.



AKTUÁLNE MOŽNOSTI FARMAKOTERAPIE MIGRÉNY NA SLOVENSKU CURRENT OPTIONS OF MIGRAINE PHARMACOTHERAPY IN SLOVAKIA

Fedorová, Monika¹; Pokrivčáková, Ivana², Štempeľová, Iveta^{1,3}

¹Katedra lekárenstva a sociálnej farmácie

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

²Lekáreň ISIS, Spišské námestie 4, 040 01 Košice

Slovenská republika

³Ústav aplikovanej farmácie

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

Česká republika

monika.fedorova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Migréna je neurologické ochorenie, patriace medzi primárne bolesti hlavy, ktoré môže výrazne ovplyvňovať kvalitu pracovného alebo osobného života ľudí, ich každodenné aktivity. Štúdia stručne popisuje aktuálne možnosti farmakologickej terapie migrény na Slovensku. Celkovo máme v registrovaných liekoch indikovaných na profylaxiu a/alebo terapiu migrény 23 liečiv (okrem liečiv v kombinácii), z ktorých je 48 % indikovaných pri akútnom záchvate migrény a 52 % pri profylaxii migrény. Modernú profylaktickú liečbu predstavujú monoklonálne protilátky (erenumab, galkanezumab, fremanezumab, eptinezumab), ktorých mechanizmus účinku spočíva v ovplyvnení CGRP receptora. Eptinezumab bol u nás registrovaný v januári 2022.

Kľúčové slová: CGRP; farmakologická liečba; migréna; Slovensko

ABSTRACT

Migraine is a neurological disease that is part of primary headaches and it can have an impact on the quality of work and personal life, and everyday activities. The study deals with the actual possibilities of pharmacological treatment of migraine in the Slovak republic. There are 23 drugs registered in migraine prophylaxis and/or migraine therapy (except for drug combination therapy). 48 % of registered drugs are indicated for the treatment of acute migraine attacks and 52 % of registered drugs are indicated for migraine prophylaxis. Mechanism of action of monoclonal antibodies (erenumab, galkanezumab, fremanezumab, eptinezumab, eptine-

zumab), which are modern prophylactic therapy, include the influence of CGRP receptor. Eptinezumab was registered in the Slovak republic in January 2022.

Keywords: CGRP; migraine; pharmacological treatment; Slovakia

ÚVOD

Migréna je celosvetovo rozšírené ochorenie, ktoré postihuje 12 % populácie na celom svete, približne 17 % žien a 6 % mužov. Prevalencia migrény sa zvyšuje v puberte až do 35 – 39. roku života, neskôr v živote klesá, hlavne po menopauze. Pravdepodobnosť migrény je trikrát vyššia u ľudí, ktorí majú ochorenie v rodine (Ruschel a Jesus, 2021). U obidvoch pohlaví je v 75 % prípadov nástup migrény pred dosiahnutím veku 35 rokov. Migréna je celosvetovo hlavnou príčinou invalidity u osôb mladších ako 50 rokov (najmä u žien) (Ashina, M. a kol., 2021b).

Príčinami migrény sú rôzne neovplyvniteľné (genetika, pohlavie, vek) a ovplyvniteľné (stres, deficit spánku, hypoxia, silné svetlo a zvuky, hormonálne zmeny, potrava) spúšťacie faktory, o ktorých sa predpokladá, že majú aditívny účinok a spôsobujú atak len vtedy, keď nadobudnú prahovú hodnotu (Golden, 2019; Gross a kol., 2019). Migréna je viacerými autormi opisovaná ako odpoveď na deficit mozgovej energie alebo škodlivé úrovne oxidačného stresu. Dôkazy naznačujú, že atak pomáha obnoviť homeostázu mozgovej energie a znižuje oxidačné úrovne stresu (Gross a kol., 2019).

Migréna sa prejavuje jednostrannými epizodickými bolesťami hlavy stredne silnej až veľmi silnej intenzity, trvajúcimi niekoľko hodín až dní. Môže byť sprevádzaná nauzeou, vracaním, fotofóbiou, fonofóbiou alebo abdominálnymi komplikáciami. Asi u 30 % pacientov samotnej bolesti hlavy pri migréne predchádza aura (migréna s aurou), najčastejšie zrková aura (škvrny, bodky, záblesky), potom senzitivná (parestézia, dyzestézia). Menej časté sú rečové a motorické poruchy. O chronickej migréne hovoríme, ak bolesť

hlavy trvá aspoň 15 dní v mesiaci, z ktorých aspoň 8 záchvatov má charakter migrény bez alebo s aurou (Klečka, 2019).

Farmakologická liečba migrény sa delí na akútnu terapiu migrény a profylaxiu. V súčasnosti sa pri akútnej terapii migrény používajú špecifické antimigreniká – triptány alebo nešpecifické liečivá – analgetiká, nesteroidné antiflogistiká a antiemetiká, zmierňujúce alebo odstraňujúce aj iné bolesti. Pri preventívnej liečbe migrény je dôležité zvážiť komorbiditu a vek pacienta, a tak vybrať adekvátne liečivo. Na Slovensku sú dostupné β -blokátory, antiepileptiká, antidepresíva, onabotulotoxín A, monoklonálne protilátky a iné liečivá, ktorých cieľom je zvýšiť efekt akútnej liečby a zamedziť rozvoju migrény.

MATERIÁL A METÓDY

Prehľad aktuálnej farmakologickej terapie migrény na Slovensku sme zisťovali na stránke Štátneho ústavu pre kontrolu liečiv (ŠÚKL). Vyhľadali sme všetky liečivá s ATC kódom N02C (Antimigreniká) a liečivá z iných ATC skupín, ktoré boli popisované v odbornej literatúre na terapiu a/alebo profylaxiu migrény. Následne sme prešli súhrny charakteristických vlastností liekov (SPC, resp. SmPC), pričom do prehľadu sme vybrali len tie liečivá, ktoré v rámci kapitoly „indikácie“ spĺňali podmienku – terapia a/alebo profylaxia **migrény**. Na základe informácií uvádzaných v SPC a v odbornej literatúre sme popisali farmakologickú terapiu migrény u dospelých, pričom sme sa venovali len liečivám nachádzajúcim sa v registrovaných liekoch na Slovensku. Prehľad liečiv bol spracovaný k 5. marcu 2022.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Farmakologická terapia migrény sa vo všeobecnosti člení na akútnu a preventívnu liečbu. Pri voľbe liečiva zohľadňujeme charakteristiku záchvatu migrény, súčasne prebiehajúce iné zdravotné problémy pacienta a výhody liečby (Ong a Felice, 2018). Celkovo máme na Slovensku podľa ATC kódov re-

gistrovaných 23 liečiv (okrem liečiv v kombinácii, ktoré sa vyskytovali 8-krát) indikovaných na profylaxiu a/alebo terapiu migrény, z toho 48 % liečiv je indikovaných pri akútnom záchvate migrény a 52 % pri profylaxii migrény.

Akútna terapia

Úspešnú akútnu liečbu charakterizujeme neprítomnosťou bolesti a príznakov spätých s migrénou (vracanie, nevoľnosť, fotofóbia či fonofóbia) do 2 hodín po užití liečiva (Ashina a kol., 2021a).

V súčasnosti sa pri akútnej terapii uplatňuje „stratifikovaný“ prístup (výber terapie v závislosti od závažnosti bolesti hlavy a symptómov), ktorý mal v istej randomizovanej, kontrolovanej štúdii vyššiu úspešnosť v porovnaní so stupňovitou stratégiou liečby (terapia začína jednoduchým analgetikom, pri neúspechu sa podávajú špecifické antimigreniká) (Ong a Felice, 2018; Ashina a kol., 2021a).

Nešpecifická liečba

V liečbe akútnych stavov spojených s bolesťou hlavy sú prvou voľbou analgetiká – **paracetamol** (500 – 1000 mg), ktorý je KI pri ochorení pečene a zlyhaní obličiek (ŠÚKL, 2019b), NSAID – **ibuprofén** (400 – 800 mg), **diklofenak** (50 – 100 mg) podávané s opatrnosťou vo veku nad 65 rokov, pri gastrointestinálnych, kardiovaskulárnych, renálnych a pečeno-vých ochoreniach (Gdovinová, 2021). Tiež sa používajú kombinácie liečiv, napr. paracetamol s kyselinou acetylsalicylovou a kofeínom. Kofeín znižuje čas potrebný na dosiahnutie analgetického pôsobenia obidvoch liečiv a zároveň zvyšuje ich analgetický účinok (ŠÚKL, 2020a). Výhodné je podávanie šumivých tabliet a granulátov – ibuprofén, paracetamol v kombinácii s kofeínom pre rýchlejšie dosiahnutie účinku (Novotná, 2019). Okrem vyššie spomínaných liečiv je možné použitie aj ďalších liečiv zo skupiny NSAID – **flurbiprofén**, **naproxén**, **ketoprofén** (ŠÚKL, 2018b; ŠÚKL, 2019a; ŠÚKL, 2020b). Ak je migréna spáta s nauzeou a vracaním, podávajú sa antiemetiká – **metoklopramid** (10 mg) ako monoterapia alebo v kombinácii (s NSAID, analgetikami

a triptánmi) (Lew a Punnapuzha, 2021). Pri akútnej migréne či histamínovej cefalgii (bolesti hlavy cievneho pôvodu) je zo skupiny antihistaminík na systémové použitie podľa SPC indikovaný aj **cypheptadín** (ŠÚKL, 2021i). Viacerí autori uvádzajú v rámci akútnej terapie migrény aj kyselinu acetylsalicylovú (Ashina a kol., 2021a; Gdovinová, 2021), ktorá nemá v SPC v rámci indikácie uvedenú konkrétne „migrénu“, ale len všeobecne „bolesť hlavy“.

Špecifická liečba

Špecifickou skupinou na liečbu akútnej migrény s/ bez aury vo fáze bolesti hlavy u dospelých sú triptány (viď tab. 1), ktorých pôsobenie vedie k vazokonstrikcii mozgových ciev, inhibíciou produkcie vazoaktívnych neuropeptidov a blokádou prenosu impulzov bolesti do mozgu (Nicolas a Nicolas, 2021). U nás sú registrované 4 triptány – **sumatriptán**, **rizatriptán**, **eletriptán** a **frovatriptán**. Podávajú sa na začiatku fázy bolesti hlavy, pretože ak sa podajú počas fázy aura, sú neúčinné. Ak prvá dávka bola účinná, ale príznaky sa opäť vrátili, druhá dávka sa má užiť počas nasledujúcich 24 hodín (potrebný 2 hod odstup). Nepodávajú sa pacientom s bazilárnou a hemiplegickou migrénou (Nicolas a Nicolas, 2021; ŠÚKL, 2021h).

Sumatriptán má ako jediný z triptánov 3 cesty podania – perorálna, parenterálna a nazálna. V liekovej forme nosového spreja sa môže indikovať aj deťom od 12 rokov. Frovatriptán je liečivo s dlhším biologickým polčasom, preto ho volíme pri rekurentných bolestiach hlavy. Triptány s kratším biologickým polčasom – sumatriptán, rizatriptán, eletriptán majú rýchlejší nástup účinku, to znamená, že po ich užití ustúpi bolesť hlavy do 2 hodín.

Triptány sú kontraindikované pri hypertenzii, cerebrovaskulárnych, kardiovaskulárnych ochoreniach a nedostatočnosti pečene. Rizatriptán a eletriptán užívame s opatrnosťou pri poruchách obličiek, neužívajú sa spolu s triptánmi, liekmi obsahujúcimi ergotamín alebo jeho deriváty. Sumatriptán a rizatriptán sa neužívajú súčasne alebo do 2 týždňov od prerušenia liečby IMAO, nepodávajú sa spolu s SSRI a SNRI (ŠÚKL, 2021e; ŠÚKL, 2021f; ŠÚKL, 2021h).

Tab. 1: Triptány

Liečivo (ATC kód)	Rx/ OTC	Jednorazová dávka (mg)	LF	T ½	Gravidita/ dojčenie	Zdroj
sumatriptán (N02CC01)	Rx	50/100	tbl	2 h	ak prínos pre matku > ako riziko pre plod / prerušenie dojčenia 12 h po liečbe	A; B; C
		6	sol inj			
		20	aer nas			
rizatriptán (N02CC04)	Rx	10	tbl oro, lyo por	2 – 3 h	v nevyhnutných prípadoch / prerušenie dojčenia 24 h po liečbe	D; E
eletriptán (N02CC06)	Rx	40	tbl flm	4 h		F
frovatriptán (N02CC07)	Rx	2,5	tbl flm	26 h	neodporúča sa / prerušenie dojčenia 24 h po liečbe	G

LF – lieková forma, T ½ – biologický polčas, Rx – liek viazaný na lekársky predpis, OTC – liek neviazaný na lekársky predpis, tbl – tablety, sol inj – injekčný roztok, aer nas – nosová aerodisperzia, tbl oro – orodispergovateľná tableta, lyo por – perorálny lyofilizát, tbl flm – filmom obalená tableta, h – hodina, A – ŠÚKL, 2020a, B – ŠÚKL, 2021b, C – ŠÚKL, 2021c, D – ŠÚKL, 2021f, E – ŠÚKL, 2021d, F – ŠÚKL, 2021e, G – ŠÚKL, 2021a

Tab. 2: Monoklonálne protilátky

Liečivo (ATC kód)	Rx/ OTC	Dávka (mg)	LF	T ½	Gravidita/ dojčenie	Zdroj
erenumab (N02CD01)	Rx	70 – 140 mg/mesiac	sol inj	28 d	vyhnúť sa užívaniu / iba ak je to z klinického hľadiska potrebné	A
galkanezumab (N02CD02)	Rx	120 mg/mesiac, počiatočná nasycovacia dávka 240 mg	sol inj	27 d		B
fremanezumab (N02CD03)	Rx	225 mg/mesiac alebo 675 mg/štvrtročne	sol inj	30 d		C
eptinezumab (N02CD05)	Rx	100 mg/12 týždňov	con inf	27 d		D

LF – lieková forma, T ½ – biologický polčas, Rx – liek viazaný na lekársky predpis, OTC – liek neviazaný na lekársky predpis, sol inj – injekčný roztok, con inf – infúzny koncentrát, d – deň, A – EMA, 2021a, B – EMA, 2021b, C – EMA, 2020a, D – EMA, 2022

Preventívna terapia

Preventívna liečba sa môže posúdiť u pacientov s migrénou, u ktorých bolesť hlavy trvá minimálne 6 dní v mesiaci alebo za ďalších individuálnych okolností, ako napríklad opätovné ataky migrény (častejšie ako 2 až 3-krát za mesiac), závažné záchvaty, ktoré ovplyvňujú bežné aktivity, atak trvajúci viac ako 48 hodín, neúčinná alebo kontraindikovaná akútna liečba, tiež ak túto terapiu preferuje pacient (Donáth, 2003; Golden, 2019). Cieľom tejto liečby je zmiernenie intenzity ataku a skrátenie jeho trvania, zvýšenie účinnosti akútnej terapie a zabránenie rozvoju epizodickej migrény (Niedermayerová, 2020).

Pri voľbe adekvátneho medikamentu sa dôraz kladie na komorbidity a vek pacienta (Novotná, 2019). Profylaktická liečba sa začína nízkou dávkou, zvyšujúcou sa až do dosiahnutia terapeutického účinku (Loder a Rizzoli, 2018). O úspešnej profylaxii hovoríme vtedy, keď počet záchvatov zredukujeme o 50 % (Niedermayerová, 2020).

Na preventívnu liečbu migrény sú na Slovensku registrované β -blokátory (**metoprolol**), antivertiginóza (**cinarizín**), antikonvulzíva (**topiramát**), antidepresíva (**amitriptylín**), antimigreniká (**pizotifén**), ktorých výdaj je viazaný na lekársky predpis a NSAID (**naproxén** 275 mg 2 – 3 x denne, pacienti nad 65 rokov max 500 mg/deň) (ŠÚKL, 2019a); ktorého výdaj nie je viazaný na lekársky predpis. Metoprolol (100 – 200 mg/deň) sa dávkuje postupne (vyhnutie sa bradykardii a hypotenzii) s opatnosťou u pacientov s astmou a u športovcov (ŠÚKL, 2018a). Cinarizín (75 mg 3 x denne) sa užíva po jedle, aby sme znížili možnosť iritácie žalúdka (ŠÚKL, 2021g). Topiramát (50 – 100 mg/deň) má závažné nežiaduce účinky, ako je depresia, somnolencia, zníženie kognitívnych funkcií (ŠÚKL, 2019c). Amitriptylín (25 – 75 mg/deň) môžeme indikovať u pacientov, ktorí trpia súčasne migrénou a depresiou alebo poruchou spánku (Ashina a kol., 2021a). Za účinnú sa považuje tiež liečba **onabotulotoxínom A** (OBTA) (155 – 195 U/12 týždňov), dokonca je lepšie tolerovaná ako iné lieky na prevenciu migrény (Becker, 2020). V porovnávacjej štúdii s topiramátom z roku 2019 odstúpilo od tera-

pie OBTA 1 % pacientov z dôvodu NÚ, na rozdiel od liečby topiramátom, kde odstúpilo od liečby až 42 % pacientov (Rothrock a kol., 2019). Iná placebom kontrolovaná štúdia tvrdí, že OBTA znížila trvanie bolesti hlavy o 39 hodín za mesiac (Becker, 2020).

Na profylaxiu boli nedávno vyvinuté monoklonálne protilátky (MAB) proti receptoru CGRP (peptid génovo príbuzný kalcitonínu, angl. calcitonin gene-related peptid). Predpokladá sa, že majú okrajový účinok na trigeminovaskulárny systém, pretože v dôsledku veľkej molekulovej hmotnosti neprejdú cez hematoencefalickú bariéru (HEB) (Zhao a kol., 2020). MAB sú imunoglobulíny priamo blokujúce CGRP receptor alebo jeho ligand. Vedľajšie účinky sú zriedkavé (Bártková, 2019; Zhao a kol., 2020). Indikujú sa pri profylaxii migrény u dospelých, ktorí ňou trpia minimálne 4 dni za mesiac. Majú dlhý biologický polčas 27 – 30 dní, čiže sa podávajú jedenkrát mesačne alebo zriedkavejšie. Aktuálne sú na Slovensku registrované 4 MAB (viď tab. 2) – **erenumab**, **gal-kanezumab**, **fremanezumab** a **eptinezumab** (registrovaný v januári 2022), z toho 3 sú kategorizované (okrem eptinezumabu). Pre úhradu z verejného zdravotného poistenia je potrebné splnenie preskripčného obmedzenia (neuroológ), indikačného obmedzenia a je potrebný predchádzajúci súhlas zdravotnej poisťovne. Za vyhovujúceho pacienta je považovaný ten, kto trpí migrénou aspoň 8 dní v mesiaci, spĺňa kritériá podľa odporúčaní Európskej federácie bolesti hlavy (EHF) pre nástup preventívnej terapie migrény a jeho predchádzajúca terapia najmenej 3 liečivami bola neúspešná (neúčinná, KI, výskyt NÚ, intolerancia). Ak sa nedosiahne zníženie počtu dní s migrénou minimálne o polovicu (50 %) po 3 mesiacoch od začatia indikácie alebo po prehodnotení liečby (každých 6 mesiacov) v porovnaní so situáciou pred začatím terapie s MAB, potom nasledujúca liečba nie je hrazenou liečbou (Gdovinová, 2021; MZ SR, 2022).

Z tradičných rastlinných liekov na zmiernenie bolesti hlavy pri migréne sa môže použiť Rimbaba obyčajná [*Tanacetum parthenium* (L.)], ktorá sa u nás nachádza ako súčasť výživových doplnkov a nie liekov. Výbor pre rastlinné lieky (HMPC, angl. Committee

on Herbal Medicinal Products) uvádza, že sa môže užívať ako bylinný liek pri prevencii migrény u dospelých po vylúčení istých komplikácií lekárom. Pre viditeľné výsledky sa má užívať aspoň 2 mesiace. Ak nedochádza k ústupu migrény, alebo sa stav pacienta zhorší, je potrebná konzultácia s lekárom (EMA, 2020b).

ZÁVER

Migréna patrí medzi najčastejšie typy bolesti hlavy. V súčasnosti máme veľa možností farmakologickej terapie migrény. Výber správneho lieku vhodného pre daného pacienta je individuálny a závisí na zvažovaní priebehu a frekvencii záchvatu, komorbidít pacienta, prípadne posúdení informácií o užívaných, resp. užívaných liekoch. Medzi novšie liečivá zaradujeme monoklonálne protilátky (erenumab, galkanezumab, fremanezumab) pôsobiace proti receptoru CGRP. Pre ich úhradu z verejného zdravotného poistenia je potrebný predchádzajúci súhlas zdravotnej poisťovne a musia byť splnené indikačné a preskripčné obmedzenia (lekársky predpis/preskripčný záznam od neurológa). Novinkou u nás je registrácia lieku s obsahom eptinezumabu od januára 2022.

ZOZNAM LITERATÚRY

Ashina, M., Buse, D. C., Ashina, H., Pozo-Rosich, P., Peres, M. F. P., Lee, M. J., Terwindt, G. M., Singh, R. H., Tassorelli, C., Do, T. P., Mitsikostas, D. D., Dodick, D. W.: Migraine: integrated approaches to clinical management and emerging treatments. *Lancet*, 2021a, 397, 1505 – 1518. [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)32342-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)32342-4/fulltext). Accessed October 23, 2021.

Ashina, M., Katsarava, Z., Do, T. P., Buse, D. C., Pozo-Rosich, P., Özge, A., Krymchantowski, A. V., Lebedeva, E. R., Ravishankar, K., Yu, S., Sacco, S., Ashina, S., Younis, S., Steiner, T. J., Lipton, R. B.: Migraine: epidemiology and systems of care. *Lancet*, 2021b, 397, 10 283, 1485 – 1495.

[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)321607/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)321607/fulltext). Accessed October 23, 2021.

Bártková, A.: Akutní a profylaktická terapie migrény [Acute and preventive migraine treatment]. *Praktické lékařství*, 2019, 15 (4), 208 – 212. <https://solen.cz/pdfs/lek/2019/04/04.pdf>. [cit. 2021-01-27].

Becker, W. J.: Botulinum toxin in the treatment of headache. *Toxins*, 2020, 12, 803. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7766412/>. Accessed October 7, 2021.

Donáth, V.: Preventívna liečba migrény [Preventive migraine treatment]. *Neurologie pro praxi*, 2003, 2, 63 – 66. <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2003/02/04.pdf>. [cit. 2021-01-26].

EMA (SmPC): *Aimovig*. Kód lieku: 1559D, reg. č. EU/1/18/1293/006, rev. 10/2021a. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=1559D. [cit. 2022-03-05].

EMA (SmPC): *AJOVY*. Kód lieku: 3333D, reg. č. EU/1/19/1358/004, rev. 10/2020a. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=3333D. [cit. 2022-03-05].

EMA (SmPC): *Emgality*. Kód lieku: 3324D, reg. č. EU/1/18/1330/006, rev. 02/2021b. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=3324D. [cit. 2022-03-05].

EMA (SmPC): *VYEPTI 100 mg koncentrát na infúzny roztok*. Kód lieku: 9648D, reg. č. EU/1/21/1599/001, rev. 02/2022. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=9648D. [cit. 2022-03-05].

EMA: *European Union herbal monograph on Tanacetum parthenium (L.) Schultz Bip., herba*. Reference number: EMA/HMPC/48715/2017, 2020b. https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-tanacetum-parthenium-l-schulz-bip-herba-revision-1_en.pdf. Accessed June 10, 2022.

Gdovinová, Z.: Kapitola 22 – Migréna. In Mirossay, L., Mojžiš, J. (Eds.). *Základná farmakológia a farmakoterapia* [Basic pharmacology and pharmacotherapy]. 2. vyd. Equilibria, 2021. 983 – 987.

Golden, P. L.: Migraine overview and summary of current and emerging treatment options. *AJMC*, 2019, 25 (2), 23 – 34. <https://www.ajmc.com/view/migraine-overview-and-summary--of-current-and-emerging-treatment-options>. Accessed January 26, 2021.

Gross, E. C., Lisicki, M., Fischer, D., Sándor, P. S., Schoenen, J.: The metabolic face of migraine — from pathophysiology to treatment. *Nat. Rev. Neurol.*, 2019, 15, 627 – 643. <https://www.nature.com/articles/s41582-019-0255-4>. Accessed January 23, 2021.

Klečka, L.: Diferenciálna diagnostika migrény [Differential diagnosis of migraine]. *Neurologie pro praxi*, 2019, 20 (6), 444 – 450. [file:///C:/Users/samok/Downloads/Solen_neu-201906-0008%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/samok/Downloads/Solen_neu-201906-0008%20(1).pdf). [cit. 2021-01-21].

Lew, C., Punnapuzha, S.: *Migraine Medications*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553159/>. Update Maj 12, 2021. Accessed October 3, 2021.

Loder, E., Rizzoli, P.: Pharmacologic prevention of migraine: A narrative review of the state of the art in 2018. *Headache, The Journal of Head and Face Pain*, 2018, 58, 218 – 229. <https://headachejournal.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/head.13375>. Accessed January 26, 2021.

MZ SR. Zoznam kategorizovaných liekov 1.2.2022 – 28.2.2022 [List of categorized drugs 1.2.2022 – 28.2.2022]. Bratislava, 2022. <https://health.gov.sk/?zoznam-kategorizovanych-liekov>. [cit. 2022-02-21].

Nicolas, S., Nicolas, D.: *Triptans*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554507>. Update October 30, 2021. Accessed December 5, 2021.

Niedermayerová, I.: Nejčastější chyby v současné profylaxi migrény [The most common errors in current migraine prophylaxis: case reports]. *Neurologie pro praxi*, 2020, 21 (5), 400 – 405. file:///C:/Users/samok/Downloads/Solen_neu-202005-0012.pdf. [cit. 2021-01-27].

Novotná, I.: Bolesti hlavy, migréna, léčba a profylaxe [Farmacotherapy of headache, mainly migraine]. *Praktické Lékařství*, 2019, 20 (4), 302 – 306. <https://solen.cz/pdfs/lek/2020/02/01.pdf>. [cit. 2021-01-21].

Ong, J. J. Y., Felice, M. D.: Migraine treatment: Current acute medications and their potential mechanisms of action. *Neurotherapeutics*, 2018, 15 (2), 274 – 290. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5935632/>. Accessed January 26, 2021.

Rothrock, J. F., Adams, A. M., Lipton, R. B., Silberstein, S. D., Jo, E., Zhao, X., Blumenfeld, A. M.: FORWARD Study: Evaluating the comparative effectiveness of Onabotulinumtoxin A and Topiramate for headache prevention in adults with chronic migraine. *Headache*, 2019, 59 (10), 1700 – 1713. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6899480/>. Accessed October 10, 2021.

Ruschel, M. A. P., Jesus, O. D.: *Migraine headache*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560787/>. Update August 30, 2021. Accessed October 4, 2021.

ŠÚKL (SPC): *Frovamen*. Kód lieku: 42661, reg. č. 07/0035/05-S, rev. 06/2021a. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=42661. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): *Imigran*. Kód lieku: 76359, reg. č. 33/0266/93-S, rev. 12/2021b. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=76359. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): *Imigran 20 mg*. Kód lieku: 93079, reg. č. 33/0244/99-S, rev. 12/2021c. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=93079. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): *Maxalt RPD 10 mg*. Kód lieku: 89959, reg. č. 33/0067/99-S, rev. 07/2021d. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=89959. [cit. 2022-03-05].

id=89959. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): Metoprolol ratiopharm 200 mg. Kód lieku: 7277C, reg. č. 58/0237/09-S, rev. 03/2018a. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=7277C. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): Nalgesin S. Kód lieku: 2053A, reg. č. 29/0328/00-S, rev. 10/2019a. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=2053A. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): Panadol Migréna. Kód lieku: 1023D, reg. č. 07/0555/09-S, rev. 12/2020a. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=1023D. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): Paracut. Kód lieku: 07727, reg. č. 07/0320/11-S, rev. 11/2019b. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=07727. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): RELPAX 80 mg. Kód lieku: 8464C, reg. č. 33/0179/01-S, rev. 05/2021e. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=8464C. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): Rizatriptan Sandoz 10 mg orodispergovateľné tablety. Kód lieku: 81551, reg. č. 33/0666/09-S, rev. 02/2021f. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=81551. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): STUGERON. Kód lieku: 30381, reg. č. 83/0056/72-S, rev. 05/2021g. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=30381. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): Sumatriptan Sandoz 100 mg tablety. Kód lieku: 5726A, reg. č. 33/0070/06-S, rev. 02/2021h. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=5726A. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): Talopam 100 mg. kód lieku: 83278, reg. č. 21/0757/09-S, rev. 12/2019c. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=83278. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): Ketonal 50 mg. Kód lieku: 1477C, reg. č. 29/0598/94-S, rev. 12/2020b. https://www.sukl.sk/hlavnastranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=1477C. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): Flugalin 50 mg. Kód lieku: 25110, reg. č. 29/0391/92-S, rev. 10/2018b. https://www.sukl.sk/hlavnastranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=25110. [cit. 2022-03-05].

ŠÚKL (SPC): Peritol. Kód lieku: 4307C, reg. č. 24/0084/73-S, rev. 07/2021i. https://www.sukl.sk/hlavnastranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=4307C. [cit. 2022-03-05].

Zhao, Y. J., Ong, J. J., Goadsby, P. J.: Emerging treatment options for migraine. *Annals Academy of Medicine Singapore*, 2020, 49 (4), 226 – 235. <https://annals.edu.sg/pdf/49VolNo4Apr2020/V49N4p226.pdf>. Accessed January 27, 2021.



ANALÝZA PRESKRIPCIE ANXIOLYTÍK V TERAPII ÚZKOSTNÝCH PORÚCH

ANALYSIS OF ANXIOLYTIC PRESCRIPTION IN THE TREATMENT OF ANXIETY DISORDERS

Drabová, Jarmila; Piešová, Elena

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

elena.piesova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Úzkostné poruchy sú jedny z najčastejších duševných ochorení, ktoré sú charakterizované intenzívnymi pocitmi úzkosti a strachu. Často sa vyskytujú v komorbidite s inými psychickými poruchami, kedy sú spojené s horším priebehom, väčším funkčným postihnutím a zvýšenými finančnými nákladmi na zdravotnú starostlivosť. V liečbe úzkostných porúch sa využívajú predovšetkým antidepresíva, anxiolytiká a psychoterapia.

Cieľom štúdie bola analýza preskripčných záznamov získaných z troch verejných lekární za obdobie 12 mesiacov. Výsledky poukazujú na to, že úzkostné poruchy postihujú 2-krát častejšie ženy než mužov. Medzi najčastejšie úzkostné poruchy patrila zmiešaná úzkostná a depresívna porucha (26,1 %); generalizovaná úzkostná po-

rucha (13,1 %) a špecifická (izolovaná) fóbia (11 %). Zastúpenie indikovaných anxiolytík v terapii úzkostných porúch (41,5 %) bolo takmer rovnaké ako podiel predpísaných antidepresív (45,8 %); ktoré predstavujú 1. voľbu v liečbe úzkosti. V terapii najčastejších úzkostných porúch anxiolytiká predstavovali vysoký podiel zastúpenia z celkovej preskripcie liečiv pri danej diagnóze.

Kľúčové slová: analýza preskripcie; anxiolytiká; benzodiazepíny; úzkostné poruchy; úzkosť

ABSTRACT

Anxiety disorders are one of the most common mental illnesses, characterized by intense feelings of anxiety and fear. They often occur in comorbidity with other mental disorders, where they are

associated with poorer course, greater functional disability and increased health care costs. Antidepressants, anxiolytics and psychotherapy are mainly used in the treatment of anxiety disorders.

The aim of the study was to analyze the prescription forms obtained from three pharmacies over a period of 12 months. The results indicate that the most common anxiety disorders were mixed anxiety and depressive disorder (26.1%), generalized anxiety disorder (13.1%) and specific (isolated) phobia (11%). The proportion of indicated anxiolytics in the treatment of anxiety disorders (41.5 %) was almost the same as the proportion of prescribed antidepressants (45.8 %), which represent the first choice in the treatment of anxiety. In the treatment of the most common anxiety disorders, anxiolytics represented a high proportion of the total prescription in the diagnosis.

Key words: anxiolytics, anxiety, anxiety disorders, benzodiazepines, prescription analysis

ÚVOD

Úzkostné poruchy patria medzi najbežnejšie typy duševných chorôb, ktoré zasiahnu až 25 – 33,7 % populácie aspoň raz za život. Častejšie postihujú ženy a ich nástup je zvyčajne v období dospievania alebo ranej dospelosti, s vyšším vekom dochádza k poklesu prevalencie. U postihnutých pacientov majú často chronický priebeh, sú sprevádzané komorbiditami, zneužívaním alkoholu a návykových látok (Bandelow a kol., 2015). V etiopatogenéze úzkostných porúch sa zisťuje prítomnosť psychosociálnych faktorov (trauma z detstva, stres), genetických vplyvov, ktoré sa prejavujú neurobiologickými a neuropsychologickými dysfunkciami, zisťujú sa biochemické a metabolické zmeny v mozgu. Etiopatogenéza úzkostných porúch je pomerne obsirna a vysvetľuje ju viacero teórií, ale pre jednotlivé poruchy sú vypracované psychoterapeutické a farmakologické algoritmy liečby (Thibaut, 2017). Úzkostné poruchy sú v primárnej starostlivosti často nedostatočne rozpoznané a nedo-

statočne liečené. Liečba je indikovaná, keď pacient vykazuje výrazné ťažkosti alebo trpí komplikáciami vyplývajúcimi z poruchy. Liečba úzkostných porúch spočíva vo farmakoterapii, psychoterapii alebo ich kombinácii. Kognitívno behaviorálnu terapiu možno považovať za psychoterapiu s najvyššou efektivitou (Ströhle a kol., 2018).

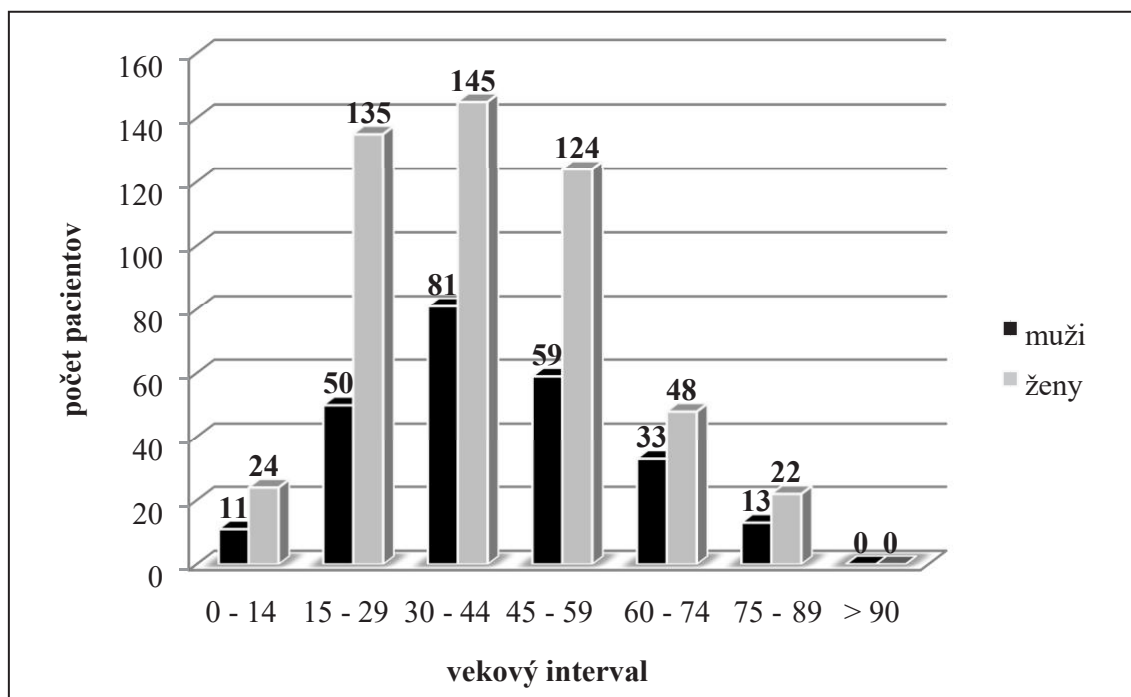
Lieky prvej voľby sú selektívne inhibítory spätného vychytávania serotonínu (SSRI) a inhibítory spätného vychytávania serotonínu a norepinefrínu (SNRI). Anxiolytiká sú liekmi 2. voľby a odporúčajú sa užívať len 4 – 6 týždňov. Aj napriek tomu, že anxiolytiká sú rýchlo pôsobiace a veľmi dobre tolerované lieky s nezávažnými nežiaducimi účinkami a interakciami s inými liekmi, na bežné použitie sa neodporúčajú. Za hlavnú nevýhodu sa považujú ich kognitívne a psychomotorické účinky, vznik tolerancie s následným rozvojom závislosti a potencionálneho zneužívania. Pri ich užívaní je dôležité myslieť na riziko abstinenčného syndrómu alebo vzniku rebound fenoménu (Pečeňák a kol., 2016; Mohr a kol., 2017). Medzi ďalšie možnosti liečby patrí pregabalín, tricyklické antidepresíva, buspirón, hydroxyzín, meprobamát, moklobemid a iné. Po remisii sa má v užívaní liekov pokračovať 6 až 12 mesiacov. Pri príprave liečebného plánu treba brať do úvahy preferencie pacienta, účinnosť, nežiaduce účinky, interakcie a náklady (Bandelow a kol., 2017).

Cieľom štúdie bola analýza pohlavia a veku pacientov trpiacich úzkostnou poruchou a analýza preskripcie farmakoterapeutických skupín liečiv indikovaných v terapii úzkostných porúch so zameraním sa na zastúpenie a indikáciu konkrétnych anxiolytík v liečbe najčastejšie sa vyskytujúcich úzkostných porúch.

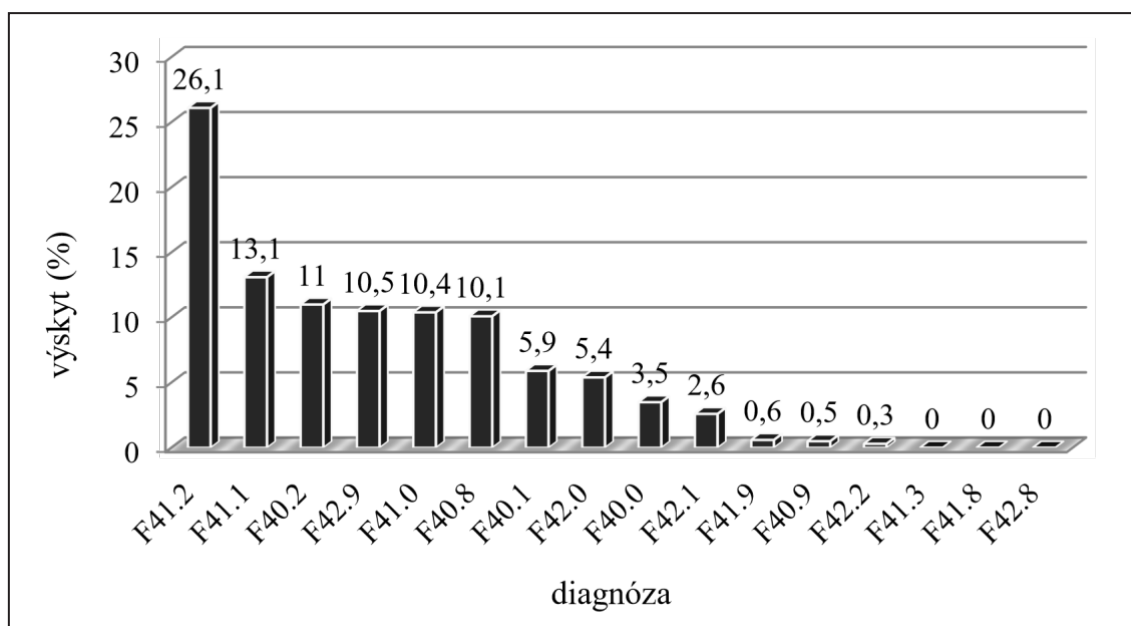
MATERIÁL A METÓDY

Analyzované údaje boli získané z troch verejných lekární v meste Prešov za obdobie jedného roka od 1. januára 2019 do 31. decembra 2019. Podľa kódov Medzinárodnej klasifikácie chorôb (MKCH-10) sme vyselektovali preskripčné záznamy s diagnózou úz-

Graf 1: Výskyt úzkostných porúch vo vzťahu k pohlaviu a veku

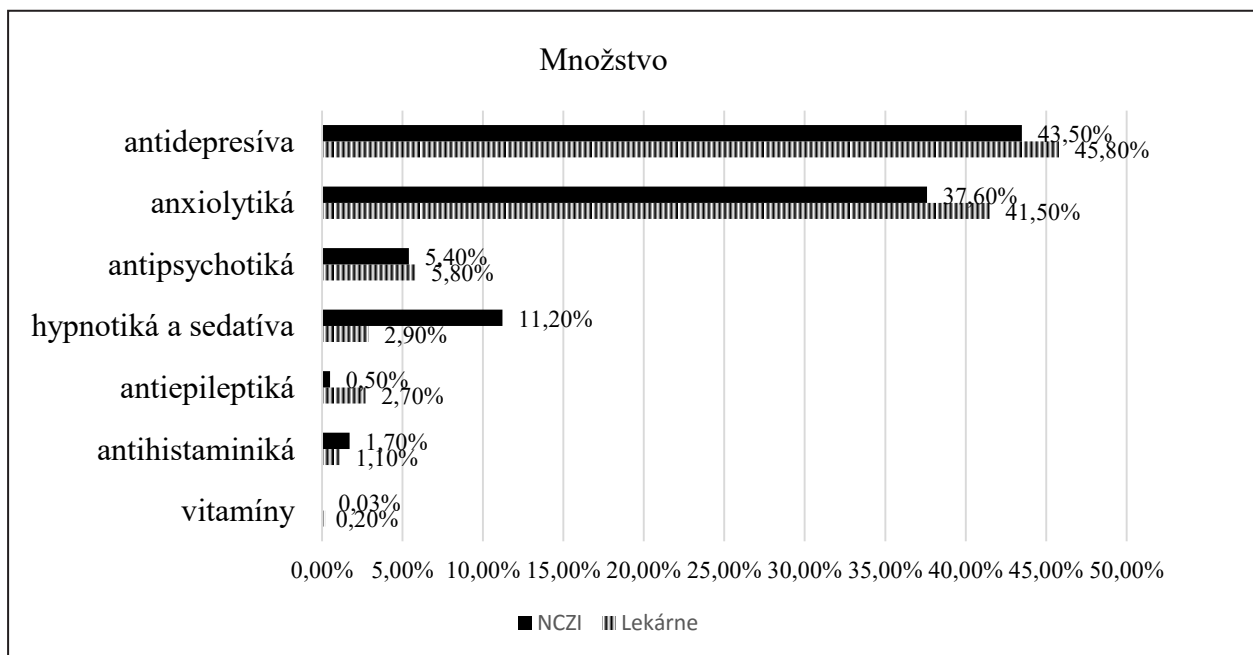


Graf 2: Výskyt jednotlivých diagnóz úzkostných porúch

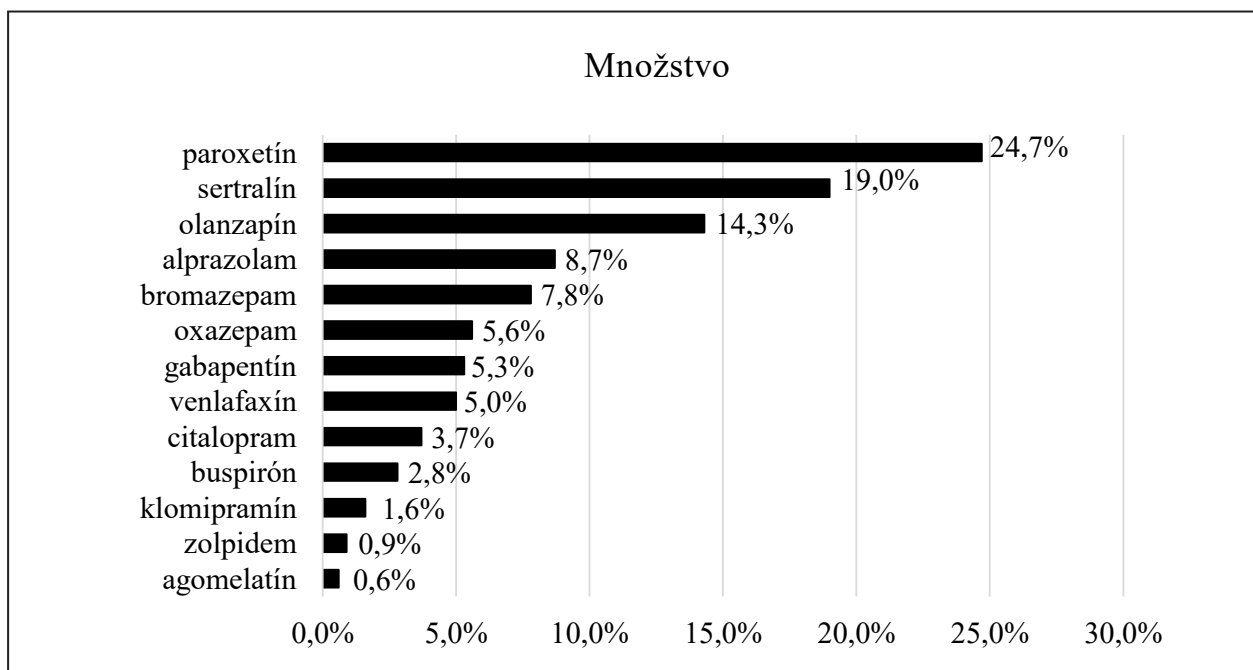


F40.0 Agorafóbia; F40.1 Sociálna fóbia; F40.2 Špecifická (izolovaná) fóbia; F40.8 Iná fóbická úzkostná porucha; F40.9 Fóbická úzkostná porucha; F40.0 Panická porucha [epizodická záchvatová úzkosť]; F41.1 Generalizovaná úzkostná porucha; F41.2 Zmiešaná úzkostná a depresívna porucha; F41.3 Iná zmiešaná úzkostná porucha; F41.8 Iná úzkostná porucha, bližšie určená; F41.9 Úzkostná porucha, bližšie neurčená; F42.0 Prevažne obsedantné myšlienky alebo ruminácie; F42.1 Prevažne kompulzívne konanie [obsedantné rituály]; F42.2 Zmiešané obsesívne myšlienky a konania; F42.8 Iná obsedantno-kompulzívna porucha; F42.9 Obsedantno-kompulzívne poruchy, bližšie neurčené

Graf 3: Zastúpenie farmakoterapeutických skupín liečiv v terapii úzkostných porúch



Graf 4: Zastúpenie liečiv indikovaných na terapiu zmiešanej úzkostnej a depresívnej poruchy (F41.2)



kostnej poruchy v rozmedzí diagnóz F40.0 – F42.9, čím sme získali zoznam diagnóz s najčastejším výskytom, vek a pohlavie pacientov. Prostredníctvom informačných systémov WinLSS a NRSYS sme vyhodnotili zastúpenie jednotlivých farmakoterape-

utických skupín liečiv indikovaných na terapiu úzkostných porúch. Pri diagnózach úzkostných porúch, ktoré presiahli hranicu výskytu 10 % sme urobili podrobnú analýzu indikovaných liečiv. Celkový počet všetkých preskripčných záznamov s úzkostnou

poruchou bol 1232. Získané údaje zo všetkých 3 lekární sme vyhodnocovali komplexne a spracovali pomocou programov Microsoft Excel do grafov.

VÝSLEDKY

V analyzovanom súbore všetkých pacientov úzkostná porucha postihovala viac ženy (66,8 %) ako mužov (33,2 %). Výskyt úzkostnej poruchy bol u žien najčastejší vo veku 30 – 44 rokov a najmenej postihovala ženy vo vekovom rozhraní 75 – 89 rokov. Najvyšší výskyt úzkostnej poruchy sme zaznamenali u mužov vo veku 30 – 44 rokov a najnižší výskyt bol u mužov vo veku 0 – 14 rokov (viď graf 1).

Percentuálne zastúpenie jednotlivých farmakoterapeutických skupín liečiv indikovaných v terapii úzkosti znázorňuje graf 2.

Z preskripčných záznamov v počte 1232 kusov boli na terapiu úzkostných porúch najčastejšie indikované antidepresíva (45,8 %); anxiolytiká (41,5 %) a antipsychotiká (5,8 %). Z údajov NCZI pre celoslovenskú spotrebu liečiv v roku 2019 vyplýva, že najčastejšie sú indikované antidepresíva (43,5 %) a anxiolytiká (37,6 %); ako tretie najčastejšie predpisované sú hypnotiká

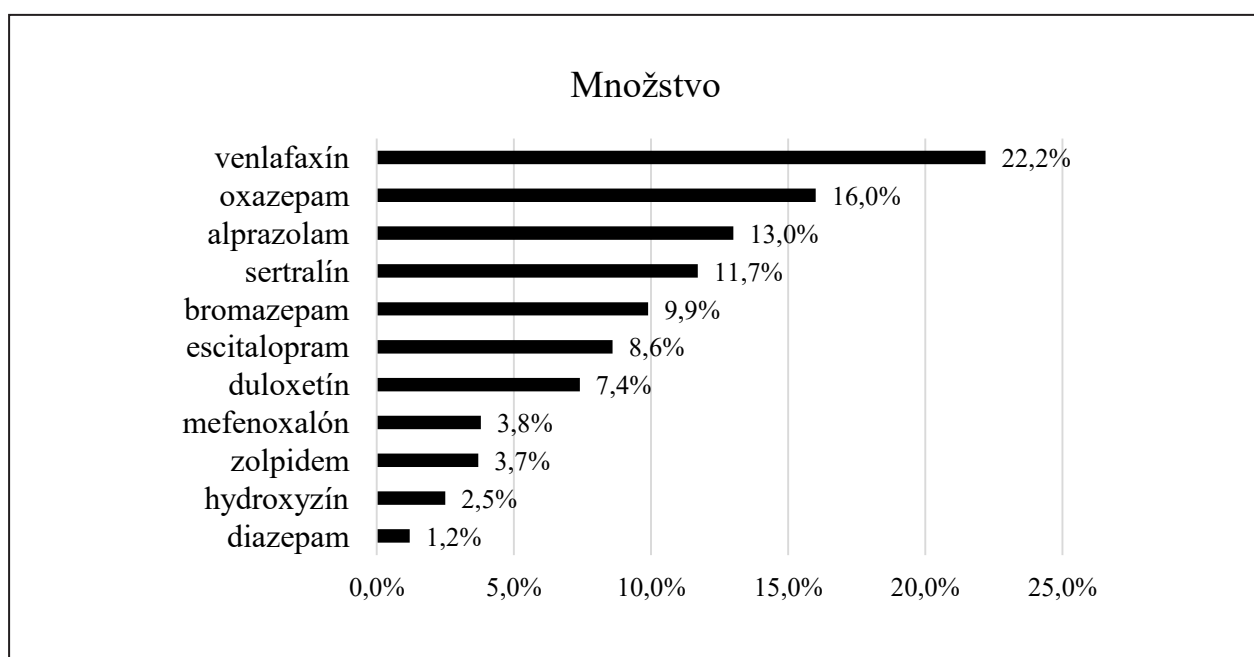
a sedatíva (11,2 %). Z preskripčných záznamov ďalej vyplynulo, že v lekárňach boli v porovnaní s údajmi z NCZI rozdiely v preskripcii antiepileptík (2,7 % vs. 0,5 %); antihistaminík (1,1 % vs. 1,7 %) a vitamínov, kedy vitamíny boli 6,6-krát častejšie predpisované v sledovaných lekárňach (viď graf 3).

Zastúpenie liečiv v preskripcii najčastejšie sa vyskytujúcich úzkostných porúch

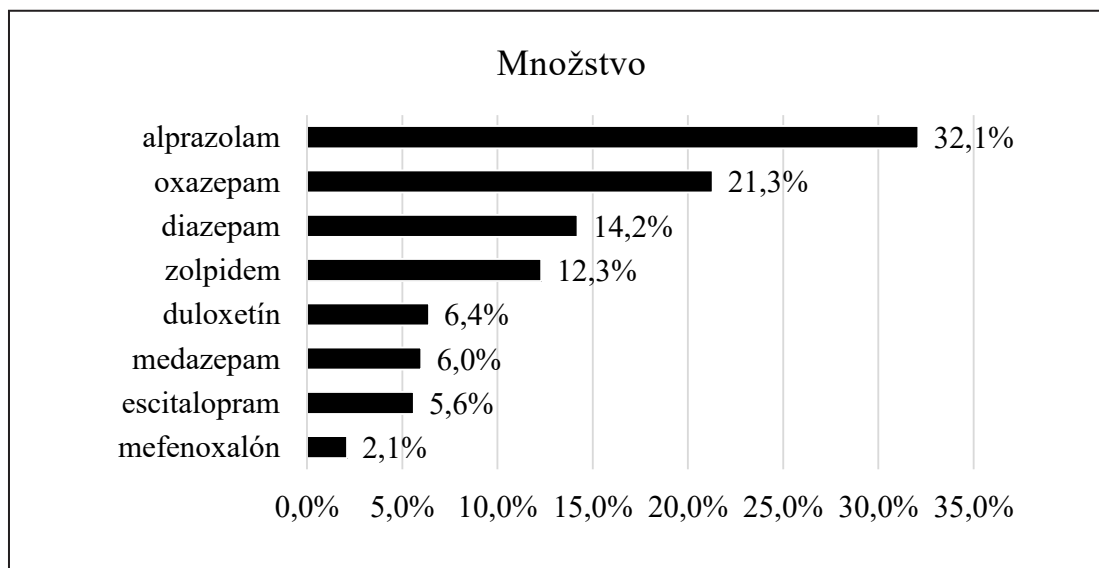
Pri diagnóze F41.2 boli najčastejšie predpisovanými liečivami paroxetín (24,7 %); sertralín (19 %) a olanzapín (14,3 %). V množstve indikovaných liečiv ďalej nasledovali anxiolytiká alprazolam (8,7 %); bromazepam (7,8 %) a oxazepam (5,6 %). Anxiolytiká spolu tvorili 24,9 % preskripcie liečiv pre diagnózu F41.2 (viď graf 4).

Na liečbu generalizovanej úzkostnej poruchy (GAD) boli najčastejšie expedovanými liekmi venlafaxín (22,2 %); oxazepam (16 %) a alprazolam (13 %). Nasledoval sertralín (11,7 %); bromazepam (9,9 %) a escitalopram (8,6 %). Pri terapii F41.1 anxiolytiká predstavovali 46,4 % celkovej preskripcie liečiv pre danú diagnózu (viď graf 5).

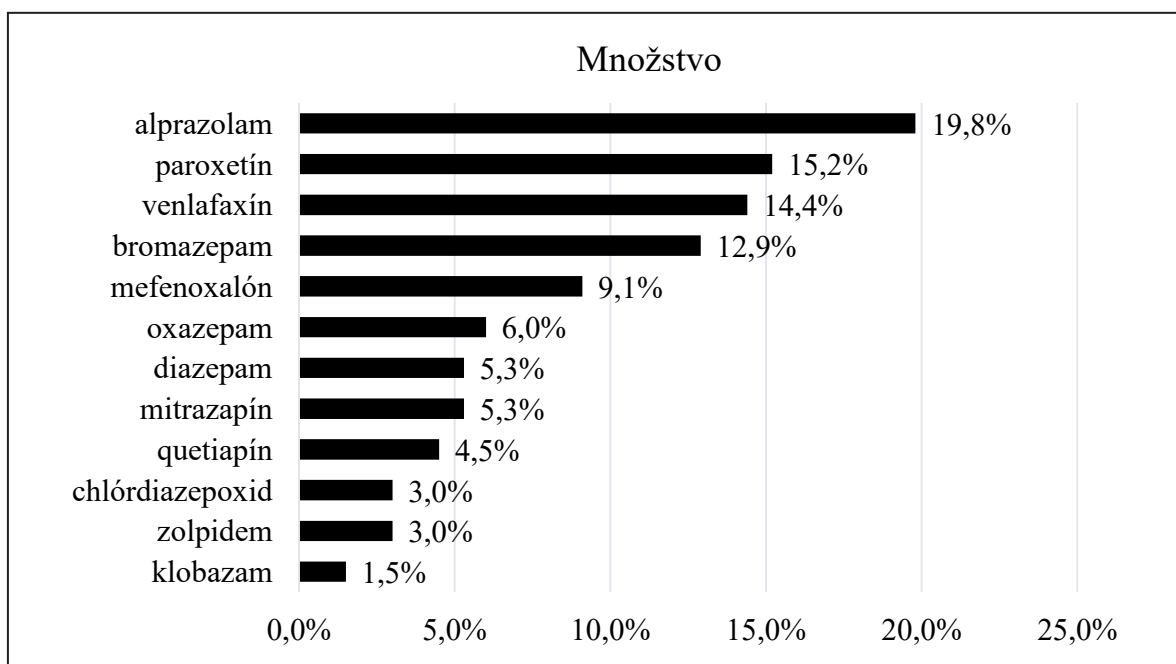
Graf 5: Zastúpenie liečiv indikovaných na terapiu generalizovanej úzkostnej poruchy (F41.1)



Graf 6: Zastúpenie liečiv indikovaných na terapiu špecifickej (izolovanej) fóbie (F40.2)



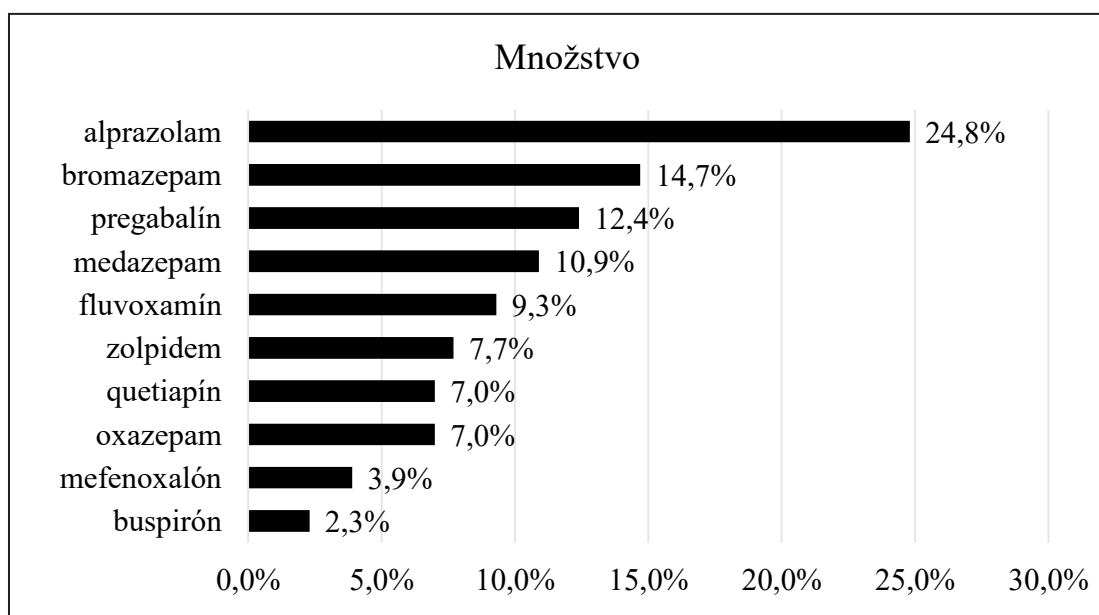
Graf 7: Zastúpenie liečiv indikovaných na terapiu diagnózy iná fóbická úzkostná porucha (F40.8)



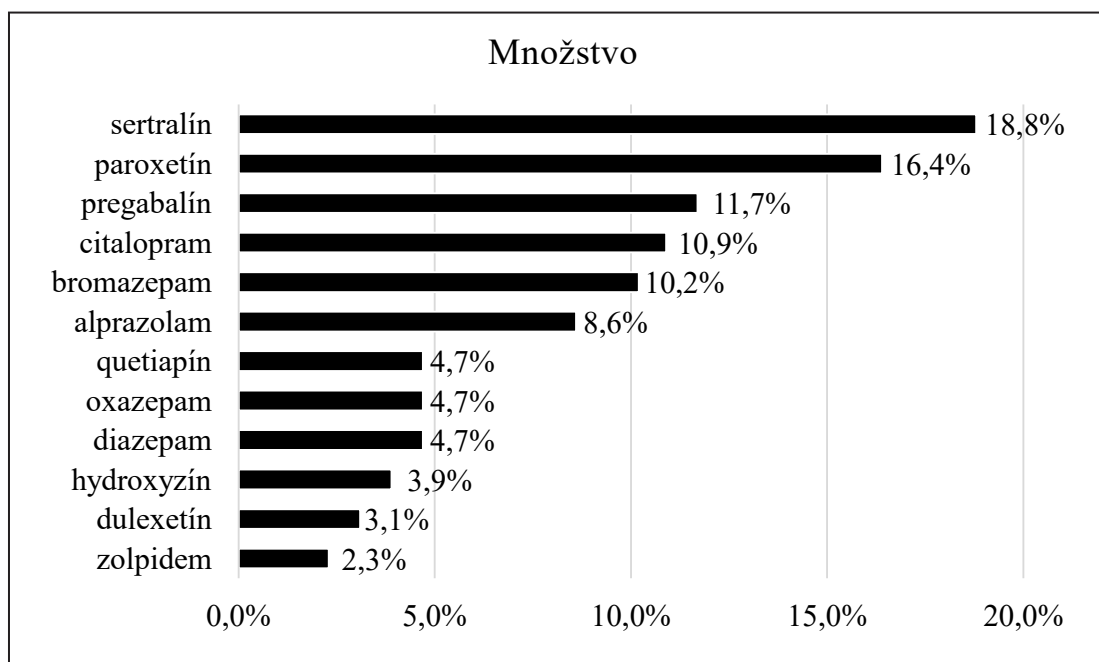
Na terapiu špecifickej fóbie boli najčastejšie predpísané anxiolytiká alprazolam (32,1 %); oxazepam (21,3 %) a diazepam (14,2 %). Nasledoval zolpidem (12,3 %); duloxetín (6,4 %) a medazepam (6 %). Anxiolytiká tvorili 75,7 % z celkovej preskripcie liečiv pre diagnózu F40.2 (viď graf 6).

Na liečbu diagnózy F40.8 boli najviac predpisovanými účinnými látkami alprazolam (19,8 %); paroxetín (15,2 %) a venlafaxín (14,4 %). Za nimi v počte preskripcných záznamov nasledovali anxiolytiká bromazepam (12,9 %); mefenoxalón (9,1 %) a oxazepam (6 %). Anxiolytiká z celkovej preskripcie liečiv pre diagnózu F40.8 tvorili 57,6 % (viď graf 7).

Graf 8: Zastúpenie liečiv indikovaných na terapiu diagnózy obsedantno-kompulzívne poruchy, bližšie neurčené (F42.9)



Graf 9: Zastúpenie liečiv indikovaných na terapiu panickej poruchy (F41.0)



Účinné látky, ktoré sa najviac vyskytovali v preskripcii na diagnózu F42.9 boli alprazolam (24,8 %); bromazepam (14,7 %) a pregabalín (12,4 %). Za nimi nasledoval medazepam (10,9 %); fluvoxamín (9,3 %) a zolpidem (7,7 %). Celkové zastúpenie anxiolytík v preskripcii liečiv pre diagnózu F42.9 bolo 63,6 % (viď graf 8).

Najčastejšími liečivami, ktoré sa vyskytli v preskripcii panickej poruchy boli sertralín (18,8 %); paroxetín (16,4 %) a pregabalín (11,7 %). Anxiolytiká predstavovali 32,1 % z celkovej preskripcie liečiv pre diagnózu F41.0 (viď graf 9).

DISKUSIA

Výsledky analýzy preukázali, že úzkostné poruchy postihujú 2-krát častejšie ženy (66,8 %) ako mužov (33,2 %); čo koreluje s výsledkami zo štúdie epidemiológov GlobalData, ktorá bola vykonaná v roku 2018 v 16 štátoch celého sveta, kde prevalencia úzkostných porúch bola u žien 62 % a mužov 38 % (Pharmaceutical Technology, 2018).

V skupine pacientov sa najčastejšie úzkostné poruchy vyskytovali u oboch pohlaví vo veku 30 – 44 rokov, avšak výskyt úzkostných porúch vo vekových kategóriách 15 – 29 a 45 – 59 rokov bol takmer porovnateľný. To nás privádza k záveru, že úzkostné poruchy sa začínajú v puberte alebo ranej dospelosti, vrchol dosahujú v strednom veku a potom majú tendenciu vo vyššom veku (po 60-tke) klesať. Podľa nemeckej epidemiologickej štúdie pri generalizovanej úzkostnej poruche a špecifických fóbiách je najvyššia prevalencia vo vekovej skupine 18 – 34 rokov a pri panickej poruche 35 – 49 rokov. Miera prevalence s nárastom veku klesá a najnižšia je u starších ľudí vo veku 65 – 79 rokov (Jacobi a kol., 2014).

Zo vzorky všetkých pacientov bola najčastejšie diagnostikovaná F41.2 zmiešaná úzkostná a depresívna porucha (26,1 %); za ňou s výskytom 13,1 % nasledovala F41.1 generalizovaná úzkostná porucha a v zastúpení 11 % nasledovala diagnóza F40.2 špecifická (izolovaná) fóbia. Je dôležité podotknúť, že systematické prehľady a štúdie potvrdili široké medzinárodné rozdiely v prevalencii úzkostných porúch v jednotlivých krajinách. Vysvetlením môžu byť odlišné metodické postupy, rozdielne diagnostické kritériá a hlavne odlišné chápanie a postoje k duševným poruchám (Stein a kol., 2017).

Analýzou sme zistili, že najčastejšie predpisovanou skupinou liečiv na terapiu úzkostných porúch boli antidepresíva (45,8 %); ktoré sú liekom 1. voľby v terapii úzkostných porúch, aj keď terapia zvyčajne trvá 4 – 6 týždňov, kým sa prejaví ich klinický účinok. Podiel anxiolytík predstavoval v našej analýze 41,5 %. Aj keď anxiolytiká preukázali účinnosť pri úzkostných poruchách, podľa pokynov klinickej pra-

xe sa všeobecne odporúčajú súbežne užívať so SSRI maximálne 4 – 6 týždňov, najlepšie pri pravidelnom dávkovaní, buď ako pomoc pri úľave pacientov s akútnou úzkosťou a nepokojom alebo do odpovede na antidepresíva (Andrews a kol., 2018). Môžeme konštatovať, že pomer preskripcie anxiolytík a antidepresív v liečbe úzkostných porúch bol takmer porovnateľný.

Pri diagnóze F41.2 bol najčastejšie predpisovaným liečivom paroxetín (24,7 %). Paroxetín bol schválený na liečbu rôznych úzkostných porúch vrátane generalizovanej úzkostnej poruchy, panickej poruchy a sociálnej úzkostnej poruchy. Dostupné empirické dôkazy naznačujú, že paroxetín poskytuje pri liečbe úzkosti a depresie iba miernu výhodu oproti placebo a dostupná literatúra nadhodnocuje skutočnú účinnosť paroxetínu pri liečbe úzkosti (Sugarman a kol., 2014).

Na terapiu generalizovanej úzkostnej poruchy bol najčastejšie indikovaný venlafaxín (22,2 %); ktorý je inhibítorom spätného vychytávania serotonínu, norepinefrínu a čiastočne aj dopamínu. Kontrolované štúdie preukázali účinnosť a bezpečnosť venlafaxínu pri liečbe úzkostných porúch vrátane generalizovanej úzkostnej poruchy, sociálnej úzkostnej poruchy, panickej a obsedantno-kompulzívnej poruchy. Venlafaxín je dôležitou alternatívou k SSRI u pacientov s úzkostnými poruchami a je účinnou a dobre tolerovanou možnosťou farmakologickej liečby pre dospelých pacientov trpiacich generalizovanou úzkostnou poruchou (Li a kol., 2017).

Na liečbu špecifickej (izolovanej) fóbie bol najčastejšie indikovaný alprazolam 32,1 % a oxazepam 21,3 %. V terapii špecifických fóbií sa uprednostňuje a výrazne odporúča psychoterapia (konkrétne terapia založená na expozícii), ktorá sa tradične považuje za najsilnejšiu a najefektívnejšiu liečbu pre špecifické fóbie. Farmakoterapia má len obmedzený prínos v liečbe špecifických fóbií. Dôležitosť benzodiazepínov ako alprazolam, diazepam a midazolam spočíva v krátkodobom znížení subjektívneho sebahláseného strachu počas vystavenia obávanému objektu alebo situácii (Thng a kol., 2020). Paradoxne na terapiu tejto diagnózy (F40.2) predstavovali anxiolytiká najväč-

šie zastúpenie, až 75,7 % z celkovej preskripcie.

V liečbe diagnózy F42.9 obsedantno-kompulzívne poruchy, bližšie neurčené (24,8 %) a F40.8 iná fóbická úzkostná porucha (19,8 %) bol najčastejšie predpisovaný alprazolam, ktorý preukázal účinnosť pri kontrole symptómov úzkostných porúch. Avšak neodporúča sa ako prvolíniová farmakologická liečba kvôli obavám z rizík rozvoja potenciálu tolerancie, závislosti a zneužívania. V prípadoch rezistentných na liečbu sa môžu benzodiazepíny ako alprazolam indikovať pacientom, u ktorých sa v minulosti nevyskytovala tolerancia či závislosť na anxiolytikách (Moylan a kol., 2012).

Na diagnózu panickej poruchy bol najviac expedovaným liečivom sertralín (18,8 %); ktorý sa používa na terapiu úzkostných porúch od polovice 90. rokov a ukázal sa ako účinná, dobre tolerovaná a ekonomicky životaschopná liečba panickej poruchy, ak sa používa v dávkovom rozmedzí 50 – 175 mg denne. V štúdiu zameranej na prevenciu relapsu sa zistilo, že sertralín znižuje závažnosť a frekvenciu záchvatov paniky, základnú úzkosť a poskytuje ochranu pred relapsom až 36 týždňov po ukončení liečby. Sertralín bol pri znižovaní počtu úplných záchvatov paniky s obmedzenými príznakmi významne účinnejší ako placebo. Medzi pacientami, ktorí užívali sertralín klesol priemerný počet záchvatov paniky o 88 % za týždeň. U pacientov liečených placebom klesol počet záchvatov o 53 %. Pacienti celkovo tolerovali sertralín dobre a iba 9 % z nich ukončilo liečbu kvôli vedľajším účinkom. Sertralín je účinná a dobre tolerovaná liečba pacientov s panickou poruchou (Hobgood a Clayton, 2009).

ZÁVER

Farmakoterapia úzkostných porúch je súčasťou komplexnej liečby ochorenia, kde jej cieľom je zmierniť až úplne odstrániť anxiózne symptómy a zabrániť remisii a opätovnému prinavráteniu vyhubavého správania. Liečba úzkostnej poruchy si vyžaduje individuálne posúdenie zdravotného stavu každého pacienta. V štúdiu sme sledovali pohlavie a vek pa-

cientov trpiacich úzkostnou poruchou a zastúpenie jednotlivých farmakoterapeutických skupín liečiv a následne podiel konkrétnych anxiolytík v preskripcii úzkostných porúch. Z analýzy vyplýva, že úzkostné poruchy postihujú častejšie ženy ako mužov a objavujú sa predovšetkým v produktívnom veku. Výsledky štúdie poukazujú na to, že aj napriek tomu, že sú anxiolytiká liekom druhej voľby, v terapii úzkostných porúch sú veľmi často indikované a ich zastúpenie je porovnateľné s antidepressívami (SSRI, SNRI), ktoré sú liekom 1. voľby.

ZOZNAM LITERATÚRY

Andrews, G., Bell, C., Boyce, P., Gale, C., Lampe, L., Marwat, O., Rapee, R., Wilkins, G.: Royal Australian and New Zealand College of Psychiatrists clinical practice guidelines for the treatment of panic disorder, social anxiety disorder and generalised anxiety disorder. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 2018, 52 (12), 1109 – 1172.

Bandelow, B., Michaelis, S., Wedekind, D.: Treatment of anxiety disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 2017, 19 (2), 93 – 107.

Bandelow, B., Michaelis, S.: Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 2015, 17 (3), 327 – 335.

GlobalData Healthcare. *The pharmaceutical technology page*. <https://www.pharmaceutical-technology.com/comment/anxiety-orders-prevalence-majormarkets/>. Accessed April 26, 2019.

Hobgood, C. D., Clayton, A. H.: Sertraline in the treatment of panic disorder. *Drugs of Today*, 2009, 45 (5), 351 – 361.

Jacobi, F., Höfler, M., Strehle, J., Mack, S., Gerschler, A., Scholl, L., Busch, M. A., Maske, U., Hapke, U., Gaebel, W., Maier, W., Wagner, M., Zielasek, J., Wittchen, H. U.: Mental disorders in the general population: Study on the health of adults in Germany and the additional module mental health. *Der Nervenarzt*, 2014, 85 (1), 77 – 87.

Li, X., Zhu, L., Su, Y., Fang, S.: Short-term efficacy and tolerability of venlafaxine extended rele-

ase in adults with generalized anxiety disorder without depression: A metaanalysis. *Plos One*, 2017, 12 (10), 26 – 33.

Mohr, P., Kopeček, M., Brunovský, M., Páleníček, T.: *Klinická psychofarmakologie* [Clinical psychopharmacology]. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2017. 568 s.

Moylan, S., Giorlando, F., Nordfjærn, T., Berk, M.: The role of alprazolam for the treatment of panic disorder in Australia. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 2012, 46 (3), 212 – 224.

NCZI – Národné centrum zdravotníckych informácií [national health Information centre]. https://data.nczisk.sk/statisticke_vystupy/top_100_liekov/spotreba_liekov/Spotreba_liekov_a_zdravotnickych_pomocok_v_SR_2019_Sprava_k_publicovanym_vystupom.pdf. Accessed July 28, 2022.

Pečeňák, J., Kořínková, V.: *Psychofarmakológia* [Psychopharmacology]. 1. vyd. Bratislava: Wolters Kluwers s. r. o., 2016. 672 s.

Stein, D. J., Scott, K. M., Jonge, P., Kessler, R. C.: Epidemiology of anxiety disorders: from surveys to nosology and back. *Dialogues in Clinical Neuro-*

uroscience, 2017, 19 (2), 127 – 136.

Ströhle, A., Gensichen, J., Domschke, K.: The diagnosis and treatment of anxiety disorders. *Deutsches Ärzteblatt International*, 2018, 115 (37), 611 – 620.

Sugarman, M. A., Loree, A. M., Baltes, B. B., Grekin, E. R., Kirsch, I.: The efficacy of paroxetine and placebo in treating anxiety and depression : A Meta-Analysis of Change on the Hamilton Rating Scales. *Plos One*, 2014, 9 (8). <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0106337>. Accessed December 20, 2021.

Thibaut, F. Anxiety disorders: a review of current literature. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 2017, 19 (2), 87 – 88.

Thng, C. E. W., Lim-Ashworth, N. S. J., Poh, B. Z. Q., Lim, CH. G.: Recent developments in the intervention of specific phobia among adults. *F1000Research*, 2020. <https://f1000research.com/articles/9-195/v1>. Accessed December 17, 2021.



INTERVENČNÉ METÓDY V LIEČBE CHRONICKEJ BOLESTI

INTERVENTION METHODS IN CHRONIC PAIN TREATMENT

Jarabová, Mária; Váczi, Peter

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

peter.vaczi@uvlf.sk

ABSTRACT

Boleť, charakterizovaná ako neprijemný citový vnem, je častou súčasťou rôznych ochorení. Chronická bolesť trvá 3 a viac mesiacov a má negatívny dopad na psychiku pacienta. S cieľom zlepšiť kvalitu života pacienta sa okrem farmakologickej a neinvazívnej terapie pristupuje aj k intervenčným metódam liečby chronickej bolesti. Princíp takýchto intervenčných metód sa realizuje blokádou periférnych nervov, použitím malého množstva anestetika, v rôznom pomere bupivakaínu a mezokaínu. Lokálne anestetikum sa aplikuje injekčnou ihlou pod röntgenologickou kontrolou s následným pozorovaním ústupu bolesti. Je to pomerne nová metóda, ktorú vykonávajú špecializovaní lekári. Patrí medzi najmodernejšie metódy v liečbe pooperačnej chronickej bolesti, ischemickej bolesti dolných končatín, bolesti pri angíne pectoris, diabetickej polyneuropatii a iných.

Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať spôsoby

miniinvazívnych metód v liečbe chronickej bolesti, ich klinický význam a výhody v porovnaní s farmakologickou a neinvazívnou terapiou. Jednou z ďalších úloh tejto práce bolo vyhodnotiť účinnosť a efektívnosť intervenčných metód. Štúdia bola realizovaná v algeziologickej ambulancii VÚSCH na základe zdravotných záznamov 20 pacientov, u ktorých bola kvôli neúspešnej farmakoterapii chronickej bolesti vykonaná intervenčná metóda. Taktiež sme vyhodnotili aj subjektívne názory pacientov formou dotazníka. Z našich výsledkov je zrejmé, že intervenčné metódy liečby sú účinné a bezpečné techniky využívané pri akútnej aj chronickej bolesti. Prinášajú pacientom úľavu od bolesti, čo pomáha zlepšiť jej prežívanie a napomáha rýchlejšiemu návratu do bežného života. Intervenčné metódy liečby predstavujú veľký prínos v terapii bolestivých stavov.

Kľúčové slová: analgetiká; chronická bolesť; intervenčné metódy; liečba bolesti; opioidy

ABSTRACT

Pain is an unpleasant mental sensation that accompanies various diseases and indicates a disorder in the course of physiological processes. Chronic pain lasts for 3 months or more and has a negative impact on the patient's psyche. In order to improve the patient's quality of life, in addition to pharmacological and non-invasive therapy, interventional methods of treatment of chronic pain are also used. Their principle is to block peripheral nerves, using a small amount of anaesthetic under X-ray control. It is one of the most modern methods in the treatment of postoperative chronic pain, ischemic lower limb pain and pain in angina pectoris or diabetic polyneuropathy. The study deals with the clinical significance, effects and advantages of mini-invasive methods in the treatment of chronic pain compared to pharmacological and non-invasive therapy.

The aim of this study is to research minimally invasive methods in treatment of chronic pain, the clinical importance, effects and advantages compared to pharmacological and non-invasive treatment. Another goal was to evaluate effectiveness and efficiency of interventional methods. The results confirmed that interventional methods of treatment are effective and safe techniques used in acute and chronic pain. They provide patients with pain relief, which helps improve pain experience and helps them return to normal life quickly. The interventional methods represent major advance in the treatment of painful conditions.

Key words: analgesics; chronic pain; intervention methods; opioids; pain treatment

ÚVOD

Podľa Medzinárodnej asociácie pre štúdium bolesti (IASAP) môžeme bolesť definovať ako nepríjemný zmyslový zážitok spojený so skutočným alebo potenciálnym poškodením tkaniva (Schug a kol., 2011).

Bolesť je nepríjemný fyzický a psychický zážitok. Je neoddeliteľnou súčasťou života každého človeka.

Akútna bolesť je prospešná a je považovaná za pozitívny varovný signál. Trvá niekoľko dní až týždňov a vzniká pri chirurgickom zákroku, traumatickom poškodení tkaniva a je súčasťou zápalových procesov. Môže byť sprevádzaná úzkosťou a nepokojom (Ellison, 2017). Chronická bolesť pretrváva alebo sa opakuje dlhšie ako tri mesiace. Je hlavným zdrojom utrpenia a často zasahuje do každodenného fungovania. Sprevádza ju strach, úzkosť a depresie.

Podľa štúdie z roku 2019 môžeme chronickú bolesť rozdeliť na primárnu a sekundárnu. Primárna chronická bolesť sa považuje za chorobu. Patrí tu fibromyalgia alebo nešpecifická bolesť dolnej časti chrbta. Za sekundárnu chronickú bolesť môžeme považovať bolesť súvisiacu s rakovinou, chronickú neuropatickú bolesť, chronickú sekundárnu viscerálnu bolesť, pooperačnú alebo posttraumatickú bolesť. Bolesť pri týchto stavoch môže byť zo začiatku považovaná za symptóm (Treede a kol., 2019).

Z hľadiska patofyziológie rozdeľujeme bolesť na nociceptívnu, neuropatickú, zmiešanú, psychogénnu a idiopatickú. **Nociceptívna bolesť** vzniká periférnou sensibilizáciou v dôsledku zápalu, poranenia alebo nádorového poškodenia organizmu. Môže vzniknúť stimuláciou nociceptívnych nervových zakončení v tkanivách organizmu (Schug a kol., 2011). Na základe lokalizácie ju môžeme rozdeliť na somatickú (napr. artritída) a viscerálnu (napr. zápalové ochorenie čriev) (Yang a kol., 2020). Somatická je povrchová z oblasti kože alebo hlboká bolesť zo šliach, svalov, kĺbov a kostí. Popisuje sa ako ostrá, bodavá a dobre reaguje na liečbu analgetikami. Je ohraničená a miesto bolesti zodpovedá miestu poškodenia. Viscerálna bolesť je difúzejšia, ťažko lokalizovaná, kŕčovitá a tupá, vychádzajúca z vnútorných orgánov gastrointestinálneho traktu a prenáša sa autonómnym nervovým systémom (Griger a kol., 2019). **Neuropatická bolesť** je spôsobená poškodením somatosenzorického systému, ako následok ochorenia nervového systému po stimulácii A δ a C vlákien. Ak je bolesť primárne spôsobená centrálnou sensibilizáciou,

ciou, nazýva sa nociplastická bolesť. Priebeh centrálnej sensibilizácie je výsledkom narušenia rovnováhy medzi excitačnými a inhibičnými systémami v mieche a mozgu (Schug a kol., 2011). Podľa miesta poškodenia rozlišujeme centrálnu a periférnu bolesť. K periférnej neuropatickej bolesti patrí diabetická neuropatia a postherpetická neuralgia. Najčastejším príkladom centrálnej bolesti je bolesť po mŕtvici (Yang a kol., 2020). **Zmiešaná bolesť** zahŕňa v sebe kombináciu nociceptívnej a neuropatickej bolesti. Príkladom zmiešanej bolesti je nádorová bolesť spolu so syndrómom neúspešnej operácie. **Psychogénna bolesť** nemá organickú príčinu, je často súčasťou psychického ochorenia. Môže vzniknúť po negatívnom psychickom impulze, a to prejavom po telesnej stránke ako spazmus svalov, pri dysfunkcii vegetatívneho nervového systému vnútorných orgánov (Yang a kol., 2020). Ďalším druhom je **idiopatická bolesť**, ktorej príčina aj napriek komplexným vyšetreniam nie je známa. Je to bolesť bez fyzickej a psychologickéj príčiny (Mirossay, Mojžiš a kol., 2006).

Na presnú charakteristiku bolesti slúžia rozličné hodnotenia. Dôkladné posúdenie bolesti sa musí zamerať aj na senzorické a afektívne vlastnosti bolesti. Posúdenie intenzity, lokalizácie a rozloženia bolesti v tele zlepši jej klasifikáciu a pomáha určiť vhodnú liečbu (Fillingim a kol., 2016). Prospešnou pomôckou na vyjadrenie príčin bolesti je charakteristika PQRST: P – Pain: lokalizácia (Kde to bolí?), Q – Quality: kvalita (Aká je bolesť?), R – Radiation: vyžarovanie (Kde sa šíri?), S – Severity: intenzita (Aká silná je bolesť?), T – Time: trvanie (Je bolesť stála alebo sa mení?) (Kulichová, 2005). Z ďalších kategorických škál pre hodnotenie intenzity bolesti sa používa číselná hodnotiaci škála. U detí je to päťstupňová obrázková škála bolesti, predstavujúca sériu obrázkov výrazu tváre, zobrazujúcu úroveň prežívania bolesti. Vizuálno-analógová škála bolesti, ktorá je znázornená ako úsečka so stupnicou. Pacient označí miesto na úsečke zodpovedajúce intenzite bolesti (Fillingim a kol., 2016).

Farmakologická liečba bolesti pozostáva z trojstupňového analgetického rebríka. Pri liečbe miernej

bolesti sa začína podávaním neopioidných analgetík a nesteroidných antiflogistík. Pri liečbe stredne silnej bolesti sa aplikujú slabé opioidy a posledný stupeň analgetického rebríka tvoria silné opioidy na liečbu silnej bolesti. Ku každej skupine liečiv je možné pridať k liečbe adjuvantné analgetikum. Je to heterogénna skupina liečiv, ktoré sa používajú primárne na liečbu iného ochorenia, ale majú aj analgetický účinok, ktorý spočíva v prerušení vedenia bolestivých podnetov na niektorom úseku dráhy bolesti, ktorá vedie z periférnych štruktúr (tkanivo kože, svalov, kostí, vnútorných orgánov) do miechy, do talamu a do mozgovej kôry, alebo ich účinkom sa znižujú nežiaduce účinky analgetík. Ako adjuvans je možné k liečbe pridať kortikosteroidy, antihistaminiká, antidepresíva, antiepileptiká (Mirossay a Mojžiš 2006; Griger a kol., 2019; Poliak a kol., 2019).

Na zlepšenie akútnej a chronickej bolesti a na zníženie potreby liekov obsahujúcich opioidy sa používajú nefarmakologické metódy liečby bolesti. Patrí tu elektrostimulácia, laserová terapia, kognitívno-behaviorálna terapia a fyzikálna terapia. Fyzikálna terapia je nevyhnutná pre optimalizáciu výsledkov. Patria tu relaxačné postupy a cvičenia zamerané na spevnenie chrbtového svalstva, joga, fyzická aktivita, masáže, kryoterapia, akupunktúra, elektroliečba a vodoliečba, aplikácia tepla (White, 2017).

Aj napriek farmakologickým a nefarmakologickým možnostiam liečby má mnoho pacientov nedostatočnú kontrolu bolesti. V takom prípade sa siahá po invazívnych metódach liečby bolesti. Je to pomerne nová metóda, založená na princípe blokady periférnych nervov s použitím lokálneho anestetika a celý zákrok sa vykonáva pod ultrazvukovou kontrolou. Výhodou týchto metód je účinnosť, bezpečnosť, menšie riziko infekcie, lepšia rekonvalescencia a rýchlejší návrat do bežného života. Intervencia sa vykonáva pomocou blokov nervových štruktúr. Tieto kontrolované bloky sú vhodnou metódou na zistenie príčin bolesti chrbta. Pod röntgenologickou, prípadne ultrasonografickou kontrolou sa injekčnou ihlou aplikuje malé množstvo lokálneho anestetika za účelom znecitlivenia danej oblasti a zistenia zdroja bolesti. Za pozitívne výsled-

Tab. 1: Intervenčné metódy

Intervenčné metódy	
Diagnosticke	Miniinvazívne
blokáda mediálnych ramienok	epiduroskopia
blokáda miechových nervov	endoskopické disektómie
provokačná diskografia	kryoablácia
blokáda sakroiliálneho kĺbu	pulzná, tepelná rádiofrekvencia
rádiofrekvenčná denervácia	blokáda popliteálneho nervu
stimulácia zadných miechových nervov	blokáda <i>nervus peroneus superficialis</i>
intratekálny katéter s implant. pumpou	

Zdroj: upravené podľa Perolat a kol., 2018

ky sa považuje úľava od bolesti nad 80 %. V tabuľke 1 sú uvedené najdôležitejšie intervenčné metódy používané v praxi (Perolat a kol., 2018).

Cieľom štúdie je zistiť, či intervenčné metódy liečby sú vhodné na liečbu chronickej bolesti. Našou úlohou bolo prostredníctvom dotazníka posúdiť úspešnosť predchádzajúcej farmakologickej liečby, zhodnotiť možnosti intervenčnej metódy liečby chronickej bolesti, jej výhody a nevýhody.

MATERIÁL A METÓDY

Získavanie informácií

Výsledky tejto štúdie pozostávajú z údajov získaných od pacientov na algeziologickej ambulancii VÚSCH – Východoslovenský ústav srdcových a cievnych chorôb v Košiciach počas 8 mesiacov. Údaje o užívaných liečivách sú doplnené zo zdravotnej dokumentácie pacientov. Do súboru boli zahrnutí 20 pacienti s chronickou bolesťou trvajúcou 3 a viac mesiacov, ktorí nedostatočne reagovali na konzervatívnu liečbu bolesti, vrátane užívania analgetík, nesteroidných antiflogistík (NSAID) a opioidov, a preto podstúpili niektorú z intervenčných techník. Všetky údaje sú anonymné a spĺňajú použitie v súlade so zákonom o ochrane osobných údajov.

Podmienky vykonávania intervenčných techník

Zákroky boli vedené pod ultrazvukovou kontrolou. Použitý bol ultrazvukový prístroj značky Siemens ACUSTON Sequoia C512. Pacientom bolo pred zákrokom aplikované lokálne anestetikum (trimekaín alebo bupivakaín) a boli bez akejkoľvek sedácie. Po zákroku boli pacienti prepustení v ten istý deň so štandardným protokolom. Všetci pacienti podstúpili nervový blok iba raz.

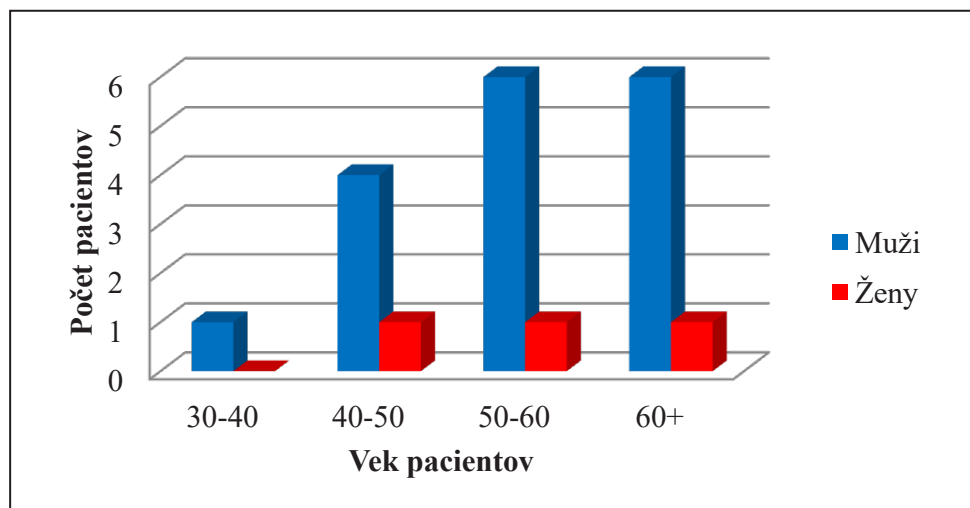
Dotazníky pre pacientov

Dotazník o bolesti bol vyplňaný s pacientmi po vykonaní intervenčného zákroku a následne boli informácie ešte doplnené po telefonickom rozhovore. Hlavným cieľom získavania informácií boli údaje o pacientoch ako je vek a pohlavie, užívané lieky, či v minulosti využívali nefarmakologické možnosti liečby, otázky ohľadom aktuálnej bolesti a subjektívneho pocitu po vykonanej intervencii.

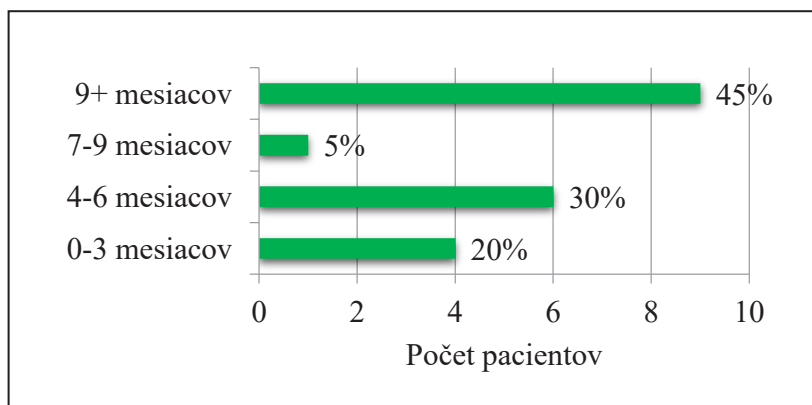
Hodnotenie bolesti

Samotná subjektívna bolesť bola meraná podľa sebahodnotiacej 10-bodovej numerickej stupnice. Po vykonaní intervenčného zákroku boli pacienti požiadaní, aby subjektívne ohodnotili svoju bolesť na stupnici v rozmedzí 0 až 10. Nula bola považovaná za žiadnu bolesť a 10 za najhoršiu možnú bolesť. Bolesť

Graf 1: Rozdelenie pacientov podľa veku a pohlavia (n = 20)



Graf 2: Rozdelenie pacientov podľa trvania bolesti (n = 20)



bola hodnotená pred zákrokom a následne v časovom intervale 2, 12, 24, 48 a 72 hodín od zákroku a dodatočne boli pacienti kontaktovaní ohľadom zodpovedania otázky o návrate bolesti.

VÝSLEDKY

Demografické ukazovatele pacientov

Súbor pacientov v sledovanej skupine sme rozdelili do viacerých kategórií podľa veku, pohlavia, dĺžky trvania bolesti, podľa doterajšej liečby a na základe vykonanej intervenčnej techniky.

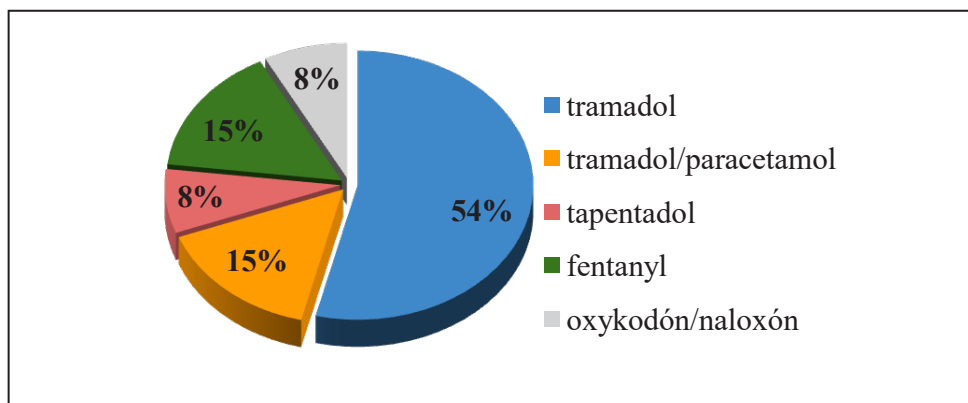
V skupine sledovaných pacientov bolo 20 pacientov, z toho 3 ženy a 17 mužov. Priemerný vek všet-

kých sledovaných pacientov bol 55 rokov. Najmladším pacientom bol muž vo veku 36 rokov a najstarším pacientom bol 66-ročný muž. Ženy v sledovanej skupine boli vo veku 45, 59 a 65 rokov. Až 70 % pacientov tvorila skupina v rozmedzí 50 – 65 rokov (viď graf 1).

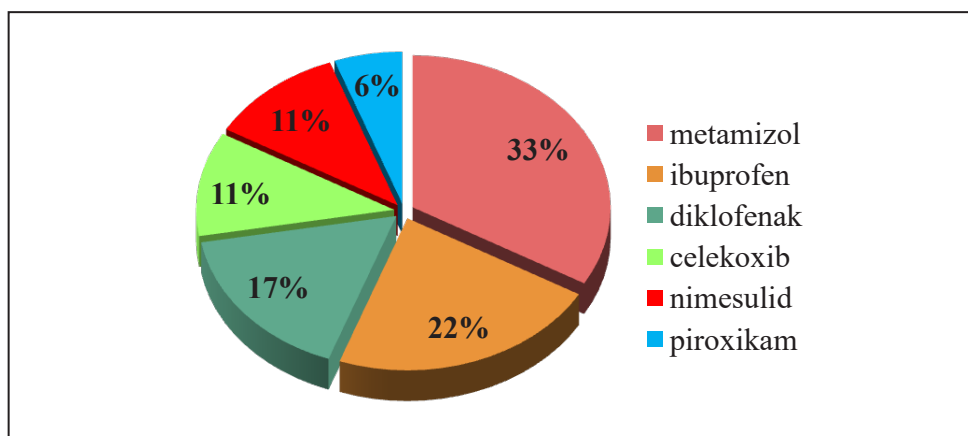
Dĺžka trvania bolesti

Najnižší počet pacientov (5 %) trpel bolesťami 7 – 9 mesiacov. Bolesťou trvajúcou 0 – 3 mesiace trpelo 20 % pacientov. Druhú najväčšiu skupinu tvorili pacienti s bolesťami trvajúcimi od 4 – 6 mesiacov a najvyšší počet pacientov (45 %) malo bolesti 9 mesiacov a viac (viď graf 2).

Graf 3: Užívanie opioidov



Graf 4: Užívanie NSAIDs



Farmakoterapia bolesti

Z celkového počtu pacientov užívajúcich opioidy (13), sedem z nich pri bolesti užívalo tramadol vo forme tabliet alebo kvapiek, čo predstavuje 54 % z celkového počtu užívaných opioidov. Kombináciu tramadol a paracetamol užívali dvaja pacienti (15 %), štyria pacienti (31 %) užívali silné opioidy (viď graf 3).

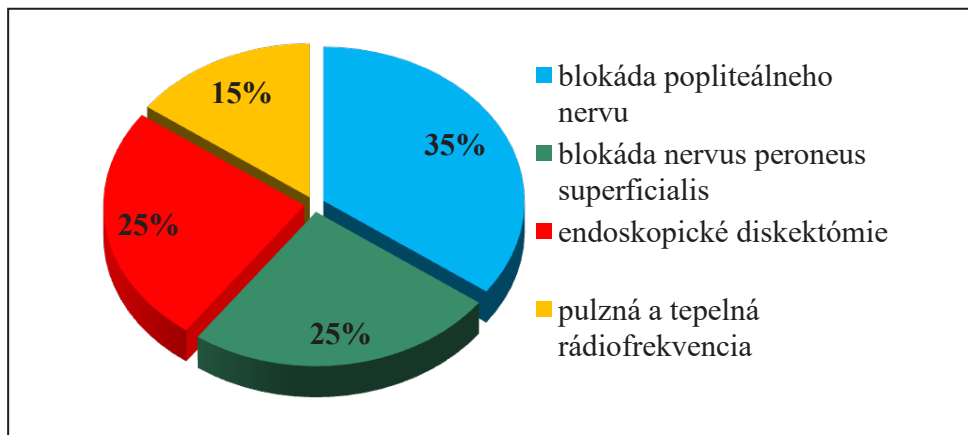
Z počtu 15 pacientov, ktorí užívali neopiooidné analgetiká a NSAIDs, šiesti užívali metamizol (33 %), štyria ibuprofén (22 %), traja diklofenak (17 %), dvaja nimesulid (11 %) a celekoxib (11 %) a jeden pacient užíval piroxikam (viď graf 4).

Monoterapiou boli liečení traja pacienti (15 %). Išlo o 2 pacientov užívajúcich nesteroidné antiflogistikum diklofenak, resp. ibuprofén a 1 pacienta užívajúceho opiát oxykodón.

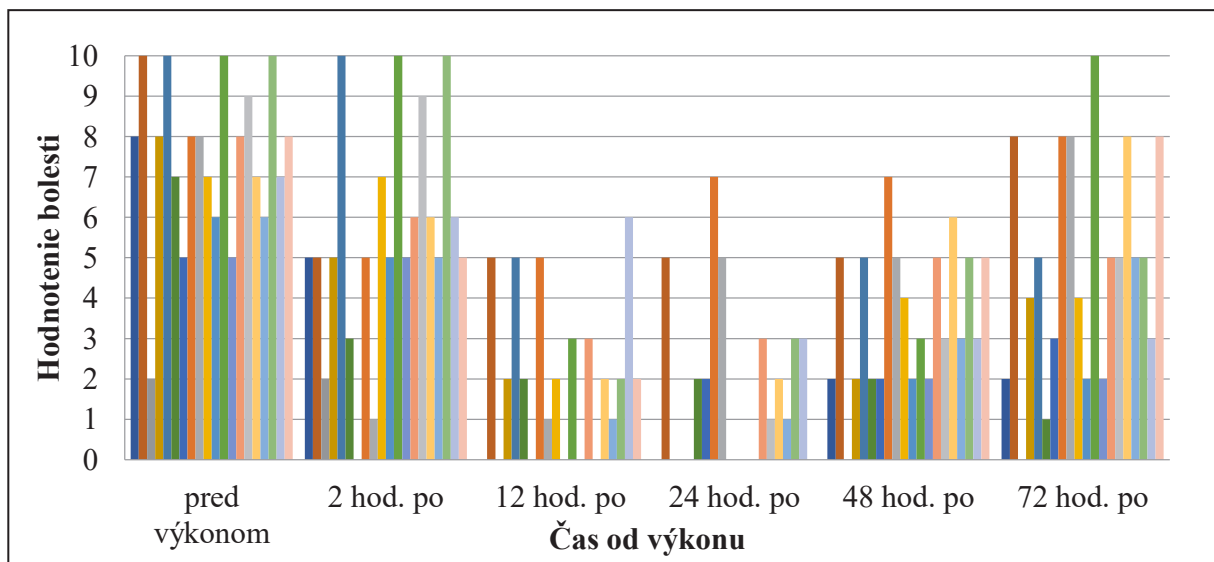
Dvojkomináciu liekov užívalo 30 % pacientov. Patria tu kombinácie analgetika s adjuvantným analgetikom ako diklofenak + mefenoxalón, paracetamol/tramadol + duloxetín, nimesulid + pregabalín, metamizol + gabapentín. Dvojkombináciu zahrňovali aj kombinácie dvoch analgetík, tramadol + celekoxib, metamizol + celekoxib.

Z našich zistení však vyplýva, že najviac pacientov (45 %) užívalo **trojkombináciu** liekov. Ide o kombi-

Graf 5: Vykonané intervenčné techniky



Graf 6: Jednotlivé skóre bolesti pred a po zákroku na 10-bodovej stupnici



náciu analgetík s anxiolytikami (alprazolam), antiepileptikami (pregabalín alebo gabapentín) a kortikosteroidmi (metylprednizolón alebo dexametazón).

Dvaja pacienti (10 %) užívali **štvorkombináciu liekov** proti bolesti. Jeden z nich užíval dve analgetiká (metamizol + piroxikam) s anxiolytikom (alprazolam) a myorelaxantom (gvajfenezín). Druhý pacient mal nastavenú liečbu z analgetika (nimesulid), anxiolytika (alprazolam), myorelaxancia (mefenoxalón) a antiepileptika (pregabalín).

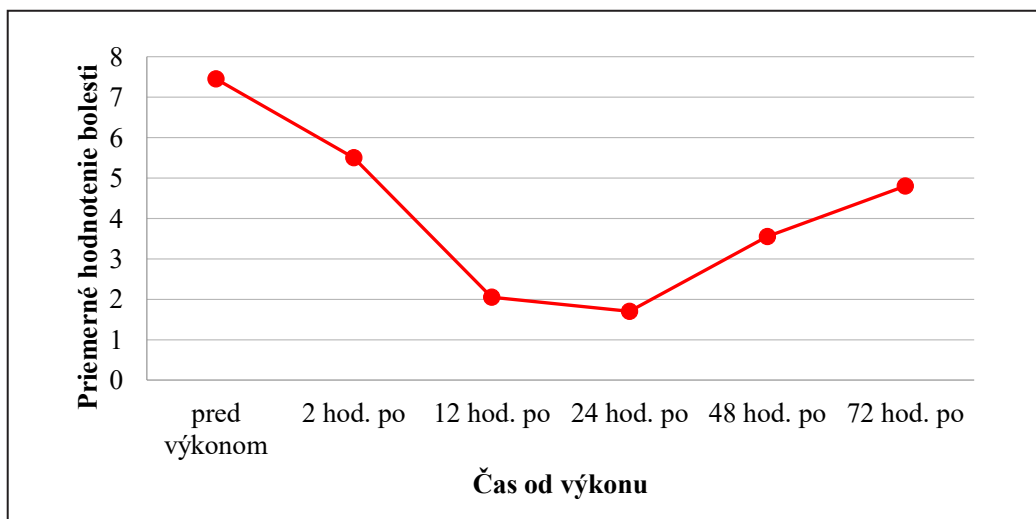
Z celkového počtu pacientov vyskúšalo **nefarmakologickú liečbu** bolesti takmer 59 %. Rehabilitácie, cvičenie a fyzioterapiu vyskúšalo 32 % pacientov.

Masáže pomáhali 14 % pacientov a 13 % pacientov
vyskúšalo terapiu chladom a teplom.

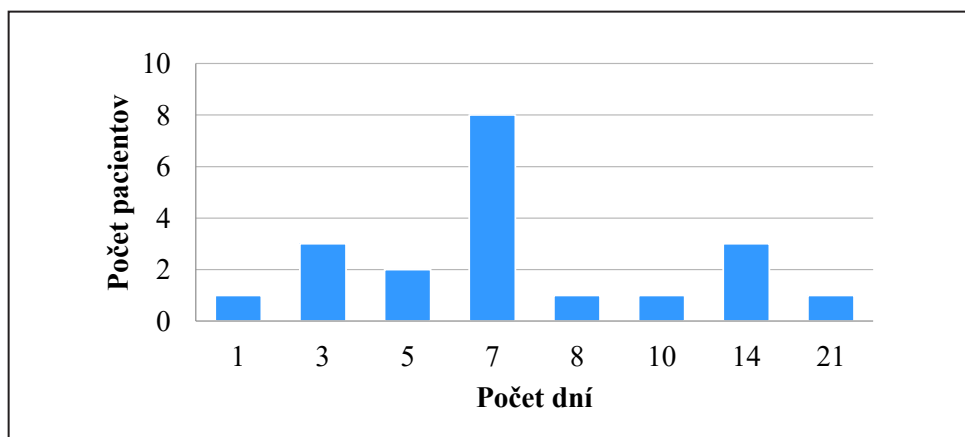
Vykonané intervenčné techniky

Zo súboru 20 pacientov, všetci pacienti podstúpili intervenčný zákrok (viď graf 5). Z nich 35 % podstúpilo blokádu popliteálneho nervu (lokalizovaný v podkolennej jamke), 25 % blokádu *nervus peroneus superficiialis* (na dorze chodidla) a endoskopickú disektómiu (medzistavcová platnička), a 15 % pulznú a tepelnú rádiovlnovú metódu (blokáda nervu, ktorý spôsobuje bolesť).

Graf 7: Priemerné skóre bolesti pred a po zákroku



Graf 8: Návrat bolesti po vykonanom zákroku (n = 20)



Účinnosť intervenčnej techniky udáva graf 6 a 7. Pacienti hodnotili subjektívne skóre bolesti v čase pred zákrokom a následne 2, 12, 24, 48 a 72 hodín po zákroku. Svoju bolesť pacienti hodnotili na numerickej stupnici od 0 po 10.

Na grafe 6 je ohodnotená bolesť jednotlivými pacientmi, najnižšie hodnoty sú uvádzané 12 a 24 hodín po zákroku. Následne na oboch grafoch je viditeľné stúpanie ohodnotenej bolesti po 48 a 72 hodín od zákroku. Avšak aj po 72 hodinách od zákroku u väčšiny pacientov bola ohodnotená bolesť nižšia ako pred výkonom.

Na grafe 7 je znázornená priemerná najnižšia hodnota bodov (1 – 10) od 2 do 72 hodín po vykonaní intervenčného zákroku.

Z grafu 8 vyplýva návrat bolesti udávaný v dňoch. Najkratšia analgézia trvala 24 hodín. Naopak, najdlhšie bol pacient bez bolesti 21 dní. Priemerne sa návrat bolesti dostavil za 7,85 dňa.

DISKUSIA

Táto štúdia objasňuje možnosti liečby chronickej bolesti, či už konvenčnými metódami, alebo novšími

intervenčnými zákrokmi. Jej súčasťou je vyhodnotenie úspešnosti intervenčných techník.

Schopnosť cítiť bolesť je bežný fyziologický proces, ktorý nás chráni pred zranením a upozorňuje na nebezpečenstvá. Je prospešný pre naše telo. Avšak stav chronickej bolesti telo vyčerpáva a nemá užitočný biologický účel (Huang a kol., 2020). Pri akútnej bolesti je potrebné zvládnuť kontrolu symptómov, ale pri chronickej bolesti sa vyžaduje špecifickejší, cielenejší farmakologický zásah (Kaye a kol., 2018). Súčasťou chronickej bolesti je v mnohých prípadoch aj stav depresie, úzkosti a tiež dochádza ku zhoršeniu kognitívnych funkcií (Corsi a kol., 2018). Bolesť má podstatný vplyv nielen na samotného pacienta, ale často krát aj na rodinných príslušníkov, zdravotnícku službu a ekonomiku krajiny (Veloso a kol., 2021).

Pacienti zaradení do nášho súboru navštívili algeziologickú ambulanciu v Košiciach, pretože všetci trpeli chronickou bolesťou. Po dôkladnej anamnéze a vyhodnotení zdravotného stavu bol pacientom odporúčaný intervenčný zákrok. Išlo o ambulantný zákrok, po ktorom sa odporúčalo určitý čas zotrvať v čakárni v prípade komplikácií. Po tomto zákroku bol s pacientom vyplnený dotazník o bolesti, ktorý obsahoval základné otázky o aktuálnej bolesti a ich subjektívne hodnotenie bolesti po zákroku.

Chronická bolesť je definovaná dĺžkou trvania bolesti aspoň 3 mesiace. V našej skupine pacientov sa nachádzali pacienti iba s chronickou bolesťou a rozdelili sme ich do štyroch skupín podľa trvania bolesti. Do skupiny pacientov s bolesťou trvajúcou 3 mesiace patria štyria pacienti. Do rozmedzia 4 – 6 mesiacov s bolesťami patria šiesti pacienti. Jeden pacient trpel bolesťami 7 mesiacov a poslednú najväčšiu skupinu tvorili pacienti s bolesťou 9 mesiacov a viac. Neuropatickou bolesťou trpelo 35 % pacientov. Podľa štúdie z roku 2019 je známe, že neuropatická bolesť slabo reaguje na liečbu opioidmi. Je to najťažšie liečiteľný typ bolesti (Griger a kol., 2019). Z toho dôvodu je práve intervenčná technika možnosťou liečby chronickej neuropatickej bolesti. Neopiodné analgetiká a nesteroidné protizápalové lieky sú najčastejšie používané pri liečbe bolesti a vykazujú veľmi dobrú

účinnosť pri krátkodobej úľave (Urits a kol., 2019). Opioidné analgetiká sa používajú na liečbu silnej, pooperačnej a nádorovej bolesti. Pre lepšie zvládanie bolesti sa k analgetikám zvyknú pridávať aj doplnkové lieky nazývané adjuvantné analgetiká (antidepresíva, antiepileptiká, anxiolytiká, hypnotiká a myorelaxanciá) (Hylands-White a kol., 2017). Podľa štúdie z roku 2021 je monoterapia v liečbe chronickej bolesti nedostačujúca (Veloso a kol., 2021).

Z výsledkov našej štúdie sme zistili, že z farmakologickej liečby boli najviac zastúpené nesteroidné antiflogistiká, z nich najčastejšie používané sú metamizol, ibuprofén a diklofenak. Zo skupiny slabých opioidov, ktoré boli zastúpené v menšej miere, sa najčastejšie užíval tramadol vo forme tabliet aj vo forme kvapiek a kombinácia tramadolu a paracetamolu. Zo skupiny silných opioidov štyria pacienti užívali liečivá tapentadol, oxykodón/naloxón a fentanyl vo forme sublinguálnych tabliet aj vo forme náplastí. Z adjuvantných analgetík išlo najčastejšie o antiepileptiká, myorelaxanciá, antidepresíva a kortikosteroidy. Podľa výsledkov štúdie z roku 2020 nemá individuálna liečba prínos v terapii bolesti, preto sa odporúča kombinovaná liečba (Flynn, 2020). V našej skupine pacientov boli traja pacienti, ktorí sa liečili monoterapiou, dvojkombináciou bolo liečených šesť pacientov, najvyšší počet pacientov patrí do skupiny s trojkombináciou liečiv a dvaja pacienti boli liečení štvorkombináciou. V niektorých prípadoch však nemá farmakologická liečba dostatočný vplyv na liečbu chronickej bolesti.

Pre priaznivejšie výsledky je vhodné ku farmakologickej liečbe zahrnúť aj nefarmakologickú liečbu. Nefarmakologická liečba v mnohých prípadoch prináša zlepšenie bolestivých stavov, a to spolu s invazívnou liečbou. Rôzne formy cvičenia, masáže, akupunktúry, alternatívnej medicíny, chudnutia a rehabilitácie sú účinné pri liečbe bolesti. Súčasťou nefarmakologickej liečby sú aj psychoterapeutické a kognitívno-behaviorálne metódy. Pri chronických bolestiach tvoria veľmi dôležitú súčasť liečby (Flynn, 2020). V našej skupine využilo nefarmakologickú liečbu bolesti 14 pacientov. Z toho počtu až 31 % pacientov vyskúšalo rehabilitácie, zdravotné cvičenie, fyzioterapiu. V

menšej miere boli zastúpené masáže, aplikácie tepla a chladu.

V rámci nedostatočnej kontroly bolesti sa siahajú aj po invazívnych metódach. Patria tu denervačné metódy liečby, implantovateľné mechanizmy a nervové stimulátory. Výhodou použitia intervenčnej liečby je menší chirurgický rez, nižšie riziko infekcie, lepšia rekonvalescencia. Avšak použitie týchto metód je drahšie a riskantnejšie. V mnohých prípadoch sa používajú pre pacientov, ktorí neodpovedajú na farmakologickú liečbu (Hylands-White a kol., 2017). Ultrazvukom riadené blokády periférnych nervov ponúkajú určité výhody ako je bezpečnosť, komfort a vyššia spokojnosť pacienta. Kratšia hospitalizácia a aj nižšie náklady na hospitalizáciu patria k ďalším výhodám. V porovnaní s celkovou anestéziou majú nervové blokády menej nežiaducich účinkov na kardiovaskulárny a pulmonálny systém (Li a kol., 2021). Podľa štúdie z roku 2019 ponúkajú intervenčné metódy v liečbe bolesti jednoznačné analgetické účinky. Vďaka pôsobeniu nervovej blokády je možné eliminovať chronickú bolesť a tiež znížiť množstvo opioidov užívaných v pooperačnom období. Výsledkom štúdie je signifikantné zníženie pooperačnej bolesti (0 – 6 hodín po operácii) u pacientov s použitím blokády pectorálneho nervu spolu s celkovou anestéziou v porovnaní s pacientmi len v samotnej celkovej anestézii. Pooperačná bolesť môže znížiť kvalitu života pacienta. Kontrola pooperačnej bolesti môže pomôcť pacientom v rekonvalescencii a následnej rehabilitácii (Zhao a kol., 2019).

Všetci pacienti v nami sledovanej skupine podstúpili intervenčný zákrok. Najviac pacientov podstúpilo blokádu popliteálneho nervu a blokádu *nervus peroneus superficialis*. Ide o blokády nervov dolnej končatiny a slúžia na inerváciu prstov, chodidla, päty. Päť pacientov podstúpilo endoskopickú disektómiu a traja pacienti podstúpili pulznú a tepelnú rádiovú frekvenčnú metódu. Naším cieľom bolo zhodnotiť účinnosť intervenčnej liečby pri terapii chronickej bolesti, a to prostredníctvom dotazníka. Bolesť bola ohodnotená (10-bodovou numerickou škálou) pred samotným intervenčným výkonom a následne 2, 12,

24, 48 a 72 hodín po zákroku. Hodnotená bolesť pred výkonom a dve hodiny po výkone sa líšila len v niektorých prípadoch tým, že bolesť po dvoch hodinách od výkonu bola o pár bodov nižšia. Najnižšie hodnoty bolesti uvádzali pacienti po 12 a 24 hodinách od výkonu. Následne mali hodnoty stúpajúcu tendenciu. Najkratšie trvanie analgézie bolo u pacienta, ktorému sa bolesť vrátila po 24 hodinách po zákroku. Najdlhšie trvala úľava od bolesti 21 dní. V priemere došlo k návratu bolesti po 7,85 dňa. Štúdia z roku 2020 skúmala úľavu od bolesti oka podaním lokálneho anestetika metódou intervenčného zákroku. Pacienti trpeli chronickými, neuropatickými bolesťami očí. V štúdii zistili, že 7 z 11 pacientov zaznamenalo úľavu od bolesti po intervenčnom zákroku, inervácii nervového zakončenia. Úľava od bolesti trvala rôzne dlho, najviac však 7 mesiacov (Small a kol., 2020). Ďalšia štúdia z roku 2020 skúmala, či blokáda pectorálneho nervu má účinok v liečbe pooperačnej bolesti u žien s rakovinou prsníka. Skóre bolesti bolo hodnotené 1, 2, 3, 6, 12 a 24 hodín po zákroku. Výsledkom tejto štúdie je, že použitie nervového bloku významne znížilo skóre bolesti v 24-hodinovom pooperačnom období. Došlo ku zníženiu chronickej bolesti, zlepšeniu spánku, vyššej spokojnosti pacientov a kratšej hospitalizácii (Sun a kol., 2020).

Bolesť predstavuje závažný celosvetový problém verejného zdravia. Ak je bolesť nedostatočne kontrolovaná, môže negatívne ovplyvniť kvalitu života pacienta. Z hľadiska patofyziologických mechanizmov je bolesť veľmi zložitý stav. Pre úspešnú liečbu chronickej bolesti sú v súčasnosti dostupné intervenčné metódy liečby (Velošo a kol., 2021). Intervenčné metódy liečby bolesti predstavujú veľký pokrok v liečbe chronických bolestivých stavov. Neustále dochádza ku vzniku inovácií, vývoju, zdokonaľovaniu techník. Tieto metódy sú čoraz viac dostupné pre širšiu populáciu pacientov trpiacich chronickými bolesťami (Vaishnav a kol., 2019).

ZÁVER

Dôkladná anamnéza pacienta je dobrým predpokladom úspešnej liečby. Komplexná liečba bolesti zahŕňa farmakologickú liečbu analgetikami, nefarmakologickú liečbu a v neposlednom rade aj psychoterapiu. Stále sa však nájdu pacienti s nedostatočnou kontrolou bolesti. V takom prípade je možné aplikovať invazívnu metódu. Intervenčné metódy liečby sú moderné, inovatívne techniky, určené pre niektoré typy bolesti. Intervenčné metódy majú svoje výhody aj nevýhody. Blokády nervových štruktúr sú, žiaľ, len dočasné a neprinášajú trvalú úľavu od bolesti. Nie každý pacient pociťuje rovnakú úľavu od bolesti a taktiež tieto metódy nie sú vhodné pre každého pacienta.

Z výsledkov tejto štúdie vyplýva, že intervenčné možnosti liečby chronickej bolesti sú veľkým prínosom v súčasnej terapii a prinášajú pacientom úľavu od bolesti po psychickej aj fyzickej stránke. Zmierňovanie prežívanej bolesti významne ovplyvňuje rekonvalescenciu a môže napomôcť k rýchlejšiemu zotaveniu a k zaradeniu do bežného života. Pacientom sa uľavilo od bolesti na nejaký čas, a to je veľkým prínosom v liečbe chronickej bolesti.

Intervenčné metódy patria k najpokročilejším možnostiam liečby bolesti. Sú efektívne, rýchle a bezpečné. Výkony praktizujú špecialisti z odboru intervenčnej algeziológie. Intervenčné zákroky ponúkajú veľký potenciál ovplyvňovania bolesti nielen v zahraničí, ale aj u nás.

ZOZNAM LITERATÚRY

Corsi, N., Roberto, A., Cortesi, L., Nobili, A., Mannucci, P. M., Corli, O.: REPOSI Investigators. Prevalence, characteristics and treatment of chronic pain in elderly patients hospitalized in internal medicine wards. *European Journal of Internal Medicine*, 2018, 55, 35 – 39.

Ellison, D. L.: Physiology of pain. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 2017, 29 (4), 397 – 406.

Fillington, R. B., Loeser, J. D., Baron, R., Edwards, R. R.: Assessment of chronic pain: domains, methods, and mechanisms. *The Journal of Pain*, 2016, 17 (9), T10 – T20.

Flynn, D. M.: Chronic musculoskeletal pain: nonpharmacologic, noninvasive treatments. *American Family Physician*, 2020, 102 (8), 465 – 477.

Griger, M., Rapčan, R., Kočan, L., Rapčanová, S., Kočanová, H.: Intervenčné techniky v liečbe refraktérnej onkologickej bolesti [Interventional pain procedures for refractory cancer pain]. *Onkológia*, 2019, 14 (5), 352 – 356.

Huang, J., Zhang, Z., Zamponi, G. W.: Pain: integration of sensory and affective aspects of pain. *Current Biology*, 2020, 30 (9), R393 – R395.

Hylands-White, N., Duarte, R. V., Raphael, J. H.: An overview of treatment approaches for chronic pain management. *Rheumatology International*, 2017, 37 (1), 29 – 42.

Kaye, A. D., Cornett, E. M., Hart, B., Patil, S., Pham, A., Spalitta, M., Mancuso, K. F.: Novel pharmacological nonopioid therapies in chronic pain. *Current Pain and Headache Reports*, 2018, 22 (4), 31.

Kulichová, M.: *Algeziológia* [Algesiology]. EDIS vydavateľstvo Žilinskej univerzity v Žiline, 2005. 299 s.

Li, Y., Zhang, Q., Wang, Y., Yin, C., Guo, J., Qin, S., Zhang, Y., Zhu, L., Hou, Z., Wang, Q.: Ultrasound-guided single popliteal sciatic nerve block is an effective postoperative analgesia strategy for calcaneal fracture: a randomized clinical trial. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2021, 22 (1), 735.

Mirossay, L., Mojžiš, J. a kol.: *Základná farmakológia a farmakoterapia* [Basic pharmacology and pharmacotherapy]. Košice: Equilibria, 2006. 533 s.

Perolat, R., Kastler, A., Nicot, B., Pellat, J. M., Tahon, F., Attie, A., Heck, O., Boubagra, K., Grand, S., Krainik, A.: Facet joint syndrome: from diagnosis to interventional management. *Insights Imaging*, 2018, 9 (5), 773 – 789.

Poliak, L., Rapčan, R., Griger, M., Mláka,

- J., Buriánek, M., Tirpák, R., Lenčěš, P., Matias, M., Kočan, L.: Komplexná liečba radikulárneho syndrómu (Prehľad terapeutických možností) [Complex therapy of lumbar radicular syndrome (Overview of therapeutic possibilities)]. *Bolest*, 2019, 22 (2), 1 – 8.
- Schug, S. A., Daly, H. C. S., Stannard, K. J. D.: Pathophysiology of pain. In: Fitridge R., Thompson M.: *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. Adelaide: University of Adelaide Press, 2011. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534269/>. Accessed December 5, 2021.
- Small, L. R., Galor, A., Felix, E. R., Horn, D. B., Levitt, R. C., Sarantopoulos, C. D.: Oral gabapentinoids and nerve blocks for the treatment of chronic ocular pain. *Eye Contact Lens*, 2020, 46 (3), 174 – 181.
- Sun, Q., Liu, S., Wu, H., Kang, W., Dong, S., Cui, Y., Pan, Z., Liu, K.: Clinical analgesic efficacy of pectoral nerve block in patients undergoing breast cancer surgery: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99 (14), e19614.
- Treede, R. D., Rief, W., Barke A., Aziz, Q., Bennett, M. I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N. B., First, M. B., Giamberardino, M. A., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., Smith, B. H., Svensson, P., Vlaeyen, J. W. S., Wang, S.-J.: Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain*, 2019, 160 (1), 19 – 27.
- Urits, I., Burshtein, A., Sharma, M., Testa, L., Gold, P. A., Orhurhu, V., Viswanath, O., Jones, M. R., Sidransky, M. A., Spektor, B., Kaye, A. D.: Low back pain, a comprehensive review: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Current Pain and Headache Reports*, 2019, 23 (3), 23.
- Vaishnav, A. S., Othman, Y. A., Virk, S. S., Gang, C. H., Qureshi, S. A.: Current state of minimally invasive spine surgery. *Journal of Spine Surgery (Hong Kong)*, 2019, 5 (1), S2 – S10.
- Veloso, C., Cardoso, C., Vitorino, C.: Topical fixed-dose combinations: a way of progress for pain management? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021, 110 (10), 3345 – 3361.
- White, P.: What are the advantages of non-opioid analgesic techniques in the management of acute and chronic pain? *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2017, 18 (4), 329 – 333.
- Yang, Y., Maher, D. P., Cohen, S. P.: Emerging concepts on the use of ketamine for chronic pain. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 2020, 13 (2), 135 – 146.
- Zhao, J., Han, F., Yang, Y., Li, H., Li, Z.: Pectoral nerve block in anesthesia for modified radical mastectomy: A meta-analysis based on randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98 (18), e15423.



MOŽNOSTI TERAPIE LYMSKEJ BORELIÓZY

THERAPY OPTIONS FOR LYME BORRELIOSIS

Dubjelová, Elena; Kostecká, Zuzana

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

zuzana.kostECKA@uvlf.sk

ABSTRACT

Lymfská borelióza je stále viac rozšíreným ochorením z dôvodu klimatických zmien spôsobujúcich zvýšený výskyt kliešťov. Spomedzi článko-
nožcov, kliešte prenášajú rôzne druhy patogénov vrátane pôvodcu boreliózy – *Borrelia burgdorferi*. Borelióza sa diagnostikuje na základe prítomnosti *erythema migrans*, zvýšenej únavy, artralgií, príznakov podobných chrípke. Ak nie je dostatočne rýchlo diagnostikovaná a správne liečená, môže postihnúť aj iné orgánové systémy ako kardiovaskulárny, nervový systém a zmyslové orgány. Na liečbu sa využívajú antibiotiká z rôznych skupín – doxycyklín, amoxicilín alebo cefuroxim axetil. Makrolidy sú liekom druhej voľby a využívajú sa u pacientov, ktorí netolerujú iné antibiotiká. Pri prejavoch fotosenzitivity a pri liečbe neuroboreliózy je možné zameniť doxycyklín za minocyklín, ktorý je lipofilnejší a lepšie prechádza hematoencefalickou bariérou. U detí do 8 rokov a tehotných

žien je doxycyklín kontraindikovaný. Cieľom štúdie bolo zozbierať demografické údaje o pacientoch, zistiť, či výskyt lymfskej boreliózy je podmienený prisatím kliešťa, zhodnotiť výskyt akútnej a chronickej formy ochorenia a ich príznakov, posúdiť v praxi využívané možnosti diagnostiky a terapie a porovnať výsledky získané vyhodnotením dotazníka s vlastnou kazuistikou. Prieskum sme uskutočnili pomocou anonymného dotazníka na vzorke 141 respondentov, z toho 113 žien (80,1 %). Vyhodnotením odpovedí sme zistili, že najčastejším prejavom akútnej formy boreliózy bolo *erythema migrans* (54,5 %) a chronickej formy únava a nespavosť (56 %). Najčastejšou terapiou bola dlhodobá liečba antibiotikami (52,4 %) alebo krátkodobá liečba antibiotikami (48,9 %). V menšej miere pacienti skúsili podpornú liečbu (39 %), najčastejšie Buhnerovým bylinným protokolom (36,9 %) alebo infúznym vitamínom C (26,2 %). Zlepšenie zdravotného stavu po liečbe zaznamenalo 63,8 % respondentov.

Kľúčové slová: antibiotiká; *Borrelia burgdorferi*; kliešť; lymská borelióza

ABSTRACT

Lyme borreliosis is more extended because of climate changes and related over-reproduction of ticks. Of all arthropods ticks carry a lot of different pathogens including the pathogen of Lyme borreliosis – *Borrelia burgdorferi*. Lyme disease could be confirmed by the presence of *erythema migrans*, increased exhaustion, arthralgia, symptoms similar to flu. When the Lyme disease is not well diagnosed and treated, another organ systems of the body could be affected, for example cardiovascular, nervous system and sensory organs. For treatment, antibiotics of different groups as amoxicillin, doxycycline and cefuroxime axetil are used. Macrolides are considered as a second choice remedy and are used for patients who cannot take another antibiotics. Doxycycline can be exchanged for minocycline in photosensitivity and in the treatment for neuroborreliosis. It is more lipophilic and is better transferred through hematoencephalic barrier. Doxycycline is contraindicated in children younger than 8 years and in pregnant women. The aim of this study was to collect demographic data, to find out if occurrence of this disease is caused by sucking of ticks, to review the acute and chronic form of the Lyme disease and their specific symptoms, to take measure of diagnosis and treatment options for Lyme disease used in practice and compare the results obtained from questionnaire with our own case. Research was realized with anonymous questionnaire on the sample of 141 respondents. 113 (80.1 %) of them were women. Based on the answers we evaluated that the most common symptom of acute Lyme disease was *erythema migrans* (54.5 %) and of chronic form Lyme disease it was exhaustion and insomnia (56 %). The most common treatment of Lyme disease was long term antibiotic treatment (52.4 %) or short term antibiotic treatment (48.9 %). Some

patients tried supportive treatment (39 %), the most often herbal treatment with Buhner protocol (36.9 %) and intravenous therapy with vitamin C (26.2 %). Improvement of health condition after treatment was noticed by 63.8 % of the patients.

Key words: antibiotics; *Borrelia burgdorferi*; tick; Lyme borreliosis

ÚVOD

Od odhalenia patogénu lymskej boreliózy ubehli štyri desaťročia a aj napriek poznaniu účinnej terapie výskyt tohto ochorenia nie je na ústupe. Počet hlásení lymskej boreliózy v Slovenskej republike v rokoch 2010 – 2019 varíruje od 680 (2014) do 1104 (2016) (Regionálny úrad verejného zdravotníctva v Banskej Bystrici, 2019).

Zmeny klimatických podmienok majú za následok nárast počtu kliešťov vo voľnej prírode, vektora mnohých infekcií vrátane lymskej boreliózy. Lymská borelióza je spôsobená baktériami rodu *Borrelia* u zvierat a ľudí, hostiteľských organizmov kliešťov, prisatých na ich kožu dlhšie ako 36 hodín. Infekcia boréliami nie je zapríčinená len kliešťami, ale aj inými krv cicajúcimi článkonožcami (Pistl a kol., 2009).

Klinická symptomatológia postihuje mnoho orgánových sústav a nemá jednoznačný typický priebeh. Diagnostika lymskej boreliózy sa okrem zhodnotenia klinických symptómov potvrdzuje aj laboratórnym vyšetrením. Možnosti laboratórnej diagnostiky sú široké, ale častokrát málo špecifické. Diagnóza sa môže stanoviť po dlhšom čase, kedy si pacient už nepamätá kontakt s krv cicajúcim hmyzom. V snahe uľahčiť diagnostiku lymskej boreliózy bola vypracovaná klasifikačná schéma podľa organizácie EUCALB (European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis), zahŕňajúca sedem kritérií: *erythema migrans*, lymfocytóm, *acrodermatitis chronica atrophicans*, skorú neuroboreliózu, chronickú neuroboreliózu, lymskú artritídu a lymskú karditídu (Roháčová, 2005).

Možnosti kauzálnej terapie (viď tab. 1) predstavujú v prípade včas diagnostikovaného ochorenia úspešnú

Tab. 1: Odporúčanie EUCALB pre liečbu lymskej boreliózy

Liek	Dávka/deň	Aplikácia	Dĺžka liečby (dni)
<i>Erythema migrans</i> a boréliový lymphocytóm			
Amoxicilín	3 x 500 mg alebo 2 x 1 g	p.o.	14 – 21
Doxycyklín	2 x 100 mg alebo 1 x 200 mg	p.o.	14 – 21
Fenoxymetylpenicilín	3 x 1000 mg	p.o.	14 – 21
Cefuroxim axetil	2 x 500 mg	p.o.	14 – 21
Neuroborelióza			
Ceftriaxon	1 x 2 g	i.v.	14 – 21
Cefotaxim	3 x 2 g	i.v.	14 – 21
Penicilín G	3 x 3 g	i.v.	14 – 21
Doxycyklín	2 x 100 – 200 mg	p.o.	14 – 28
Akrodermatitída			
Amoxicilín	3 x 500 mg alebo 2 x 1 g	p.o.	21 – 28
Doxycyklín	2 x 100 mg alebo 1 x 200 mg	p.o.	21 – 28
Ceftriaxon	1 x 2 g	i.v.	14 – 21
Cefotaxim	3 x 2 g	i.v.	14 – 21
Penicilín G	3 x 3 g	i.v.	14 – 21
Lymská artritída			
Ceftriaxon	1 x 2 g	i.v.	14 – 21
Cefotaxim	3 x 2 g	i.v.	14 – 21
Penicilín G	3 x 3 g	i.v.	14 – 21

antibiotickú liečbu v priebehu dvoch až štyroch týždňov (Roháčová, 2005). Makrolidy sú menej účinné v liečbe a využívajú sa ako liek druhej voľby, ak pacienti netolerujú primárnu liečbu. Neskoro diagnostikované ochorenie vyžaduje dlhodobú kombináciu antibiotík a symptomatickú liečbu na základe príznakov postihujúcich viaceré orgánové systémy.

Základné odporúčania pre liečbu sú nasledovné: 1. kombinovať antibiotiká kvôli dvojitému umiestneniu borélií v tkanivách aj v telesných tekutinách, ďalej kvôli intracelulárnemu úkrytu a tvorbe cýst (kombinácia s metronidazolom); 2. podávať cholestyramínovú živicu alebo cholestagel kvôli tvorbe neurotoxínov, ktoré sa ukladajú v tukovom tkanive a enterohepatickým obehom sú vylučované naspäť do krvi; 3. pri rezistencii na betalaktámové antibiotiká a cefalosporíny kvôli tvorbe betalaktamáz a cefalosporináz nasa-

diť sulbaktám/ampicilín, imipeném a vankomycín; 4. nepodávať imunosupresíva vrátane kortikosteroidov, ak je liečba kortikoidmi nutná, tak antibiotická liečba by mala začať minimálne 48 hodín predtým; 5. aplikovať pulznú liečbu – antibiotikum sa podáva 2 až 4 dni každý týždeň. Výhodou je zdvojnásobenie dávok, čo zvyšuje účinnosť a toxické lieky môžu byť použité s väčšou bezpečnosťou (napr. vankomycín). Táto liečba je založená na tom, že baktericídna aktivita antibiotika je udržiavaná 48 – 72 hodín, aby boli borelie zlikvidované a počas ďalších 4 až 5 dní sa môžu zacystené borelie množiť (Burrascano, 2009).

Okrem antibiotík pri liečbe je dôležitá aj rehabilitácia, doplnky výživy, odpočinok, vyhýbanie sa stresu, strava s vysokým obsahom vlákniny, abstinencia od alkoholu, kofeínu atď. Existuje viacero možností podpornej liečby lymskej boreliózy.

Marshalov protokol je liečebný postup, ktorého princípom je obnoviť pacientovu vrodennú imunitu. Pacient užíva Olmesartan medoxomil, ktorý je schopný sa viazať na receptor vitamínu D a aktivovať ho vytlačením kalcidiolu a bakteriálnych proteínov z receptora. Ide o znižovanie hladiny kalcidiolu v tele vyháňaním sa vitamínu D prítomného v potravinách. Imunitný systém by mal byť schopný zničiť L-formy baktérií. Súčasne sa užívajú v troch fázach pulznej liečby nízke dávky bakteriostatických antibiotík (minocyklín, v druhej sa pridá azitromycín a v tretej kľindamycín, kotrimoxazol a demeklocyklín). Sú schopné oslabiť L-formy baktérií a imunitný systém pacienta je schopný ich zničiť (Borelioza CZ, n. d.).

Buhnerov protokol predstavuje bylinnú liečbu, ktorá má väčší úspech pri podpore imunity, symptomatickej liečbe a podpore kolagénových vlákien. Symptomatická liečba je dôležitá kvôli dlhodobej liečbe antibiotikami a tiež u mnohých pacientov antibiotická liečba nezaberá. Základný Buhnerov protokol sa môže užívať súčasne s antibiotickou terapiou. Zahŕňa tri hlavné a dve doplnkové byliny *Andrographis paniculata* (pravenka latnatá, obsahujúca hlavné účinné látky andrografolid, dehydroandrografolid, neoandrografolid, andrografozid), *Polygonum cuspidatum* (krídlatka japonská, obsahujúca hlavné účinné látky emodín, chryzorfanol, reín emodín, resveratrol), *Uncaria tomentosa* (mačací pazúr, obsahujúci hlavné účinné látky oxindolové alkaloidy, glykozidy kyseliny chinovikovej, katechíny, taníny), môže sa pridať *Astragalus membranaceus* (kozinec blanitý, obsahujúci hlavné účinné látky astragalozid 1 – 7, astrazoflavín, astramembranagenín, kyselinu gama-aminomaslovú, izoastragalozid 1, 2 a 4) a *Smilax* (smilax, obsahujúci hlavné účinné látky sarsapogenín, smilagenín, sitosterolsarsasaponín, smilasaponín). Môže byť pridaný vitamín C, ktorý podporuje tvorbu kolagénového tkaniva a pôsobí proti zápche. Je možné ho obohatiť o rozšírený protokol pre pacientov, ktorí nechcú užívať antibiotiká alebo antibiotická liečba nebola účinná. Rastliny v tomto protokole sú určené na špecifické príznaky pre konkrétného pacienta [napr. bolesti kĺbov a ataky artritídy – *Dipsacus sylvestris* (štetka

lesná), vitamín A] (Buhner, 2014).

Cieľom štúdie je charakterizovať lymskú boreliózu, jej klinické príznaky, diagnostiku a posúdiť možnosti terapie na základe dotazníkového prieskumu. Keďže autorka štúdie má osobnú skúsenosť s týmto ochorením, cieľom štúdie je porovnať výsledky dotazníkového prieskumu s vlastnou kazuistikou.

MATERIÁL A METÓDY

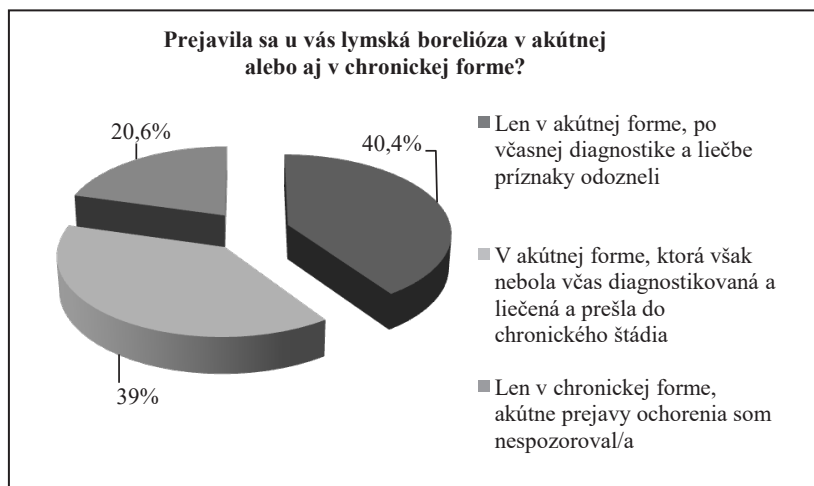
rieskum sme zrealizovali prostredníctvom elektronického dotazníka zverejneného od konca roka 2020 do februára 2022 na rôznych internetových fórach a v skupinách na sociálnych sieťach týkajúcich sa pacientov s lymskou boreliózou. Dotazník bol anonymný a zameraný na otázky ohľadom klinických prejavov, diagnostiky, možností terapie a dĺžky liečby lymskej boreliózy. V dotazníku sme využili uzavreté a poloopené otázky. Pre štatistické hodnotenie výsledkov sme použili deskriptívnu štatistiku, ktorou sme sumarizovali dáta, prezentovali ich a popisovali.

VÝSLEDKY

Do prieskumu sa aktívne zapojilo 141 respondentov, 113 žien a 28 mužov v nasledujúcej vekovej škále od 5 do 10 rokov (2,13 % opýtaných), od 11 do 20 rokov (3,55 %); od 21 do 30 rokov (31,21 %); od 31 do 40 rokov (24,11 %); od 41 do 50 rokov (20,57 %); v skupine nad 50 rokov (18,44 %).

Z grafu 1 vyplýva, že u 57 opýtaných (40,4 %) sa prejavila lymská borelióza len v akútnej forme a bola dobre diagnostikovaná a liečená, avšak u 55 pacientov (39 %) toto ochorenie nebolo včas diagnostikované a prešlo do chronického štádia, u 29 pacientov (20,6 %) sa lymská borelióza prejavila len v chronickom štádiu. Záverom je, že väčšina pacientov lymská borelióza nebola včas diagnostikovaná. Pacienti neboli dostatočne liečení a prejavila sa u nich chronická forma lymskej boreliózy. Podobne to bolo aj v inom prípade, kde lymská borelióza nebola dostatočne včas diagnostikovaná a liečená a prešla do chronickej formy.

Graf 1: Forma lymskej boreliózy u pacientov



Graf 2: Prichytenie kliešť'a na tele

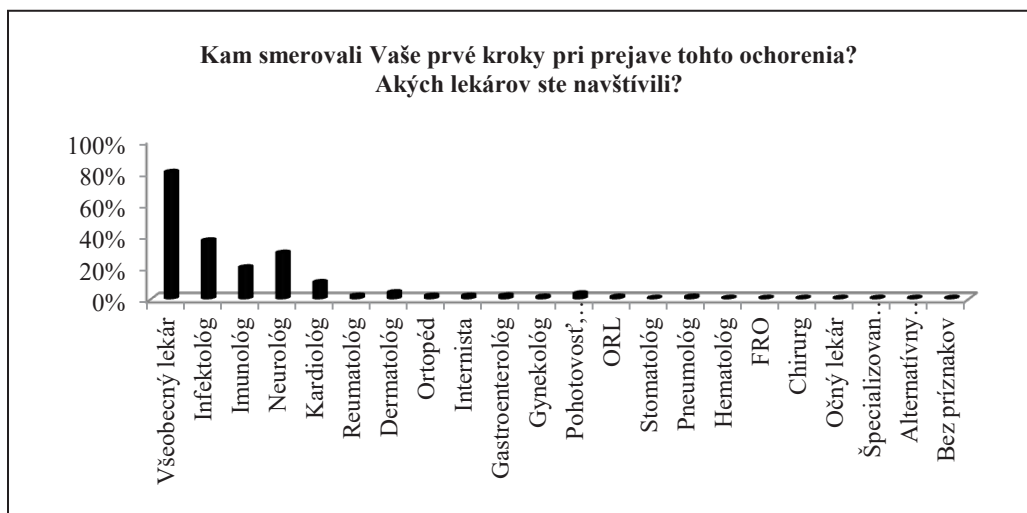


Pacienti ako najčastejšie akútne prejavy popisovali *erythema migrans* a kožné prejavy (54,5 %); druhé najčastejšie boli uvedené príznaky podobné chrípke (zvýšená teplota, zimnica, kašeľ, nevoľnosť) u 42,5 % pacientov, ďalej pacienti udávali pokles ústneho kútika, zníženú citlivosť v končatinách a brnenie v končatinách v 12 %, bolesti a opuchy kĺbov, bolesti chrbtice, šliach, svalov, zubov, svalové spazmy a pálenie tela sa vyskytlo u 12 % opýtaných. Únavu, depresie, poruchy koncentrácie, panické ataky, depersonalizáciu, derealizáciu, úzkosti udáva 10 pacientov (7 %), u 7 pacientov (4,9 %) sa vyskytovali boles-

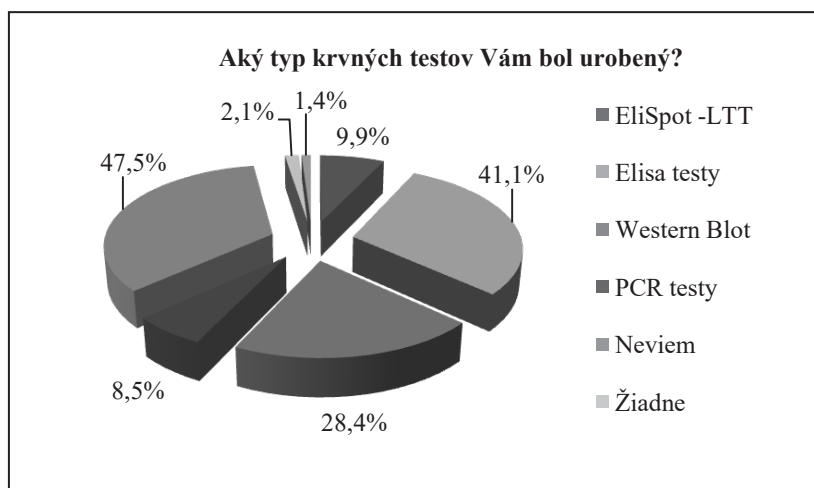
ti hlavy, tinnitus, poruchy koordinácie a problémy s očami. Chronické prejavy ochorenia malo 5 pacientov (3,5 %); žiadne symptómy alebo si na ne nespomínajú malo 7 pacientov (4,9 %) a iné nešpecifické prejavy ako napr. tachykardia, perikarditída, sťažené dýchanie, tráviace problémy, bolesť sánky, bolesť korieňkov vlasov udáva 8 respondentov (5,6 %).

Pacienti s chronickými prejavmi najčastejšie trpia únavou a nespavosťou, a to v 79 prípadoch (56 %), respondenti tiež udávajú artralgie a bolesti chrbtice, a to presne v 61 prípadoch (43,2 %); veľmi časté sú myalgie, konkrétne nimi trpí 60 opýtaných (42,6 %).

Graf 3: Návšteva lekára



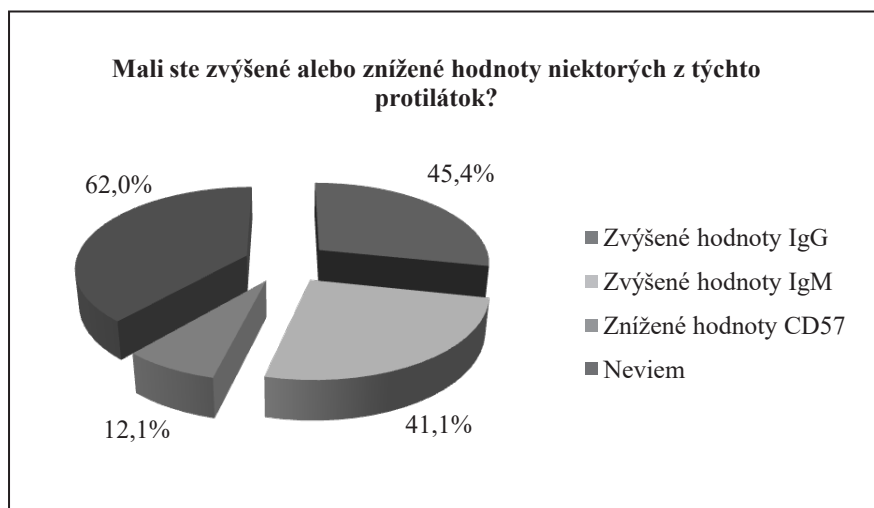
Graf 4: Typy krvných testov



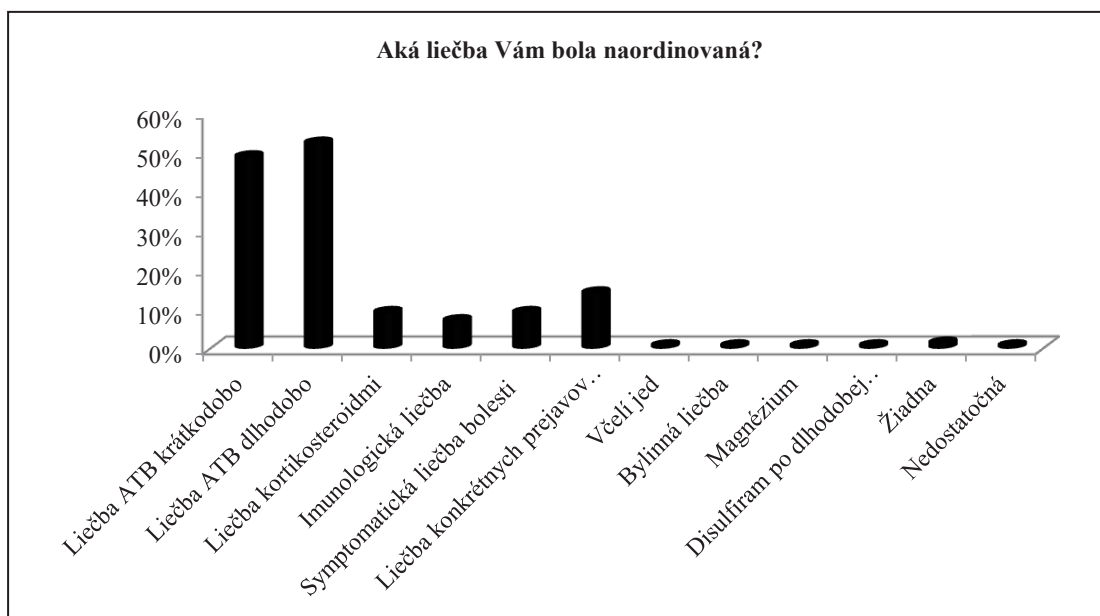
U 57 pacientov (40,4 %) sa prejavujú neuropatie ako napr. znížená citlivosť, neistota pri chôdzi, pocit trpnutia v rôznych častiach tela, pokles ústneho kútika. Depresie, úzkosti a panické ataky sa objavili u 52 opýtaných (36,9 %); problémy s očami (rozmazané, dvojité videnie, konjunktivitída, štiepanie očí popisuje 36 pacientov (25,5 %); na kardiovaskulárne ťažkosti sa sťažovalo 29 opýtaných (20,6 %). Lymfická borelióza neprešla do chronickej fázy u 32 respondentov (22,4 %). Z menej častých prejavov sa objavila neuroborelióza, problémy s pamäťou, mozgová hmla u 4

opýtaných (2,8 %); tinnitus, kinetózy a stratu sluchu popisali 6 pacienti (4,2 %); pocit, že v ich tele „niečo žerie“ mali 2 pacienti (1,4 %); tráviace problémy popisovali taktiež 2 opýtaní a kožné problémy mali tiež 2 pacienti. Na pocit chladu a problémy s dýchaním sa sťažoval 1 pacient (0,7 %); stále prítomné jemné príznaky a bolesti chrbtice sa vyskytli u 1 pacienta. Bolesťové lymfatické uzliny, subfebrility, opuchy mäkkých tkanív spojené s teplotou, bolestivé hrčky na rôznych častiach tela (kĺby, šľachy, ucho), bolesti hlavy, kŕče v tráviacom trakte, leukopénie udával 1

Graf 5: Hodnoty protilátok u pacientov



Graf 6: Liečba lymskej boreliózy



pacient a tiež bolesti hlavy, Sjogrenov a Raynaudov syndróm sa vyskytol u 1 opýtaného.

Zistili sme, že 56 opýtaných (39,7 %) malo prisatého kliešťa 1 – 5-krát v živote, 36 (25,5 %) pacientov malo kliešťa viac ako 5-krát v živote, 32 opýtaných (22,7 %) má každý rok prichyteného aspoň jedného kliešťa a 22 respondentov (15,6 %) nemalo nikdy pri-

satého kliešťa (viď graf 2). Z uvedených výsledkov môžeme dedukovať, že kliešť nemusí byť jediný vektor ochorenia.

141 respondentov navštívilo lekárov s rôznou odbornosťou. Najčastejšie cesta pacientov viedla k všeobecnému lekárovi, a to v 113 prípadoch (80,1 %). 52 pacientov (36,9 %) svoje ťažkosti konzultovalo

s infektológom, 41 pacientov (29,1 %) sa obrátilo na neurológa, 28 pacientov (19,9 %) vyhľadalo imunológa a 15 pacientov (10,6 %) smerovalo ku kardiológovi, 6 pacientov (4,2 %) navštívilo dermatológa a piati pacienti (3,5 %) si museli zavolať záchranku, diagnóza im bola stanovená počas hospitalizácie alebo boli nútení ísť na pohotovosť. Trom pacientom (2,4 %) diagnózu stanovil reumatológ, ortopéd, internista či gastroenterológ. Na gynekológa, otorinolaryngológa alebo pneumológa sa obrátili dvaja pacienti (1,4 %). Z grafu 3 vyplýva, že po jednom pacientovi (0,7 %) sa obrátilo na stomatóloga, hematológa, fyziatricko-rehabilitačného lekára, chirurga a očného lekára. Konkrétne špecializovanú lekárku v Bratislave, ktorá sa zaoberá liečbou lymfatickej boreliózy, vyhľadal jeden pacient. Na alternatívneho lekára MUDr. Josefa Jonasa sa obrátil taktiež jeden pacient. Jeden pacient bol bez príznakov.

Pacienti najčastejšie podstúpili odber krvi, a to až 137 opýtaných (97,2 %); lumbálnou punkciou bolo vyšetrených 27 respondentov (19,1 %). Jeden z týchto pacientov sa vyjadril, že diagnostika ochorenia nebola dostatočná, prevedenie lumbálnej punkcie nebolo správne a mok mu bol odobratý až na dvanásty pokus. Traja pacienti (2,1 %) mali urobený rozbor odobraného kliešť'a, štyria pacienti (2,8 %) boli diagnostikovaní na základe klinických prejavov ochorenia, napr. *erythema migrans* alebo na základe prehliadky príslušným lekárom im bola ordinovaná liečba, štyria respondenti (2,8 %) podstúpili EEG vyšetrenie, magnetickou rezonanciou boli vyšetrení traja opýtaní (2,1 %); EMG vyšetrenie mali vykonané dvaja pacienti (1,4 %). EKG, röntgen srdca a pľúc, CT mozgu alebo žiadne vyšetrenie podstúpilo po jednom pacientovi (0,7 %).

Z grafu 4 vyplýva, že na túto otázku nevedelo odpovedať 67 opýtaných (47,5 %); Elisa testy mali urobené 58 respondenti (41,1 %); Western Blot testom bolo vyšetrených 40 opýtaných (28,4 %); Elispot-LTT testom bolo diagnostikovaných 14 pacientov (9,9 %); PCR test podstúpilo 12 pacientov (8,5 %); žiadnym testom neboli vyšetrení traja pacienti (2,1 %) a Elisa testom aj Western blotom bolo potvrdené ochorenie

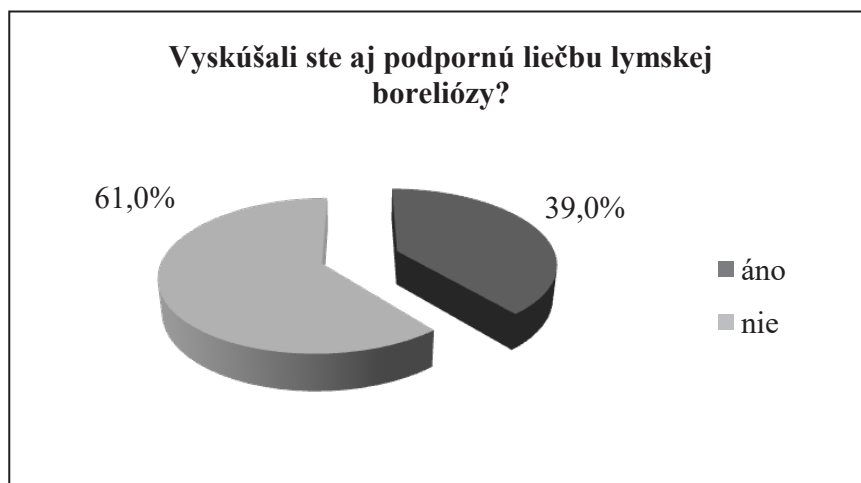
u dvoch pacientov (1,4 %). Z výsledkov môžeme dedukovať, že veľa pacientov nie je informovaných o tom, aký test im bol vykonaný, resp. nemajú vedomosti o metódach diagnostiky.

Na otázku ohľadom stanovenia protilátok (viď graf 5) nám nevedelo dať odpoveď 64 opýtaných (45,4 %); 58 respondentov (45,4 %) malo zvýšené hodnoty IgG protilátok, 58 pacientov (41,1 %) malo zvýšené hodnoty protilátok triedy IgM, znížené hodnoty protilátok CD57 sa vyskytli u 17 respondentov (12,1 %). Z odpovedí vyplýva, že 45,4 % pacientov trpelo chronickou formou ochorenia, keďže malo zvýšené hladiny protilátok triedy IgG a tiež znížené hodnoty protilátok CD57 u 12,1 % opýtaných poukazujú na prítomnosť chronickej formy ochorenia.

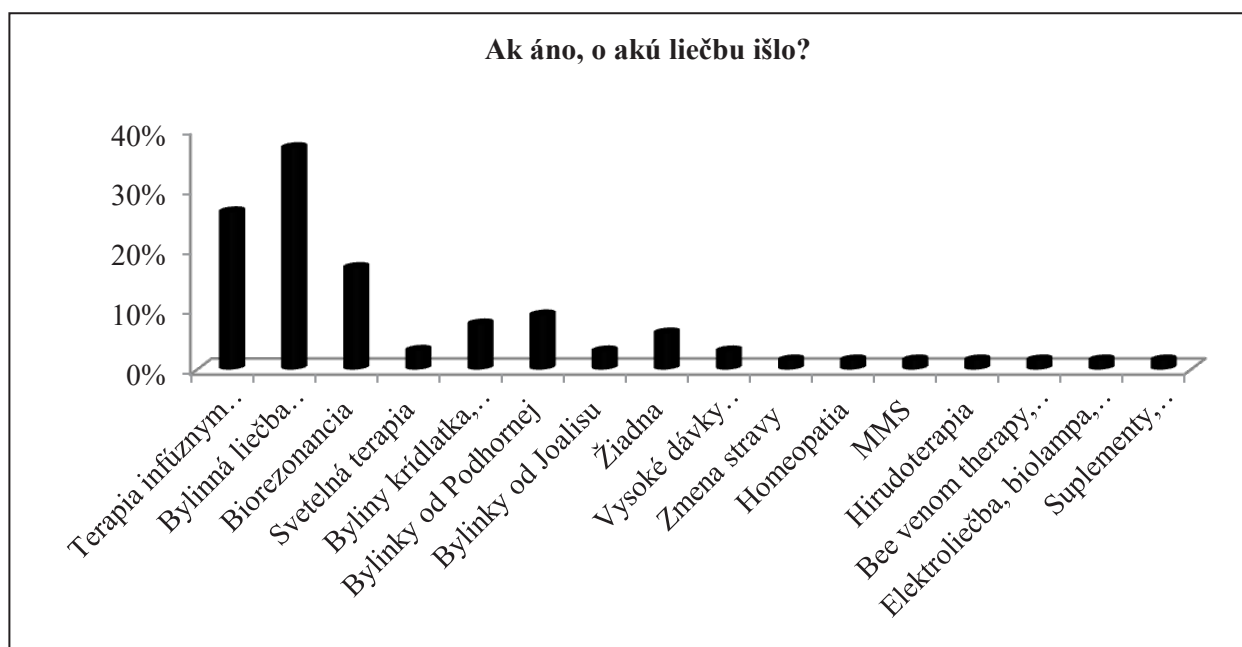
Najviac zastúpenou odpoveďou pri zisťovaní jednotlivých možností liečby (viď graf 6) bola liečba antibiotikami dlhodobo v 74 prípadoch (52,4 %) a liečba antibiotikami krátkodobo u 69 pacientov (48,9 %). Jedna respondentka uviedla, že si lekára našla sama po troch týždňoch antibiotickej liečby, platí si ho sama a lieči ju dlhodobo. V menšej miere pacienti uviedli, že tlmili konkrétne prejavy ochorenia, napr. betablokátormi, antidepresívami u 14,2 % pacientov, liečili sa kortikosteroidmi v 9,2 % prípadov, bola im naordinovaná symptomatická liečba bolesti napr. nesteroidnými antiflogistikami u 9,2 % respondentov a užívali imunologickú liečbu (7,1 %). Jedna pacientka uviedla, že po užívaní antidepresív mala nevoľnosti a bola ich nútená vysadiť. V najmenšom zastúpení sa pacienti liečili včelím jedom (0,7 %); neliečili sa antibiotikami, ale hneď prešli na bylinnú liečbu (0,7 %); brali magnézium (0,7 %); užívali disulfiram po dlhodobej antibiotickej liečbe (0,7 %); neužívali žiadne lieky (1,4 %) alebo liečba antibiotikami nebola dostatočná (0,7 %).

Graf 7 znázorňuje odpovede respondentov ohľadom podpornej liečby lymfatickej boreliózy. Záporne odpovedalo 86 opýtaných (61 %), teda neskúsili podpornú liečbu lymfatickej boreliózy a 55 pacientov (39 %) skúsilo podpornú liečbu lymfatickej boreliózy. Taktiež ja som využila podpornú liečbu lymfatickej boreliózy.

Graf 7: Podporná liečba lymfatickej boreliózy



Graf 8: Možnosti podpornej liečby lymfatickej boreliózy



Graf 9: Výsledky liečby



K tejto otázke sme pripojili podotázku, kde nás zaujímalo, aké možnosti podpornej liečby lymskej boreliózy respondenti využili (viď graf 8). Najčastejšie to bola liečba Buhnerovým bylinným protokolom v 36,9 %; 26,2 % respondentov vyskúšalo terapiu infúznym vitamínom C; 16,9 % opýtaných si vybralo biorezonanciu. V menšej miere pacienti využili bylinky od Podhornej (9 %); 7,5 % využilo rôzne bylinky ako krídlatka japonská, štetka lesná, andrographis mix, vilcacora. 6 % opýtaných neskúsilo žiadnu podpornú terapiu; 3,1 % respondentov vyskúšalo svetelnú terapiu a 3 % opýtaných využilo bylinky z Joalisu.

V najmenej miere (3 % alebo 1,5 %) respondentov skúsilo zmenu stravy, homeopatiu, hirudoterapiu, vysoké dávky vitamínov v tabletách, MMS (Miracle Mineral Supplement, „zázračný“ minerálny doplnok), terapiu včelím jedom (apiterapiu), elektroliečbu, masáže, akupunktúru, termálne kúpele, biolampu, gammanorm, vysoké dávky vitamínu B12 alebo hydrokortizón. Z uvedených výsledkov vyplýva, že možnosti podpornej liečby lymskej boreliózy sú naozaj rozmanité a z uvedených mám vlastnú skúsenosť s terapiou vysokými dávkami vitamínu C a s liečbou Buhnerovým bylinným protokolom.

U väčšiny respondentov došlo k zlepšeniu zdravotného stavu po liečbe (63,8 %); v 31,9 % prípadov sa zdravotný stav nezmenil a 6,4 % opýtaných zaznamenalo zhoršenie zdravotného stavu po liečbe. Z výsledkov môžeme usúdiť, že u väčšiny pacientov je liečba lymskej boreliózy úspešná (viď graf 9). Podobne to bolo aj v mojom prípade, kedy som zaznamenala ústup symptómov po dlhodobej antibiotickej liečbe.

DISKUSIA

Lymská borelióza je ochorenie prenášané kliešťami a je spôsobené baktériami z rodu *Borrelia*. Prítomnosť kliešťa na tele hostiteľa nemusí byť hneď spozorovaná. Klinické príznaky u pacientov sa môžu líšiť podľa toho, či trpia akútnou formou ochorenia alebo chronickou. Má široké spektrum príznakov, ktoré sa môžu vyskytovať aj pri iných ochoreniach. Sú to napr. príznaky podobné chrípke, bolesti hlavy, tin-

itus, únava, depresie, opuchy kolien. Na stanovenie diagnózy sú potrebné informácie ako kontakt s kliešťom, prítomnosť klinických symptómov a na potvrdenie sa využívajú laboratórne testy. Aby došlo k infekcii, musí byť kliešť prisatý na tele hostiteľa dlhšie ako 24 hodín, avšak táto infekcia nemusí byť prenášaná len kliešťami. Na zložitú diagnostiku poukazujú aj výsledky dotazníka, kde u 39 % pacientov nebola borelióza včas diagnostikovaná a prešla do chronickej formy a 20,6 % respondentov trpelo len chronickou formou ochorenia. Väčšina opýtaných sa liečila dlhodobo antibiotikami (52,4 %) a niektorí pacienti užívali symptomatickú liečbu NSAID (nesteroidnými protizápalovými liekmi, non-steroidal anti-inflammatory drugs), antidepresívami, magnéziom a pod. Ja som okrem kombinácie antibiotík užívala diklofenak lokálne aj *p. o.*, sulfasalazín, ktorý som musela vysadiť kvôli hematómom a stále užívam magnézium. Bol mi podaný beklometazón intraartikulárne ½ amp., ktorý sa však počas liečby lymskej boreliózy neodporúča podávať spolu s antibiotikami (Burrascano, 2009). Antibiotiká som užívala s prestávkami dlhšie ako 2 roky, avšak podľa IDSA (Americká spoločnosť pre infekčné choroby, Infectious Diseases Society of America) sa neodporúča užívať ich dlhšie ako 6 mesiacov, kvôli hnačkám spôsobeným *Clostridium difficile* (Medical Coverage Policy, 2020) a taktiež kvôli bakteriálnej rezistencii (Stanek a kol., 2011). U niektorých pacientov dochádza k reaktivácii ochorenia po vysadení antibiotík a sú odkázaní na pokračujúcu antibiotickú liečbu, ako to bolo aj v mojom prípade (Burrascano, 2009). Menšina opýtaných vyskúšala podpornú liečbu lymskej boreliózy (39 %). Z tých respondentov, ktorí podpornú liečbu skúsili, to bola najčastejšie liečba Buhnerovým bylinným protokolom (36,9 %) a terapia infúznym vitamínom C (16,9 %). Tieto formy podpornej liečby stále užívam. Vo väčšine prípadov došlo k zlepšeniu zdravotného stavu po liečbe (63,8 %). V mojej kazuistike som spozorovala zlepšenie zdravotného stavu, ale nie úplnú remisiu.

ZÁVER

Z dotazníkového prieskumu možno konštatovať, že najčastejším prejavom akútnej formy boreliózy bolo *erythema migrans* (54,5 %) a chronickej formy únava a nespavosť (56 %). Najčastejšie ordinovanou terapiou bola dlhodobá liečba antibiotikami (52,4 %) alebo krátkodobá liečba antibiotikami (48,9 %). Niektorí pacienti skúsili podpornú liečbu (39 %), najčastejšie Buhnerovým bylinným protokolom (36,9 %) alebo infúznym vitamínom C (26,2 %). Zlepšenie zdravotného stavu po liečbe zaznamenalo 63,8 % respondentov.

ZOZNAM LITERATÚRY

Borelioza CZ. *Lymská borelioza: komplexní pohled* [Lyme borreliosis: complex view]. <https://adoc.pub/lymska-borelioza-komplexni-pohled-sdruzeniboreliozacz.html>. [cit. 2022-01-24].

Buhner, S.: *Borelióza: Přírodní prevence a bylinná léčba lymské boreliózy a jejích koinfekcí* [Borreliosis: natural prevention and herbal treatment of Lyme disease and its co-infections]. 1. vyd. Praha: Triton, 2014. 227 s.

Burrascano, J.: *Pokročilá témata v lymské nemoci: Diagnostická nápověda a směrnice léčby pro boreliózu a jiné klíšťaty přenášené nemoci* [Advanced

issues in Lyme disease: Diagnostic manual and guidelines for treatment of borreliosis and other tick-borne diseases] 16. vyd. Borelioza CZ, 2009. https://www.borelioza.cz/cs/ke_stazeni/. [cit. 2022-01-25].

Medical Coverage Policy: *Lyme disease treatment — antibiotic treatment*. 26 s. <https://www.cigna.com/search?query=lyme%20disease>. Accessed February 21, 2022.

Pistl, J. a kol.: *Stále aktuálne zoonózy: prionózy, borelióza, salmonelóza a E.coli. infekcie u ľudí a zvierat* [Current zoonoses: prionoses, borreliosis, salmonellosis and *E. coli* infections in humans and animals]. Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach, 2009.

Regionálny úrad verejného zdravotníctva: *Kliešte sa už začali prebúdzat', myslite na prevenciu* [Regional Public Health Office: Ticks have already woken up, think of the prevention]. https://www.uvzs.sk/index.php?option=com_content&view=article&id=3741:uvz-sr-kliešte-sa-u-zaali-prebudza-myslite-na-prevenciu&catid=56:tlaove-spravy&Itemid=62. [cit. 2021-11-17].

Roháčová, H.: *Lymská borelióza* [Lyme borreliosis]. 5. vyd. Praha: Maxdorf, 2005. 76 s.

Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J., Strle, F.: Lyme borreliosis. Review. *Lancet*, 2012, 379 (9814), 461 – 473. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21903253/>. Accessed February 2, 2022.

POKYNY PRE AUTOROV

ZAMERANIE ČASOPISU

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

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

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

Za uverejnenie článku v časopise sa nevyžadujú žiadne poplatky.

VŠEOBECNÉ ZÁSADY

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

Kompletný text rukopisu vrátane fotografií, obrázkov, tabuliek a grafov sa zasiela v elektronickej forme na nasledovnú adresu: **folia.pharma@uvlf.sk** alebo **zuzana.holeckova@uvlf.sk**. Ak rukopis 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 prehlásenie, že ich článok je pôvodný, nebol publikovaný ani zaslaný na publikáciu inde.

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

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

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

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

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

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

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

Latinské termíny sa píše 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 čierobielej 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.

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

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

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

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

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

v štandardnom ISO zozname skrátených názvov časopisov. ISSN číslo sa nevyžaduje:

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

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

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

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

Kniha (editovaná, needitovaná):

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

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

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 rozborov odborného diela (napr. knihy, článku), ktoré obsahujú odôvodnené hodnotenie. Odporúčaná štruktúra recenzie je nasledovná:

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

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

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

Redakčná rada