

FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis
UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609

ISSN 2729-790X



2
VI • 2024



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:

Jozef Nagy

Jana Koščová

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. (Košice, Slovak Republic), Leddy, J. J. (Ottawa, Canada), Mojžiš, J. (Košice, Slovak Republic), Klimas, J. (Bratislava, Slovak Republic), Mučaji, P. (Bratislava, Slovak Republic), Opatřilová, R. (Brno, Czech Republic), Pirník, Z. (Bratislava, Slovak Republic), Pistl, J. (Košice, Slovak Republic), Roh, J. (Hradec Králové, Czech Republic). Şekeroğlu, N., (Turkey, Kilis), Šimůnek, T. (Hradec Králové, Czech Republic), Zitterl, K. (Vienna, Austria)

Vydavateľ/Publisher:

© Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, 2019

Adresa redakcie/Editor Address:

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

Technická redaktorka/Technical Editor:

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

Grafická úprava/graphic design:

Báštiová, I.

ISSN: 2585-9609

EVČ: EV 5741/18

IČO: 00 397 474

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

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

VYDÁVA
UNIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE V KOŠICIACH
SLOVAKIA



FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA
VI., 2, 2024

PUBLISHED BY
THE UNIVERSITY OF VETERINARY MEDICINE AND PHARMACY IN KOŠICE
2024

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, VI., 2, 2024

O B S A H

Ungvarská Maľučká, Lucia; Korchňák, Dávid; Sobeková, Anna:

SYNTEZA NOVÝCH ARYLOXYAMINOPROPANOLOVÝCH DERIVÁTOV AKO POTENCIÁLNYCH INHIBÍTOROV CHOLÍNESTERÁZ SYNTHESIS OF NEW ARYLOXYAMINOPROPANOL DERIVATIVES AS POTENTIAL INHIBITORS OF CHOLINESTERASES	5
--	---

Rozman Antolíkova, Natália; Zelencová, Dominika:

EPILEPTICKÉ ZÁCHVATOVÉ SYNDRÓMY V DETSKOM VEKU A ICH LIEČBA EPILEPTIC SEIZURE SYNDROMES IN CHILDHOOD AND THEIR TREATMENT.....	15
--	----

Gabriková, Ivana; Holéciová, Monika; Fedor, Pavol; Sukeľ, Ondrej:

INTERVENCIA FARMACEUTA VEREJNEJ LEKÁRNE PRI PREDCHÁDZANÍ RIZIKA LIEKOVÝCH INTERAKCIÍ U STARŠÍCH PACIENTOV S HYPERTENZIOU COMMUNITY PHARMACIST'S INTERVENTIONS CONNECTED TO THE PREVENTION OF RISK OF DRUG INTERACTIONS RELATED TO ELDERLY PATIENTS WITH HYPERTENSION	26
---	----

Takáč, Peter:

ABSKOPÁLNY EFEKT V TERAPII NÁDOROV (PREHLADOVÝ ČLÁNOK) ABSCOPAL EFFECT IN CANCER THERAPY (REVIEW).....	37
---	----

Feješová, Dominika; Maková, Zuzana:

VÝSKYT NAJČASTEJŠÍCH GYNEKOLOGICKÝCH OCHORENÍ A ICH LIEČBA OCCURRENCE OF THE MOST COMMON GYNECOLOGICAL DISEASES AND THEIR TREATMENT	54
---	----

Takáč, Peter; Kužmová, Sofia:

FARMAKOTERAPIA VYBRANÝCH UROGENITÁLNYCH INFEKCIÍ V GRAVIDITE PHARMACOTHERAPY OF SELECTED UROGENITAL INFECTIONS IN PREGNANCY.....	71
---	----

Višňovská, Martina; Čonková, Eva:

ANTIBIOFILMOVÁ ÚČINNOSŤ KOMBINÁCIE ANTIMYKOTÍK A RASTLINNÝCH SILÍC VOČI <i>CANDIDA ALBICANS</i> ANTIBIOFILM EFFICACY OF A COMBINATION OF ANTIMYCOTIC AND PLANTS ESSENTIAL OILS AGAINST <i>CANDIDA ALBICANS</i>	80
---	----

Sovíková, Simona; Marcinčáková, Dana; Kolesárová, Mária; Mílek, Michal; Legáth, Jaroslav:

ANTIOXIDAČNÉ A ANTIPROLIFERATÍVNE ÚČINKY TINKTÚRY ZO ZELENÉHO ORECHA KRÁLOVSKÉHO ANTIOXIDANT AND ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF THE TINCTURE FROM IMMATURE GREEN WALNUT FRUITS.....	92
--	----

Valko-Rokytovská, Marcela; Mateszová, Nikoleta:

DIAGNOSTIKA OCHORENIA DNA (<i>ARTHRITIS URICA</i>) A JEJ PRIDRUŽENÝCH KOMPLIKÁCIÍ DIAGNOSTICS OF GOUT DISEASE (<i>ARTHRITIS URICA</i>) AND ITS ASSOCIATED COMPLICATIONS.....	100
---	-----

Megyesy Eftimová, Zuzana; Eftimová, Jarmila:

STRAVOVACIE PREFERENCIE U ŠTUDENTOV A ZAMESTANCOV NA UVLF DIETARY PREFERENCES OF STUDENTS AND STAFF AT UVLF	110
--	-----

Pokyny pre autorov	131
--------------------------	-----



SYNTÉZA NOVÝCH ARYLOXYAMINOPROPANOLOVÝCH DERIVÁTOV AKO POTENCIÁLNYCH INHIBÍTOROV CHOLÍNESTERÁZ

SYNTHESIS OF NEW ARYLOXYAMINOPROPANOL DERIVATIVES AS POTENTIAL INHIBITORS OF CHOLINESTERASES

Ungvarská Maľucká, Lucia^{1,2}; Korchňák, Dávid¹; Sobeková, Anna¹

¹Katedra chémie, biochémie a biofyziky
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

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

lucia.ungvarska.malucka@uvlf.sk

ABSTRAKT

Deriváty aryloxyaminopropanolu sú betablokátory používané na liečbu hypertenzie, tachykardie a glaukómu. Vedci pracovali na vytvorení viacúčelových liečiv, ktoré sa môžu zamerať na viacero cieľov naraz. To zahŕňa kombinovanie rôznych farmakofórnych skupín do jednej molekuly liečiva. Táto práca sa zameriava na syntézu derivátov aryloxyaminopropanolu, ktoré obsahujú karbamátovú funkčnú skupinu. Očakáva sa, že tieto molekuly budú plniť funkciu betablokátorov a zároveň reverzibilne inhibovať enzým cholinesterázu, čo môže pomôcť zmierniť príznaky Alzheimerovej choroby. Štúdia zahŕňa testovanie fyzikálno-chemických vlastností syntetizovaných produktov, analýzu ich štruktúry pomocou nuk-

leárnej magnetickej rezonancie a testovanie ich anticholinesterázovej aktivity pomocou kinetickej spektrofotometrickej metódy.

Kľúčové slová: anticholinesterázová aktivita; aryloxyaminopropanol; biologická aktivita; syntéza

ABSTRACT

Aryloxyaminopropanol derivatives are beta-blockers used for treating hypertension, tachycardia, and glaucoma. Scientists have been working on creating multi-targeted drugs that can target multiple goals at once. This involves combining different pharmacophore groups into one drug molecule. This work is focused on the synthesis of

aryloxyaminopropanol derivatives containing a carbamate functional group. These molecules are expected to act as beta-blockers and also reversibly inhibit the enzyme cholinesterase, which may help alleviate symptoms of Alzheimer's disease. The study includes testing the physicochemical properties of the synthesized products, analyzing their structure using nuclear magnetic resonance, and testing their anticholinesterase activity using the kinetic spectrophotometric method.

Key words: anticholinesterase activity; aryloxyaminopropanol; biological activity; synthesis

ÚVOD

Farmakoterapia respiračných, tráviacich, dermatologických a iných typov ochorení vedie často k ich úplnému vyliečeniu. Naproti tomu farmakoterapia neurodegeneratívnych ochorení, medzi ktoré patrí napríklad Parkinsonova alebo Alzheimerova choroba (ACH) nevedie k ich vyliečeniu, ale len k potlačeniu ich príznakov. Príčinou týchto ochorení je neurozápal a abnormálna akumulácia špecifických proteínov. ACH je celosvetovo najčastejšou príčinou demencie a trpí ňou viac než 50 miliónov ľudí. Terapia neurodegeneratívnych ochorení je obmedzená na potlačanie symptómov a vzhľadom na ich progresivitu je nedostatočná. Vedecké štúdie skúmajú nové liečivá s cieľom zvýšiť účinnosť a obmedziť nežiaduce účinky terapie. Najnovšie vedecké výskumy sa zameriavajú na možnosti liečby ACH napríklad využitím fotodynamickej terapie ovplyvnením agregácie proteínov (Xu a kol., 2022; Sanfilippo a kol., 2022; Bayram a kol., 2023; Liu a kol., 2023). Koncom dvadsiateho storočia sa do popredia výskumu dostávali tzv. multifunkčne zamerané molekuly, vytvorené spájaním viacerých liečiv do jednej molekuly. Ukázalo sa, že na komplexnú liečbu neurodegeneratívnych ochorení sú bezpečnejšie a vhodnejšie (Sameem a kol., 2017; Ramsay a kol., 2018; Lu a kol., 2018).

Štúdia sa zaoberá syntézou nových molekúl obsahujúcich aryloxyaminopropanolový a karbamátový

fragment. Pripravené deriváty sú potenciálne inhibítory acetylcholinesterázy (AcChE) a butyrylcholinesterázy (BuChE). Ako multifunkčne zamerané molekuly môžu mať aj ďalšie zaujímavé vlastnosti vyplývajúce z ich chemickej štruktúry. Pripravené deriváty môžu byť v konečnom dôsledku použité na symptomatickú liečbu ACH s ďalšou pridanou hodnotou (môžu účinkovať aj ako betablokátory). Aryloxyaminopropanolové deriváty tvoria významnú skupinu liečiv používaných pri terapii kardiovaskulárnych ochorení a glaukómu. Sú nazývané aj β -blokátory alebo β -adrenolytiká, pretože majú sympatolytické účinky na β -adrenergických receptoroch (Čižmáriková a kol., 2000; Švihovec a kol., 2018).

MATERIÁL A METÓDY

Pri práci boli použité chemikálie a rozpúšťadlá od domácich (Slavus, Mikrochem) a zahraničných dodávateľov (Organic Acros, Merck, Sigma Aldrich). Chemikálie a rozpúšťadlá boli použité v komerčnom stave bez ďalšieho čistenia. Pri príprave roztokov, stanovení fyzikálno-chemických vlastností syntetizovaných zlúčenín a testovaní anticholinesterázovej aktivity boli použité prístroje, ktoré sú uvedené v texte.

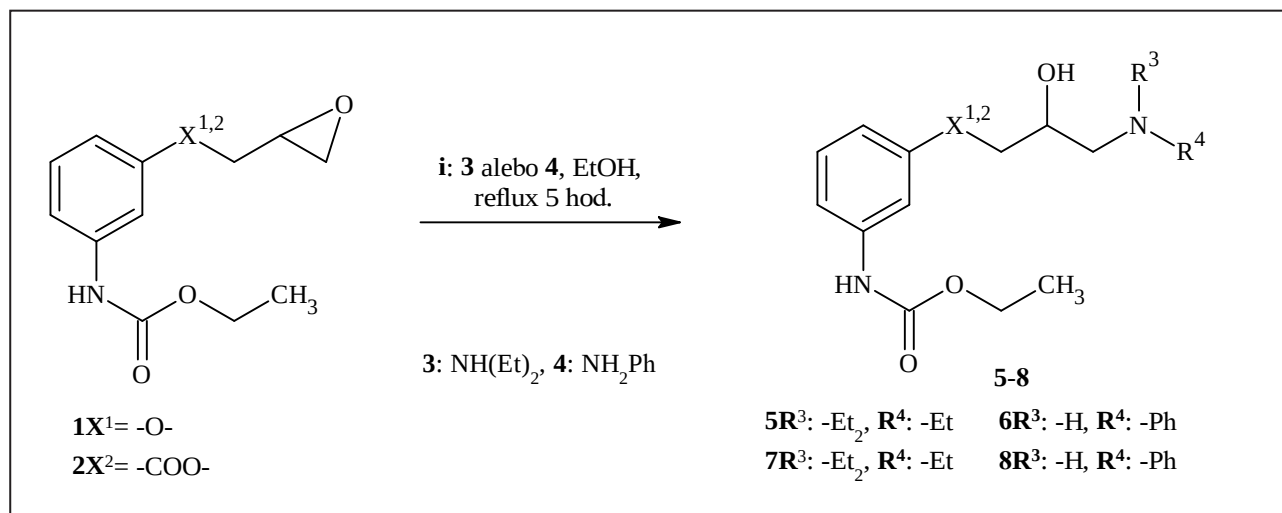
Syntéza produktov 5 – 8

Východiskové látky etyl{3-[(oxirán-2-yl)metoxy]fenyl}karbamát **1**, (oxirán-2-yl)metyl-3-[(etoxykarbonyl)amino]benzoát **2** reagovali s dvoma typmi amínov, dietylamínom **3** a anilínom **4**. Reakciou východiskových zlúčenín **1** a **2** s amínmi došlo k otvoreniu epoxidového kruhu za vzniku aryloxyaminopropanolových derivátov **5 – 8** (viď obr. 1). Pri písaní reakčných schém bol použitý softvér ACD/C+H NMR Predictors and DB: ChemSketch Window Product Version 12.01, MDL ISISTM/DRAW 2.5.

Syntéza etyl{3-[3-(dietylamino)-2-hydroxypropoxy]fenyl}karbamátu **5**

Do varnej banky bol pridaný etyl{3-[(oxirán-2-yl)metoxy]fenyl}karbamát **1** (1,68 mmol), ktorý bol

Obr. 1: Syntéza aryloxyaminopropanolových karbamátov 5 – 8



rozpustený v 20 ml etanolu. Ku reakčnej zmesi sa pridal dietylamin **3** (1,68 mmol). Reakčná zmes sa nechala refluxovať 5 hodín. Po ukončení reakcie bolo rozpúšťadlo odparené na rotačnej vákuovej odparke (IKA® RV 10 digital, ProfiLab24, Nemecko) dosucha a surový produkt bol za varu prekryštalizovaný z etylacetátu.

Syntéza etyl{3-[3-(anilino-2-hydroxypropoxy)]fenyl}karmamátu **6**

Do varnej banky bol pridaný etyl{3-[(oxirán-2-yl)methoxy]fenyl}karmamát **1** (1,68 mmol), anilín **4** (1,68 mmol) a reakčná zmes sa refluxovala 5 hodín. Po ukončení reakcie bol etanol odparený na rotačnej vákuovej odparke dosucha a surový produkt bol za varu prekryštalizovaný z etylacetátu.

Syntéza 3-(dietylamin)-2-hydroxypropyl-3-[(etoxykarbonyl)amino]benzoátu **7**

Do varnej banky bol pridaný (oxirán-2-yl)metyl-3-[(etoxykarbonyl)amino]benzoát **2** (1,18 mmol) a 20 ml etanolu. Následne bol do reakčnej zmesi pridaný dietylamin **3** (1,18 mmol). Reakčná zmes sa refluxovala 5 hodín. Po ukončení reakcie bol etanol odparený za zníženého tlaku na rotačnej vákuovej od-

parke dosucha a surový produkt bol za varu prekryštalizovaný z etylacetátu.

Syntéza 3-anilino-2-hydroxypropyl-3-[(etylkarbonyl)amino]benzoátu **8**

Do varnej banky bol pridaný (oxirán-2-yl)metyl-3-[(etoxykarbonyl)amino]benzoát **2** (1,18 mmol), anilín **4** (1,18 mmol) a 20 ml etanolu. Reakčná zmes sa refluxovala 5 hodín. Po ukončení reakcie bol etanol odparený za zníženého tlaku na rotačnej vákuovej odparke dosucha a surový produkt bol za varu prekryštalizovaný z etylacetátu.

U syntetizovaných produktov bola následne stanovená teplota topenia (Electrothermal, Keison Product, Veľká Británia) a stanovená chemická štruktúra analýzou 1D a 2D NMR spektier (Varian VNMRs 600 MHz, Palo Alto, USA). Pri spracovaní NMR spektier bol použitý softvér Mnova-MestReNova, verzia 11.0.4-18998, 2017 (Cobas a kol., 2017).

Stanovenie anticholinesterázovej aktivity

Na stanovenie anticholinesterázovej aktivity syntetizovaných produktov bola využitá cholinesterázová aktivita krvnej plazmy. Stanovenie cholinesterázovej aktivity bolo uskutočnené kinetickou spektroskopickou

kou metódou podľa Ellmana (UV/Vis Thermo Helios Beta, UK). Acetylcholin pri teplote 25 °C bol štiepený enzýmom BuChE na tiocholin a kyselinu octovú. Vzniknutý tiocholin reagoval s Ellmanovým činidlom za vzniku 3-karboxy-4-nitrotiolátového aniónu, ktorý má absorpčné maximum $\lambda = 412 \text{ nm}$ (Balog, 2021). Reakčná zmes s celkovým objemom 1 ml obsahovala fosfátový tlmivý roztok (pH = 7,35); 1 mmol.l⁻¹ acetylthiocholin (substrát), 3 mmol.l⁻¹ DTNB (kyselina 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoová – Ellmanovo činidlo), zriedenú krvnú plazmu (R = 50) a testované vzorky v koncentrácii 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Testované vzorky boli rozpustené v metanole, respektíve dimetylsulfoxide. Uvedené rozpúšťadlá boli použité ako slepé kontroly. Pred spustením enzýmovej reakcie pridaním substrátu bola zmes enzýmu a testovaných látok predinkubovaná 5 minút pri 25 °C. Kinetické meranie trvalo 2 minúty a ΔA v tomto intervale bola stanovená v štyroch cykloch. Enzýmová aktivita bola vypočítaná podľa vzťahu:

$$\text{BuChE } (\mu\text{mol.dm}^{-3}.\text{min}^{-1}) = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot l} R \cdot 10^6$$

R – celkové riedenie enzýmu, l – hrúbka kvety = 1 cm, ε (BuChE) = 14 220 dm³.mol⁻¹.cm⁻¹.

VÝSLEDKY

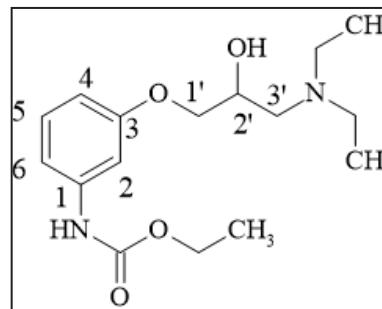
V tejto časti sú uvedené fyzikálno-chemické vlastnosti syntetizovaných produktov 5 – 8, ako aj spektrofotometrické výsledky ich pôsobenia na aktivitu BuChE (viď obr. 2 – 5).

Fyzikálno-chemické vlastnosti syntetizovaných produktov 5 – 8

Etyl{3-[3-(dietylamino)-2-hydroxypropoxy]fenyl} karbamát 5

Derivát 5 bol pripravený s 56,3 % výťažnosťou vo forme oleja, C₁₆H₂₆N₂O₄, R_f = 0,10 (v/v cyklohexán : etylacetát, 1 : 2), M_m = 310,39 g.mol⁻¹.

Obr. 2: Chemická štruktúra derivátu 5



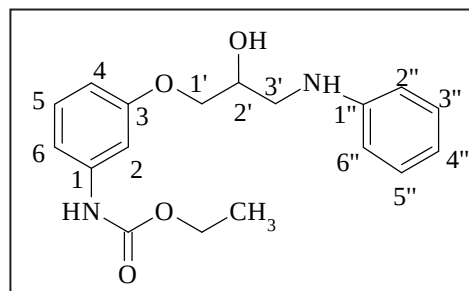
¹H NMR (600 MHz, 25 °C, DMSO) δ = 9,86 (s, 1H, NH); 7,15 (s, 1H, H-2); 7,14 (m, 1H, H-5); 7,00 (d, 1H, H-6, J = 6,6 Hz); 6,56 (dd, 1H, H-4, J = 2,6 Hz, 7,9 Hz); 4,11 (k, 4H, CH₃-CH₂-O, J = 7,2 Hz); 3,94 (dd, 1H, H-1_A', J = 6,0 Hz, 12,0 Hz); 3,86-3,84 (m, 1H, H-2); 3,79 (dd, 1H, H-1_B', J = 6,0 Hz, 12,0 Hz); 2,54 (dd, 1H, H-3_A', J = 6,0 Hz, 12,0 Hz); 2,52 (k, 4H, CH₃-CH₂-N, J = 12,0 Hz); 2,48 (dd, 1H, H-3_B', J = 6,0 Hz, 12,0 Hz); 1,23 (t, 3H, CH₃-CH₂-O, J = 7,2 Hz); 0,94 (t, 6H, CH₃-CH₂-N, J = 12,0 Hz)

¹³C NMR (150 MHz, 25 °C, DMSO) δ = 159,2 (C-3); 153,5 (C=O); 140,4 (C-1); 129,5 (C-5); 110,4 (C-6); 110,5 (C-4); 104,6 (C-2); 70,6 (C-1'); 67,2 (C-2'); 62,7 (C-3'); 60,2 (CH₃-CH₂-O); 47,3 (CH₃-CH₂-N); 14,5 (CH₃-CH₂-O); 11,8 (CH₃-CH₂-N).

Etyl{3-[3-(anilino-2-hydroxypropoxy)fenyl]karbamát 6

Derivát 6 bol pripravený s 43,4 % výťažnosťou vo forme oleja, C₁₈H₂₂N₂O₄, R_f = 0,36 (v/v cyklohexán : etylacetát, 1:1), M_m = 330,38 g.mol⁻¹.

Obr. 3: Chemická štruktúra derivátu 6



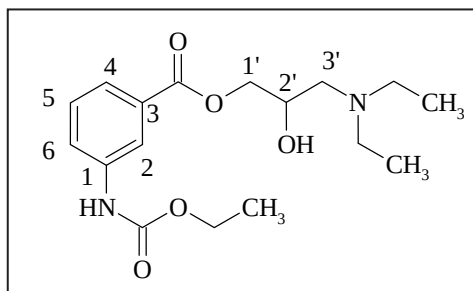
¹H NMR (600 MHz, 25 °C, DMSO) δ = 9,60 (s, 1H, NH); 7,16 (s, 1H, H-2); 7,15 (m, 1H, H-5); 7,05 (t, 2H, H-3'', 5'', J = 6,0 Hz); 7,00 (d, 1H, H-6, J = 6,6 Hz); 6,62 (d, 2H, H-2'', 6'', J = 6,0 Hz); 6,56 (dd, 1H, H-4, J = 2,6 Hz, 7,9 Hz); 6,51 (t 1H, H-4''); 4,11 (k, 2H, CH₃-CH₂-O, J = 7,2 Hz); 3,99-3,69 (m, 1H, H-2); 3,94 (dd, 1H, H-1_A', J = 6,0 Hz, 12,0 Hz); 3,88 (dd, 1H, H-1_B', J = 6,0 Hz, 12,0 Hz); 3,24-3,19 (m, 1H, H-3_A'); 3,08-3,04 (dd, 1H, H-3_B'); 1,23 (t, 3H, CH₃-CH₂-O, J = 7,2 Hz)

¹³C NMR (150 MHz, 25 °C, DMSO) δ = 159,0 (C-3); 155,1 (C=O); 140,4 (C-1); 148,8 (C-1''); 129,5 (C-5); 129,0 (C-3'', 5''); 115,7 (C-4'); 115,5 (C-2'', 6''); 112,1 (C-6); 110,5 (C-4); 104,6 (C-2); 70,2 (C-1'); 67,5 (C-2'); 62,7 (C-3'); 60,1 (CH₃-CH₂-O); 14,5 (CH₃-CH₂-O)

3-(diethylamino)-2-hydroxypropyl-3-[(etoxykarbonyl)amino]benzoát 7

Derivát 7 bol pripravený s 49,8 % výtťažnosťou vo forme bielej kryštalickej látky, C₁₇H₂₆N₂O₅, t_f = 94 – 95 °C, R_f = 0,58 (v/v cyklohexán : etylacetát, 3:1), M_m = 338,39 g.mol⁻¹.

Obr. 4: Chemická štruktúra derivátu 7



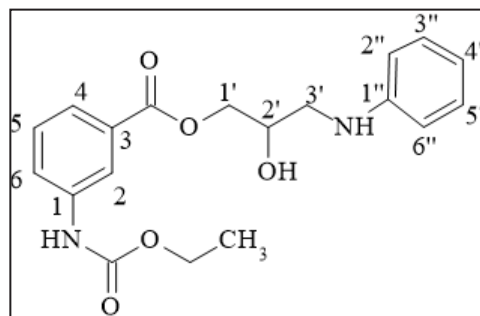
¹H NMR (600 MHz, 25 °C, DMSO) δ = 9,83 (s, 1H, NH); 8,12 (s, 1H, H-2); 7,65 (d, 1H, H-4, J = 12,0 Hz); 7,54 (d, 1H, H-6, J = 6,0 Hz); 7,39 (t, 1H, H-5, J = 6,0 Hz); 4,27 (k, 2H, CH₃-CH₂-O, J = 6,0 Hz); 3,87-3,84 (m, 1H, H-2'); 3,33 (dd, 1H, H-1_A', J = 6,0 Hz, 12,0 Hz); 3,30 (dd, 1H, H-1_B', J = 6,0 Hz, 12,0 Hz); 2,52 (k, 4H, CH₃-CH₂-N, J = 6,0 Hz); 2,41 (dd, 1H, H-3_A', J = 6,0 Hz, 12,0 Hz); 2,29 (dd, 1H, H-3_B', J = 6,0 Hz, 12,0 Hz); 1,22 (t, 3H, CH₃-CH₂-O), 0,90 (t, 6H, CH₃-CH₂-N, J = 12,0 Hz)

¹³C NMR (150 MHz, 25 °C, DMSO) δ = 165,6 (C=O, -COO-); 153,5 (C=O, -OOCNH-); 139,7 (C-1); 130,5 (C-3); 129,1 (C-5); 122,9 (C-6); 122,6 (C-4); 118,5 (C-2); 69,0 (C-2'); 65,1 (C-1'); 62,0 (C-3'); 60,8 (CH₃-CH₂-O); 47,3 (CH₃-CH₂-N); 14,5 (CH₃-CH₂-O); 11,8 (CH₃-CH₂-N)

3-anilino-2-hydroxypropyl-3-[(etylkarbonyl)amino]benzoát 8

Derivát 8 bol pripravený s 52,0 % výtťažnosťou vo forme bielej kryštalickej látky, C₁₉H₂₂N₂O₅, t_f = 181 – 182 °C, R_f = 0,20 (v/v cyklohexán : etylacetát, 3 : 1), M_m = 358,38 g.mol⁻¹.

Obr. 5: Chemická štruktúra derivátu 8



¹H NMR (600 MHz, 25 °C, DMSO) δ = 9,86 (s, 1H, NH); 8,20 (s, 1H, H-2); 7,68 (d, 1H, H-4, J = 12,0 Hz); 7,05 (t, 2H, H-3'', 5'', J = 6,0 Hz); 7,63 (d, 1H, H-6, J = 6,0 Hz); 7,41 (t, 1H, H-5, J = 6,0 Hz); 6,62 (d, 2H, H-2'', 6'', J = 6,0 Hz); 6,52 (t, 1H, H-4''); 4,13 (k, 2H, CH₃-CH₂-O, J = 6,0 Hz); 4,11 – 4,05 (m, 1H, H-2'); 3,31 – 3,37 (m, 2H, H-1_A', 1_B'); 3,25-3,18 (m, 1H, H-3_A'); 3,12 – 3,08 (m, 1H, H-3_B'); 1,24 (t, 3H, CH₃-CH₂-O)

¹³C NMR (150 MHz, 25 °C, DMSO) δ = 165,6 (C=O, -COO-); 153,6 (C=O, -OOCNH-); 148,8 (C-1''); 139,7 (C-1); 130,3 (C-3); 129,1 (C-5); 129,0 (C-3'', 5''); 123,1 (C-6); 122,7 (C-4); 118,5 (C-2); 115,7 (C-4'); 115,5 (C-2'', 6''); 67,0 (C-2'); 65,4 (C-1'); 60,4 (C-3'); 60,4 (CH₃-CH₂-O); 14,5 (CH₃-CH₂-O)

Tab. 1: Vplyv derivátov 5 – 8 na enzýmovú aktivitu

koncentrácia inhibítora ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	použité rozpúšťadlo	% inhibície			
		derivát 5	derivát 6	derivát 7	derivát 8
20	metanol	15,0	7,5	12,5	10,0
40	metanol	25	15,0	17,5	15,0
4	metanol	0	7,3	0	4,8
20	dimetylsulfoxid	82,5	80,0	80,0	75,0

Tab. 2: Inhibícia enzýmu derivátom 7 oproti kontrolnej vzorke

Vzorka	% inhibície
K_{MeOH}	17,5
K_{DMSO}	77,5
7_{MeOH}	17,5
7_{DMSO}	80
$7_{\text{H}_2\text{O}} (37^\circ\text{C})$	0
$7_{\text{H}_2\text{O}+\text{Tween}}$	10

K – kontrolný roztok s MeOH/DMSO

DISKUSIA

Syntéza aryloxyaminopropanolových karbamátov 5 – 8

3-Amino-1,2-propándiolový fragment **12** je formálne klasifikovaný ako derivát glycerolu získaný náhradou primárnej hydroxylovej skupiny glycerolu amino skupinou. Tento aminoalkohol sa môže získať redukčnou amináciou glyceraldehydu **9**, resp. nukleofilným atakom amoniaku na glycidol **10** (viď obr. 6). Medziprodukt **10** je možné pripraviť aj katalytickou dekarboxyláciou glycerolkarbonátu. Z dôvodu karcinogénneho účinku 3-chlór-1,2-propándiolu **11** je jeho použitie pri príprave fragmentu **12** menej atraktívnou možnosťou (Rigo a kol., 2021).

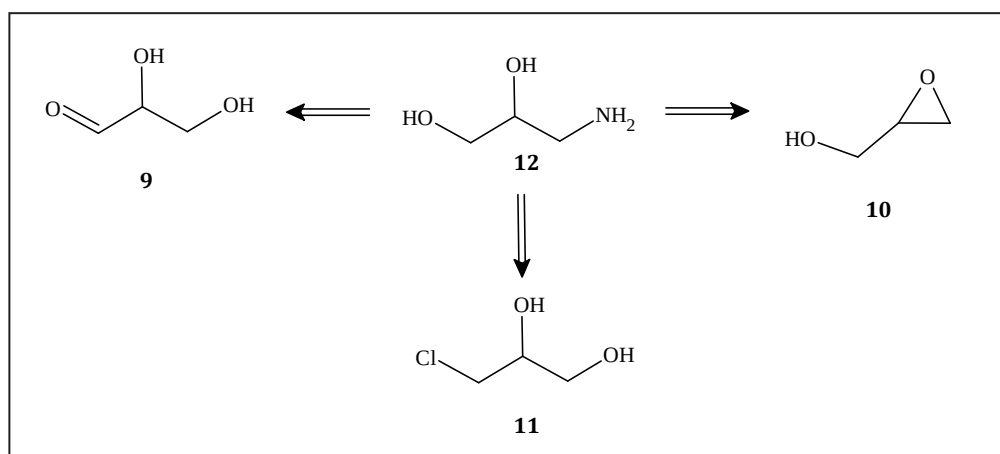
Jedným z jednoduchých spôsobov prípravy aryloxyaminopropanolov je pôsobenie amínu na oxiránový kruh v molekule, ktorý sa vplyvom nukleofilného ataku pomerne ľahko otvára. Pri syntéze finálnych produktov 5 – 8 boli ako východiskové látky použité amíny (dietylamín **3** a anilín **4**) a epoxidy **1** a **2**, ktoré

Stanovenie anticholínesterázovej aktivity

V tabuľkách 1 a 2 sa nachádzajú výsledky meraní pôsobenia derivátov 5 – 8 na aktivitu BuChE.

Boli uskutočnené aj ďalšie experimenty spojené so zmenou rozpúšťadla, počas ktorých sa testovala rozpustnosť derivátu **7** v destilovanej vode pri laboratórnej teplote, zvýšenej teplote (37°C), po prídavku emulgátora (Tween) a prídavku kyseliny chlorovodíkovej.

Obr. 6: Syntéza 3-amino-1,2-propándiolového fragmentu **12**



obsahovali karbamátovú funkčnú skupinu. V priebehu reakcie amínov **3** a **4** s epoxidovým kruhom derivátov **1** a **2** došlo k jeho otvoreniu za vzniku aryloxyaminopropanolových derivátov **5** – **8**. Produkty **5** a **6** boli olejovité látky, zatiaľ čo karbamáty **7** a **8** mali tuhé skupenstvo. U všetkých štyroch produktov boli stanovené ich fyzikálno-chemické vlastnosti, ako aj ich chemická štruktúra. U syntetizovaných zlúčenín sa následne testoval ich potenciálny inhibičný účinok na aktivitu cholinesterázy.

Čižmáriková a kol. (2003) sa na základe štúdií vzťahu medzi štruktúrou a aktivitou rozhodli syntetizovať a farmakologicky testovať nové zlúčeniny typu aryloxyaminopropanolov odvodené od 2- alebo 4-hydroxyfenylalkanónov s fenetylovými, resp. 3,4-dimetoxifenetylovými skupinami v hydrofilnej časti molekuly. Aryloxyaminopropanolové deriváty boli pripravené pomocou dvoch metód a ich štruktúra bola stanovená na základe analýzy IČ, UV a ^1H NMR spektier. Enantioméry sa oddelili pomocou HPLC na chirálnych stacionárnych fázach. Afinity pripravených racemických zlúčenín k β_1 a β_2 -adrenergným receptorom bola stanovená na izolovaných predsieňach a priedušnici morčiat. Počas testovania aryloxyaminopropanolových derivátov sa zistilo, že zavedenie objemného substituenta na atóm dusíka v hydrofilnej časti 3,4-dimetoxifenetylového fragmentu molekuly viedlo k zvýšeniu afinity k srdcovému tkanivu (β_1 -adrenoreceptor), v porovnaní s tracheálnym (β_2 -adrenoreceptor) tkanivom.

Kečkečová a kol. (2008) sa zaoberali syntézou, potvrdením štruktúry a štúdiom fyzikálno-chemických vlastností niektorých derivátov aryloxyaminopropanolu, zlúčenín 2-hydroxy-3-[4-(2-fluórfenyl)-piperazín-1-yl]-propyl-4-[(alkoxykarbonyl)amino]benzoátov a ich solí s kyselinou chlorovodíkovou, s jedným až štyrmi atómami uhlíka v alkoxykupine karbamoylovej skupiny. Ich štruktúra bola potvrdená analýzou IČ, UV a MS spektier. U pripravených zlúčenín bola stanovená teplota topenia, rozpustnosť, povrchová aktivita, disociačná konštanta a niektoré parametre lipofility, t. j. rozdeľovací koeficient P , hodnoty R_M z reverznej tenkovrstvovej chromatografie a retenčný

faktor získaný z HPLC.

Čižmáriková a kol. (2018) uvádza, že bola syntetizovaná séria šiestich farmakologicky aktívnych zlúčenín (β -adrenolytických látok) odvodených od 4-hydroxyfenyletanónu a 4-hydroxyfenylpropán-1-ónu. Zlúčeniny obsahujú pyrrolidín-1-yl a 4-metypiperazín-1-ylové substituenty v hydrofilnej časti molekuly a etoxymetylové a metoxyetoxymetylové bočné reťazce na aromatickom kruhu v lipofilnej časti molekuly. Deriváty boli pripravené štvorstupňovou syntézou zo 4-hydroxyalkanónov cez chlormetylové, alkoxy-metylové a oxiránové medziprodukty. Čistota cieľových zlúčenín bola kontrolovaná TLC a ich štruktúry boli potvrdené analýzou IČ, UV, ^1H NMR a ^{13}C NMR spektier. Farmakologické hodnotenie získaných zlúčenín potvrdilo ich vazodilatačné a špecifické betalytické účinky.

Stanovenie anticholinesterázovej aktivity

Pri *in vitro* meraní anticholinesterázovej aktivity derivátov **5** – **8** sa sledovala zmena enzýmovej aktivity za čas. Pri kinetickom spektrofotometrickom stanovení inhibičnej aktivity testovaných derivátov bol ako rozpúšťadlo najprv použitý metanol. Ďalšie merania boli uskutočnené pri zmene podmienok merania. Metanol bol nahradený dimetylsulfoxidom (viď tab. 1), bola zvýšená teplota z pôvodných 25 °C na 37 °C, predĺžená doba predinkubácie na 20 minút a koncentrácia produktov **5** – **8** bola zvýšená na dvojnásobok. Boli uskutočnené aj merania, pri ktorých sa derivát **7** rozpúšťal vo vode pri zvýšenej teplote, pri použití emulgátora a aj zmene pH (kyslé podmienky a predpokladaná tvorba solí, viď tab. 2).

Počas merania bolo zistené, že aj samotné rozpúšťadlo, či už metanol alebo dimetylsulfoxid inhibujú cholinesterázu (viď tab. 2). Keďže väčšina enzýmov má bielkovinovú štruktúru, môžeme predpokladať, že tieto organické rozpúšťadla spôsobujú denaturáciu. Pri porovnaní hodnôt $\Delta A/\text{min}$ kontrolných roztokov s rozpúšťadlom a vzoriek **5** – **8** neboli zaznamenané žiadne zmeny. Môžeme predpokladať, že deaktiváciou enzýmu rozpúšťadlom nebolo možné otestovať anticholinergnú aktivitu syntetizovaných produktov

5 – 8. Na základe chemickej štruktúry derivátov 5 – 8 môžeme predpokladať, že budú inhibovať AcChE, resp. BuChE, keďže majú prítomnú farmakofórnú karbamátovú funkčnú skupinu. Napriek prítomnosti farmakofórnej skupiny môže mať na inhibíciu vplyv aj zvyšná časť molekuly. Tá môže byť príčinou neschopnosti molekuly viazať sa na väzobné miesto enzýmu. Je dôležité nájsť vhodné rozpúšťadlo, schopné rozpustiť syntetizované molekuly, ale zároveň s minimálnym vplyvom na aktivitu enzýmu.

Okrem spomínaných rozpúšťadiel bola použitá aj destilovaná voda, v ktorej sa obmedzene rozpúšťal 3-(dietylamo)-2-hydroxypropyl 3-[(etoxykarbonyl)amino]benzoát 7. Za účelom zvýšenia rozpustnosti derivátu 7 vo vode bola použitá aj vyššia teplota, ktorá však rozpusteniu produktu 7 výrazne nepomohla a pri meraní inhibičný účinok nebol zaznamenaný. Následne bol použitý aj polysorbát 20 (Tween), ktorý slúži na zníženie povrchového napätia. Vďaka tomu emulgátoru vznikla emulzia. Pri následnom meraní bola zaznamenaná 10 % inhibícia aktivity.

Vidal a kol. (1987) testovali vplyv teploty na $v_{\max}$ a K_m acetylcholinesterázy z mozgu potkanov. Zistilo sa, že tetramérna štruktúra enzýmu pri 4 °C disociuje na monoméry a pri 37 °C tvorí agregáty s vyššou molekulovou hmotnosťou. Vedecké štúdie ukazujú, že vplyv teploty na aktivitu enzýmu nemožno jednoznačne vysvetliť pomocou dvojstavového modelu založeného na zvýšení aktivity a denaturácii. Daniel a kol. (2009) vo svojej štúdii dokázali, že rozdiel medzi aktívnymi a neaktívnymi formami enzýmu je v aktívnom mieste enzýmu. Výsledky tejto štúdie ukazujú, že existuje univerzálny mechanizmus nezávislý od enzymovej reakcie alebo štruktúry enzýmu. Je založený na teórii, že enzýmy v aktívnom mieste alebo v jeho blízkosti postupne so stúpajúcou teplotou strácajú aktivitu. Denaturácia nastáva pri určitej teplote a strata aktivity je úplná. Z toho vyplýva, že pri meraní enzymovej aktivity môže pri zvyšovaní teploty dochádzať k nepresným výsledkom a namerané hodnoty nebudú skutočným výsledkom katalytického účinku enzýmu.

Najrozšírenejším signálnym systémom v mozgu je

cholinergný systém, ktorý hrá hlavnú úlohu pri progresii ACH. Súčasná liečba ACH sa primárne zameriava na neuronálny enzým AcChE. Meranie aktivity AcChE môže mať dôležitú úlohu pri optimalizácii testov na analyzovanie nových látok inhibujúcich AcChE. Počas testov aktivity AcChE *in vitro* je nevyhnutné použitie rôznych organických rozpúšťadiel (Dnyaneshwar a Awanish, 2023). Štúdia Dnyaneshwara a Awanisha (2023) je navrhnutá tak, aby zhodnotila účinok rôznych organických rozpúšťadiel na aktivitu a kinetiku enzýmov. Inhibičný potenciál organických rozpúšťadiel na aktivitu AcChE (vrátane kinetických charakteristík – $V_{\max}$, K_m a K_{cat}) sa hodnotil pomocou lineárneho zobrazenia (Lineweaver-Burk) závislosti rýchlosti reakcie od koncentrácie substrátu podľa Michaelis-Mentenovej. Z výsledkov testovania vyplynulo, že DMSO má na AcChE najsilnejší inhibičný účinok, nasleduje acetonitril a etanol. Kinetická štúdia odhalila, že DMSO má zmiešaný inhibičný účinok (kompetitívny/nekompetitívny), etanol pôsobí ako nekompetitívny inhibítor a acetonitril ako kompetitívny inhibítor AcChE. Z analýz vyplynulo, že metanol preukázal zanedbateľný vplyv na inhibíciu enzýmov a kinetiku. Čo sa týka použitia DMSO ako rozpúšťadla, podobné výsledky v účinku na aktivitu enzýmu sme zaznamenali aj my. V prípade použitia metanolu sme pozorovali opačný trend, nie však taký výrazný ako pri DMSO.

Použitie rozpúšťadiel na solubilizáciu testovaných zlúčenín pri analýze minimálnych účinkov na enzymovú aktivitu je dôležitým aspektom mnohých biochemických štúdií. Predikcia účinkov rozpúšťadiel na aktivitu enzýmov môže byť komplikovaná, pretože enzýmy s podobnou celkovou štruktúrou môžu vykazovať rôzne správanie v rôznych rozpúšťadlách. V štúdii od Novales a Schwans (2022) boli hodnotené účinky niekoľkých bežne používaných rozpúšťadiel: metanolu, acetonitrilu, acetónu a DMSO na dve cholinesterázy, AcChE a BuChE. Hoci štruktúry enzýmov sú veľmi podobné, AcChE bola v porovnaní s BuChE na testované organické rozpúšťadlá citlivejšia. Kinetické merania podľa Michaelis-Mentenovej ukázali, že hodnoty $V_{\max}$ neboli podstatne ovplyvnené, zatiaľ

čo hodnoty K_M sa pre AcChE zvýšili až 20-násobne a pre BuChE 4-násobne v prítomnosti 5 % DMSO alebo acetónu. Výsledky naznačujú, že BuChE v porovnaní s AcChE vykazuje voči použitému prostrediu (rozpúšťadlu) väčšiu odolnosť. Výsledky tejto štúdie môžu pomôcť pri rozhodovaní o vhodnom výbere rozpúšťadiel používaných v enzýmových testoch, a môžu tak pomôcť pri optimalizácii podmienok merania (Novales a Schwans, 2022).

ZÁVER

Štúdia sa zaoberá syntézou aryloxyaminopropanolových derivátov s karbamátovou funkčnou skupinou 5 – 8. Karbamáty boli pripravené v jednom reakčnom kroku. U všetkých produktov 5 – 8 bola stanovená výťažnosť a základné fyzikálno-chemické vlastnosti. Štruktúra produktov bola stanovená analýzou 1D a 2D NMR spektier. V práci bola testovaná inhibičná aktivita produktov 5 – 8 voči cholinesteráze kinetickou spektrofotometrickou metódou (*in vitro*). Merania prebiehali pri rôznych podmienkach s cieľom zistiť vplyv podmienok merania na aktivitu enzýmu a inhibičný účinok derivátov 5 – 8. Uskutočnilo sa viacero meraní, pri ktorých sa menila teplota, koncentrácia produktov 5 – 8, čas pôsobenia látok 5 – 8 na enzým, ako aj rozpúšťadlo. Výsledky ukázali, že aktivita enzýmu bola inhibovaná vplyvom organických rozpúšťadiel – metanol a dimetylsulfoxid, čo znemožnilo otestovať inhibičnú aktivitu týchto látok. Pri jednom meraní bola ako rozpúšťadlo použitá voda, pričom produkt bol emulgovaný pomocou polysorbátu. Pri tomto meraní bola zaznamenaná mierna 10 % inhibičná aktivita karbamátu 7.

Na základe chemickej štruktúry syntetizovaných produktov môžeme očakávať, že by sa mohli správať ako aj multifunkčne zamerané molekuly (MTDL) potenciálnych liečiv, ktoré by mohli inhibovať cholinesterázu a zároveň pôsobiť ako betablokátory. Čiastočným problémom pri testoch biologickej aktivity *in vitro* prostredím však ostáva nájst' vhodné podmienky testovania, ktoré by nemali vplyv na aktivitu enzýmu, ako aj samotných testovaných látok (nájst' vhod-

né rozpúšťadlo, vzhľadom na vodné prostredie organizmu; fyzikálno-chemické vlastnosti liečiva, ktoré ovplyvňujú prechod cez hematoencefalickú bariéru).

POĎAKOVANIE

Za nameranie NMR spektier patrí poďakovanie doc. RNDr. Márii Vílkovej, PhD. z laboratória Nukleárnej magnetickej rezonancie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach. Poďakovanie patrí aj prof. RNDr. Jozefovi Csölleiovi, CSc. a Mgr. Petrovi Mokrému, PhD. z Ústavu chemických liečiv, Farmaceutická fakulta, Masarykova univerzita v Brne za poskytnutie epoxidových medziproduktov 1, 2.

ZOZNAM LITERATÚRY

Balog, D.: Stanovení aktivity cholinesteráz vybranými analytickými metodami [Determination Of Cholinesterase Activity By Selected Analytical Methods]. Diplomová práca. Univerzita Pardubice: Fakulta chemicko-technologická, 2021, 36 – 38.

Bayram, E., Batzu, L., Tilley, B., Gandhi, R., Jagota, P., Biundo, R., Garon, M., Prasertpan, T., Lazcano-Ocampo, C., Chaudhuri, K. R., Weil, R. S.: International Parkinson and Movement Disorder Society Non-Motor Parkinson's Disease Study Group: Clinical trials for cognition in Parkinson's disease: Where are we and how can we do better? *Park. Relat. Disord.*, 2023, 112, 105 385.

Cobas, C., Domínguez, S., Larin, N., Iglesias, I., Geada, C., Seoane, F., Sordo, M., Monje, P., Fraga, S., Cobas, R., Peng, Ch., García, J. Á., Goebel, M., Vaz, E.: Mnova-MestReNova, version 11.0.4-18998, 2017.

Čižmáriková, R., Némethy, A., Habala, L., Račanská, E., Valentová, J., Hroboňová, K.: Synthesis, pharmacological activity, and chromatographic enantioseparation of new heterocyclic compounds of the aryloxyaminopropanol type derived from 4-hydroxyphenylalkanones. *Monatsh. Chem.*, 2018, 149, 969 – 976.

- Čižmáriková, R., Kráľová, K., Sersen, F.: The effect of aryloxyaminopropanol substances on the photosynthetic activity of chloroplasts in *Spinacia oleracea* L. *Ceska. Slov. Farm.*, 2000, 49, 45 – 47.
- Čižmáriková, R., Račanská, E., Hroboňová, K., Lehotay, J., Aghová, Z., Halesová, D.: Synthesis, pharmacological activity and chromatographic separation of some novel potential beta-blockers of the aryloxyaminopropanol type. *Pharmazie*, 2003, 58 (4), 237 – 241.
- Daniel, R. M., Peterson, M. E., Danson, M. J., Price, N. C., Kelly, S. M., Monk, C. R., Weinberg, C. S., Oudshoorn, M. L., Lee, C. K.: The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *Biochem. J.*, 2009, 425, 353 – 360.
- Dnyaneshwar, B., Awanish, M.: Effect of organic solvents on acetylcholinesterase inhibition and enzyme kinetics, *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, 2023, 23 (1), 40 – 47.
- Kečkečová, S., Sedlářová, E., Csöllei, J., Mokrá, P.: Synthesis and physicochemical properties of novel potential ultrashort acting beta-adrenergic blockers. *Čes. slov. Farm.*, 2008, 57, 160 – 164.
- Liu, Y., Mazundar, S., Bath, P. A.: Alzheimer's disease neuroimaging initiative: an unsupervised learning approach to diagnosing Alzheimer's disease using brain magnetic resonance imaging scans. *Int. J. Med. Inform.*, 2023, 173, 105 027.
- Lu, X., He, S. Y., Li, Q., Yang, H., Jiang, X., Lin, H., Chen, Y., Qu, W., Feng, F., Bian, Y., Zhou, Y., Sun, H.: Investigation of multi-target-directed ligands (MTDLs) with butyrylcholinesterase (BuChE) and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibition: The design, synthesis of miconazole analogues targeting Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.*, 2018, 26, 1665 – 1674.
- Novales, A. A., Schwans, J. P.: Comparing the effects of organic cosolvents on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. *Anal. Biochem.*, 2022, 654, 114 796.
- Ramsay, R. R., Popovic-Nikolic, M. R., Nikolic, K., Uliassi, E., Bolognesi, M. L.: A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clin. Transl. Med.*, 2018, 7, 1 – 14.
- Rigo, D., Carmo Dos Santos, N. A., Peresa, A., Selva, M.: Concatenated batch and continuous flow procedures for the upgrading of glycerol-derived aminodiols via N-acetylation and acetalization. *Catal.*, 2021, 11 (1), 2 – 12.
- Sameem, B., Saeedi, M., Mahdavi, M., Shafiee, A.: A review on tacrine-based scaffolds as multi-target drugs (MTDLs) for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, 10, 332 – 345.
- Sanfilippo, C., Castrogiovanni, P., Imbesi, R., Musumeci, G., Vecchio, M., Li Volti, G., Tibullo, D., Broggi, G., Caltabiano, R., Ulivieri, M., Kazakova, M., Parenti, R., Vicario, N., Fazio, F., Di Rosa, M.: Sex-dependent neuro-deconvolution analysis of Alzheimer's disease brain transcriptomes according to CHI3L1 expression levels. *J. Neuroimmunol.*, 2022, 373, 577 977.
- Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., Votava, M.: Blokáda adrenergických receptoru β a kombinovaná blokáda receptoru $\beta+\alpha$. *Pharmacology, Grada Publishing, a. s.*, 2018, 340 – 344.
- Vidal, C. J., Chai, M. S., Plummer, D. T.: The effect of temperature on the activity of acetylcholinesterase preparations from rat brain. *Neurochem. Int.*, 1987, 11, 135 – 141.
- Xu, Y., Xiong, H., Zhang, B., Lee, I., Xie, J., Li, M., Zhang, H., Kim, J. S.: Photodynamic Alzheimer's disease therapy: from molecular catalysis to photo-nanomedicine. *Coord. Chem. Rev.*, 2022, 470, 214 726.



EPILEPTICKÉ ZÁCHVATOVÉ SYNDRÓMY V DETSKOM VEKU A ICH LIEČBA EPILEPTIC SEIZURE SYNDROMES IN CHILDHOOD AND THEIR TREATMENT

Rozman Antoliková, Natália; Zelencová, Dominika

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

natalia.antolikova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Celosvetovo žije s epilepsiou viac ako 50 miliónov ľudí, pričom na Slovensku evidujeme približne 68 000 prípadov s jej aktívnou formou bez vplyvu na vek či pohlavie. Až 8 000 udalostí postihuje deti s heterogenitou epileptického záchvatu, jeho frekvenciou, etiológiou, začiatkom, priebehom a vplyvom na vývoj, resp. psychiku chorého dieťaťa. Napriek výraznému pokroku v liečbe epilepsií v detskom veku, niektoré syndrómy zostávajú ťažko liečiteľné a sú spojené s postihnutím kognitívnych a behaviorálnych funkcií. Svojím priebehom ovplyvňujú bežné denné aktivity a menia kvalitu života nielen chorého dieťaťa, ale aj celej jeho rodiny. Výber vhodného antiepileptika (AE) vyžaduje na jednej strane dostatočnú znalosť špecifik jednotlivých syndrómov opierajúcich sa o dlhodobé a vlastné skúsenosti lekára, no na druhej strane by mal byť tento výber podložený kvalitnými kontrolovanými štúdiami.

Naša štúdia je z uvedeného dôvodu sústredená na najnovšie usmernenia založené na dôkazoch v manažmente akútnych epileptických záchvatov u detí. Zamerali sme sa na analýzu kazuistiky detského pacienta s refraktérnym *status epilepticus* (RSE). Zhodnotili sme priebeh ochorenia, zvolené liečebné postupy a ich účinnosť a následne sme ich porovnali s odbornou domácou a zahraničnou literatúrou. Zistili sme, že dôležitou súčasťou liečby farmakorezistentných epileptických záchvatov je voľba vhodnej invazívnej terapie vyžadujúcej si spoluprácu zo strany rodičov ev. pacientov. Ďalším zistením bolo, že v prípade opakovaných recidív ochorenia a podozrenia na autoimunitnú epilepsiu je vhodné napriek nejasej diagnóze čo najskôr začať imunomodulačnú liečbu. Časovo adekvátne nasadenie viedlo u pacienta k spomaleniu progresie ochorenia, zníženiu frekvencie a lepšiemu zvládaniu záchvatov, avšak po dvoch cykloch liečby zlyhala kompliance zo strany rodiča pre potrebu častej, min. 5-dňovej hospitalizácie. V terapii sa už

nepokračovalo a v tomto čase nemáme ďalšie informácie o vývoji ochorenia.

Kľúčové slová: invazívna liečba; kompliance; pediatria; refraktérny *status epilepticus*

ABSTRACT

Worldwide, more than 50 million people live with epilepsy, and in Slovakia we have approximately 68.000 cases of active epilepsy, regardless of age or gender. Up to 8.000 events affect children with heterogeneity of epileptic seizure, its frequency, etiology, onset, course and impact on the development or psyche of the sick child. Despite significant advances in the treatment of childhood epilepsies, some syndromes remain difficult to treat and are associated with cognitive and behavioural impairment. Their course affects normal daily activities and alters the quality of life not only of the sick child but also his or her entire family. The choice of an appropriate antiepileptic drug (AE) requires, on the one hand, sufficient knowledge of the specifics of the individual syndromes, based on the physician's own experience over a long period of time, but on the other hand, it should be supported by high-quality controlled studies.

For this reason, our study focuses on the latest evidence-based guidelines in the management of acute epileptic seizures in children. We focused on a case report analysis of a pediatric patient with refractory *status epilepticus* (RSE). We evaluated the course of the disease, the chosen treatment modalities and their efficacy, and then compared them with the professional domestic and foreign literature. We found that an important part of the treatment of pharmacoresistant epileptic seizures is the choice of appropriate invasive therapies requiring cooperation of parents or patients. Another finding was that in case of recurrent relapses and suspected autoimmune epilepsy, despite an unclear diagnosis, immunomodulatory the-

rapy should be initiated as soon as possible. Timed adequate deployment resulted in slower disease progression, reduced frequency and better seizure control in the patient, but after two cycles of the treatment, parental compliance failed due to the need for frequent, minimum 5-day hospitalization. The therapy was not continued and at this time we have no further information on disease progression.

Key words: compliance; invasive treatment; paediatrics; refractory *status epilepticus*

ÚVOD

Epileptický záchvat je náhla, prechodná, stereotypná porucha funkcie mozgu spôsobená patologickým výbojom neurónov v mozgovej kôre (Sýkora, 2015). Je charakterizovaná rýchlym nástupom zmeny správania a častými motorickými prejavmi. Môže zahŕňať aj iné mozgové dysfunkcie (senzorické, senzitivne, viscerálne, vegetatívne, zmeny povahy, nálady, alebo emócií). Z uvedeného dôvodu vyplýva, že klinické symptómy závisia od oblasti, ktorá je abnormálnou aktivitou postihnutá (Ošlejšková, 2008). Už pri prvom kontakte pacienta s epilepsiou sa podľa nových usmernení z roku 2017 odporúča zvážiť etiológiu záchvatov. Ak jej určenie nie je spočiatku jasné, mala by sa prehodnotiť na všetkých ďalších rozhodovacích miestach. Pracovná skupina ILAE (ILAE Task Force) definovala šesť etiologických kategórií (štrukturálna, genetická, infekčná, metabolická, imunologická, neznáma) s možnosťami ďalšieho manažmentu pacienta s epilepsiou (Donáth, 2018). Neurologické poruchy sú spájané aj s depléciou vitamínu D, pričom nie sú obmedzené len na roztrúsenú sklerózu, Alzheimerovu a Parkinsonovu chorobu, ale aj na cerebrovaskulárne poruchy. Oveľa menej pozornosti sa venovalo epilepsii, ktorá je druhou najčastejšou neurologickou poruchou. V súčasnosti sa ale objavuje spojitosť medzi nedostatkom vitamínu D a patofyziológiou epilepsie (Holló, Clemensova, Lakatoš, 2013). Dnes už s určitosťou vieme, že vitamín D, resp. D-hormón vykazuje

dobre známu úlohu v homeostáze vápnika a metabolizme kostí. Podieľa sa aj na ovplyvnení imunitného systému, neuromuskulárnych funkcií, ochrany pred rozvojom zápalov a infekcií. Pri suplementácii sa uprednostňuje prioritne aplikácia D3 (cholecalciferol) pred formou D2 (ergocalciferol). Forma D3 sa účinnejšie absorbuje tenkým črevom, a teda efektívnejšie zvyšuje a udržiava sérové koncentrácie hlavnej cirkulujúcej formy vitamínu D (kalcidiolu) (Rozman Antoliková, 2022).

Z hľadiska epileptogenézy epilepsiu klinicky definujú opakované záchvaty, ktoré sú produkované paroxyzmálnymi neuronálnymi výbojmi. Donáth (2002) definuje záchvatovú aktivitu na neurotransmiterovú, na ktorej sa podieľajú inhibičné neurotransmiterové systémy a excitačné neurotransmiterové systémy, oba fyziologicky v rovnováhe. Závažné porušenie rovnováhy medzi nimi, či v zmysle zníženia inhibície, alebo zvýšenia excitácie, môže mať za následok epileptický záchvat. Druhým dôležitým mechanizmom je transport iónov – selektívny alebo napätovo závislý (iónové kanály).

Medzi rizikové faktory alebo spúšťače epilepsie patrí hlavne spánková deprivácia, preto sa primárne u detí kladie dôraz na pravidelný a dostatočný spánok s rešpektovaním ich vlastných cirkadiánnych rytmov (Stehlíková, Modrá, 2017). U adolescentov a dospelých s epilepsiou je vážnou hrozbou zase konzumácia alkoholu, hlavne vo fáze poklesu hladiny etanolu v krvi, kedy sa veľmi výrazne zvyšuje pravdepodobnosť vzniku záchvatu. Konzumácia energetických a kolových nápojov by sa mala v tomto prípade obmedziť. Spúšťačím faktorom môžu byť aj bežné infekčné ochorenia sprevádzané horúčkou. Riziko sa vzácne objavuje aj po očkovaní, preto je vhodné neočkovať deti s prebiehajúcou infekciou. Záchvat môže vyprovokovať aj blikajúce svetlo (tzv. strobooskopický efekt). Špecifickým vonkajším faktorom sú počítačové hry, videá alebo mobil. V niektorých z nich sa totiž vyskytujú sekvencie so striedajúcim sa kontrastom (Bratský, 2022).

Diagnostika ochorenia sa opiera o dôkladnú anamnézu (výskyt záchvatov v rodine, prítomnosť psy-

chických porúch, ochorenie matky počas tehotenstva, komplikácie pri pôrode, výskyt febrilných kŕčov, časté kolapsy, prekonané infekcie nervovej sústavy a úrazy hlavy). Kľúčový je podrobný opis záchvatu, súbor vyšetровacích metód a zobrazovacie štruktúrne vyšetrenia ako magnetická rezonancia (MRI), elektroencefalografia (EEG), video-elektroencefalografia (video-EEG) a laboratórne vyšetrenie krvi (Bullová, 2022). Počítačová tomografia (CT) nemá pre diagnostiku v epileptológii dostatočnú výpovednú hodnotu a mala by sa využívať len pri akútnych stavoch a vtedy, ak v potrebnom čase nie je MRI vyšetrenie dostupné (Bratský, 2022).

Status epilepticus (SE) definujeme ako záchvat s trvaním bez prerušenia dlhší ako 30 min, resp. sa jedná o nahromadenie záchvatov, medzi ktorými pacient nenadobudne vedomie (Bullová, 2022). Autori Strýček, Šrámek (2018) uvádzajú, že *status epilepticus* je stav vznikajúci buď pri zlyhaní mechanizmov zodpovedných za ukončenie epileptického záchvatu, alebo pri spustení mechanizmov vedúcich k abnormálne prolongovaným epileptickým záchvatom, aj s možnými dlhodobými následkami pre mozog. Rovnako uvádzajú, že refraktérny *status epilepticus* (RSE) nereaguje na benzodiazepíny ani na antiepileptiká (AE) II. voľby a tvorí až 43 % prípadov SE. V tomto zmysle je potrebné uviesť termín farmakorezistentná epilepsia, v rámci ktorej sa nepodarí dlhodobo plne kompenzovať pacienta za použitia dvoch vhodne zvolených antiepileptík v adekvátnych terapeutických dávkach, v monoterapii, alebo kombinovanej terapii (Kuba, 2012).

MATERIÁL A METÓDY

Naša štúdia pozostávala z kazuistiky vybraného pediatrického pacienta s refraktérnym *status epilepticus*, ktorý bol farmakorezistentný na konvenčné antiepileptiká. Kazuistiku sme vypracovali na základe lekárskeho správ, ktoré nám poskytla MUDr. Stanislava Suroviaková z Univerzitnej nemocnice Martin. Súčasťou postupu bol rozbor anamnézy, dispenzarizácie, hospitalizácie, klinických príznakov

a diagnostiky pacienta so záverečnými úvahami o možných príčinách vzniku ochorenia, jeho priebehu, efektívnosti zvolených liečebných postupov a nemej dôležitého faktora kompliance, ktoré sme následne porovnávali s domácimi aj zahraničnými štúdiami. Prinášame aj úvahu o možnostiach intervencie farmaceuta v rámci dispenzarizácie pacienta.

VÝSLEDKY

Osobná a rodinná anamnéza

Pacient je 13-ročný chlapec Nikolas. Narodil sa z 1. rizikovej gravidity pre hroziaci predčasný pôrod v 38. týždni. Pôrodná hmotnosť bola 3320 g, dĺžka 48 cm, Apgar skóre (AS) 7/9, popôrodná adaptácia primeraná a kriesený nebol. Kojený bol 3 mesiace. Strava bola primeraná veku, bez mlieka, mliečnych produktov a sóje. Očkovania prebehli podľa predvolania, pričom po každom mal teplotu do 40 °C. Po podaní paracetamolu nastal pokles do 48 hod. Chlapec disponuje alergiou na:

- antibiotiká: cefaklor (exantém)
- zeleninová zmes (mrkva ale aj slivky)
- bielkoviny kravského mlieka (BMK) a sója.

Matka Veronika (1986) má potravinovú alergiu na BKM a inhalačnú alergiu na peľ. Otec nie je udaný. Matkin otec je od detstva epileptik na liečbe. V rodine sa vyskytuje častejšie ischemická choroba srdca, hypertenzia a matkina stará mama, ako aj teta, majú diagnostikovaný karcinóm prsníka.

Dispenzarizácia, hospitalizácie a priebeh ochorenia u chlapca

Chlapec mal ako 4-mesačný úraz hlavy a bol hospitalizovaný na Klinike detí a dorastu Univerzitnej nemocnice Martin (KDaD UNM) s negatívnym neurologickým nálezom. Opäť bol hospitalizovaný na KDaD UNM ako 5-mesačný pre prítomnú alergickú reakciu na potraviny – anafylaktická reakcia s laryngospazmom a tonicko-klonické kŕče s desaturáciou. Stav sa 3-krát opakoval cca 5 min, mal hypoxiu s následnou intubáciou a kardiopulmonálnou resusci-

táciou. Pri prepustení evidovaný ľahký hypotonický syndróm. Od toho času je popisované výrazné oneskorenie psychomotorického vývoja. Ďalší priebeh ochorenia zachytáva tabuľka 1, ktorá zahŕňa aj ďalšie pridružené komplikácie s odporúčanou liečbou.

Tabuľka 1 zachytáva priebeh starostlivosti o pacienta, chlapca, s bohatou anamnézou ochorení, komplikácií a liečby. Na riešení jeho zdravotného stavu sa podieľa komplexne tím odborníkov. Mnoho publikovaných prác poukazuje aj na výhody začlenenia klinického farmaceuta do rutinej starostlivosti o pediatrických pacientov s dlhodobými ochoreniami vrátane epilepsie, čo by v predkladanom prípade bolo žiaduce, nakoľko sa v závere preukázal negatívny vplyv na adherenciu pacienta k liečbe (Jarad a kol., 2022).

Zhoršenie stavu pacienta a proces liečby

13-ročný (rok výskytu problému 2019) polystigmatizovaný chlapec s DMO a epilepsiou na chronickej liečbe valproátom a levetiracetamom bol preložený na Oddelenie pediatrickej intenzívnej medicíny (OPIM) UNM pre kumuláciu epileptických záchvatov pri nedodržaní liečebného režimu a prebiehajúcim febrilnom stave. Rodičia zabudli podať synovi lieky, inak ich dostáva pravidelne. Ráno boli prítomné mimické záškľby pravým kútikom a pravým viečkom a následne protrahovaný fokálny záchvat prechádzajúci do bilaterálneho tonicko-klonického záchvatu v trvaní 30 min a s odznením po podaní druhej dávky diazepamom *per rectum* (celkovo podaných 20 mg). Podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb (MKCH-10) mal pridelenú diagnózu G40.5 – Osobitný epileptický syndróm.

Pacient ostal v sledovaní neurológa, ktorý odporúčal zvýšiť dávky pôvodnej medikácie. Od prijatia na OPIM bola prítomná hemiparéza vpravo, taktiež aj centrálna lézia *nervus facialis* vpravo. Na MR sa zobrazovali postischemické zmeny v mozgovom tkanive supratentoriálne a bolo podozrenie na meziotemporálnu sklerózu vľavo. V EEG bol ťažko abnormálny nález pre výrazné spomalenie pozadia s akcentáciou hemisféry vľavo (delta aktivita s fr. 0,5 – 1,5

Tab. 1: Dispenzarizácia pacienta

Ambulancia	Ochorenie	Terapia
Neurológia	Klinika detí a dorastu Univerzitnej nemocnice Martin (KDaD UNM) syndróm Cornelia de Lange (01.01.2011 – 05.01.2011)	valproát (VPA) (150-0-300 mg) levetiracetam (LEV) (500-0-250 mg)
	Klinika detí a dorastu Univerzitnej nemocnice Martin stav po prolongovanom epileptickom paroxyzme s ľavostrannou hemiparézou, febríliami a suspektnou neuroinfekciou (nepotvrdil sa syndróm Cornelia de Lange a Angelmanov syndóm) (29.05.2014 – 09.06.2014)	
	Klinika anestéziológie a intenzívnej medicíny (KDAIM) UNM fokálne záchvaty vľavo, so sekundárnou generalizáciou, nutná bola preto umelá pľúcna ventilácia (09.06.14 – 08.07.14)	
V októbri 2019 bola potvrdená detská mozgová obrna (DMO), kvadruspastická forma.		
Dieťa bolo počas ďalších rokov v sledovaní neurológa pre polymorfné záchvaty, matkou popisované ako stavy areaktivity, deviacie bulbov, hlavy, tonického vypnutia končatín, flekčné postury (akoby schúlenie do kĺbka), záchvaty s rôznou frekvenciou.		
Gastroenterológia	alergia na bielkoviny kravského mlieka a potravinová alergia	diéta
Fyziatricko-rehabilitačná	bolesť a stuhnutosť svalov	rehabilitačný pobyt v Martine
Oftalmologická	hypermetropia, astigmatizmus	bez terapie
Endokrinologická	hypothyreóza s postupnou úpravou	bez terapie

Tab. 2: Lieková anamnéza pacienta do potvrdenia status epilepticus vzhľadom na posledný zachytený stav

Názov liečiva	Spôsob podania	Dávkovanie
cefuroxím	i.v.	750 mg každých 8 hod.
metamizol	i.v.	300 mg každých 8 hod.
paracetamol	i.v.	400 mg p.p.
furosemid	i.v.	10 mg p.p.
fenobarbital	i.v.	100 mg
propofol	i.v.	60 mg
midazolam	i.v.	p.p.
izotonický roztok elektrolytov		
injekčný/infúzny roztok midazolamu		
nadroparín	s.c.	2 x 0,2 ml
levetiracetam	NGS	500-0-500 mg
valproát	NGS	300-0-300 mg
fenobarbital	NGS	50-50-50 mg

i. v. – intravenózne / s. c. – subkutánne / NGS – nazogastrická sonda / p. p. – podľa potreby

Hz); vpravo základná aktivita v pásme delta – theta (fr. 2 – 4 Hz) s takmer kontinuálnou epileptiformnou aktivitou v oblasti F – T vpravo. Počas hospitalizácie bol pacient subfebrilný – febrilný s mierne zvýšenou zápalovou aktivitou. V úvode bola nastavená antiepileptická terapia prechodne parenterálne fenobarbitalom, no po obnovení enterálneho príjmu cez nasogastrickú sondu (NGS) bola preordinovaná chronická liečba na enterálnu formu a postupne sa navyšovala podľa ordinácie neurológa.

Výsledky prác poukazujú na to, že úroveň adheencie pacienta alebo opatrovateľa k liekom možno výrazne zvýšiť poskytovaním informácií vhodnou metódou vzdelávania, pričom poskytovateľom tohto procesu môže byť klinický farmaceut. Klinický farmaceut má schopnosť vytvoriť harmonogram podávania liekov a zaznamenávať jeho kontinuitu a koreláciu s terapeutickým plánom (Jarad a kol., 2022).

Zmena charakteru záchvatov

Pre pretrvávajúce febrílie a opakovane len mierne zvýšenú zápalovú aktivitu boli do liečby pridané antibiotiká. 02.01.2020 bola zaznamenaná kumulácia záchvatov a do terapie bol preto kontinuálne podávaný midazolam (2,5 mg) v dávke 0,11 mg/kg/hod prechodne s dobrým efektom. Od 06.01.2020 bola u pacienta prítomná opätovná frekventná generalizovaná kľčová aktivita, ktorá pretrvávala i napriek intenzívnej antiepileptickej liečbe. Vzhľadom na zmenu charakteru záchvatov, ako aj celkového klinického stavu bolo odporúčané doplniť likvorologické vyšetrenie. Kompletnú liekovú anamnézu pacienta uvádzame v tabuľke 2.

Na základe rozsiahlej liekovej anamnézy (viď tab. 2) by bolo vhodné do procesu liečby začleniť aj farmaceuta, ktorý prijateľným spôsobom edukácie poskytne pacientovi informácie o závažnosti nežiaducich účinkov, najmä tých, ktoré súvisia s kogníciou, koordináciou a akademickým výkonom. Upozorní na potrebu nepodceňovania nešpecifických nežiaducich účinkov, ako je bolesť hlavy a únava (pacienti, ktorí majú viac nežiaducich účinkov, môžu mať nižšiu kvalitu života). Lepšie znalosti o terapii vedú k

lepšej znášanlivosti liečby a schopnosti rozlíšiť medzi nešpecifickým problémom, ktorý nesúvisí s terapiou epilepsie, a skutočnými nežiaducimi účinkami, udalosťami (Jarad a kol., 2022).

Status epilepticus

Pacient bol následne hospitalizovaný na KDAIM UNM pre *status epilepticus* refraktérny. Do terapie sa pridal kontinuálny propofol a intravenózne dvojkombinácia AE (VPA a LEV). Pri tejto liečbe boli prítomné konvulzie pravého ústneho kútika a 1-krát tonický záchvat. Pokračovalo sa v nasledovnej kombinácii: VPA v dávke 400-0-400 mg (30 mg/kg/deň), a LEV v dávke 750-0-750 mg (60 mg/kg/deň). Do terapie sa mal pridať lakosamid (LCM) vo forme infúzneho roztoku a podávať ho 30 min dvakrát denne s postupnou titráciou (50 mg 2 dni, 75 mg 2 dni a 100 mg trvale). Pred nastavením na túto terapiu bolo potrebné doplniť EKG vyšetrenie.

Od 10.01.2020 bol pacient kontinuálne tlmený tiopentalom (THP) a zároveň intubovaný. Pri tlmení bol bez kľčovej aktivity, nebudil sa. V rámci AE pokračoval v kombinovanej terapii VPA + LEV. LCM bol pre arytmiu vysadený. Odporúčalo sa ďalej postupne znižovať tlmenie tiopentalom, pri rekurencii kľčovej aktivity opätovne pacienta uviesť do celkovej anestézie a pokračovať v kombinácii AE (VPA + LEV) v rozpísaných dávkach. Pri opakovaní kľčov sa mal tiež do liečby pridať cestou NGS topiramát (TPM) 50 mg v dávke 0-0-1/2 tbl. (4 dni), 1/2-0-1/2 tbl. (4 dni), 1/2-0-1 tbl. (4 dni), 1-0-1 tbl. (t. j. pri súčasnej hmotnosti 4,6 mg/kg/deň).

O osem dní neskôr (18.01.2020) pre kumuláciu kľčovej aktivity bola zvýšená sedácia THP. Pacient bol ďalej na kombinácii antiepileptík – VPA + LEV + TPM. Na MRI pribudli zmeny v bazálnych gangliách vľavo s miernou reštrikciou difúzie, prítomný edém ľavej mozgovej hemisféry s jej leptomeningeálnym sýtením a hypervaskularizáciou. Na EEG pretrvávala asynchronia mozgových hemisfér, pomalá kontinuálna delta vľavo, vpravo rýchlejšia aktivita z pásma delta s intermitentnými epileptickými grafoelementami F – C – T vpravo charakteru periodických laterali-

zovaných epileptiformných výbojov. V diferenciálnej diagnostike bola prítomná Rasmussenova encefalítida.

Zahájenie imunomodulačnej liečby

Pre podozrenie z encefalitídy sa odporúčalo doplniť likvorologické vyšetrenie. Antiepileptická medikácia bola bez zmeny, podľa predošlého konzília. Stav pacienta sa telefonicky konzultoval s prednostkou Kliniky detskej neurológie Národného ústavu detských chorôb (KDN NÚDCH) v Bratislave, kde bol odporúčaný ďalší terapeutický postup po odbere likvoru. Pri poslednom MRI vyšetrení sa zobrazovala meningoencefalitída ľavej hemisféry, postkontrastne s leptomeningeálnym syténím. EEG vyšetrenie – nad ľavou hemisférou kontinuálna nízka voltáž, pomalá delta aktivita, nad pravou hemisférou rýchlejšia delta prerušovaná intermitentnou epileptickou aktivitou charakteru PLEDs (periodické lateralizované epileptiformné výboje), občasne delta so superponovanou beta aktivitou (delta brush). Likvorologické vyšetrenie bolo biochemicky bez zápalovej formuly, PCR negatívne a realizovaný bol odber kompletného autoimunitného panelu. Zahájila sa terapia kortikosteroidmi v pulzoch – metylprednizolón intravenózne 5 x 500 mg (celková dávka 2,5 g). Po ukončení od 27.01.2020 sa mala podávať liečba intravenóznym imunoglobulínom (IVIg) v celkovej dávke 2 g/kg rozdelená na 5 dní. Pridaná bola antiulcerózna liečba a ostatná terapia ostala bez zmeny.

Koncom toho istého mesiaca (30.01.2020) sa vzhľadom na recidívu krčovej aktivity navýšila sedácia THP (3,2 mg/kg/hod). Pacient pokračoval v imunosupresívnej terapii. Nutný bol EEG monitoring. 31.01.2020 bola opätovne prítomná recidíva krčovej aktivity, pacient bol kontinuálne sedovaný THP, IVIg bola podaná 5. dávka. Telefonicky sa konzultovalo pracovisko KDN NÚDCH v Bratislave, odporúčal sa preklad pacienta na 03.02.2020. Do liečby bol cestou NGS pridaný karbamazepín (CBZ) 150 mg v dávke 0-0-1/2 tbl. 2 dni, 1/2-0-1/2 tbl. 2 dni, 1-0-1 tbl. 2 dni, 1,5-0-1,5 tbl. (18 mg/kg/deň).

22.02.2020 podstúpil pacient opäť hospitalizáciu

pre fokálne epileptické záchvaty. Matkou bol podaný rektálny diazepam 10 mg s ústupom krčovej aktivity do 15 min. Následne pacient zaspal, nedal sa zobudiť cca 4 hod. Privezený rýchlou zdravotnou pomocou na OPIM, už bez krčovej aktivity, pričom opakovane zvracal. Plánované bolo podávanie IVIg v celkovej dávke 2 g/kg do 5 dávok pre supponovaný autoimunitný proces. Gastroenterológ indikoval zavedenie perkutánnej endoskopickkej gastrotómie pre malnutríciu.

Z neurologického hľadiska sa odporúčalo nasledovné:

- pokračovať v kombinovanej antiepileptickej medikácii
- IVIg podávať podľa rozpisu
- pri krčovej aktivite použiť intravenózne benzodiazepam.

Behom uvedenej liečby došlo postupne ku klinickému zlepšeniu stavu pacienta, pričom ju podstúpil dvakrát. Avšak zo strany matky došlo k stavu *non-compliance*, pretože synova liečba vyžadovala aspoň 5-dňovú hospitalizáciu. Matka nechcela v terapii ďalej pokračovať. O ďalšom vývoji ochorenia teda nemáme vedomosť.

DISKUSIA

V predloženej štúdii sme analyzovali prípad chlapca, ktorého rizikový zdravotný stav vyústil do komplikovanej formy epilepsie. Na samotný vývoj ochorenia mohla mať dopad riziková gravidita a nižšie Apgar skóre, nakoľko to potvrdzujú aj viaceré štúdie (Persson a kol., 2018). Výskyt epilepsie a hypertenzie v rodine chlapca mohol v tomto prípade tiež zohrávať určitú rolu. Okrem uvedeného, aj spomínaná alergia môže mať podiel na výskyte krčových stavov u detí (Falsaperla a kol., 2014). Anafylaktická reakcia u nášho pacienta vyvolala epileptické záchvaty už 5 mesiacov po narodení, pričom stav sa odvtedy zhoršoval. Z patologického hľadiska môže ísť o šírenie periférnej zápalovej odpovede do CNS. Existujú dôkazy, že

prozápalové cytokíny sú zodpovedné za narušenie hematoencefalickej bariéry, čo spôsobuje fokálny zápal CNS a následne vznik záchvatov (Falsaperla a kol., 2014). Podľa Sadowska a kol. (2019) môžeme predpokladať aj koexistenciu detskej mozgovej obrny a epilepsie najmä s liekovou rezistentnou epilepsiou, ale aj s mentálnou retardáciou, poruchou zraku a sluchu, ako aj poruchami kŕmenia a správania. Do terapie bol zaradený valproát s levetiracetamom, pretože sa dobre tolerujú a sú efektívne v pediatrickej populácii. Valproát je liek prvej voľby pre väčšinu typov záchvatov. Pre jeho široké spektrum účinku a dostupné liekové formy je vhodný aj pre deti. Levetiracetam hrá nielen významnú úlohu pri kontrole epileptických záchvatov, ale v kombinácii s valproátom môže zlepšiť kognitívne funkcie detí s epilepsiou za súčasného zníženia nežiaducich účinkov, a tým zlepšiť kvalitu ich života (Zhu a kol., 2022). Na uvedenej kombinácii ostal náš pacient počas celého sledovania, kedy sa k nej pridali, alebo naopak eliminovali ďalšie liečivá.

Zdravotný stav nášho pacienta sa začal komplikovať už v jeho 13. rokoch, keď mu rodičia zabudli podať predpísané lieky. Nevyhnutnosťou v liečbe epilepsie je pritom dodržiavať a riadiť sa liečebným plánom. Antiepileptiká je potrebné užívať presne podľa stanovenia lekára, a to nielen čo sa týka dávky, ale aj ich rozdelenia v priebehu dňa. Už vynechanie jednej dávky môže viesť k zvýšenému počtu záchvatov, pričom návrat k pôvodnému dávkovaniu nemusí znamenať aj návrat k pôvodnej frekvencii kŕčových stavov. Predpokladáme, že u nášho pacienta za vznik a kumuláciu záchvatov prispelo nedodržanie liečebného režimu.

Ako záchranný liek mu bol pri výskyte mimických záškľbov pravým kútikom a pravým viečkom s následne protrahovaným fokálnym záchvatom prechádzajúcim do bilaterálneho tonicko-klonického záchvatu v domácom prostredí podaný diazepam *per rectum*, pretože spomedzi benzodiazepínov je diazepam najčastejšie predpisovaným liekom predĺžených a opakujúcich sa epileptických stavov (Nunley a kol., 2019).

Nakoľko sa stav pacienta nezlepšoval, indikovali sa

pomocné vyšetrenia ako MR, EEG, hladina glukózy, základné laboratórne vyšetrenie vrátane kompletného krvného obrazu a metabolického panelu. Po akútnej fáze diagnostiky a liečby je potrebné zvážiť ďalšie vyšetrenie napr. lumbálnej punkcie, likvorologické vyšetrenie a stanovenie toxikologického panelu (Alo-layan a kol., 2021). Tento postup bol podobný aj v našom prípade. Po zhodnotení výsledkov, kde neustále pretrvávala subfebrilita – febrilita, bol do liečby prechodne pridaný fenobarbital, midazolam a antibiotiká. Spolu s fenytoínom je fenobarbital najbežnejšie používaným antiepileptikom druhej línie (Khajeh a kol., 2018) a midazolam je preferovaný pre rýchly nástup účinku a relatívne krátky polčas, ktorý umožňuje rýchlejšiu titráciu (Rezník, Berger, Claassen, 2016).

V prípade zlyhania terapie s kontinuálne podávaným midazolamom je liekom druhej voľby propofol, ktorým pokračovala liečba aj u nášho pacienta, pretože sa mu diagnostikoval *status epilepticus* (refraktérny). Refraktérny *status epilepticus* (RSE) je definovaný ako prebiehajúce záchvaty, ktoré nie je možné kontrolovať liekmi prvej a druhej línie (Rezník, Berger, Claassen, 2016). K pôvodným antiepileptikám sa pridal lakosamid ako dobrá alternatíva u pediatrických pacientov s farmakorezistentnou fokálnou epilepsiou a refraktérnym *status epilepticus* vzhľadom na jeho účinnosť a bezpečnostný profil (Rosa a kol., 2018). V našom prípade však došlo k opätovnej recidíve aj po propofole, a preto sa použil v terapii tiopental s postupnou titráciou podľa potreby. Lakosamid bol pre arytmiu vysadený a následne nahradený topiramátom NGS sondou. Bresnahan a kol. vo svojej štúdii z roku 2019 uvádza, že TPM je účinný ako prídavná liečba fokálnej epilepsie rezistentnej na lieky, pretože je takmer trikrát účinnejší v porovnaní s placebom pri znižovaní záchvatov.

Na základe pretrvávajúcich problémov bola zahájená liečba kortikosteroidmi v pulzoch metylprednizolón (na dobu určitú). Po skončení aplikácie sa prešlo na liečbu intravenóznym imunoglobulínom (IVIg) v celkovej dávke 2 g/kg rozdelená na 5 dní. K uvedenému postupu liečby sa pristúpilo z dôvodu farmakorezistentnosti na konvenčnú terapiu a pravdepodobnom

výskyte autoimunitnej encefalitídy. Štúdie ukázali, že včasné začatie imunoterapie môže mať za následok rýchlejšie zotavenie a lepšiu prognózu, ktorá závisí od hĺbky autoimunity a prítomnosti poškodenia neurónov (Jang a kol., 2020). Odpoveď na túto liečbu v akútnej fáze môže mať diagnostickú aj terapeutickú hodnotu (Toledano, Pittock, 2015). Do liečby sa pridal aj karbamazepín opäť sondou, ktorý v kombinácii s AE nevykazoval závažné interakcie.

Nastavená liečba sa z neurologického hľadiska javila ako vhodná so žiaducim efektom, avšak tentokrát zlyhal ľudský faktor zo strany rodiča, matky, ktorá odmietla ďalej spolupracovať na zvolenom algoritme liečby. Prekážala jej min. 5-dňová hospitalizácia so synom, preto v terapii nechcela ďalej pokračovať. Na tomto mieste je potrebné uviesť termín adherencia v oblasti farmakológie. Definujeme ju ako jav alebo stav, v ktorom sa pacient prispôsobuje liečebným postupom a nárokom lekára, akceptuje požiadavky preskripcie a dodržiava pokyny lekára a ošetrojúceho personálu, ako aj prispôsobuje svoj životný štýl. Jej dodržiavanie sa v značnej miere podieľa na úspešnosti liečby, avšak bez aktívnej spolupráce s pacientom (jeho blízkymi) sa adherencia či kompliance nezlepší. V prvom rade je potrebná edukácia pacienta (jeho blízkych) o prebiehajúcej chorobe, podanie zrozumiteľných informácií o liečbe a liekoch, pričom akceptujeme jeho zvyky a návyky. Náhle zmeny v životnom štýle sa nemusia stretnúť s porozumením a úspechom (Gažová, Kyselovič, 2015).

Na základe zníženej adherencie a compliance zo strany rodiča nedisponujeme v súčasnosti informáciami o výsledku intervencie. Ak by ani táto možnosť liečby nebola úspešná, ako vhodná by bola chirurgická terapia.

Lekárneň je často miestom prvého kontaktu pacienta s odborníkom pripraveným erudovane pomôcť pri riešení pacientovho problému. Rovnako je to aj v prípade epilepsie, kde farmaceuti zvládajú edukovať pacienta na úrovni farmakologickej liečby a úspešnej dlhodobej kompenzácie (Nežádal, 2022; Laca Megyesi, Dubán, Kmeťková, 2023).

ZÁVER

Neexistujú žiadne údaje, ktoré by určovali trvanie dlhodobej imunosupresie pri autoimunitnej epilepsii. U niektorých pacientov dochádza k spontánnej remisii, zatiaľ čo iní sú na jej udržanie závislí od celoživotnej terapie. Touto štúdiou sme chceli dokázať zložitost' liečby refraktérneho *status epilepticus*, ktorý si vyžaduje skúsenosti a znalosti zo strany lekára, ale aj značnú trpezlivosť a spoluprácu zo strany rodičov detí trpiacich na toto ochorenie. Aj v tomto bode vedia byť farmaceuti nápomocní, v zmysle edukácie pacienta o spôsobe liečby, nutnosti jej dodržiavania a rešpektovania stanovených cieľov.

POĎAKOVANIE

Naše úprimné poďakovanie patrí MUDr. Stanislave Suroviakovej z Univerzitnej nemocnice Martin, za ústretovosť pri poskytnutí materiálov a ochotu konzultácie.

ZOZNAM LITERATÚRY

Alolayan, Y. S., McKinley, K., Bhatia, R., Alkhachroum, A.: Review and updates on the treatment of refractory and super refractory status epilepticus. *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10 (14), 3028.

Bratský, V.: Špecifiká epilepsie v detskom veku [Specifics of epilepsy in childhood]. *Invitro*, 2022, 10 (1), 72 – 79.

Bresnahan, R., Hounscome, J., Jette, N., Hutton J. L., Marson, A. G.: Topiramate add-on therapy for drug-resistant focal epilepsy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2019, 10, CD001417.

Bullová, A.: Liečba epilepsie: Lieky, diéta, režimové opatrenia + prvá pomoc [Epilepsy treatment: medication, diet, regimen + first aid]. <https://zdravoteka.sk/choroby/epilepsia/liecba/>. Accessed April 22, 2024.

Donáth, V.: Nová klasifikácia epileptických záchvatov a epilepsií ILAE 2017 [New classification of epileptic seizures and epilepsies ILAE 2017]. *Neurol.*

prax, 2018, 19 (1), 35 – 39.

Donáth, V.: Patofyziológia epilepsie [Pathophysiology of epilepsy]. *Neurologie pro praxi*, 2002, 2, 64 – 68.

Falsaperla, R., Pavone, P., Miceli Sopo, S., Mahmood, F., Scalia, F., Corsello, G., Lubrano, R., Vitali, G.: Epileptic seizures as a manifestation of cow's milk allergy: a studied relationship and description of our pediatric experience. *Expert review of clinical immunology*, 2014, 10 (12), 1597 – 1609.

Gažová, A., Kyselovič, J.: Kompliancia pacienta a adherencia k liečbe [Patient compliance and adherence to treatment]. *Farmi news*, 2015, 3.

Holló, A., Clemensová, Z., Lakatoš, P.: Epilepsy and Vitamin D. *The International Journal of Neuroscience*, 2013, 124 (6), 387 – 393.

Jang, Y., Kim, D. W., Yang, K. I., Byun, J. I., Seo, J. G., No, Y. J., Kang, K. W., Kim, D., Kim, K. T., Cho, Y. W., Lee, S. T.: Drug Committee of Korean Epilepsy Society: Clinical approach to autoimmune epilepsy. *Journal of Clinical Neurology (Seoul, Korea)*, 2020, 16 (4), 519.

Jarad, S., Akour, A., Khreisat, W. H., Elshammari, A. K., Madae'en, S.: The role of clinical pharmacist in pediatrics' adherence to antiepileptic drugs. *J. Pharm. Technol.*, 2022, 38 (5), 272 – 282.

Khajed, A., Yaghoubinia, F., Yaghoubi, S., Fayyazi, A., Aliabad, G. M.: Comparison of the effect of phenobarbital versus sodium valproate in management of children with status epilepticus. *Iranian Journal of Child Neurology*, 2018, 12 (4), 85 – 93.

Kuba, R.: Léčba farmakorezistentní epilepsie [treatment of pharmacoresistant epilepsy]. *Praktické lékařství*, 2012, 8 (2), 71 – 75.

Laca Megyesi, Š., Dubán, L., Kmet'ková, V.: Vývoj lekárenskej starostlivosti na Slovensku v rokoch 2013 – 2022 [Development of pharmacy care in Slovakia in 2013 – 2022]. In *Recenzovaný sborník příspěvku mezinárodní vědecké konference*, 2023.

Nunley, S., Glynn, P., Rust, S., Vidaurre, J., Albert, D. V. F., Patel, A. D.: A hospital-based study on caregiver preferences on acute seizure rescue medications in pediatric patients with epilepsy: intranasal

midazolam versus rectal diazepam. *Epilepsy & Behavior*, 2019, 92, 53 – 56.

Ortiz de la Rosa, J. S., Ladino, L. D., Rodríguez, P. J., Rueda, M. C., Polanía, J. P., Castañeda, A. C.: Efficacy of lacosamide in children and adolescents with drug-resistant epilepsy and refractory status epilepticus: a systematic review. *Seizure*, 2018, 56, 34 – 40.

Ošlajšková, H.: Epilepsie a její léčba [Epilepsy and its treatment]. *Praktické lékařství*, 2008, 4 (2), 55 – 59.

Persson, M., Razaz, N., Tedroff, K., Joseph, K. S., Cnattingius, S.: Five and 10 minute Apgar scores and risks of cerebral palsy and epilepsy: population based cohort study in Sweden. *Bmj.*, 2018, 73 (7), 391 – 393.

Reznik, M. E., Berger, K., Claassen, J.: Comparison of intravenous anesthetic agents for the treatment of refractory status epilepticus. *Journal of clinical medicine*, 2016, 5 (5), 54.

Rozman Antoliová, N.: Moderná a populárna forma podávania vitamínu D vo forme orodispergovateľného filmu [A modern and popular form of vitamin D administration in the form of orodispersible film]. *PHARMA tribune*, 2022, 4 (1), 14, 16.

Stehlíková, P., Modrá, E.: Epilepsie a dítě [Epilepsy and The Child]. Praha: Společnost E, 2017, 1 – 88.

Strýček, O., Šrámek, V.: Nová definice status epilepticus a možnosti jeho farmakologické léčby [A new definition of status epilepticus and its pharmacological treatment options]. *Anesteziologie a intenzivní medicína*, 2018, 29 (4), 207 – 216.

Svetový deň epilepsie: Prvá pomoc pri epileptickým záchvate má zabezpečiť, aby sa pacient nezranil [First aid for an epileptic seizure is to ensure that the patient is not injured]. <https://nemocnicazvolen.agel.sk/o-nemocnici/novinky/230327-epilepsia.html>. Accessed April 22, 2024.

Sýkora, P.: Liečba epilepsie a epileptických syndrómov u detí [Treatment of epilepsy and epileptic syndromes in children]. *Neurologie pro praxi*, 2015, 16 (2), 74 – 76.

Toledano, M., Pittock, S. J.: Autoimmune epilepsy. *Seminars in Neurology*, 2015, 35 (3), 245 – 258.

Zhu, Y., Yang, J., Zhu, X.: Combined effects of levetiracetam and sodium valproate on paediatric patients with epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Seizure*, 2022, 95, 17 – 25.



INTERVENCIA FARMACEUTA VEREJNEJ LEKÁRNE PRI PREDCHÁDZANÍ RIZIKA LIEKOVÝCH INTERAKCIÍ U STARŠÍCH PACIENTOV S HYPERTENZIOU

COMMUNITY PHARMACIST'S INTERVENTIONS CONNECTED TO THE PREVENTION OF RISK OF DRUG INTERACTIONS RELATED TO ELDERLY PATIENTS WITH HYPERTENSION

Gabriková, Ivana¹; Holécyová, Monika; Fedor, Pavol^{4, 5}; Sukeľ, Ondrej^{2, 3}

¹Lekárneň Medikament, Starohájska 6755/2, 917 01 Trnava

²Slovenská lekárnická komora, Nová Rožňavská 3, 831 04 Bratislava 3

³Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave
Odbojárov 10, Bratislava

⁴Detská fakultná nemocnica Košice, Trieda SNP 1, 040 11 Košice

⁵Lekárska fakulta UPJŠ Košice, Ústav epidemiológie, Trieda SNP 1, 040 11 Košice
Slovenská republika

ondrej.sukel@slek.sk

ABSTRAKT

Vzhľadom na stúpajúce množstvo rôznych liekových kombinácií, sa liekové interakcie stávajú čoraz väčším medicínskym problémom. Tie liekové interakcie, ktoré sú nežiaduce, môžu viesť k vážnym zdravotným problémom, ktoré sa prejavujú rôznymi zmenami v organizme.

V štúdiu sme zhodnotili riziko vzniku liekových interakcií u pacientov starších ako 65 rokov, ktorým boli vydané lieky v sledovanej verejnej lekární v priebehu roka 2021 a ktorí užívali aspoň jeden liek zo skupiny antihypertenzív. V skupine 1724 pacientov (66,42 % žien) sme identifikovali 5205 výdajov, pri ktorých bolo vydaných celko-

vo 11 157 liekov. Počet liekov pri jednom výdaji bol 1 – 13 (medián = 3). Viac ako 5 druhov liekov bolo vydaných pri 261 výdajoch, lieková interakcia sa vyskytla v 205 (78,54 %) prípadoch, pričom všetkých liekových interakcií bolo 543 a interakcií s liečivom ATC skupiny C bolo 398 (73,30 %). Najviac liekových interakcií (34,81 %) malo tretí stupeň (zo 6) klinickej závažnosti, najzávažnejších interakcií (4. – 6. stupeň) bolo 12,51 %. Viac než polovica pacientov vykonala v lekární iba jednu návštevu; iba štvrtina pacientov realizovala počas roka viac ako tri výbery. Z našich zistení vyplýva, že možnosť identifikácie rizika liekových interakcií pri výdaji lieku je reálna, avšak vzhľadom k rozsahu poskytovateľov lekárenskej starostlivosti

a z toho vyplývajúcej fluktuácie pacientov je táto možnosť značne limitovaná, preto je nevyhnutné implementovať nástroje, ktoré predpisujúcim lekárom a expedujúcim farmaceutom umožnia prístup ku kompletnej liekovej anamnéze pacienta.

Kľúčové slová: liekové interakcie; lieky na liečbu hypertenzie; mechanizmus účinku

ABSTRACT

With the increasing number of different drug combinations, drug interactions have become a growing medical problem. Undesirable drug interactions can lead to serious health issues, manifesting in various changes in the body.

In this study, we evaluated the risk of drug interactions in patients over 65 years of age who were dispensed medications in a monitored public pharmacy during 2021 and who took at least one antihypertensive drug. In a group of 1724 patients (66.42 % women), we identified 5205 dispensations which included a total of 11,157 drugs. The number of drugs per dispensation was 1 – 13 (median = 3). More than 5 types of drugs were dispensed in 261 dispensations, and drug interaction occurred in 205 (78.54 %) cases, with a total of 543 drug interactions, of which 398 (73.30 %) were interactions with drugs from the ATC group C. Most drug interactions (34.81 %) were of the third degree (out of 6) of clinical severity, and the most severe interactions (4th – 6th degree) were 12.51 %. More than half of the patients made only one visit to the pharmacy, and only a quarter of the patients made more than three visits during the year. Our findings suggest that the possibility of identifying the risk of drug interactions during drug dispensing is real, but due to the scope of providers of pharmacy care and the resulting fluctuation of patients, this possibility is significantly limited. Therefore, it is essential to implement tools that allow prescribing physicians and dispensing pharmacists access to a complete medication history of the patient.

Key words: drugs for the treatment of hypertension; drug interactions; mechanism of action

ÚVOD

Interakcie liekov sa v súčasnosti stávajú čoraz viac dôležitou témou. Pri častom užívaní kombinácie liekov (polyfarmácia) môže dôjsť k vzájomnému spolupôsobeniu a v dôsledku toho sa môžu vyskytnúť menej závažné, ale aj vážnejšie nežiaduce účinky.

Polyfarmácia je termín, ktorý sa používa v praxi viac ako jeden a pol storočia, no najvhodnejšou definíciou je užívanie 5 a viac liekov súčasne. Svetová zdravotnícka organizácia navrhuje, aby sa viac kládol dôraz na prax, ktorá je založená na dôkazoch, hoci je definícia vyjadrená v číselnej podobe. Cieľom je možnosť redukovať nevhodnú polyfarmáciu (Varghese a kol., 2022).

Najčastejšie sa vyskytujúce ochorenie, pri ktorom pacienti užívajú viaceré kombinácie liekov (a tým je zvýšená šanca vzniku liekových interakcií) je kardiovaskulárneho pôvodu – hypertenzia. Hypertenzia je celosvetovo najrozšírenejším rizikovým faktorom kardiovaskulárnej morbidity a mortality najmä u starších ľudí (Mills a kol., 2020).

Správne nastavenou liečbou hypertenzie sa môže znižovať riziko vzniku mŕtvice, infarktu myokardu alebo aj srdcového zlyhania a podobne.

Liečba hypertenzie môže byť nefarmakologická, čo súvisí so zdravým životným štýlom, ale aj farmakologická, kde sa užívajú liečivá viacerých skupín ako sú diuretiká, inhibítory angiotenzín-konvertujúceho enzýmu (ACEI), blokátory angiotenzínových receptorov, β -blokátory a blokátory kalciových kanálov (Oparil a kol., 2018).

Pre minimalizáciu liekových interakcií by mal mať lekár prístup k všetkým liekom, ktoré pacient užíva, a taktiež pri expedícii v lekárni by sa mal farmaceut dostatočne zaujímať o pacienta a patrične mu vysvetliť užívanie liekov, respektíve nezanedbávať dispenzačné minimum, prípadne upozorniť pacienta na možné vzniknutie interakcie liekov.

Národná rada Slovenskej republiky (regulátor) príslušnými právnymi normami zveruje farmaceutom

kompetenciu predchádzania, riešenia a zabezpečenia potrebných informácií vo vzťahu k liekovým interakciám. Na druhej strane, legislatíva nijakým spôsobom nevytvára priestor pre implementáciu konkrétnych zdravotných výkonov týkajúcich sa modifikácie liečby, zaznamenania podozrenia na výskyt liekovej interakcie, či komunikácie s predpisujúcim lekárom, alebo uzmiernenie indikovanej liečby. V zmysle uvedeného majú všetky aktivity farmaceutov v tomto smere konzultačný a odporúčací charakter bez možnosti validácie poskytovaných informácií, či možnosti spätného hodnotenia prípadných intervencií vo vzťahu k liekovým interakciám.

MATERIÁL A METÓDY

Údaje pre analýzu sme získali z verejnej lekárne Don Bosco, Námestie slobody 52 v Humennom. Ide o verejnú lekáreň nachádzajúcu sa v centre mesta s počtom obyvateľov viac než 30 tisíc, bez priamej väzby na konkrétne zariadenia ambulantnej alebo ústavnej zdravotnej starostlivosti.

Do hodnotenia sme zaradili pacientov vo veku 65 a viac rokov, ktorým bol v sledovanej lekární vytvorený aspoň jeden dispenzačný záznam o výdaji lieku v období 1. január 2021 až 31. december 2021.

Do posúdenia farmakoterapie sme zaradili konkrétne expedičné prípady, teda súbor liekov vydaných jednému pacientovi vo veku 65 a viac rokov pri jednom výdaji, pokiaľ bolo pri tomto výdaji vydaných viac ako 5 liekov.

Na hodnotenie liekových interakcií sme použili aplikáciu „Interakcie liekov“ spoločnosti Infopharm, a. s.

Klinická závažnosť liekových interakcií je rozdelená do niekoľkých stupňov:

Stupeň 0 – pri podávaní dvoch liekov nedochádza k interakcii, čo znamená, že sa nemenia farmakodynamické a farmakokinetické vlastnosti podaných liekov.

Stupeň 1 – nezávažná interakcia, kedy má daná lieková interakcia malý rozsah farmakokinetických zmien, čo znamená:

- nárast maximálnej koncentrácie látky v plazme

(cMAX) o menej než 25 % alebo pokles o 20 %

- nárast a taktiež aj pokles plochy pod krivkou (AUC) o menej než 25 %
- pri hladine významnosti $p < 0,05$.

Stupeň 2 – táto interakcia je málo závažná. Tak ako aj pri predchádzajúcom stupni, je tu malý rozsah farmakokinetických zmien. Nárast alebo pokles cMAX a AUC ostáva rovnaký, no čo sa mení, je hladina významnosti, a to je $p < 0,01$, no môže byť aj vyššia.

Stupeň 3 – táto interakcia už patrí k stredne závažným a je charakteristická veľkým rozsahom farmakokinetických zmien:

- nárast cMAX 25 – 99 %, pokles 22 – 49 %
- nárast AUC 25 – 199 %, pokles 25 – 59 %.

Stupeň 4 – v tomto prípade dochádza k závažnej liekovej interakcii, kde dochádza k veľkému rozsahu farmakokinetických zmien:

- nárast cMAX o viac než 100 % alebo pokles o viac než 50 %
- nárast AUC o viac než 200 % alebo pokles o viac než 60 %
- pričom sa zároveň odporúča upraviť dávkovanie aspoň jedného alebo aj oboch liekov.

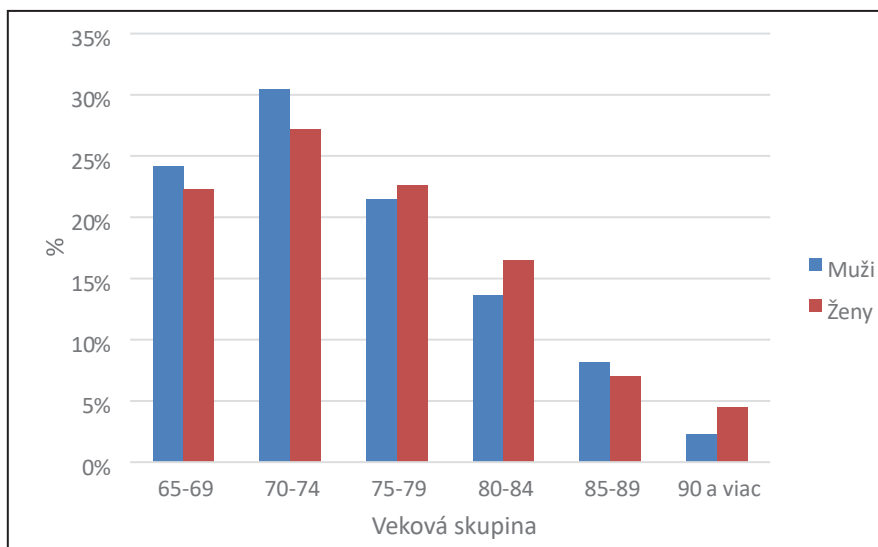
Stupeň 5 – táto interakcia je už veľmi závažná a je charakterizovaná takým veľkým rozsahom zmien, že to môže viesť k hospitalizácii pacienta alebo aj k smrti.

Údaje sme spracovali v programe MS Office 365 Excel, v štúdiu sú použité metódy deskriptívnej a analytickej štatistiky.

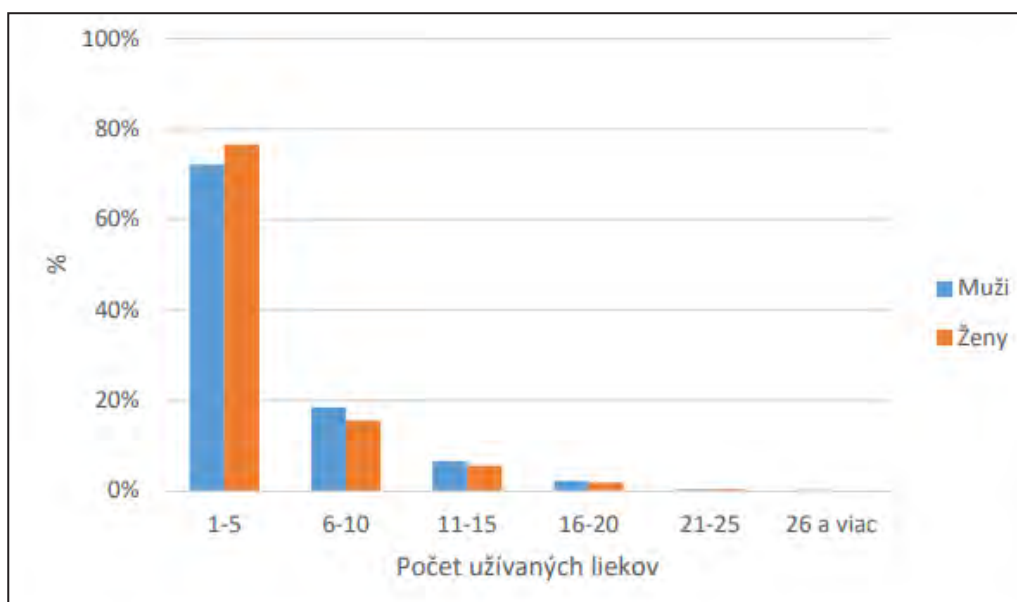
Štatistickú významnosť získaných výsledkov sme posudzovali na hladine významnosti $p < 0,05$. Ak sú v práci uvádzané údaje, ktoré sú aritmetickým priemerom (AP) viacerých meraní, sú udávané s príslušnou štandardnou odchýlkou (SD) v tvare $AP \pm SD$. Počet pacientov v súbore alebo jednotlivých podskupinách je označený symbolom n . Výsledky sú uvádzané s príslušným percentuálnym vyjadrením a spracované do formy tabuliek a grafov.

Štatistická významnosť bola hodnotená jednostranným Studentovým t-testom. Štatistickú významnosť sme posudzovali pri hodnotách $p \leq 0,05$.

Graf 1: Rozdelenie pacientov podľa veku a pohlavia



Graf 2: Množstvo užívaných liekov



VÝSLEDKY

Štruktúra súboru

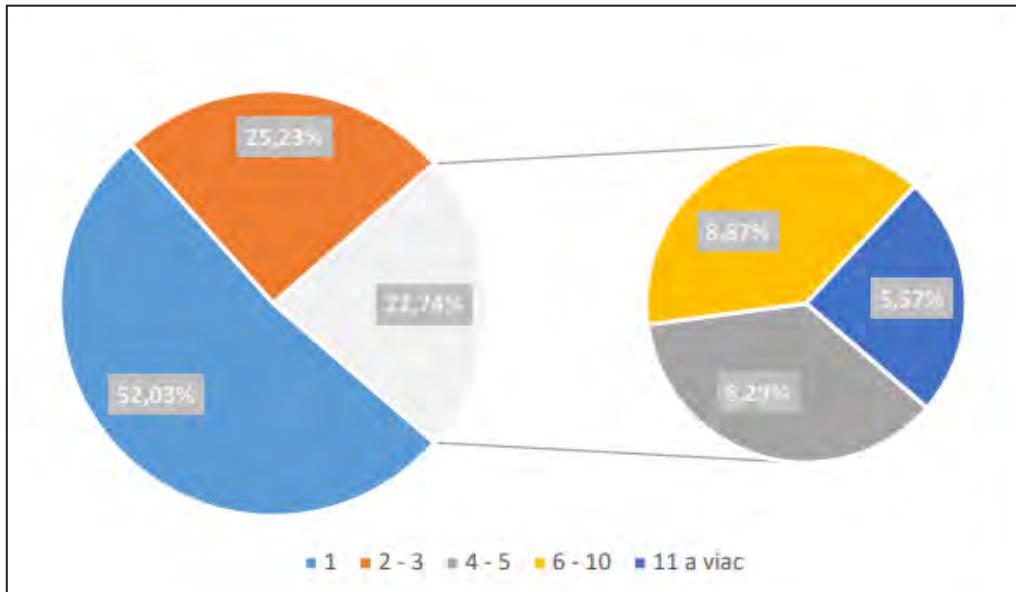
V štúdií sme sa zamerali na dispenzačné záznamy z obdobia roka 2021 u pacientov vo veku 65 a viac rokov. Analyzovali sme štruktúru pacientov z hľadiska veku, pohlavia, návštevnosti lekárne, rozsahu farmakoterapie realizovanej pri jednom výdaji a štruktúry

farmakoterapie. V sledovanom roku navštívilo sledovanú lekáreň 5478 pacientov, ktorým bolo realizovaných 24 734 dispenzačných záznamov. Z nich vekovú podmienku zaradenia do sledovania farmakoterapie spĺňalo 1724 pacientov (31,47 %).

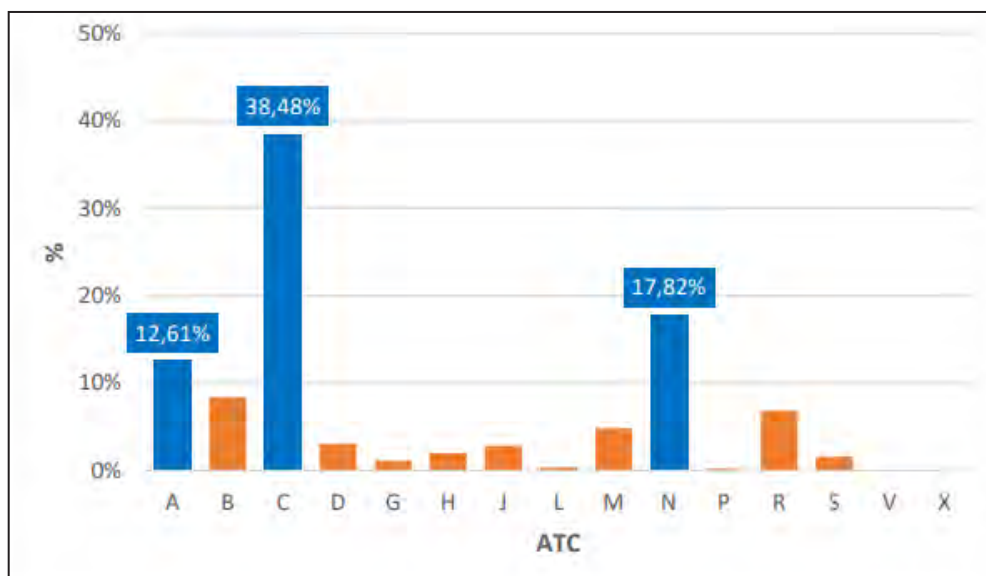
Vek a pohlavie

Sledovaný súbor pacientov (n = 1724) sme rozde-

Graf 3: Počet návštev lekárne (celý súbor)



Graf 4: Štruktúra ATC vydaného sortimentu v sledovanom období v sledovanom súbore



lili do päťročných vekových skupín. Najpočetnejšiu skupinu pacientov (muži aj ženy) tvorili pacienti vo veku 70 – 74 rokov. Priemerný vek mužov ($n = 579$) bol v sledovanom súbore $75,03 \pm 6,67$ rokov a žien ($n = 1145$) $75,64 \pm 6,80$ rokov (viď graf 1).

Množstvo užívaných liekov a frekvencia návštev lekárne

Pacienti v sledovanom súbore užívali v priebehu roka od 1 – 31 liekov (medián u žien = 3, u mužov = 3), najväčšiu skupinu tvorili pacienti užívajúci 1 – 5 liekov (70,47 % mužov a 74,93 % žien). Priemerný

Tab. 1: Liekové interakcie všetkých stupňov klinickej závažnosti

Stupeň	Počet	%
0	0	0,00 %
1	102	18,78 %
2	184	33,89 %
3	189	34,81 %
4	61	11,23 %
5	6	1,10 %
6	1	0,18 %

Tab. 2: Najčastejšie vyskytujúce sa potenciálne liekové interakcie

Liečivo 1	Liečivo 2	Stupeň	Výskyt
kyselina acetylsalicylová	perindopril	1	17
bisoprolol	rilmenidín	4	16
furosemid	metamizol, sodná soľ	2	14
kyselina acetylsalicylová	ramipril	1	10
kyselina acetylsalicylová	diklofenak	3	9
bisoprolol	teofylín	3	9
kyselina acetylsalicylová	paracetamol	2	8
furosemid	perindopril	2	8
Ginkgo biloba	atorvastatín	2	8
metoprolol	bromazepam	2	8
atorvastatín	klopidogrel	1	8

počet užívaných liekov bol 4,71 u mužov a 4,32 u žien (viď graf 2).

V sledovanom období bolo v určenej vekovej skupine realizovaných 5205 expedičných prípadov, z ktorých bolo realizovaných 11 157 dispenzačných záznamov (45,11 % všetkých dispenzačných záznamov v sledovanom období). Počet pacientov (jediných rodných čísel), ktorým boli výdaje realizované, bol 1724 (1145 žien; 66,42 %).

Z hľadiska možností intervencie farmaceuta pri dlhodobom sledovaní pacienta, pri neexistencii dostupnosti údajov o farmakoterapii realizovanej v inej lekární považujeme za dôležitý aj údaj o návštevnosti lekárne konkrétnym pacientom. V súbore sledova-

ných pacientov (n = 1 724), viac než polovica 897 (52,04 %) navštívila sledovanú lekáreň iba raz počas sledovaného obdobia (12 mesiacov).

Približne štvrtina pacientov navštívila lekáreň 2 – 3-krát počas sledovaného obdobia. Viac ako tri návštevy absolvovala tiež približne štvrtina pacientov (viď graf 3). Viac ako 5 návštev v sledovanej lekární v priebehu sledovaného roka 2021 realizovalo 12,26 % mužov a 15,55 % žien.

Štruktúra vydaného sortimentu

Štruktúru vydávaného sortimentu z hľadiska anatomicko–terapeuticko–chemických (ATC) skupín demonštruje graf 4.

Tab. 3: Najzávažnejšie liekové interakcie 4. a 5. stupňa

Interakcia (ATC1+ATC2)	Výskyt	Liečivo 1	Liečivo 2	Stupeň
C01BD01+J01FA10	1	amiodarón	azitromycín	5
C01BD01+ C07AB02	7	amiodarón	metoprolol	4
C08CA01+C10AA01	2	amlodipín	simvastatín	4
C07AB02+C02AC06	3	metoprolol	rilmenidín	4
C01BD01+C03DA04	1	amiodarón	eplerenón	5
C03DA04+C09AA05	1	eplerenón	ramipril	4
C07AB07+C02AC06	16	bisoprolol	rilmenidín	4
C07AG02+C02AC06	6	karvedilol	rilmenidín	4
C07AB12+C02AC06	1	nebivolol	rilmenidín	4
C07AB07+C01BC03	7	bisoprolol	propafenón	4
C01BD01+J01FA09	1	amiodarón	klaritromycín	5
C07AB02+C01BC03	1	metoprolol	propafenón	4
C03DA04+C09CA03	2	eplerenón	valsartan	4
C01BD01+B01AA03	1	amiodarón	warfarín	4
C09AA01+C09CA07	1	kaptopril	telmisartan	4
C07AB07+C01BD01	1	bisoprolol	amiodarón	4
A12BA01+C03DA01	1	chlorid draselný	spironolaktón	4
C08DA01+C07AB02	1	verapamil	metoprolol	4
C09AA01+C09CA03	1	kaptopril	valsartan	4

Pacientom bolo v sledovanom období vydaných celkovo 16 782 balení 1315 druhov liekov, ktoré reprezentujú 481 ATC skupín (liečiv, resp. kombinácií liečiv).

Identifikovali sme 261 expedičných prípadov s výdajom viac ako piatich druhov liekov. V týchto expedičných prípadoch sme identifikovali 205 prípadov s výskytom jednej alebo viac liekových interakcií.

Zachytené boli liekové interakcie všetkých stupňov klinickej závažnosti, pričom najpočetnejšia je skupina liekových interakcií klinického stupňa závažnosti 3 (viď tab. 1).

Desať najčastejšie sa vyskytujúcich liekových interakcií s výskytom aspoň jedného liečiva ATC skupiny C uvádza tabuľka 2.

V ďalšej časti sme sa zamerali na liekové interakcie 4. a 5. stupňa závažnosti, pričom najčastejšie sa vyskytujúce uvádza nasledujúca tabuľka 3.

Klinické dôsledky liekových interakcií 4. – 5. stupňa

Amiodarón – Azitromycín

Amiodarón je inhibítor CYP3A4 a súbežné podávanie s liečivami, ktoré sú substrátmi pre daný cytochróm (napríklad aj azitromycín) môže zvýšiť plazmatické koncentrácie a taktiež aj toxicitu liečiv. Amiodarón a azitromycín majú spoločnú vlastnosť, a to predĺženie QT intervalu, a práve daný mechanizmus účinku spočíva pravdepodobne v aditívnom účinku na predĺženie QT intervalu.

Amiodarón – Metoprolol

Metoprolol je substrátom pre CYP2D6 a amiodarón spolu so svojimi metabolitmi pôsobí ako inhibítor CYP2D6, mechanizmus tejto interakcie spočíva v spomalení biotransformácie metoprololu, ktorá je spôsobená práve inhibíciou CYP2D6 amiodarónom.

Rizikom tejto interakcie je výskyt srdcových arytmií (bradykardia) a ďalších nežiaducich účinkov metoprololu.

Amlodipín – Simvastatín

Amlodipín je slabý inhibítor CYP3A4, ktorého je simvastatín substrát a práve v tejto inhibícii CYP3A4 amlodipínom spočíva mechanizmus vzniku tejto interakcie, a to má za následok spomalenie biotransformácie simvastatínu a riziko zvýšenia výskytu jeho nežiaducich účinkov (myopatie, rabdomyolýzy).

Metoprolol – Rilmenidín

Rilmenidín je antihypertenzívum, ktoré pôsobí centrálne znížením tonu sympatika a podávanie pacientom, ktorí sú liečení β -blokátormi môže viesť k zhoršeniu srdcového zlyhávania. Úplne presný mechanizmus tejto interakcie nie je známy. U pacientov bez srdcového zlyhávania je táto kombinácia (vrátane použitia iných betablokátorov) bezpečná a efektívne využívaná.

Amiodarón – Eplerenón

Ako uvádzame vo vyššie uvedených interakciách, amiodarón je inhibítor CYP3A4 a v tomto prípade je substrátom eplerenón. Mechanizmus vzniku liekovej interakcie spočíva v spomalení biotransformácie eplerenónu inhibíciou CYP3A4 amiodarónom.

Eplerenón – Ramipril

Presný mechanizmus, ktorým dochádza k vzniku a klinickým dôsledkom tejto liekovej interakcie nie je úplne známy.

Ako jedna z možností sa ponúka farmakodynamická lieková interakcia, vychádzajúca zo skutočnosti, že eplerenón je draslík šetriace diuretikum a ramipril patrí k ACEi, ktoré znižujú hladinu aldosterónu, a to vedie k retencii draslíka, a to má za následok vznik závažnej hyperkalémie.

Bisoprolol – Rilmenidín

Úplne presný mechanizmus tejto interakcie nie je známy. Rilmenidín, ako už bolo uvedené v popise interakcie s metoprololom, je liečivom, ktoré pôsobí centrálne znížením tonu sympatika. Podávanie pacientom, ktorí sú liečení β -blokátormi môže viesť k zhoršeniu srdcového zlyhávania. U pacientov bez srdcového zlyhávania ide o možnú kombináciu.

Karvedilol – Rilmenidín

Aj pri tejto interakcii vychádzame z vyššie pomenovanej hypotézy, v zmysle ktorej rilmenidín ako centrálne pôsobiace antihypertenzívum, v synergii s bradykardizujúcim účinkom β -blokátorov môže viesť k zhoršeniu srdcového zlyhávania.

Nebivolol – Rilmenidín

Rovnako aj pri tejto interakcii vychádzame z vyššie pomenovanej hypotézy, v zmysle ktorej rilmenidín ako centrálne pôsobiace antihypertenzívum, v synergii s bradykardizujúcim účinkom β -blokátorov môže viesť k zhoršeniu srdcového zlyhávania.

Bisoprolol – Propafenón

U pacientov, ktorých liečba srdcového zlyhávania je založená predovšetkým na β -blokátoroch, v kombinácii s propafenónom môže dôjsť k synergickému pôsobeniu v zmysle negatívneho inotropného účinku. Negatívny inotropný účinok je charakterizovaný poklesom sily svalovej kontrakcie.

Amiodarón – Klaritromycín

Mechanizmus tejto farmakodynamickej liekovej interakcie je pravdepodobne založený na aditívnom účinku amiodarónu a klaritromycínu, ktorý spočíva v predlžovaní QT intervalu (obe liečivá majú riziko predĺženia QT intervalu).

Metoprolol – Propafenón

Propafenón je inhibítor CYP2D6, ktorého je metoprolol substrátom; mechanizmus liekovej interakcie spočíva v spomalení biotransformácie metoprololu. U pacientov, ktorých liečba srdcového zlyhávania je založená predovšetkým na β -blokátoroch, tak v kombinácii s propafenónom môže dôjsť k synergickému pôsobeniu v zmysle negatívneho inotropného účinku.

Eplerenón – Valsartan

Eplerenón je draslík šetriace diuretikum a valsartan patrí k antagonistom angiotenzínu na AT1-receptoch, ktoré znižujú účinnosť aldosterónu, čo vedie k retencii draslíka, a to má za následok vznik závažnej hyperkalémie. Ide o farmakodynamickú liekovú interakciu.

Amiodarón – Warfarín

Amiodarón je inhibítor CYP2D6, CYP3A4, CYP2C9. Mechanizmus interakcie spočíva v spomalení

biotransformácie warfarínu, ktorá je spôsobená inhibíciou CYP2C9, CYP3A4 amiodarónom, čím dochádza k zvýšeniu hladiny warfarínu a k zvýšeniu rizika krvávacích komplikácií. Zároveň amiodarón, ako liečivo s vysokou mierou väzbovosti na bielkoviny plazmy, môže vytesňovať warfarín z tejto väzby, a zvýšiť tak podiel jeho voľnej frakcie. To môže viesť nárazovo k výskytu krvávacích stavov alebo paradoxne tiež k stavom oslabeného účinku warfarínu z dôvodu zvýšenia jeho metabolizmu v pečeni a vylučovania.

Kaptopril – Telmisartan

Úplne presný mechanizmus vzniku tejto interakcie nie je známy, no pravdepodobne vychádza z duálneho pôsobenia kaptoprilu a telmisartanu na renín-angiotenzínový systém, čo môže spôsobovať zvýšený výskyt nežiaducich účinkov (hypotenzia, hyperkaliémia).

Bisoprolol – Amiodarón

Spolupôsobenie týchto dvoch liečiv je založené na vzniku farmakokinetickej interakcie, ktorá je spôsobená inhibíciou biotransformácie bisoprololu amiodarónom, ktorý je inhibítor CYP2D6, čím dochádza k zvýšeniu hladiny bisoprololu a riziku prejavu jeho nežiaducich účinkov, vrátane potenciácie negatívneho chronotropného účinku.

Chlorid draselný – Spironolaktón

Spironolaktón patrí k diuretikám, ktoré inhibujú reabsorpciu sodíka v distálnom tubule obličiek, taktiež inhibuje zmenu draslíka za sodík, a tým dochádza aj k retencii draslíka. Súčasné podávanie s chloridom draselným má aditívny účinok na zvyšovanie celkového množstva draslíka v organizme a zvyšovanie jeho plazmatických koncentrácií. V tomto prípade ide o farmakodynamickú liekovú interakciu.

Verapamil – Metoprolol

Pri tejto farmakodynamickej liekovej interakcii spočíva mechanizmus jej vzniku v spoločnom negatívnom inotropnom účinku verapamilu a metoprololu pri súbežnom podávaní. Pri intravenóznom podaní môže spôsobiť asystóliu, a preto je tento spôsob podania kontraindikovaný okrem výnimky intenzívnej starostlivosti.

Kaptopril – Valsartan

Úplne presný mechanizmus vzniku tejto interakcie nie je známy, no pravdepodobne vychádza z duálneho pôsobenia kaptoprilu a telmisartanu na renín-angiotenzínový systém, čo môže spôsobovať zvýšený výskyt nežiaducich účinkov (podobne ako kaptopril – telmisartan).

DISKUSIA

Výskyt liekových interakcií v sledovanom súbore umožňuje vysloviť isté všeobecné predpoklady uplatniteľné všeobecne pri poskytovaní lekárenskej starostlivosti. V skupine liekových interakcií najzávažnejšej klinickej významnosti sa u starších pacientov užívajúcich liečivá na liečbu KVS ochorení vyskytujú v minimálnej miere. V tomto kontexte je však potrebné zdôrazniť, že zo všetkých expedičných prípadov (5205) bolo iba 5 % (261) expedičných prípadov takých, pri ktorých došlo k výdaju viac ako 5 druhov liekov; zároveň v sledovanom súbore viac než polovica pacientov navštívila sledovanú lekárňu v priebehu roka iba raz. Pacienti, s ktorými sa dá dlhodobo pracovať (viac než 5 návštev v priebehu roka) predstavujú v prípade žien iba 15 % a v prípade mužov 12 % podiel. Možno tak predpokladať, že v sledovanom súbore sa s vysokou pravdepodobnosťou vyskytli aj pacienti, ktorí si svoje lieky nevyberajú naraz, ale v rozličných intervaloch a v rozličných lekárnach. U týchto pacientov nie je možné pri výdaji identifikovať mieru rizika výskytu liekových interakcií.

Klinické dôsledky nami identifikovaných liekových interakcií sú rôznorodé a predpisujúci lekár, ako aj vydávajúci farmaceut, by mali nachádzať spôsoby, ako týmto liekovým interakciám predchádzať.

Úplne kontraindikovaná lieková interakcia (klinická významnosť 6. stupňa) sa v celom súbore vyskytla iba u jedného pacienta. Šlo o súčasné užívanie sulpiridu a domperidonu, liečiv, ktorých vzájomné pôsobenie závažným spôsobom predlžuje QT interval.

Ako vyplýva z našich zistení, u klinicky najzávažnejších liekových interakcií v skupine sledovaných pacientov sú najviac zastúpené liekové interakcie

betablokátorov s rilmenidínom a interakcie amiodarónu. U menej závažných liekových interakcií sú najpočetnejšie interakcie liečiv ovplyvňujúcich systém renín – angiotenzín – aldosterón.

Pri súbežnom podávaní amiodarónu s liečivami, ktoré zvyšujú riziko predĺženia QT intervalu je dôležité dbať na opatrnosť. Ak je nevyhnutné podávať obe liečivá súčasne (napríklad pri potrebe liečby bakteriálnej infekcie azitromycínom, či klaritromycínom), je dôležité korigovať faktory, ktoré sa podieľajú na vzniku arytmií torsade de pointes, ktorými sú napríklad hypokaliémia, hypomagneziémia a podobne – toto opatrenie je možné na úrovni expedujúceho farmaceuta, ktorý informuje pacienta o prejavoch deficitu týchto minerálov, či o prejavoch súvisiacich s prejavmi interakcie (pokles tlaku krvi, búšenie srdca, pocit nevoľnosti). Taktiež je dôležité sledovať EKG krivku, pred a po zahájení liečby, pričom mnohé dnešné dostupné tlakomery dokážu identifikovať riziko zmien na EKG laickým spôsobom, čo dáva pacientovi v domácom prostredí pri správnej inštrukcii farmaceutom možnosť predchádzať riziku vyplývajúcej z liekovej interakcie. Podobný manažment je vhodný aj na monitoring prejavov interakcie amiodarónu s metoprololom.

Vysoký výskyt liekových interakcií rilmenidínu a betablokátorov vyplýva z rizika tejto kombinácie u pacientov so srdcovým zlyhávaním – u ostatných pacientov je táto kombinácia efektívna a možná. Táto lieková interakcia je názornou ukážkou potreby správnej interpretácie informácií.

Nie zriedka sa v praxi stáva, že aj dobre mienená rada lekára či farmaceuta je nesprávne pochopená, a preto je dôležité – pri poskytnutí klinicky závažnej informácie – uistiť sa o jej správnej interpretácii pacientom. Pri náhlom vysadení rilmenidínu a súčasnom užívaní betablokátorov môže dochádzať k významným prejavom rebound fenoménu, prejavujúceho sa rizikovým, náhlým zvýšením tlaku krvi.

Keďže liekové interakcie betablokátorov s rilmenidínom sú uvádzané aj v príbalovej informácii pre pacienta, je vhodné dispenzačné upozornenie na skutočnosť, že táto lieková interakcia sa týka výhradne

pacientov so zlyhávajúcim srdcom a u ostatných, štandardne liečených hypertonikov nepredstavuje riziko, naopak vedie k efektívnemu dosahovaniu kontrolovaných hodnôt tlaku krvi. Podobné dôsledky je vhodné komunikovať aj pri súčasnej liečbe bisoprololom a propafenónom, kde je žiaduce pacienta upozorniť na sledovanie srdcového rytmu s rizikom jeho nízkych hodnôt, ktoré si vyžadujú úpravu dávky predpisujúcim lekárom.

Za pomerne zaujímavú skutočnosť možno považovať výskyt liekových interakcií eplerenónu. V nami sledovanom súbore sa vyskytli jeho interakcie s valsartanom, amiodarónom a ramiprilom. U jedného pacienta sa súčasne vyskytla lieková interakcia eplerenónu s ramiprilom, amiodarónom a chloridom draselným, ako aj lieková interakcia amiodarónu s atorvastatínom. Amiodarónom navodené klinicky významné zvýšenie hladiny eplerenónu vedie k zvýšeniu závažnosti hyperkaliémie navodenej liekovou interakciou eplerenónu s ramiprilom, pričom pacientovi je podávaný aj samotný chlorid draselný. Súčasne sa zvyšuje riziko výskytu nežiaducich účinkov atorvastatínu.

Nie je zjavné, aké má tento pacient napríklad biochemické parametre, nie je zjavné, či ide o terapiu indikovanú jedným alebo viacerými lekármi (hoci predpísanú jedným všeobecným lekárom), avšak je zjavné, že miera rizika prejavu nežiaducich dôsledkov výskytu liekových interakcií je pomerne vysoká a vyžaduje si intervenciu minimálne v upozornení pacienta na prejavy hyperkaliémie, na prejavy myopatie a na potrebu riešenia prípadnej manifestácie aj menej závažných problémov ošetroujúcim lekárom.

Je dôležité vnímať aj riziko vzniku liekových interakcií s klinicky menej závažným priebehom, resp. s nízkym rizikom ich prejavov, zvlášť u polymorbídnych pacientov, pri ktorých súčasný výskyt menej závažných liekových interakcií môže viesť k znásobeniu ich dôsledkov. Pomerne vysoký výskyt rizika liekových interakcií liečiv ovplyvňujúcich systém renín – angiotenzín – aldosterón s rôznymi druhmi liečiv (diuretiká, NSAID, minerály, antacidá – aj v rôznych vzájomných kombináciách) by mal viesť k podrobnému poznaniu mechanizmov účinku ako aj

mechanizmov vzniku týchto liekových interakcií s definovanými postupmi farmaceutickej intervencie.

Ako vyplýva z prezentovaných výsledkov, výskyt liekových interakcií nie je zanedbateľný a zvlášť u pacientov vo vyššom veku, s rizikom viacerých ochorení, resp. s rizikom užívania aj iných ako lekárom indikovaných liekov, je nevyhnutné vo vyššej miere hodnotiť aj prípadné riziko vzniku aj málo pravdepodobnej liekovej interakcie.

Z hľadiska monitorovania liekových interakcií sú dôležité dve činnosti farmaceuta, a to je výdajná a konzultačná činnosť. Vďaka včasnému zachyteniu môže farmaceut pomôcť znížiť riziko výskytu liekovej interakcie a zabrániť prípadným zdravotným komplikáciám.

Ako žiaduce sa, aj na základe výsledkov našej štúdie, javí implementovať legislatívnu úpravu prístupu farmaceuta k patientskemu sumáru a na tento prístup postupne aplikovať konkrétne odborné výkony spojené s ich evidenciou a záznamom v elektronickej zdravotnej knižke pacienta. Ako jedno z možných riešení by bolo vhodné zaviesť možnosť (povinnosť) pravidelnej revízie farmakoterapie napríklad u klientov zariadení sociálnych služieb, pacientov ústavných zdravotníckych zariadení a pri vhodne nastavených kvantitatívnych a kvalitatívnych parametroch aj u ambulantných pacientov.

ZÁVER

Dostatočná informovanosť o vzniku potenciálnej liekovej interakcie je dôležitá a môže viesť k zníženému výskytu nežiaducich účinkov. Preto okrem plnenia príslušných kompetencií lekára a farmaceuta považujeme za dôležitú edukáciu pacienta v danej problematike.

ZOZNAM LITERATÚRY

Mills, K. T., Stefanescu, A., He, J.: The global epidemiology of hypertension. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2020, 16 (4), 223 – 237. Doi: 10.1038/s41581-019-0244-2.

Oparil, S., Acelajado, M. C., Bakris, G.L., Berlowitz, D. R., Cífková, R., Dominiczak, A. F., Grassi, G., Jordan, J., Poulter, N. R., Rodgers, A., Whelton, P. K.: Hypertension. *Nat. Rev. Dis. Primers.*, 2018, 22 (4), 18 014. Doi: 10.1038/nrdp.2018.14.

Varghese, D., Ishida, C., Haseer Koya, H.: Polypharmacy. In *StatPearls Treasure Island (FL)*. StatPearls Publishing, 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30422548/>. Accessed March 03, 2023.



ABSKOPÁLNY EFEKT V TERAPII NÁDOROV (PREHLADOVÝ ČLÁNOK)

ABSCOPAL EFFECT IN CANCER THERAPY (REVIEW)

Takáč, Peter

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

peter takac@uvlf.sk

ABSTRAKT

Abskopálny efekt je hypotéza pri liečbe metastatických karcinómov, pričom k zmenšeniu neliečených nádorov dochádza súčasne so zmenšením nádorov v rámci lokalizovanej liečby. R. H. Mole v roku 1953 navrhol termín „abscopal“ („ab“ – preč od, „scopus“ – cieľ) na označenie účinkov ionizujúceho žiarenia „vo vzdialenosti od ožiareného objemu, ale v rámci toho istého organizmu.“

Termín „abskopálny efekt“, ktorý bol pôvodne spojený s jednonádorovou lokalizovanou radiačnou terapiou, začal zahŕňať aj iné typy lokalizovaných liečebných postupov, ako je elektroporácia a intratumorálna injekcia terapeutík. Tento termín by sa však mal používať iba vtedy, keď skutočne lokálna liečba vedie k systémovým účinkom. Napríklad chemoterapeutiká bežne cirkulujú cez krvný obeh, a preto vylučujú možnosť akejkoľvek abskopálnej odpovede.

Mediátory abskopálneho účinku rádioterapie boli desaťročia neznáme. V roku 2004 sa prvýkrát predpokladalo, že imunitný systém môže byť zodpovedný za tieto „necieľové“ protinádorové účinky. Túto hypotézu potvrdili rôzne štúdie na zvieraciach modeloch melanómu, nádoru prsnej žľazy a kolorektálneho nádoru. Abskopálne účinky cielej intraoperačnej rádioterapie boli pozorované v klinických štúdiách, vrátane randomizovaných štúdií, kde ženy liečené lumpektómiou pre rakovinu prsníka v kombinácii s rádioterapiou celého prsníka preukázali zníženú úmrtnosť na iné ako rakovinové príčiny v porovnaní s rádioterapiou celého prsníka. Okrem toho boli imunitne sprostredkované abskopálne účinky opísané aj u pacientov s metastatickým karcinómom. Zatiaľ čo tieto správy boli počas 20. storočia extrémne zriedkavé, klinické použitie protilátok blokujúcich imunitné kontrolné body, ako je napr. ipilimumab alebo pembrolizumab, výrazne zvýšilo počet pacientov s

abскопálnou odpoveďou vo vybraných skupinách pacientov, ako sú pacienti s metastatickým melanómom alebo lymfómom.

Cieľom tohto článku je zosumarizovať súčasné poznatky o abскопálnej odpovedi pri liečbe nádorov s poukázaním na možnosť jej aplikácie aj v budúcnosti.

Kľúčové slová: abскопálny efekt; imunoterapia; nádory; rádioterapia

ABSTRACT

The abscopal effect is a hypothesis in the treatment of metastatic cancer whereby shrinkage of untreated tumors occurs concurrently with shrinkage of tumors within the scope of the localized treatment. R. H. Mole proposed the term “abscopal” (*‘ab’* – away from, *‘scopus’* – target) in 1953 to refer to effects of ionizing radiation “at a distance from the irradiated volume but within the same organism.”

Initially associated with single-tumor, localized radiation therapy, the term “abscopal effect” has also come to encompass other types of localized treatments such as electroporation and intra-tumoral injection of therapeutics. However, the term should only be used when truly local treatments result in systemic effects. For instance, chemotherapeutics commonly circulate through the blood stream and therefore exclude the possibility of any abscopal response.

The mediators of the abscopal effect of radiotherapy had been unknown for decades. In 2004, it was postulated for the first time that the immune system might be responsible for these “off-target” anti-tumor effects. Various studies in animal models of melanoma, mammary, and colorectal tumors have substantiated this hypothesis. Abscopal effects of Targeted intraoperative radiotherapy had been seen in clinical studies, including randomized trials where women treated with lumpectomy for breast cancer combined with whole breast

radiotherapy showed reduced mortality from non-breast-cancer causes when compared with whole breast radiotherapy. Furthermore, immune-mediated abscopal effects were also described in patients with metastatic cancer. Whereas these reports had been extremely rare throughout the 20th century, the clinical use of immune checkpoint blocking antibodies such as ipilimumab or pembrolizumab had greatly increased the number of abscopally responding patients in selected groups of patients such as those with metastatic melanoma or lymphoma.

The aim of this article is to summarize the current knowledge about the abscopal response in the treatment of tumors, pointing out the possibility of its application in the future as well.

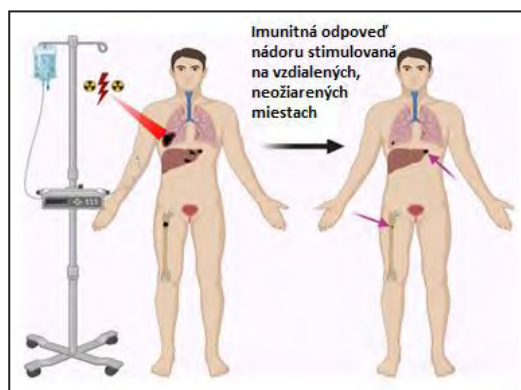
Key words: abscopal effect; immunotherapy; tumours; radiotherapy

ÚVOD

Hoci rádioterapia je spôsob liečby nádorov, ktorý sa používa dominantne na dosiahnutie lokálnej kontroly v ožarovanom poli, môžu sa objaviť aj jej vzdialené účinky (viď obr. 1). Tento jav sa nazýva abскопálny efekt. Pojem abскопálny (z latinčiny *„ab“* – preč, *„scopus“* – cieľ) efekt bol prvýkrát použitý Mólom v roku 1953 na opis imunitnej podmienenej odpovede nádorových buniek na rádioterapiu, ktoré boli lokalizované mimo ožarovanej oblasti (Mole, 1953). V tomto kontexte bola ožiarená oblasť nádoru (napr. povodie regionálnych lymfatických uzlín). Po tejto liečbe nasledovala prekvapivá regresia metastáz aj vo vzdialených neožiarených oblastiach. Od prvých pozorovaní tohto javu sa predpokladalo, že lokálne žiarenie spúšťa systémovú imunitnú odpoveď (Golden a kol., 2013; Chandra a kol., 2015; Liu a kol., 2018).

Z pohľadu vplyvu rádioterapie na imunitný systém je nutné rozlišovať pojem abскопálny efekt a synergický účinok rádioterapie a imunoterapie. V užšom zmysle môžeme hovoriť o abскопálnom efekte rádioterapie iba vtedy, ak dôjde k liečebnej odpovedi v

Obr. 1: Klinický efekt abskopálneho fenoménu



Abskopálny fenomén je systémová odpoveď pozorovaná pri ožiarení primárneho nádoru, resp. v kombinácii s imunoterapiou, ktorá môže stimulovať imunitnú odpoveď proti nádorom mimo radiačné pole na vzdialených miestach. Zdroj: upravené podľa Nelson a kol., 2023

úplne odlišnej lokalite, a to bez pomoci inej liečebnej metódy ako chemoterapia, cielená terapia či imunoterapia.

Svojím pôsobením je rádioterapia schopná iniciovať imunitnú reakciu za pomoci stimulácie produkcie a uvoľňovania cytokínov a chemokínov, ktoré sú zodpovedné za chemoatrakciu a infiltráciu dendritických buniek. Vďaka interakcii medzi T-lymfocytmami a dendritickými bunkami dochádza v lymfatických uzlinách k možnosti vycestovania takýchto aktivovaných T-lymfocytov do oblastí mimo ožarovaného poľa a tým k protinádorovej aktivite aj v ďalších lokalitách (Schaue a kol., 2012; Abuodeh a kol., 2016; Weichselbaum a kol., 2017). Abskopálny efekt v skutočnosti nie je až tak častou situáciou. V priebehu niekoľkých desiatok rokov (1969 až 2014) bolo publikovaných formou kazuistík iba 46 prípadov hodnotených ako skutočná abskopálna efektrorádioterapia (Abuodeh a kol., 2016).

Dôvodom je skutočnosť, že okrem vyššie menovaných pozitívnych imunostimulačných efektov rádioterapie má rádioterapia z princípu mechanizmu účinku aj imunosupresívny potenciál. Toto je spôsobené minimálne tým, že v rámci pôsobenia radiácie dochádza

aj k chemoatrakcii a infiltrácii nádorového mikroprostredia imunosupresívne pôsobiacimi bunkami, akými sú napr. T-regulačné lymfocyty či supresorové bunky odvodené z myeloidných buniek (MDSC) (Schaue a kol., 2012; Demaria a kol., 2012). Avšak pokiaľ už k tomuto efektu dôjde, nie je závislý od podanej radiačnej dávky, frakcionácie, modality či od ožarovanej oblasti. Rozsah dávok v publikovaných kazuistikách sa pohyboval od 0,45 Gy až do 74,8 Gy a abskopálny účinok bol pozorovaný od druhého týždňa po začatí rádioterapie. Väčšina prípadov abskopálneho efektu bola hlásená v prípade karcinómu obličiek, melanómu a lymfómu, čo sú v podstate nádory, ktoré sú považované za imunogénne (Abuodeh a kol., 2016).

Patofyziológia abskopálneho efektu

Žiarenie je fyzikálne činidlo, ktoré deštruuje nádorové bunky a ionizujúce žiarenie vytvára elektricky nabitú časticu, ktoré ukladajú energiu v tkanivách, ktorými prechádza, čím zabíja nádorové bunky alebo spôsobuje genetické zmeny vedúce k smrti rakovinových buniek (Baskar a kol., 2012). Nádorové bunky nie sú, v porovnaní s normálnymi bunkami, do takej

miery schopné opravovať poškodenia spôsobené žiarením, čo prispieva k rozdielnej smrti nádorových buniek (Begg a kol., 2011). Externé lúčové žiarenie dodávané zvonku tela nasmerovaním vysokoenergetických lúčov na miesto nádoru je najbežnejším prístupom v klinickom prostredí, zatiaľ čo spôsoby, ako je SBRT (extrakraniálna stereotaktická rádioterapia, z angl. stereotactic body radiation therapy), môžu dodávať vysoké dávky žiarenia v menšom počte liečebných frakcií na miesto definovaných primárnych a/alebo oligometastatických nádorov kdekoľvek v tele (Baskar a kol., 2012).

Rádioterapia (RT) je schopná navodiť imunosupresívne prostredie prostredníctvom podpory dysfunkcie T-buniek a nábory myeloidných buniek, ktoré podporujú rast nádoru (Garelli a kol., 2019). Na druhej strane však môže aj generovať pozitívne účinky stimuláciou systémovej imunitnej odpovede na kontrolu neožiarenej rakoviny, ako to prvýkrát preukázali Demaria a kolegovia v roku 2004 (Demaria kol., 2004).

Abskopálny efekt sa dáva do súvislosti s uvoľnením nádorových antigénov, a teda ich účinnejšiu prezentáciu dendritickými bunkami, makrofágmi a/alebo B-lymfocyty s následným efektívnejším vyzrievaním T-lymfocytov (CD4+ a CD8+) a aj prirodzených zabíjačov (NK buniek).

Bližšia podstata tohto javu: prežívajúce ožiarené bunky zvyšujú expresiu receptorov smrti, vrátane Fas a upregulujú molekuly MHC triedy I, čím zlepšujú ich rozpoznávanie a zabíjanie aktivovanými nádorovými antigénovo špecifickými CD8+ T-bunkami (Chakraborty a kol., 2003). Biologickým cieľom žiarenia v bunke je molekula DNA a prostredníctvom priamych aj nepriamych účinkov sa kumulujú v DNA dvojvláknové zlomy, ktoré sú najčastejšie príčinou usmrtenia nádorových buniek (Baskar a kol., 2003). Dvojvláknové zlomy vedú k tvorbe mikrojadier, ktoré v konečnom dôsledku môžu spustiť stimuláciu génov *IFN* (Janopaul-Naylor a kol., 2021). Dráha STING, aktivovaná génmi *IFN*, je aktivovaná aj v dendritických bunkách a podporuje protinádorové CD8+ T-bunky v sentinelových lymfatických uzli-

nách (TDLN, z angl. tumor-draining lymph nodes), ktoré hrajú kľúčovú úlohu pri stimulácii T-buniek tým, že koncentrujú nádorové antigény (Buchwald a kol., 2020). Buchwald a kol. preukázali, že ožarovanie sentinelových uzlín oslabilo kontrolu vzdialených metastáz nádoru a že nádorovo špecifické kmeňové CD8+ T-bunky v sentinelových uzlinách poskytujú rezervoár pre terminálne diferencované efekторы v nádore, ktoré sú schopné zabíjať nádorové bunky (Buchwald a kol., 2020).

Predklinické dôkazy abskopálneho efektu

Klasicky sa RT považovala za imunosupresívnu, pretože lymfocyty patria medzi bunky s najvyššou rádiosenzitivitou. Lymfocytopéniiu možno bežne pozorovať pri celkovom ožiarení tela pred transplantáciou kmeňových buniek alebo ožarovaním kraniospinálnej chrbtice, keďže lymfocytárna deplécia z RT závisí od objemu ožiareného tkaniva. Napriek tomu mnohé štúdie, predklinické aj klinické, podporujú hypotézu, že spontánna regresia nádorov mimo ožiareného poľa je sprostredkovaná imunitným systémom (Golden a kol., 2012; Kalbasi a kol., 2013; Buchwald a Efsthathiou, 2015).

V roku 2004 Demaria informovala, že abskopálne účinky indukované RT sú imunitne sprostredkované, na základe zistení, že regresia tumoru na podklade abskopálneho efektu nebola pozorovaná u imunodeficientných myší (Demaria a kol., 2004). Daná štúdia bola jedna z prvých, ktorá vyvodila takýto záver. Predklinické modely skúmali mechanizmus imunitnej stimulácie RT0 a ukázali, že RT môže zlepšiť dráhu spracovania a prezentácie antigénu (Golden a kol., 2012; Kalbasi a kol., 2013; Buchwald a Efsthathiou, 2015); najmä hladiny hlavného histokompatibilného komplexu (MHC) triedy I (Kalbasi a kol., 2013). Hlavnými efektormi zabíjania nádorových buniek sú CD8+ T-bunky (cytotoxické T-lymfocyty, CTL); ktoré sa spoliehajú na prezentáciu neoantigénu dendritických buniek (DC). Je pozoruhodné, že bunková smrť indukovaná RT uľahčuje skríženú prezentáciu neoantigénov v DC a stimuláciu CD8+ T-buniek aktiváciou Toll-Like Receptor 4 (TLR4) a signalizácie interferó-

nu typu I (IFN) (Apetoh a kol., 2007; Burnette a kol., 2011).

Rodriguez-Ruiz a kol. uviedli, že abskopálne účinky RT sú závislé od CD8⁺ T-buniek a skríženej prezentácie DCs (Rodriguez-Ruiz a kol., 2016). Avšak pre prístup k dendritovým bunkám a nádorovým antigénom sa CD8⁺ T-bunky môžu spoliehať na intercelulárnu adhéziu molekulu-1 (ICAM-1) na uľahčenie infiltrácie tumoru. Zvieracie modely ukázali, že koncentrácia ICAM-1 na PET zobrazovaní negatívne koreluje s rastom neožiarených nádorov, čo naznačuje potenciálnu úlohu v abskopálnom efekte (Zhao a kol., 2021).

Po nekróze sa z buniek uvoľňujú molekulové vzory spojené s poškodením (DAMP). Nedávne štúdie naznačujú, že špecifické formy programovanej bunkovej smrti, ako je nekroptóza a imunogénna bunková smrť (ICD) po RT, môžu tiež spustiť uvoľňovanie DAMP do extracelulárneho priestoru, vrátane skupiny s vysokou motilitou 1 (HMGB1), proteínov tepelného šoku (HSP), glukózou regulovaného proteínu 96 (GP96) a povrchovo exponovaného kalretikulínu (Kono a kol., 2008; Pandolfi a kol., 2016; Galluzzi a kol., 2017; Rodriguez-Ruiz a kol., 2018). Je potrebné poznamenať, že iné lokálne terapie, ako je ireverzibilná elektroporácia v modeloch ortotopickej rakoviny pankreasu, preukázateľne spúšťajú imunogénnu bunkovú smrť s následnou sekréciou DAMP (He a kol., 2020). HMGB1 je jedným z najčastejších nebezpečných signálov uvoľnených po RT (Inoue a kol., 2014). Kalretikulín, vysoko konzervatívny chaperónový proteín plazmatického retikula, môže stimulovať fagocytózu rakovinových buniek pomocou DC (Obeid a kol., 2007); zatiaľ čo HMGB1, kritický chromatinový proteín, podporuje prezentáciu antigénu (Ghiringhelli a kol., 2009). Uvoľňovanie HMGB1 spustené RT zvyšuje prezentáciu antigénu sprostredkovanú DC prostredníctvom signalizácie závislej od TLR4 cesty (Apetoh a kol., 2007). To následne vedie k dozrievaniu DC (Obeid a kol., 2007; Gameiro a kol., 2014) a stimuluje následnú lýzu tumoru sprostredkovanú T-bunkami (Gameiro a kol., 2014). Vrodená imunita môže fungovať aj samostat-

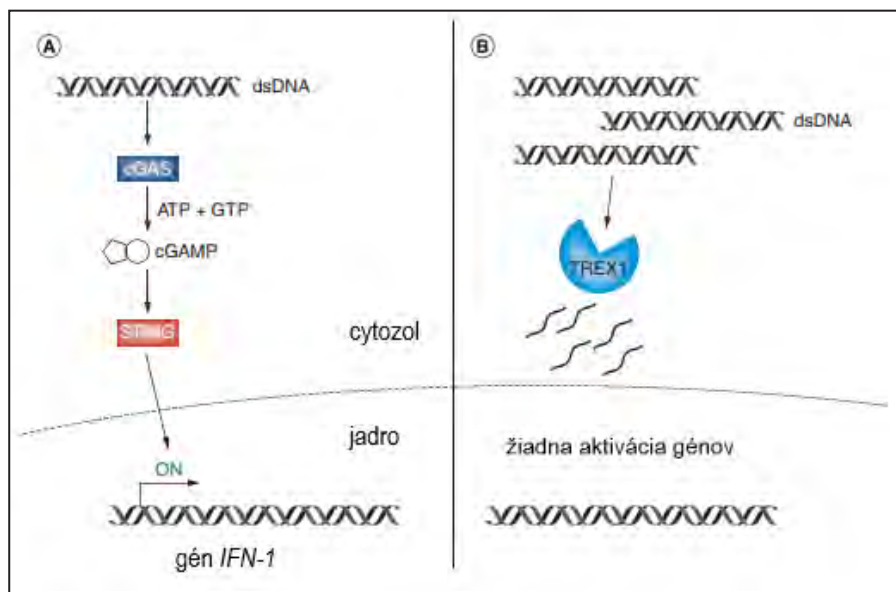
ne a v tandeme s adaptívnou protinádorovou imunitnou odpoveďou. Napríklad ľudské neutrofile, ale nie myšie, môžu uvoľňovať katalyticky aktívnu elastázu neutrofilov, aby špecificky zabíjali rakovinové bunky a uvoľnili doménu smrti CD95, čo pomáha zosilniť abskopálne účinky sprostredkované CD8⁺ T-bunkami (Cui a kol., 2021).

RT je dobre zdokumentovaný induktor poškodenia DNA, čo je dôležitý základný mechanizmus pre iniciáciu abskopálneho efektu. RT-indukované poškodenie DNA sa vyskytuje hlavne prostredníctvom: (1) priameho štiepenia DNA vysokoenergetickými sekundárnymi elektrónmi a (2) tvorby voľných radikálov (Lomax a kol., 2013; Lippert a kol., 2021). RT-indukované dvojvláknové zlomy (DSB) sú najsmrteľnejším typom poškodenia DNA. DSB vedie k tvorbe mikrojadier, ktorých defektná membrána môže vystaviť dvojvláknovú DNA (dsDNA) cytosolickej dsDNA senzorovej cyklickej GMP-AMP syntáze (cGAS). cGAS je receptor na rozpoznávanie vzorov, ktorý spúšťa produkciu IFN typu I prostredníctvom downstream stimulátora génov IFN (STING) (viď obr. 2).

Nedávno sa zistila dôležitosť dráhy cGAS-STING v protinádorovej imunitnej odpovedi stimulovanej RT aj anti-PD1/L1. Schopnosť RT účinne indukovať abskopálny účinok závisí od IFN typu I vylučovaného ožiarenými bunkami. Je známe, že permeabilizácia mitochondriálnej vonkajšej membrány (MOMP), čo je kľúčový krok v apoptóze, riadi sekréciu IFN robustného typu I. Táto sekrécia je výraznejšia, keď je mitochondriálna autofágia potlačená alebo sú inaktivované apoptotické kaspázy, čo je typické pre rakovinové bunky. Yamazaki a kol. (2020) preukázali, že autofágia inhibuje RT-riadenú cGAS-dependentnú sekréciu IFN typu I sekundárne k cytosolickej akumulácii mitochondriálnej DNA (mtDNA) v myších rakovinových bunkách. Okrem toho inhibícia autofágie podporuje abskopálne efekty RT závislé od IFN typu I.

V roku 2019 bola hlásená dôležitosť TDLN pri sprostredkovaní silnej, RT-stimulovanej protinádorovej odpovede a synergie RT s ICI (inhibítory imunit-

Obr. 2: Dráhy, ktoré prispievajú k abskopálnemu efektu



(A) Cytosolická dsDNA indukovaná radiačnou terapiou sa viaže na cGAS a iniciuje tvorbu cGAMP. cGAMP sa potom viaže na STING viazaný na endoplazmatické retikulum proteín, čo vedie k signálnej kaskáde na zvýšenie expresie génu IFN-1 a spustenie imunitnej odpovede. (B) Vysoké množstvo cytosolickej dsDNA spustí TREX1, cytosolickú exonukleázu, ktorá degraduje cytosolickú dsDNA a zabráni signálnej kaskáde cGAS, čo má za následok neaktiváciu imunity.

Zdroj: upravené podľa Craig a kol., 2021

ných kontrolných uzlov, z angl. immune checkpoint inhibitors), ktoré sa začali charakterizovať iba nedávno (Buchwald a kol., 2020; Marciscano a kol., 2019). TDLN hrá rozhodujúcu úlohu pri stimulácii buniek prostredníctvom aktivácie DC a koncentrácie nádorových antigénov (Buchwald a kol., 2020; Schenkel a kol., 2021; Connolly a kol., 2021). Okrem toho sa zdá, že v nádore aj v TDLN existuje aprogenitorová subpopulácia CD8⁺ T-buniek, ktorá je kritická pre silnú odpoveď na liečbu PD-1 (Im a kol., 2016; Siddiqui a kol., 2021). Zatiaľ čo RT zameraná na nádor zvyšuje progenitorové T-bunky vo vzdialenom neožiarenom nádore, tento účinok bol oslabený RT riadenou TDLN (Buchwald a kol., 2020). Zvýšenie hustoty progenitorových T-buniek v neožiarených nádoroch je potenciálnym mechanizmom synergie medzi RT a ICI, ktorý je diskutovaný na nasledujúcich stranách.

Na rozdiel od niekoľkých frakcií SBRT, nízкодávková frakcionovaná RT (napr. ≤ 3 Gy perfrakcia na ≤ 30 Gy celková dávka) nie je imunostimulačná. Reijmen a kol. hodnotili terapeutické a imunologické účinky nízкодávkovanej frakcionovanej RT na rakovinu pľúc u myši. Zistili, že štyri po sebe idúce denné frakcie RT pri 3,2 Gy výrazne znížili počet CD8⁺ T- buniek a zrelých buniek prezentujúcich antigén v pľúcnych nádoroch (Reijmen a kol., 2021). Ideálnym použitím žiarenia ako imunitného stimulantu preto môže byť indukcia imunogénnej bunkovej smrti nádorových buniek pri vyhýbaní sa ožarovaniu do TDLN na zachovanie populácií CD8⁺ T-buniek a zrelých buniek prezentujúcich antigén. Predovšetkým systémy *in vitro* a *in vivo* preukázali vzťah medzi dávkou a načasovaním medzi RT a imunitnou odpoveďou (Wang a kol., 2016). Ďalej sa pracuje na charakterizácii týchto vzťahov, aj keď väčšinou v

prostredí ICI, ktoré preukázalo konzistentnejšie a častejšie systémové reakcie. Indukcia protinádorových imunitných odpovedí, okrem priamej tumoricídnej aktivity RT0, viedla k zvýšenému klinickému záujmu o imunostimulačné aktivity RT0. Okrem toho sa zdá, že pri optimalizácii imunostimulačných účinkov RT je rozhodujúce vyhýbanie sa technikám TDLN a vysoko konformným technikám RT, aby sa predišlo lymfocytopenii.

Abskopálny účinok pozorovaný v klinickej praxi pri viacerých typoch nádorov

Abskopálny účinok bol pozorovaný pri viacerých typoch nádorov. Systematický prehľad z roku 2016, ktorý publikoval Aboudeh a jeho kolegovia, uvádzal celkovo 46 prípadov z rokov 1969 – 2014 (Aboudeh a kol., 2016). V tomto prehľade sú prezentované reakcie vzdialených, neožiarených oblastí, typicky dva mesiace po ožiarení; použitá stredná dávka žiarenia bola 31 Gy. Kazuistiky s primárnymi nádormi, vrátane melanómu, cholangiokarcinómu a karcinómu obličkových buniek, popísali takýto účinok (Wersäll a kol., 2006; Postow a kol., 2012; Liu a kol., 2019).

Wersäll s autormi popisujú, že medzi 28 pacientmi s karcinómom obličky s liečenými a neliečenými metastatickými léziami došlo u štyroch pacientov s neožiarenými metastázami k regresii buď dočasne alebo natrvalo po liečbe stereotaktickou radiačnou terapiou buď primárneho tumoru alebo iných metastatických lézií. Frekvencia takejto príhody bola porovnaná s konvenčnou liečbou, ako je interferón a interleukín-2, a bola zaznamenaná ako vysoká v porovnaní s mierou spontánnej regresie 0,3 – 7 % v literatúre (Wersäll a kol., 2006). Autori tejto štúdie tiež zaznamenali zlepšenie prežívania alebo predĺženie času do úmrtia u pacientov, u ktorých sa preukázal abskopálny efekt, v porovnaní s pacientmi, u ktorých nebol preukázaný (Tubin a kol., 2019).

Liu a kol. (2019) pozorovali, že v prípade, ak sa abskopálny účinok pozoroval pri intrahepatálnych cholangiokarcinómoch, rádioterapia pôsobila na zvýšenie prezentácie antigénov asociovaných s nádorom a pomohla pri rozpoznávaní T-buniek. Iná štúdia po-

pisujúca pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc, ktorí neboli kandidátmi na štandardnú chemoradiáciu, preukázala, že u pacientov, ktorým bola podaná SBRT do hypoxického jadra samotného primárneho nádoru, bolo jednoročné celkové prežitie o 15 % vyššie v porovnaní so systémovou terapiou, hoci výsledky neboli štatisticky významné (Tubin a kol., 2019). Okrem toho hlásené údaje o pacientoch, ktorí počas lumpektómie pre rakovinu prsníka dostávajú cieľenú intraoperačnú rádioterapiu prispôbenú riziku, naznačujú, že v porovnaní s pacientmi, ktorí dostávali externú rádioterapiu, pacienti, ktorí dostávali intraoperačnú rádioterapiu s lokálnou recidívou, nemali horšie výsledky prežitia, a preto mohli ovplyvniť rast nádoru na vzdialených miestach (Vaidya a kol., 2021).

V inej kazuistike bola žena s pokročilým melanómom ústnej dutiny liečená lokálnym ožiarением. U pacientky došlo k relapsu s léziami na krku a pľúcnyimi metastázami. V tom čase začala s pembrolizumabom, ale zaznamenala sa progresia a liečila sa paliatívnym ožarovaním. Po ožiarení bola pozorovaná regresia pľúcnych metastáz tumoru (Tsui a kol., 2018).

Ďalšia prípadová štúdia zaznamenala abskopálnu odpoveď u pacienta s melanómom na piatom prste. Počiatočná liečba pozostávala z amputácie palca na nohe. V priebehu 1 roka po amputácii bola zaznamenaná progresia ochorenia s uzlinami v inguinálnej oblasti a kožnými léziami na prednej a vnútornej strane nohy. Inguinálne lézie boli liečené ožarovaním a 1 mesiac po liečbe bola pozorovaná regresia necieľových lézií (Silva a kol., 2019).

Autori Shi a kol. študovali abskopálnu odpoveď u pacientky s metastatickým karcinómom pankreasu. Pacientke, 67-ročnej žene, bol diagnostikovaný pankreatický karcinóm s metastázami do pečene aj pravej pleury. Karcinóm bol refraktérny na liečbu gemcitabínom a len čiastočne reagoval na liečbu paklitaxelom naviazaným na albumín. Následne bola pacientke začatá liečba inhibítorom tyrozínkinázy, apatinibom, ale pre profil vedľajších účinkov bola liečba prerušená. Nakoniec bol nastavený na kombinovanú RT s GM-CSF na paliatívnu starostlivosť.

Podaná RT bola 45 Gy x 15 počas 3 týždňov spolu s dennými injekciami 125 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ GM-CSF počas 2 týždňov. Pozoruhodné je, že pôvodný nádor pankreasu v radiačnom poli ako aj systémové metastázy, ktoré neboli ožiarené, vykazovali významné zmenšenie, ako dokazuje CT sken. O mesiac neskôr kontrolné CT vyšetrenie preukázalo stabilné ochorenie, čo naznačuje trvalý abskopálny účinok na systémové lézie (Shi a kol., 2017).

Ebner a kol. opísali dva prípady metastatického karcinómu hrubého čreva vykazujúceho abskopálnu odpoveď na cielečné ožarovanie. 75-ročný muž s kolo- rektálnym karcinómom štádia IV mal bolesti brucha vpravo. Pozitrónová emisná tomografia (PET)-CT skeny odhalili 35 mm masu na ľavej strane brucha a 15 mm masu zasahujúcu do pravej spoločnej bedrovej artérie. Vzhľadom na blízkosť tenkého čreva nebolo možné liečiť nádor postihujúci pravú artériu (*a. iliaca communis*), zatiaľ čo ľavostranná masa sa ožarovala pomocou rádioterapie uhlíkovými iónmi (CIRT) dávkou 73,6 Gy dodanej v 16 frakciách počas 28 dní. Jeden mesiac po CIRT PET-CT vyšetrenie odhalilo významné zníženie liečeného aj neliečeného nádoru s výrazným znížením akumulácie fludeoxyglukózy. Pacient zomrel na myelodysplastický syndróm 46 mesiacov po CIRT bez expanzie liečených alebo neliečených nádorov, ako ukázali každoročné PET-CT skeny, čo naznačuje trvalú abskopálnu odpoveď (Ebner a kol., 2017). Druhý pacient, 85-ročný muž, mal recidivujúcu rakovinu hrubého čreva spolu so 45 mm nádorom v blízkosti brušnej aorty a dvoma 10 mm nádormi pod mediastínom a pravou kľúčnou kosťou. Vzhľadom na svoj vek a stav nebol spôsobilý na adjuvantnú chemoterapiu a následne bol odporučený na klinickú štúdiu, ktorá liečila izolované nádory para-aortálnej lymfatickej uzliny pomocou CIRT. Bol liečený dávkou 50,4 Gy podávanou v 12 frakciách počas 21 dní. Počítačová tomografia (CT) aj PET-CT zobrazovanie ukázali signifikantný pokles veľkosti liečeného paraaortálneho tumoru aj neliečeného klavikulárneho tumoru bez zmeny vo veľkosti nádoru v nádore lokalizovanom pod mediastínom. Tento pacient zostal v remisii so stabilným ochorením

a bez zmeny veľkosti tumoru od času zverejnenia (92 mesiacov) (Ebner a kol., 2017).

Postow a kol. opísali prípad, keď 33-ročná žena s metastatickým melanómom mala zachytený 2 cm pľúcny uzol. Bola liečená štandardnou chemoterapiou cisplatinou, vinblastínom a temozolomidom počas dvoch cyklov, po ktorých nasledovala chirurgická resekcia. O šesť mesiacov neskôr kontrolné CT vyšetrenie odhalilo novú pleurálnu paraspínálnu masu a pravostrannú hilárnu lymfadenopatiu. Pacientke sa potom podával ipilimumab ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) každé 3 týždne v celkovom počte štyroch dávok, čo malo za následok mierne zväčšenie pleurálnej hmoty, ale celkovo stabilné ochorenie. Štrnásť mesiacov po počiatočnej liečbe ipilimumabom sa preukázalo progresívne zväčšenie pleurálnej paraspínálnej hmoty spolu s ďalšími novými slezinovými léziami. Paraspínálna hmota bola ošetrovaná paliatívnou RT s použitím dávky 2850 cGy dodanej v troch frakciách počas 7 dní. O desať mesiacov neskôr axiálne CT snímky odhalili významné zmenšenie veľkosti liečenej paraspínálnej hmoty a hmoty sleziny (Postow a kol., 2012).

Abskopálny efekt ako predmet klinických štúdií

Niektoré štúdie fázy 2 a 3 preukázali evidentnú abskopálnu odpoveď. Celkové trvanie prežitia (OS) pripísané abskopálnemu účinku je uvedené v tabuľke 1. Jedna z prvých kľúčových skúšok demonštrujúcich abskopálny účinok zahŕňala pacientov s viacerými typmi nádorov, ktorí dostávali faktor stimulujúci kolónie granulocytov a makrofágov (GM-CSF; 125 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$), o ktorom je známe, že je imunoadjuvans, najmä v prostredí RT, ktorý uľahčuje AR (Golden a kol., 2015). Skúšajúci podali GMCSF subkutánne spolu s ožarovaním a zvolili si chemoterapiu, pričom miera abskopálnej odpovede (AR) bola 27 %. Zaznamenali tiež zlepšenie OS u pacientov, ktorí mali AR, s priemerným trvaním OS 21 mesiacov v porovnaní s mediánom trvania 8,3 mesiaca u pacientov, ktorí neodpovedali.

Chicas-Sett a kol. (2018) vytvorili systematický prehľad literatúry, pričom sa zamerali na stereotaktickú rádioterapiu (SRS)/stereotaktickú telovú RT

Tab. 1: Charakteristiky klinických skúšok fázy 2 a 3 a ich zodpovedajúce trvanie OS a frekvencie abskopálnych odpovedí u pacientov s abskopálnym efektom

Klinické skúšanie	Fáza	Typ tumoru	Typ rádioterapie	Postupnosť systémovej terapie	Dávky rádioterapie	Systémová terapia	Celkové prežívanie	Abskopálna odpoveď (%)
NCT02474186 (Golden a kol., 2015)	2	rôzne	konvenčná	sekvenčná GM-CSF a súbežná chemoterapia	35 Gy/10 frakcií	chemoterapia, GM-CSF	20,98 mesiacov	27
ChiCTR-1900027768 (Adler, 1976)	1	pľúca	SBRT	sekvenčná	40–50 Gy/5 frakcií a hypofrakcionovaná brachyterapia	nivolumab	neurčené	45,2
NCT03332069 (Minnaar a kol., 2020)	3	krčok maternice	konvenčná	súbežná	50 Gy/25 frakcií, brachyterapia a elektrohypotermia	cisplatina	nedosiahnuté	24,1
NCT02239900 (Welsh a kol., 2019)	2	rôzne	SBRT	súbežná vs. sekvenčná	50–60 Gy/4–10 frakcií	ipilimumab	neurčené	26
NCT03450967 (Kim a kol., 2018)	2	skvamózny karcinóm hlavy a krku	protónová terapia	súbežná	25 Gy/5 frakcií	durvalumab a tremelimumab	nedosiahnuté	27,3
NCT02710253 (Patel a kol., 2020)	2	rôzne	konvenčná alebo SBRT	súbežná	neznáme	imunoterapia	6,40 mesiacov	11
NCT01502293 (Algazi a kol., 2018)	2	melanóm	elektroporácia	sekvenčná	six opakovaní, 1,500 V/cm na 1., 5., a 8. deň každých 90 dní	intra-tumorálna aplikácia tavokinogén telseplazmidu	neurčené	29,2
NCT02492568; NCT02444741 (Theelen a kol., 2021)	2; 1/2	pľúca	konvenčná alebo SBRT	súbežná vs. sekvenčná	24 Gy/3 frakcií, 50 Gy/4 frakcií, 45 Gy/15 frakcií	pembrolizumab	19, 20 mesiacov	41,7

GM-CSF – granulocyty, makrofágy, kolóny stimulujúce faktory

Tab. 2: Prebiehajúce klinické štúdie hodnotiace abskopálne odpovede

Klinické skúšanie	Fáza	Typ tumoru	Postupnosť systémovej terapie	Dávky rádioterapie	Systémová terapia
NCT01976585	1/2	nízko agresívny (low-grade) lymfóm	–	nízke	intratumorálna aplikácia Flt3L a poly-ICLC
NCT02768558	3	pľúca	súbežná nasledovaná sekvenčnou	60 Gy	sekvenčne nivolumab, súbežne cisplatina + etopozid
NCT03192059	2	krčok maternice, maternica	súbežná	8 Gy/3 frakcií	pembrolizumab
NCT02992912	2	rôzne	súbežná	45 Gy/3 frakcií	atezolizumab
NCT04245514	2	III. štádium tumoru pľúc	neoadjuvantná nasledovaná adjuvantnou	20 x 2 Gy každý deň 4 týždne, 5 x 5 Gy každý deň 1 týždeň, or 3 x 8 Gy každý druhý deň počas 1 týždňa	neoadjuvante a adjuvantne durvalumab, neoadjuvantne cisplatina + docetaxel
NCT03721341	3	rôzne (4 – 10 lézií)	súbežná	SABR (20 Gy/1 frakcia, 30 Gy/3 frakcie, alebo 35 Gy/5 frakcií, spolu s terapiou zvolenou investigátorom, vrátane chemoterapie, imunoterapie, hormonálna terapia a aktívny dohľad	paliatívna rádioterapia, chemoterapia, imunoterapia, hormonálna terapia alebo pozorovanie
NCT03137771	–	NSLC	sekvenčná	SBRT	docetaxel, erlotinib, gemcitabín, pemetrexed G, pembrolizumab
NCT04785287	1/2	rôzne	súbežná	SBRT indukovaný radskopálny efekt	BMS-986218 G nivolumab
NCT05039632	1/2	rôzne		abskopálny versus radskopálny efekt	intratumorálne NBTXR3 + ipilimumab + nivolumab
NCT03480334	2	relabovaný Hodgkinov lymfóm		20 Gy	nivolumab
NCT04873440	1/2	rôzne		konvenčná al RT vs. SBRT	inhalovaný mangán
NCT04238169	2	pokročilý NSLC		SBRT 30 – 50 Gy/5 frakcií (2 – 4 lézií)	toripalimab vs. bevacizumab + toripalimab

NCT03449238	1/2	karcinóm prsníka s metastázami do mozgu		SRS	pembrolizumab
NCT03457948	2	NET a metastatické lézie v pečeni		PRRT použitím 177Lu-DOTA0- Tyr3- octreotát vs. transarteriálna embolizácia vs. radioembolizácia použitím yttrium-90 mikroguličiek	pembrolizumab

GM-CSF – granulocyty, makrofágy, kolóny stimulujúce faktory

(SBRT) a ipilimumab a frekvenciu AR u pokročilých nádorov. V 16 retrospektívnych alebo randomizovaných štúdiách bola stredná miera výskytu abskopálneho účinku 26,5 %; pričom sa ukázalo, že zlepšené výsledky pacientov, ktoré možno pripísať AR, sú klinicky relevantným javom. Vedci zaznamenali zlepšené klinické výsledky u pacientov, ktorým bola podávaná RT väčšia ako 3 Gy/frakcia spolu s ipilimumabom.

Súhrnná analýza dvoch randomizovaných štúdií – štúdie PEMBRO-RT fázy 2 a štúdie fázy 1/2 MDACC – skúmala úlohu žiarenia v AR na imunoterapiu u pacientov s pokročilým karcinómom pľúc (Theelen a kol., 2021). Do oboch štúdií boli zaradení pacienti s metastatickým nemalobunkovým karcinómom pľúc a aspoň jedným neožiareným nádorom na hodnotenie AR. V štúdií PEMBRO-RT bola sekvencia podania prvej dávky pembrolizumabu na konci ožarovania (24 Gy v 3 frakciách) a v štúdií MDACC sa pembrolizumab podával súčasne s ožarovaním (50 Gy v 4 frakciách alebo 45 Gy v 15 frakciách). Miera AR bola 19,7 % v ramene pembrolizumabu ako monoterapie, ale 41,7 % v skupine s dubletom pembrolizumab a RT ($p = 0,0039$) v súhrnnej analýze 2 vyššie uvedených štúdií. Miera kontroly abskopálneho ochorenia bola 43,4 % pre pembrolizumab a 65,3 % pre pembrolizumab a RT ($p = 0,0071$). Okrem toho mala skupina s

monoterapiou pembrolizumabom medián trvania prežitia bez progresie 4,4 mesiaca, zatiaľ čo v skupine s pembrolizumabom plus RT bola stredná dĺžka trvania 9 mesiacov ($p = 0,045$). Medián trvania OS bol 8,7 mesiaca len pre pembrolizumab a 19,2 mesiaca pre pembrolizumab a RT ($p = 0,0004$).

Použitie tradičných techník ožarovania nie je potrebné na dosiahnutie abskopálnych efektov. Tubin a kol. (2021) vyvinuli metódu čiastočného ožarovania nádorov na báze SBRT zameranú na hypoxické časti objemných nádorov (SBRT-PATHY). Táto metóda stimuluje abskopálny efekt, pretože indukuje radiáciou indukovaný vedľajší efekt manipuláciou s hypoxiou nádoru, ochranou peritumorálneho prostredia a čiastočným ožiarovaním objemného nádoru. Tubin a kol. vykonali štúdiu fázy 2, v ktorej použili techniku SBRT-PATHY u 60 pacientov s objemným neresekovateľným nemalobunkovým karcinómom pľúc (SBRT-PATHY, chemoterapia a paliatívna RT). Miera OS po 1 roku bola najvyššia v kohorte SBRT-PATHY na pôsobivých 75 % ($p = 0,099$). Tiež miera primárnej kontroly ožiareného nádoru bola 95 % v kohorte SBRT-PATHY v porovnaní s iba 20 % v ostatných dvoch skupinách. Výskumníci pozorovali vedľajšie účinky u 95 % pacientov a nežiaduce reakcie u 45 % kohorty SBRT-PATHY. Aby sa stávalo na tomto klinickom dôkaze, pribúdajú subjekty vo viacerých

prebiehajúcich klinických štúdiách (viď tab. 2). Tieto štúdie zahŕňajú tie, ktoré skúmajú kombinácie rastových faktorov, inhibítorov imunitných kontrolných bodov a chemoterapie. Výskumníci v štúdiách testujú účinok súbežnej alebo sekvenčnej neoadjuvantnej terapie s RT a portfólia imunoterapeutických látok.

Prediktory abskopálneho efektu

Vzhľadom na to, že abskopálny efekt bol v priebehu času v literatúre pozorovaný len zriedka, so zvyšujúcim sa povedomím o tomto fenoméne bolo vynaložené úsilie pochopiť, či nejaký špecifický faktor tento efekt sprostredkuje. Camphausen a kol. skúmali, či k efektu prispel p53, proteínový komplex, ktorý je up-regulovaný v ožiarených bunkách. Celkovo zistili, že rádioterapia môže viesť k systémovému antiangiogénnemu účinku sprostredkovanému prostredníctvom p53 a že to môže byť jeden z mechanizmov abskopálneho účinku. Konkrétne, v porovnaní s myšami s divokým typom p53 s implantovaným Lewisovým pľúcny karcinómom a fibrosarkómom, ktoré rástli pomalšie, myši liečené pifitrínom-alfa, blokátorom p53, s ožarovaním nádoru nezaznamenali oneskorený rast (Camphausen a kol., 2003). Prítomnosť infiltrujúcich T-lymfocytov v určitých nádoroch je spojená so zlepšenými klinickými výsledkami a existuje významná súvislosť medzi abskopálnym účinkom a absolútnym počtom lymfocytov pred rádioterapiou, čo z neho robí potenciálne užitočný biomarker na predpovedanie toho, kto bude vykazovať tento jav (Craig a kol., 2021).

Iné štúdie ukázali, že ožarovanie vedie k zvýšenej expresii mutantu KPNA2 korelujúcej s upreguláciou receptorov T-buniek, čo naznačuje možnosť týchto mutácií predpovedať reakciu protinádorových T-buniek, čo vedie k abskopálnemu účinku. Klony receptora T-buniek reagujúce na tento mutant takmer úplne chýbali pred ožiarovaním, ale po ožiarení mali dramatickú expanziu vzoriek periférnej krvi (Wilkins a kol., 2019). Ďalšie biomarkery, ktoré môžu sprostredkovať abskopálny efekt, zahŕňajú TREX1, INF-B, ako aj fosforylovaný histón H2AX (Siva a kol., 2016).

Abskopálny efekt indukovaný kryoterapiou

Českí autori (Kodet a kol., 2021) opisujú zaujímavý prípad pacienta s recidivujúcim metastatickým melanómom.

Opis prípadu: pacient s recidivujúcim metastatickým postihnutím melanómu v jazve po predchádzajúcej excízii superficiálne šíriaceho sa melanómu Breslow 1,5 mm v roku 2009 na chrbte vľavo bol liečený podaním anti-CTLA-4 terapie bez efektu. Dva mesiace po terapii anti-CTLA-4 došlo k progresii ako kožných a podkožných metastáz v oblasti pôvodnej jazvy, tak k rozvoju metastatického postihnutia axilárnych uzlín vľavo a pečene podľa CT vyšetrenia. Lekári následne pacientovi navrhli ako symptomatickú paliatívnu liečbu kryoterapiu, pri ktorej sa spodina nádoru zmrazila tekutým dusíkom s teplotou -196°C .

Po kryodestrukcii časti kožných metastáz bol viditeľný prekvapivý efekt nielen na kožné a podkožné metastázy chrbta, ale došlo aj k vymiznutiu postihnutia axilárnych lymfatických uzlín a suspektného pečeneového postihnutia. Pacient je k dnešnému dňu bez ďalšej terapie a bez recidívy ochorenia 10 mesiacov od ukončenej terapie ipilimumabom a 8 mesiacov po ukončenej kryoterapii. Aktiváciu imunitného systému a terapeutickú odpoveď po kryalizácii naznačujú aj laboratórne dáta týkajúce sa hladín ALC, LDH a hladina S100 proteínu.

Hoci existuje množstvo predklinických dát, ktoré ukazujú na možnú synergiu medzi aplikáciou kryoterapie a aktiváciou imunitného systému, podľa autorov štúdie sa zrejme jedná o prvý prípad možného abskopálneho efektu kryoterapie u pacienta s melanómom. Kryoterapia aplikovaná na kožné metastázy mohla vyvolať zvýšený rozpad nádorových antigénov s následnou aktiváciou imunitného systému a systémovým efektom na úrovni lymfatických uzlín a pečeneového postihnutia, hoci nádor pacienta na predchádzajúcej liečbe ipilimumabom progredoval.

Perspektíva do budúcnosti

Väčšina sľubných údajov o kombinovanom ožarovaní a imunoterapii pochádza od pacientov s melanó-

mom a rakovinou pľúc, sú potrebné aj štúdie zamerané na mieru odozvy v iných typoch nádorov. Okrem toho existujú rôzne protokoly, ktoré študujú kombinácie žiarenia/imunoterapie vyvinuté v obmedzenom aj rozsiahлом štádiu rakoviny pľúc, nemalobunkového karcinómu pľúc, rakoviny močového mechúra a genitourinárnych malignít a inými. Analýza hodnotenia Janopaula-Naylor a kol. (2021) poukazuje na deväť prebiehajúcich klinických štúdií hodnotiacich abskopálne odpovede a/alebo kombináciu žiarenia a imunoterapie, pri kolorektálnych karcinómoch, nemalobunkových karcinómoch pľúc, klasických Hodgkinových lymfómoch CUP (z. angl. cancer of unknown primary) a mezotelióme.

Poznamenávajú, že modality ako je ICAM-špecifické PET zobrazovanie, môžu poskytnúť budúcim pacientom prognostické a prediktívne údaje. Craig a kol. poznamenávajú, že biomarkery je možné kombinovať s indikátormi po liečbe, aby sa maximalizovali výsledky abskopálneho účinku kombinácie ožarovania a imunoterapie (Siva a kol., 2016).

ZÁVER

Koncept abskopálneho efektu v súčasnosti nabera na význame v modernej onkológii, keďže sa čoraz jasnejšie ukazuje súvislosť medzi lokalizovaným ožiarovaním a spúšťaním imunitne sprostredkovaných systémových protinádorových účinkov. Rastúci počet štúdií dokumentuje abskopálny účinok hlavne po ožiarení vonkajším lúčom. Intervenčná rádioterapia sa môže použiť spolu s uzavretými rádioaktívnymi zdrojmi ako brachyterapia alebo s neuzatvorenými rádioaktívnymi zdrojmi ako transarteriálna rádioembolizácia. Cieľom tohto článku bolo zhodnotiť existujúce dostupné klinické údaje a diskutovať o mechanizmoch abskopálneho účinku.

ZOZNAM LITERATÚRY

Abuodeh, Y., Venkat, P., Kim, S.: Systematic review of case reports on the abscopal effect. *Curr. Probl. Cancer*, 2016, 40 (1), 25 – 37.

Adler, S. S.: The pathogenesis of spleen mediated phenomena in chronic myeloid leukaemia and agnogenic myeloid metaplasia: a non-abscopal mechanism. *Scand. J. Haematol.* 1976, 17 (3), 153 – 159.

Algazi, A., Bhatia, S., Tsai, K. K., Gargosky, S., Bannavong, D., Talia, R., Browning, E., Twitty, C. G., Canton, D., Campbell, J., Pierce, R. H., Le, M. H., Ballesteros-Merino, C., Bifulco, C. B., Fox, B. A., Faries, M., Molina, M., Agarwala, S., Lewis, K., Daud, A.: Intratumoral tavokinogene telseplasmid induces abscopal clinical responses in metastatic melanoma patients. *J. Transl. Med.*, 2018, 17 (Suppl. 1), 21.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M. C., Ullrich, E., Saulnier, P., Yang, H., Amigorena, S., Ryffel, B., Barrat, F. J., Saftig, P., Levi, F., Lidereau, R., Nogues, C., Mira, J. P., Chompret, A., Joulin, V., Clavel-Chapelon, F., Bourhis, J., André, F., Delaloge, S., Tursz, T., Kroemer, G., Zitvogel, L.: Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.*, 2007, 13 (9), 1050 – 1059.

Buchwald, Z. S., Efstathiou, J. A.: Immunotherapy and radiation – A new combined treatment approach for bladder cancer? *Bl. Cancer*, 2015, 1 (1), 15 – 27.

Buchwald, Z. S., Nasti, T. H., Lee, J., Eberhardt, C. S., Wieland, A., Im, S. J., Lawson, D., Curran, W., Ahmed, R., Khan, M. K.: Tumor-draining lymph node is important for a robust abscopal effect stimulated by radiotherapy. *J. Immunother. Cancer.*, 2020, 8 (2), e000867.

Burnette, B. C.; Liang, H., Lee, Y., Chlewicki, L., Khodarev, N. N., Weichselbaum, R. R., Fu, Y. X., Auh, S. L.: The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res.*, 2011, 71 (7), 2488 – 2496.

Camphausen, K., Moses, M. A., Ménard, C., Sproull, M., Beecken, W. D., Folkman, J., O'Reilly, M. S.: Radiation abscopal antitumor effect is media-

ted through p53. *Cancer Res.* 2003, 63 (8), 1990 – 1993.

Connolly, K. A., Kuchroo, M., Venkat, A., Khatun, A., Wang, J., William, I., Hornick, N. I., Fitzgerald, B. L., Damo, M., Kasmani, M. Y., Cui, C., Fagerberg, E., Monroy, I., Hutchins, A., Cheung, J. F., Foster, G. G., Mariuzza, D. L., Nader, M., Zhao, H., Cui, W., Krishnaswamy, S., Joshi, N. S.: A reservoir of stem-like CD8 + T cells in the tumor-draining lymph node preserves the ongoing antitumor immune response. *Sci. Immunol.*, 2021, 6 (64), eabg7836.

Craig, D. J., Nanavaty, N. S., Devanaboyina, M., Stanbery, L., Hamouda, D., Edelman, G., Dworkin, L., Nemunaitis, J. J.: The abscopal effect of radiation therapy. *Future Oncol.*, 2021, 17 (13), 1683 – 1694.

Cui, C., Chakraborty, K., Tang, X. A., Zhou, G., Schoenfelt, K. Q., Becker, K. M., Hoffman, A., Chang, Y. F., Blank, A., Rear-don, C. A., Kenny, H. A., Vaisar, T., Lengyel, E., Greene, G., Becker, L.: Neutrophil elastase selectively kills cancer cells and attenuates tumorigenesis. *Cell*, 2021, 184 (12), 3163 – 3177.

Demaria, S., Formenti, S. C.: Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy. *Front. Oncol.*, 2012, 2, 95.

Demaria, S., Ng, B., Devitt, M. L., Babb, J. S., Kawashima, N., Liebes, L., Formenti, S. C.: Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2004, 58 (3), 862 – 870.

Ebner, D. K., Kamada, T., Yamada, S.: Abscopal effect in recurrent colorectal cancer treated with carbon-ion radiation therapy: 2 case reports. *Adv. Radiat. Oncol.*, 2017, 2 (3), 333 – 338.

Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., Kroemer, G.: Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, 17, 97 – 111.

Gameiro, S. R., Jammeh, M. L., Wattenberg, M. M., Tsang, K. Y., Ferrone, S., Hodge, J. W.: Radiation-induced immunogenic modulation of tumor enhances antigen processing and calreticulin exposure,

resulting in enhanced T-cell killing. *Oncotarget.*, 2014, 5 (2), 403 – 416.

Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Parnaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., Perfettini, J. L., Schlemmer, F., Tasdemir, E., Uhl, M., Génin, P., Civas, A., Ryffel, B., Kanellopoulos, J., Tschopp, J., André, F., Lidereau, R., McLaughlin, N. M., Haynes, N. M., Smyth, M. J., Kroemer, G., Zitvogel, L.: Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1B-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.*, 2009, 15 (10), 1170 – 1178.

Golden, E. B., Demaria, S., Schiff, P. B., Chachoua, A., Formenti, S. C.: An abscopal response to radiation and ipilimumab in a patient with metastatic non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Res.*, 2013, 1 (6), 365 – 372.

Golden, E. B., Chhabra, A., Chachoua, A., Adams, S., Donach, M., Fenton-Kerimian, M., Friedman, K., Ponzio, F., Babb, J. S., Goldberg, J., Demaria, S., Formenti, S. C.: Local radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to generate abscopal responses in patients with metastatic solid tumours: a proof-of-principle trial. *Lancet Oncol.*, 2015, 16 (7), 795 – 803.

Golden, E. B., Pellicciotta, I., Demaria, S., Barcellos-Hoff, M. H., Formenti, S. C.: The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways. *Front. Oncol.*, 2012, 2, 88.

He, C., Huang, X., Zhang, Y., Lin, X., Li, S.: T-cell activation and immune memory enhancement induced by irreversible electroporation in pancreatic cancer. *Clin. Transl. Med.*, 2020, 10 (2), e39.

Chakraborty, M., Abrams, S. I., Camphausen, K., Liu, K., Scott, T., Coleman, C. N., Hodge, J. W.: Irradiation of tumor cells up-regulates fas and enhances CTL lytic activity and CTL adoptive immunotherapy. *The Journal of Immunology*, 2003, 170 (12), 6338 – 6347.

Chandra, R. A., Wilhite, T. J., Balboni, T. A., Alexander, B. M., Spektor, A., Ott, P. A., Ng, A. K., Hodi, F. S., Schoenfeld, J. D.: A Systematic evaluation of abscopal responses following radiotherapy in

patients with metastatic melanoma treated with ipilimumab. *Oncoimmunology*, 2015, 4 (11), 1 – 7.

Chicas-Sett, R., Morales-Orue, I., Rodriguez-Abreu, D., Lara-Jimenez, P.: Combining radiotherapy and ipilimumab induces clinically relevant radiation-induced abscopal effects in metastatic melanoma patients: a systematic review. *Clin. Transl. Radiat. Oncol.*, 2018, 9, 5 –11.

Im, S. J., Hashimoto, M., Gerner, M. Y., Lee, J., Kissick, H. T., Burger, M. C., Shan, Q., Hale, J. S., Lee, J., Nasti, T. H., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., Germain, R. N., Nakaya, H. I., Xue, H. H., Ahmed, R.: Defining CD8⁺ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature*, 2016, 537 (7620), 417 – 421.

Inoue, H., Tani, K.: Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ.*, 2014, 21 (1), 39 – 49.

Janopaul-Naylor, J. R., Shen, Y., Qian, D. C., Buchwald, Z. S.: The abscopal effect: a review of pre-clinical and clinical advances. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22 (20), 11 061.

Kalbasi, A., June, C. H., Haas, N., Vapiwala, N.: Radiation and immunotherapy: a synergistic combination. *J. Clin. Investig.*, 2013, 123 (7), 2756 – 2763.

Kim, H., Ahn, M. J., Oh, D., Park, S., Jung, H. A., Lee, S. H., Park, K., Ahn, Y. C.: Phase II trial of combined durvalumab plus tremelimumab with proton therapy to boost the abscopal effect for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 2021, 39 (Suppl. 15), 6034 – 6034.

Kodet, O., Němejcová, K., Strnadová, K., Havlínová, A., Dundr, P., Krajsová, I., Štork, J., Smetana, K., Jr., Lacina, L.: The abscopal effect in the era of checkpoint inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22 (13), 7204.

Kono, H., Rock, K. L.: How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, 8 (4), 279 – 289.

Lippert, T. P., Greenberg, R. A.: The abscop-

al effect: A sense of DNA damage is in the air. *J. Clin. Investig.*, 2021, 131 (9), e148274.

Liu, X., Yao, J., Song, L., Zhang, S., Huang, T., Li, Y.: Local and abscopal responses in advanced intrahepatic cholangiocarcinoma with low TMB, MSS, pMMR and negative PD-L1 expression following combined therapy of SBRT with PD-1 blockade. *J. Immunother. Cancer*, 2019, 7 (1), 204.

Liu, Y., Dong, Y., Kong, L., Shi, F., Zhu, H., Yu, J.: Abscopal effect of radiotherapy combined with immune checkpoint inhibitors. *J. Hematol. Oncol.*, 2018, 11 (1), 104.

Lomax, M. E., Folkes, L. K., O'Neill, P.: Biological consequences of radiation-induced DNA damage: Relevance to radiotherapy. *Clin. Oncol.*, 2013, 25 (10), 578 – 585.

Marciscano, A. E., Ghasemzadeh, A., Nirschl, T. R., Theodros, D., Kochel, C. M., Francica, B. J., Muroyama, Y., Anders, R. A., Sharabi, A. B., Velarde, E., Mao, W., Chaudhary, K. R., Chaimowitz, M. G., Wong, J., Selby, M. J., Thudium, K. B., Korman, A. J., Ulmert, D., Thorek, D. L. J., DeWeese, T. L., Drake, C. G.: Elective nodal irradiation attenuates the combinatorial efficacy of stereotactic radiation therapy and immunotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 2018, 24 (20), 5058 – 5071.

Minnaar, C. A., Kotzen, J. A., Ayeni, O. A., Vangu, M. D. T., Baeyens, A.: Potentiation of the abscopal effect by modulated electro-hyperthermia in locally advanced cervical cancer patients. *Front. Oncol.*, 2020, 10, 376.

Mole, R. H.: Whole body irradiation; radiobiology or medicine? *Br. J. Radiol.*, 1953, 26 (305), 234 – 241.

Nelson, B. E., Adashek, J. J., Lin, S. H., Subbiah, V.: The abscopal effect in patients with cancer receiving immunotherapy. *Med.*, 2023, 4 (4), 233 – 244.

Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Métivier, D., Larochette, N., van Endert, P., Ciccosanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L., Kroemer, G.: Calreticulin expo-

sure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.*, 2007, 13 (1), 54 – 61.

Pandolfi, F., Altamura, S., Frosali, S., Conti, P.: Key role of DAMP in inflammation, cancer, and tissue repair. *Clin. Ther.*, 2016, 38 (5), 1017 – 1028.

Patel, R. R., Guo, C., Hong, D. S., Chang, J. Y., Altan, M., Chun, S. G., Diab, A., Davies, M., Nguyen, Q. N., Barsoumian, H., Simon, G. R., Gltza, I., Tang, C., Verma, V., Comeaux, N., Welsh, J. W.: Abscopal response rates after salvage radiation in patients with progressive disease on immunotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2020, 108 (Suppl. 3), e120 – e121.

Postow, M. A., Callahan, M. K., Barker, C. A., Yamada, Y., Yuan, J., Kitano, S., Mu, Z., Rasalan, T., Adamow, M., Ritter, E., Sedrak, C., Jungbluth, A. A., Chua, R., Yang, A. S., Roman, R. A., Rosner, S., Benson, B., Allison, J. P., Lesokhin, A. M., Gnjatic, S., Wolchok, J. D.: Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2012, 366 (10), 925 – 931.

Reijmen, E., De Mey, S., De Mey, W., Gevaert, T., De Ridder, K., Locy, H., Martens, S., De Blay, E., Bouwens, L., Debie, P., Breckpot, K., De Grève, J., De Ridder, M., Goyvaerts, C.: Fractionated radiation severely reduces the number of CD8+ T cells and mature antigen presenting cells within lung tumors. *Int. J. Radiat. Oncol.*, 2021, 111 (1), 272 – 283.

Rodriguez-Ruiz, M. E., Rodriguez, I., Garasa, S., Barbes, B., Solorzano, J. L., Perez-Gracia, J. L., Labiano, S., Sanmamed, M. F., Azpilikueta, A., Bolaños, E., Sanchez-Paulete, A. R., Aznar, M. A., Rouzaut, A., Schalper, K. A., Jure-Kunkel, M., Melero, I.: Abscopal effects of radiotherapy are enhanced by combined immunostimulatory mAbs and are dependent on CD8 T cells and crosspriming. *Cancer Res.*, 2016, 76 (20), 5994 – 6005.

Rodríguez-Ruiz, M. E., Vanpouille-Box, C., Melero, I., Formenti, S. C., Demaria, S.: Immunological mechanisms responsible for radiation-induced abscopal effect. *Trends Immunol.*, 2018, 39 (8), 644 – 655.

Shi, F., Wang, X., Teng, F., Kong, L., Yu, J.:

Abscopal effect of metastatic pancreatic cancer after local radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy. *Cancer Biol. Ther.*, 2017, 18 (3), 137 – 141.

Schaue, D., Kachikwu, E. L., McBride, W. H.: Cytokines in radiobiological responses: a review. *Radiat. Res.*, 2012, 178 (6), 505 – 523.

Schenkel, J. M., Herbst, R. H., Canner, D., Li, A., Hillman, M., Shanahan, S.-L., Gibbons, G., Smith, O. C., Kim, J. Y., Westcott, P., Hwang, W. L., Freed-Pastor, W. A., Eng, G., Cuoco, M. S., Rogers, P., Park, J. K., Burger, M. L., Rozenblatt-Rosen, O., Cong, L., Pauken, K. E., Regev, A., Jacks, T.: Conventional type I dendritic cells maintain a reservoir of proliferative tumor-antigen specific TCF-1+ CD8+ T cells in tumor-draining lymph nodes. *Immunity*, 2021, 54 (10), 2338 – 2353.

Siddiqui, I., Schaeuble, K., Chennupati, V., Fuertes Marraco, S. A., Calderon-Copete, S., Pais Ferreira, D., Carmona, S. J., Scarpellino, L., Gfeller, D., Pradervand, S., Luther, S. A., Speiser, D. E., Held, W.: Intratumoral Tcf1 + PD-1 + CD8 + T cells with stem-like properties promote tumor control in response to vaccination and checkpoint blockade immunotherapy. *Immunity*, 2019, 50 (1), 195 – 211. e10.

Silva, C., Fardilha, C., Freitas, D., Fonseca, G., Louro, M., Costa, P.: Abscopal effect of radiation therapy in monotherapy in patient with malignant melanoma. *Appl. Rad. Onc.*, 2019, 8 (3), 46 – 48.

Siva, S., Lobachevsky, P., MacManus, M. P., Kron, T., Möller, A., Lobb, R. J., Ventura, J., Best, N., Smith, J., Ball, D., Martin, O. A.: Radiotherapy for non-small cell lung cancer induces DNA damage response in both irradiated and out-of-field normal tissues. *Clin. Cancer Res.*, 2016, 22 (19), 4817 – 4826.

Theelen, W. S. M. E.; Chen, D., Verma, V., Hobbs, B. P., Peulen, H. M. U., Aerts, J. G. J. V., Bahce, I., Niemeijer, A. L. N., Chang, J. Y., de Groot, P. M., Nguyen, Q. N., Comeaux, N. I., Simon, G. R., Skoulidis, F., Lin, S. H., He, K., Patel, R., Heymach, J., Baas, P., Welsh, J. W.: Pembrolizumab with or without radiotherapy for metastatic non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of two randomised

trials. *Lancet Respir. Med.*, 2021, 9 (5), 467 – 475.

Tsui, J. M., Mihalciou, C., Cury, F. L.: Abscopal effect in a stage IV melanoma patient who progressed on pembrolizumab. *Cureus*, 2018, 10 (2), e2238.

Tubin, S., Khan, M. K., Salerno, G., Mourad, W. F., Yan, W., Jeremic, B.: Mono-institutional phase 2 study of innovative Stereotactic Body RadioTherapy targeting PArTial Tumor HYpoxic (SBRT-PATHY) clonogenic cells in unresectable bulky non-small cell lung cancer: profound non-targeted effects by sparing peritumoral immune microenvironment. *Radiat Oncol.*, 2019, 14 (1), 212.

Vaidya, J. S., Bulsara, M., Baum, M., Wenz, F., Massarut, S., Pigorsch, S., Alvarado, M., Douek, M., Saunders, C., Flyger, H., Eiermann, W., Brew-Graves, C., Williams, N. R., Potyka, I., Roberts, N., Bernstein, M., Brown, D., Sperk, E., Laws, S., Sütterlin, M., Corica, T., Lundgren, S., Holmes, D., Vinante, L., Bozza, F., Pazos, M., Blanc-Onfroy, M. L., Gruber, G., Polkowski, W., Dedes, K. J., Niewald, M., Blohmer, J., McReady, D., Hoefler, R., Kelemen, P., Petralia, G., Falzon, M., Joseph, D., Tobias, J. S.: New clinical and biological insights from the international TARGIT-A randomised trial of targeted intra-operative radiotherapy during lumpectomy for breast cancer. *Br. J. Cancer.*, 2021, 125 (3), 380 – 389.

Wang, L., He, L., Bao, G., He, X., Fan, S., Wang, H.: Ionizing radiation induces HMGB1 cytoplasmic translocation and extracellular release. *Guo Ji Fang She Yi Xue He Yi Xue Za Zhi = Int. J. Radiat. Med. Nucl. Med.*, 2016, 40 (2), 91 – 99.

Weichselbaum, R. R., Liang, H., Deng, L., Fu, Y. X.: Radiotherapy and immunotherapy: a beneficial liaison? *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2017, 14 (6), 365 – 379.

Welsh, J. W., Tang, C., de Groot, P., Naing, A., Hess, K. R., Heymach, J. V., Papadimitrakopoulou, V. A., Cushman, T. R., Subbiah, V., Chang, J. Y., Simon, G. R., Ramapriyan, R., Barsoumian, H. B., Menon, H., Cortez, M. A., Massarelli, E., Nguyen, Q., Sharma, P., Allison, J. P., Diab, A., Verma, V., Raju, U., Shaaban, S. G., Dadu, R., Cabanillas, M. E., Wang, K., Anderson, C., Gomez, D. R., Hahn, S., Komaki, R., Hong, D. S.: Phase II trial of ipilimumab with stereotactic radiation therapy for metastatic disease: outcomes, toxicities, and low-dose radiation-related abscopal responses. *Cancer Immunol. Res.*, 2019, 7 (12), 1903 – 1909.

Wersäll, P. J., Blomgren, H., Pisa, P., Lax, I., Kälkner, K. M., Svedman, C.: Regression of non-irradiated metastases after extracranial stereotactic radiotherapy in metastatic renal cell carcinoma. *Acta Oncol.*, 2006, 45 (4), 493 – 497.

Wilkins, A., McDonald, F., Harrington, K., Melcher, A.: Radiotherapy enhances responses of lung cancer to CTLA-4 blockade. *J. Immunother. Cancer*, 2019, 7 (1), 64.

Yamazaki, T., Kirchmair, A., Sato, A., Buqué, A., Rybstein, M., Petroni, G., Bloy, N., Finotello, F., Stafford, L., Navarro Manzano, E., Ayala de la Peña, F., García-Martínez, E., Formenti, S. C., Trajanoski, Z., Galluzzi, L.: Mitochondrial DNA drives abscopal responses to radiation that are inhibited by autophagy. *Nat. Immunol.*, 2020, 21 (10), 1160 – 1171.

Zhao, Y., Zhang, T., Wang, Y., Lu, D., Du, J., Feng, X., Zhou, H., Liu, N., Zhu, H., Qin, S., Liu, C., Gao, X., Yang, Z., Liu, Z.: ICAM-1 orchestrates the abscopal effect of tumor radiotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2021, 118 (114), e2010333118.



VÝSKYT NAJČASTEJŠÍCH GYNEKOLOGICKÝCH OCHORENÍ A ICH LIEČBA OCCURRENCE OF THE MOST COMMON GYNECOLOGICAL DISEASES AND THEIR TREATMENT

Feješová, Dominika; Maková, Zuzana

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

zuzana.makova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Štúdia sa venuje gynekologickým ochoreniam, ktoré sa pomerne často vyskytovali v sledovanom období piatich rokov (2016 – 2021). Ide o tieto ochorenia: bakteriálna vaginóza, vulvovaginálna kandidóza, močová inkontinencia a sekundárna amenorea, ktorá patrí k najfrekvencovanejším poruchám menštruačného cyklu. Prieskum bol vykonaný a následne vyhodnotený na základe otázok elektronického dotazníka, na ktoré odpovedalo 98 respondentiek a na základe štyroch klinických prípadov získaných v košickej gynekologickej ambulancii. Gynekologické ochorenia postihujú najčastejšie ženy v reprodukčnom veku (15 – 45 rokov) a v uvedených rokoch sa vyskytlo gynekologické ochorenie u 64 % žien. Faktom ostáva skutočnosť, že najviac vyskytujúcim sa ochorením sú gynekologické infekcie, ktoré predstavovali 31 %. Poruchy menštruačného cyklu sa vyskytli u 20 % žien, inkontinencia u 17 % žien a ostatné ochorenia tvo-

rili podiel 15 %. Vzhľadom na etiologickú variabilitu, terapia musí byť cielená a v prípade gynekologických infekcií spočíva v podaní liečiv s účinkom proti konkrétnym patogénom. Pri terapii inkontinencie sa uprednostňuje konzervatívna liečba. Terapia sekundárnej amenorey je zložitá v dôsledku množstva príčin, ktoré ju môžu spôsobovať.

Kľúčové slová: bakteriálna vaginóza; gynekologické ochorenia; močová inkontinencia; sekundárna amenorea; vulvovaginálna kandidóza

ABSTRACT

The study deals with gynecological diseases that occurred quite often in the observed period of five years (2016 – 2021). These diseases were: bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis, urinary incontinence and secondary amenorrhea, which is one of the most frequent disorders of the menstrual cycle. The survey was conducted and sub-

sequently evaluated based on the questions in an electronic questionnaire, which were answered by 98 female respondents and based on four clinical cases obtained at a gynecological clinic in Košice. Gynecological diseases most often affect women of reproductive age (15 – 45 years) and in the last 5 years, gynecological diseases have occurred in 64 % of women. The fact is that the most common diseases are gynecological infections with 31 % occurrence. Menstrual disorders occurred in 20 % of women, incontinence in 17 % of women and other diseases occurred in 15 % of women. Due to etiological variability, therapy must be targeted and, in case of gynecological infections, consists of the administration of drugs with action against specific pathogens. Conservative treatment is preferred for incontinence therapy. Secondary amenorrhea therapy is complex due to a number of factors that can cause it.

Key words: bacterial vaginosis; gynecological diseases; secondary amenorrhea; urinary incontinence; vulvovaginal candidiasis

ÚVOD

Ženský reprodukčný systém je zložitý komplex orgánov a mechanizmov regulovaný pomocou hormónov, ktorý zabezpečuje reprodukciu a zachovanie života. Ochorenia reprodukčného systému postihujú ženy v každom veku. Takmer každá žena sa počas života stretla s rôznymi infekčnými a zápalovými ochoreniami, poruchami menštruačného cyklu, poruchami plodnosti, urogynekologickými ochoreniami, nádorovými ochoreniami a inými. Tieto ochorenia negatívne ovplyvňujú kvalitu života, čo sa prejaví nízkym seba-vedomím, úzkosťou, pocitom menejcennosti a inými psychickými problémami. Často už len prítomnosť príznakov môže byť príčinou dyskomfortu pacientky.

V posledných rokoch sa gynekologické problémy vyskytujú čoraz častejšie, čo je zapríčinené odlišným spôsobom života (užívanie väčšieho množstva liečiv, menej pohybu, nevyvážená strava s vysokým obsa-

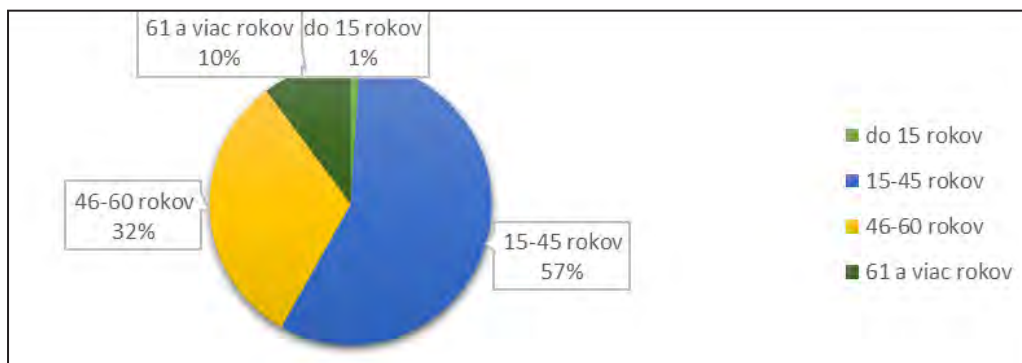
hom sacharidov, stres, viac sexuálnych partnerov), aký bol v minulosti. Je napríklad dôležité poznať rozdiel medzi bakteriálnou vaginózou a kandidózou, pretože častokrát sa akýkoľvek vulvovaginálny dyskomfort diagnostikuje ako vulvovaginálna kandidóza a predpisujú sa antimykotiká aj v prípadoch, kedy to nie je potrebné, čo môže viesť k rezistencii kvasiniek na tieto liečivá. Výskyt rôznych typov vaginitíd sa spája napríklad s užívaním antibiotík, ktoré sa predpisujú často aj bez predošlých odborných vyšetrení a na ochorenia, na ktoré nie sú určené (Kalia, Singh, Kaur, 2020). Inkontinencia môže byť dôsledkom sedavého zamestnania a slabnutia svalov panvového dna. Na hormonálnu hladinu a vznik sekundárnej amenorey môže mať vplyv stres, zníženie hmotnosti alebo užívanie iných liekov (Klein, Paradise, Reeder, 2019).

V skutočnosti môže byť prevalencia týchto ochorení oveľa vyššia. Častokrát sa totiž stáva, že žena ignoruje návštevu lekára z dôvodu hanblivosti alebo obáv z gynekologického vyšetrenia. Je však potrebné venovať patričnú pozornosť týmto ochoreniam, nepodceňovať prevenciu a adekvátnu liečbu. Častou komplikáciou gynekologických ochorení je neplodnosť, ako aj negatívne dôsledky neliečených prípadov. Základnou úlohou reprodukčného systému je práve vznik nového jedinca.

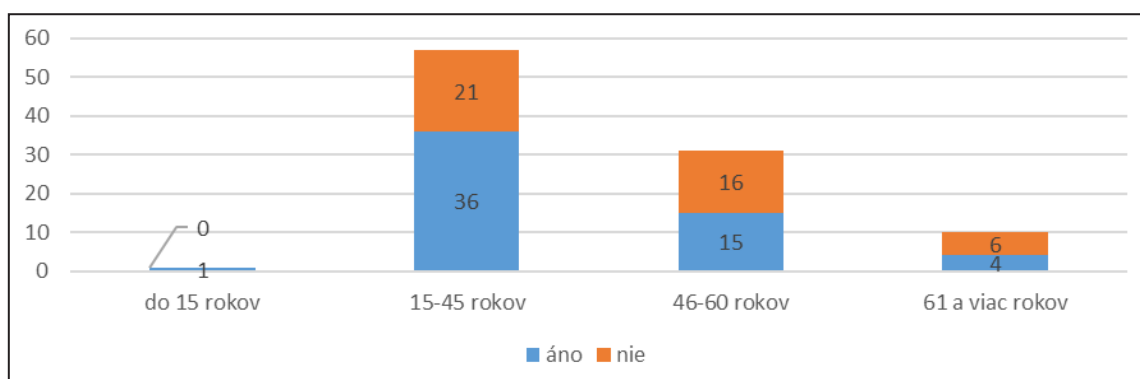
MATERIÁL A METÓDY

Štúdia bola vypracovaná pomocou domácej i zahraničnej odbornej literatúry vo forme kníh, časopisov a článkov elektronicky dostupných v internetových databázach. Údaje o výskyte najčastejších gynekologických ochorení za obdobie piatich rokov (máj 2016 – máj 2021) boli získané v gynekologickej ambulancii v Košiciach pomocou systému ezdravie. Anonymný dotazník bol skoncipovaný na základe zistených výsledkov zo systému ezdravie, pozostával zo 17 otázok, odpovedalo na nich 98 respondentiek, ktoré daným ochorením trpeli v minulosti, alebo trpia v súčasnosti. Terapeutické postupy vybraných ochorení boli prezentované pomocou štyroch klinických prípadov získaných v spolupráci s už spomínanou gy-

Graf 1: Vek respondentiek



Graf 2: Výskyt gynekologických ochorení v období 5 rokov



nekologickou ambulanciou. Všetky uvedené informácie boli spracované v súlade s platnou legislatívou Slovenskej republiky a s dodržaním etických noriem a ochrany osobných údajov.

VÝSLEDKY

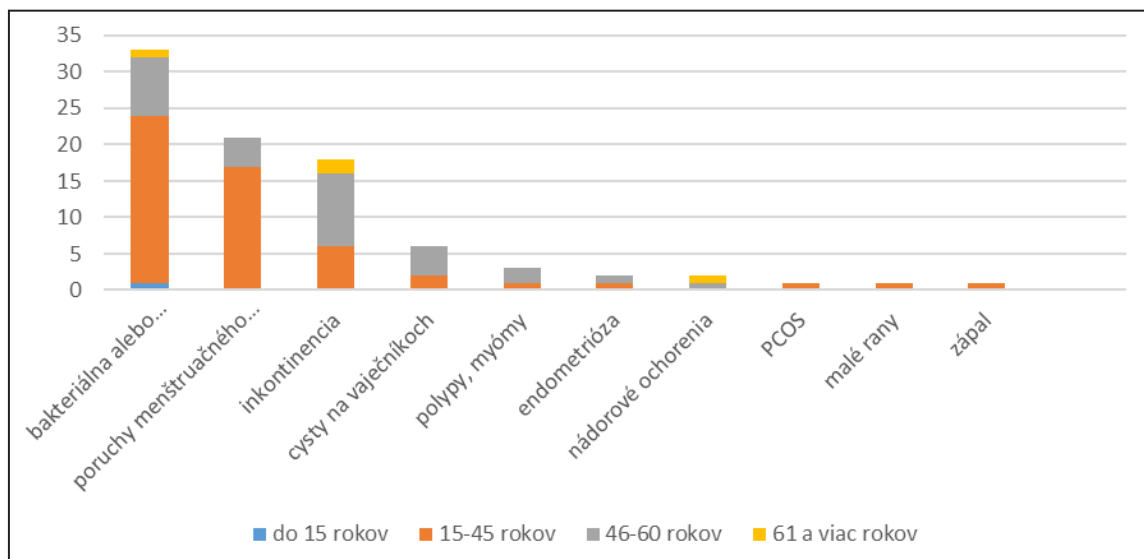
Výsledky sumarizujú a vyhodnocujú elektronicky poskytnutý dotazník pozostávajúci zo 17 otázok a súčasné liečebné metódy na príkladoch štyroch klinických prípadov. Vyplnený dotazník poskytlo 98 respondentiek, pozostáva z otázok týkajúcich sa veku, výskytu gynekologických ochorení, lekárskeho liečebných odporúčaní a vybraných ochorení, ktoré sa za obdobie piatich rokov (2016 – 2021) v košickej gynekologickej ambulancii najčastejšie vyskytovali –

gynekologické infekcie, inkontinencia moču a poruchy menštruačného cyklu. Klinické prípady sa týkali bakteriálnej vaginózy (26-ročná pacientka), vulvovaginálnej kandidózy (33-ročná pacientka), močovej inkontinencie (35-ročná pacientka) a sekundárnej amenorey (22-ročná pacientka).

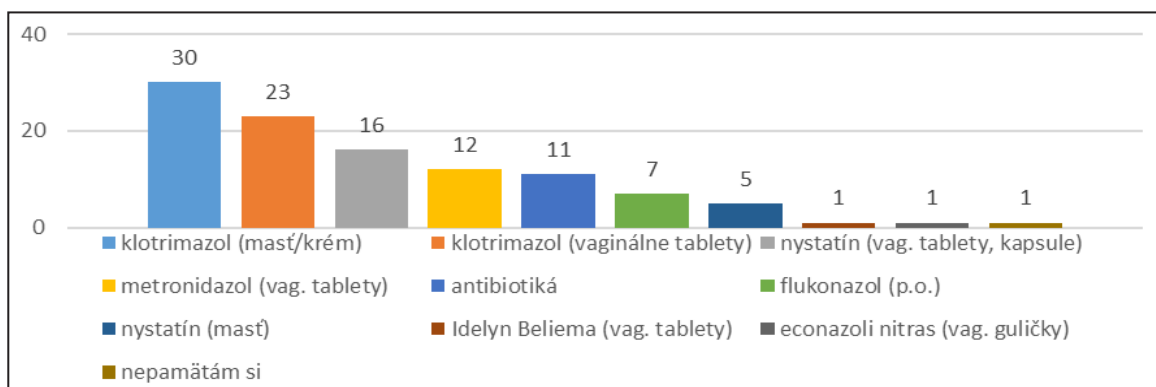
Dotazník vyplnila 1 žena vo veku do 15 rokov, 56 žien vo veku 15 až 45 rokov, 31 žien vo veku 46 až 60 rokov a 10 žien vo veku 61 a viac rokov (viď graf 1).

Vo veku do 15 rokov sa vyskytlo gynekologické ochorenie u pacientky, ktorá na dotazník odpovedala. Vo veku 15 – 45 rokov sa vyskytlo gynekologické ochorenie u 36 z 56 žien v danej vekovej kategórii, v kategórii 46 – 60 rokov sa vyskytlo ochorenie u 15 z 31 žien a vo veku 61 a viac rokov sa vyskytlo gynekologické ochorenie u 4 z 10 žien. Z toho vyplýva, že

Graf 3: Ochorenia, ktoré sa vyskytli v priebehu 5 rokov



Graf 4: Preskripčia liekov na bakteriálnu alebo kvasinkovú infekciu



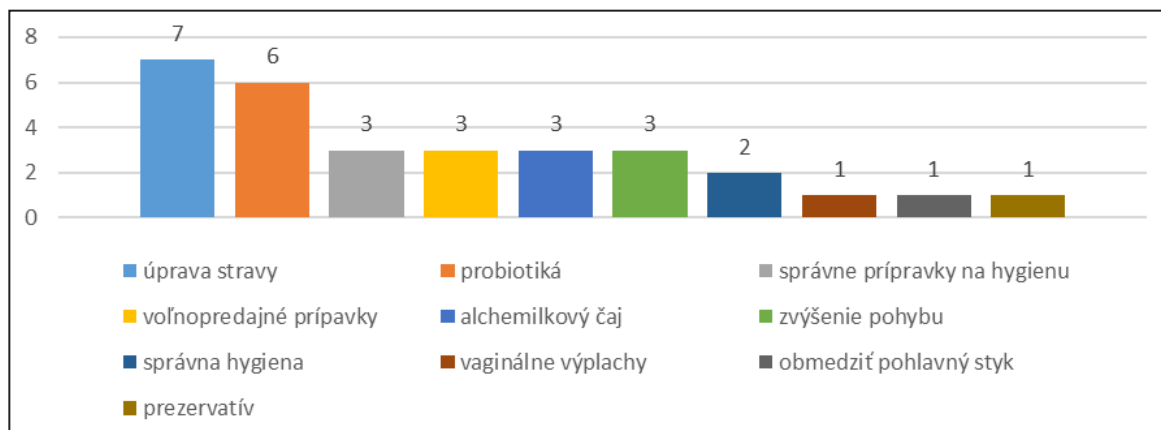
za posledných 5 rokov sa s týmto ochorením stretlo celkovo 56 z 98 žien, čo predstavuje 57,14 % (viď graf 2).

Najčastejšie bola diagnostikovaná bakteriálna alebo kvasinková infekcia (33), z toho bola 1 odpoveď vo veku do 15 rokov, 23 odpovedí vo veku 15 – 45 rokov, 8 odpovedí vo veku 46 – 60 rokov a 1 odpoveď vo veku 61 a viac rokov. Druhou najrozšírenejšou chorobou boli poruchy menštruačného cyklu (21), z toho žiadna pacientka do 15 rokov ani nad 61 rokov.

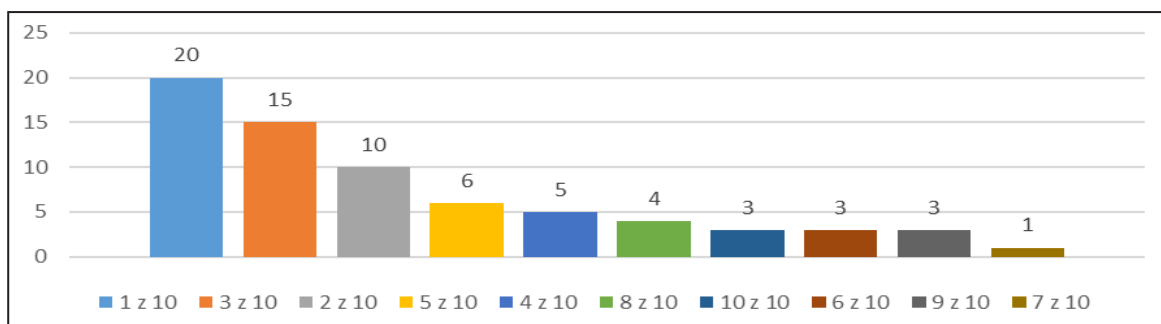
Poruchami menštruačného cyklu trpelo 17 žien vo veku 15 – 45 rokov a 4 ženy vo veku 46 – 60 rokov. Inkontinenciou trpelo 18 žien, z toho 6 žien vo veku 15 – 45 rokov, 10 žien vo veku 46 – 60 rokov a 2 ženy vo veku 61 a viac rokov. Inými ochoreniami trpelo 16 žien v rôznych vekových kategóriách. V tejto otázke mohli pacientky označiť viac odpovedí (viď graf 3).

Lekári najčastejšie predpisovali masť/krém s obsahom klotrimazolu (30), ako aj vaginálne tablety s obsahom klotrimazolu (23), vaginálne tablety/kapsule

Graf 5: Nefarmakologická liečba gynekologických infekcií odporúčaná gynekológom



Graf 6: Vplyv gynekologických infekcií na kvalitu života pacientky



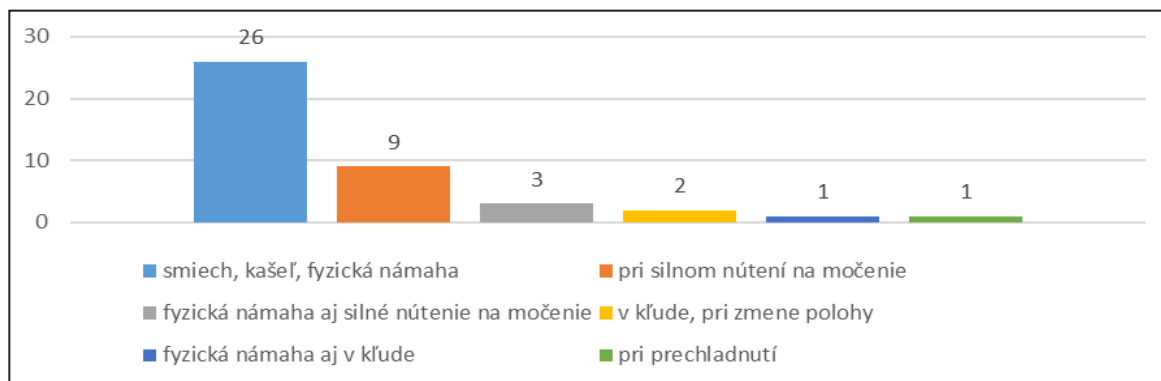
s obsahom nystatínu (16), metronidazol vo forme vaginálnych tabliet (12), antibiotiká (11), perorálne tablety s obsahom flukonazolu (7), masť s obsahom nystatínu (5). V možnosti „iné“ uviedla 1 respondentka Idelyn Beliema vaginálne tablety, 1 respondentka uviedla vaginálne guľičky s obsahom ekonazol-nitrát a 1 respondentka uviedla, že si nepamätá. V tejto otázke bolo možné označiť viac možností. Z týchto odpovedí vyplýva, že sa viac predpisovali antimykotiká a na základe toho sme prišli k záveru, že častejšie sa vyskytovala kvasinková infekcia za predpokladu správnej diagnostiky ochorenia lekárom (viď graf 4).

V tejto otázke neboli možnosti na označenie, ale respondentky uvádzali rady, ktoré dostali od svojho gynekológa. Najčastejšie bola uvedená úprava stravy

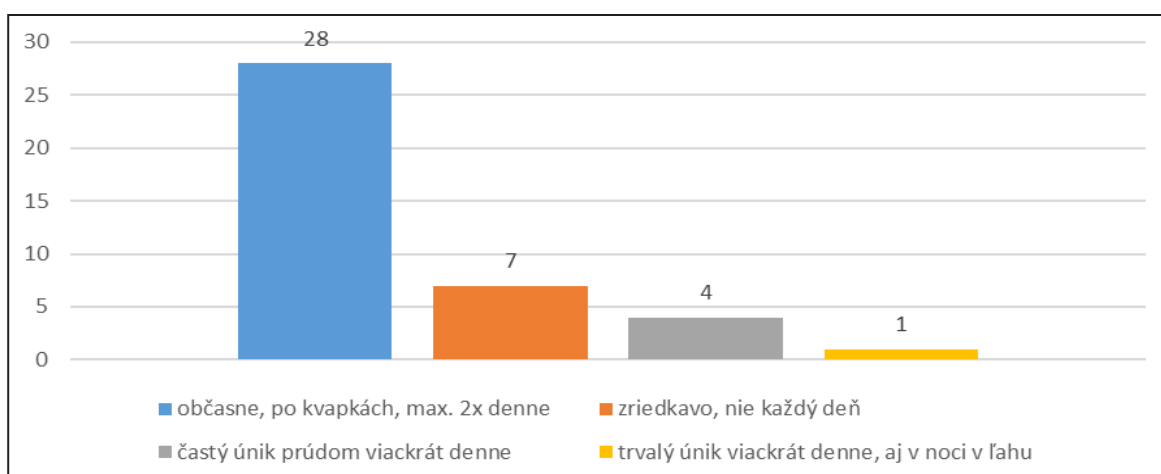
s obmedzením cukru (7), ďalej nasledovalo užívanie probiotík (6). 3 respondentky uviedli, že majú používať intímne mydlá, ktoré nedráždia a neobsahujú parfumáciu, 3 respondentkám odporúčal lekár kúpiť si v lekární voľnopredajný liek (vaginálne kapsuly, gély, vaginálny výplach), 3 respondentky uviedli pitie alchemilkového čaju a 3 respondentky mali zvýšiť pohyb. 2 respondentkám bola odporúčaná správna a dôsledná hygiena. Po 1 odpovedi boli uvedené vaginálne výplachy, obmedzenie pohlavného styku a užívanie prezervatívu (viď graf 5).

V tejto otázke mali pacientky možnosť označiť číslo na stupnici od 1 do 10, pričom 1 znamenalo vôbec a 10 znamenalo veľmi. Na prvom mieste označovali respondentky možnosť 1/10 (20), ďalej nasledovala

Graf 7: Situácie, pri ktorých dochádza k inkontinencii



Graf 8: Intenzita a frekvencia úniku moču



možnosť 3/10 (15) a možnosť 2/10 (10). 6 respondentiek označilo možnosť 5/10, 5 respondentiek 4/10, 4 respondentky 8/10, po 3 odpovede mala každá z možností 10/10, 6/10 a 9/10, 1 respondentka označila možnosť 7/10. Z uvedeného vyplýva, že gynekologické zápaly majú prevažne menší vplyv na život pacientky (viď graf 6).

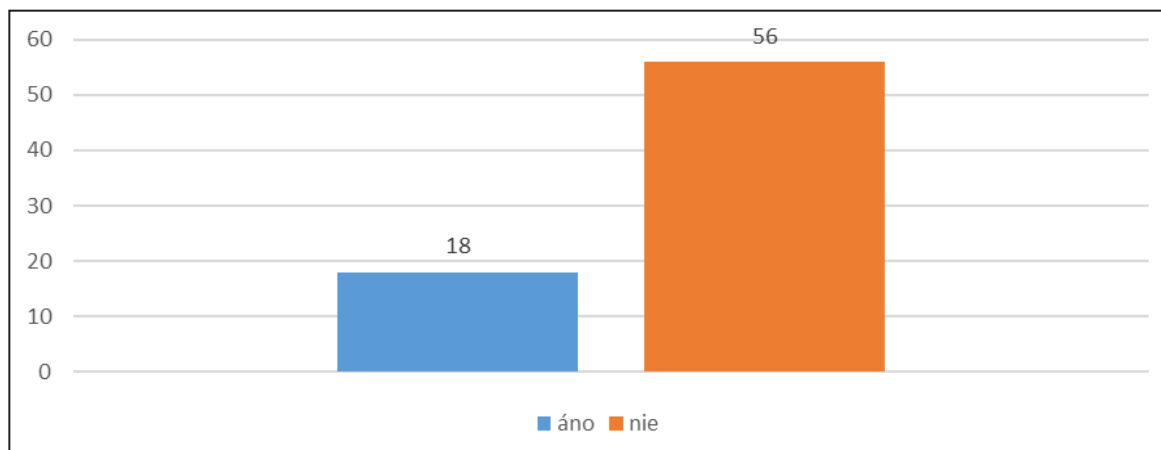
Z grafu 7 vyplýva, že najviac zastúpená bola stresová inkontinencia (hypermobilná močová trubica vinou oslabeného panvového svalstva vedúca k úniku moču pri smiechu, kašli či fyzickej námahe), za ňou nasleduje urgentná inkontinencia (naliehavá potreba močenia vedúca k nedobrovoľnému úniku moču) a v najmenšom zastúpení kombinovaná močová inkontinencia.

Najčastejšie sa únik moču vyskytol občasne, po kvapkách, max. 2-krát denne (28). 7 respondentiek uviedlo, že k úniku u nich dochádza len zriedkavo, nie každý deň. 4 respondentky uviedli, že trpia častým únikom moču prúdom niekoľkokrát denne a 1 respondentka trpí trvalým únikom moču niekoľkokrát denne, aj v noci v ľahu. Z grafu 8 vyplýva, že najčastejšie pacientky trpeli inkontinenciou 1. stupňa (1. stupeň – občasný, 2. stupeň – častý, 3. stupeň – trvalý).

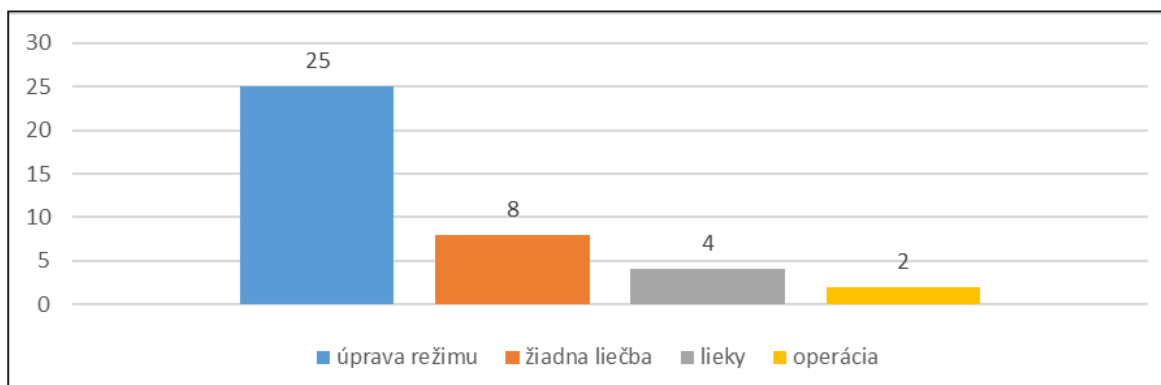
56 respondentiek nepoužívalo žiadne inkontinenčné pomôcky na rozdiel od 18 respondentiek, ktoré tieto pomôcky používalo (viď graf 9).

V tejto otázke mali respondentky možnosť označiť odpovede, ktoré sa týkali ich liečby. Najčastej-

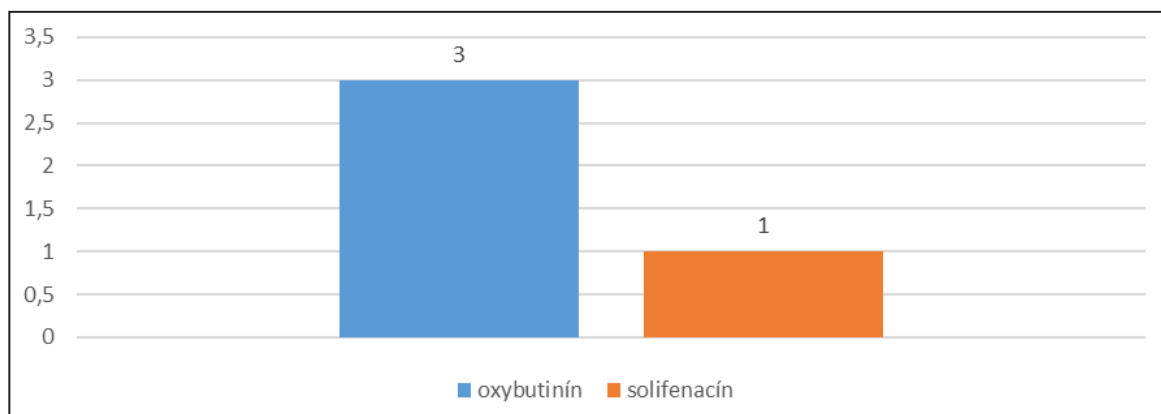
Graf 9: Používanie inkontinenčných pomôcok



Graf 10: Spôsob liečby inkontinencie



Graf 11: Farmakologická liečba močovej inkontinencie



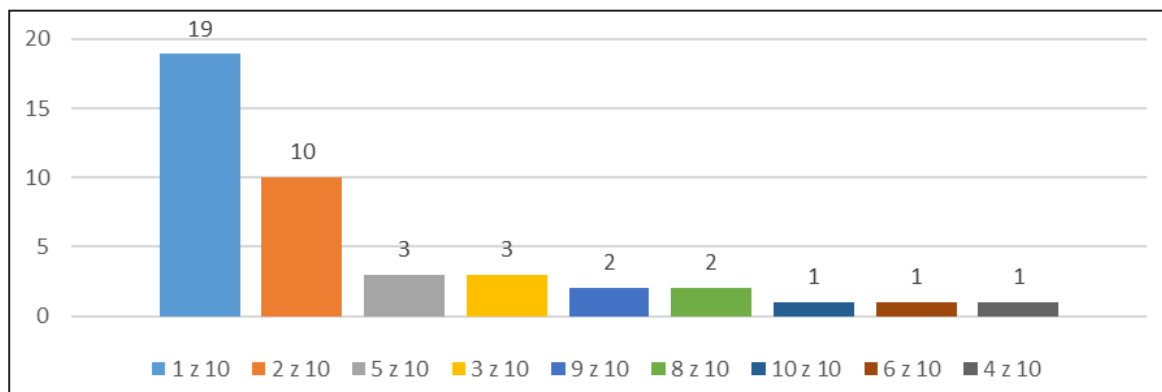
ším spôsobom bola úprava režimu, napríklad tréning močového mechúra, cvičenie svalov panvového dna (25). 8 žien odpovedalo, že problémy s únikom moču zatiaľ neriešia. 4 respondentky uviedli aj užívanie liekov a 2 respondentky podstúpili operačný zákrok

(viď graf 10).

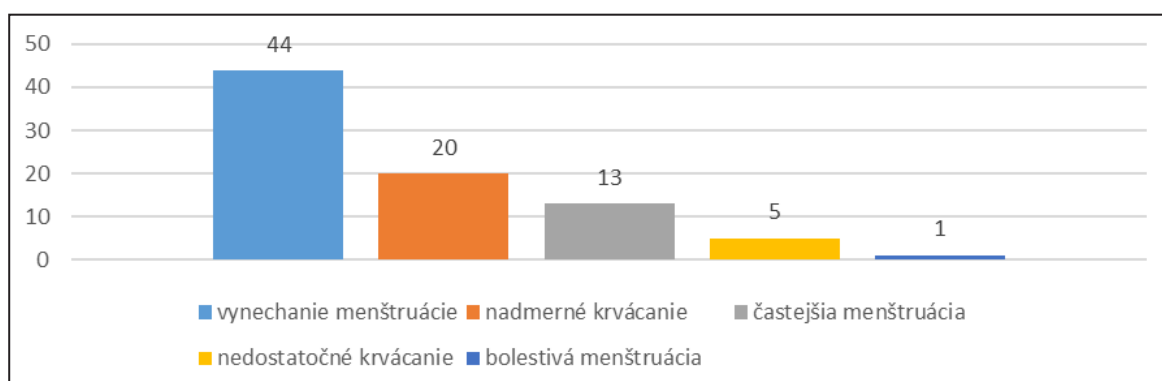
3 respondentky užívali na inkontinenciu lieky s obsahom oxybutinínu a 1 respondentka liek s obsahom solifenacínu (viď graf 11).

V tejto otázke mali pacientky možnosť označiť

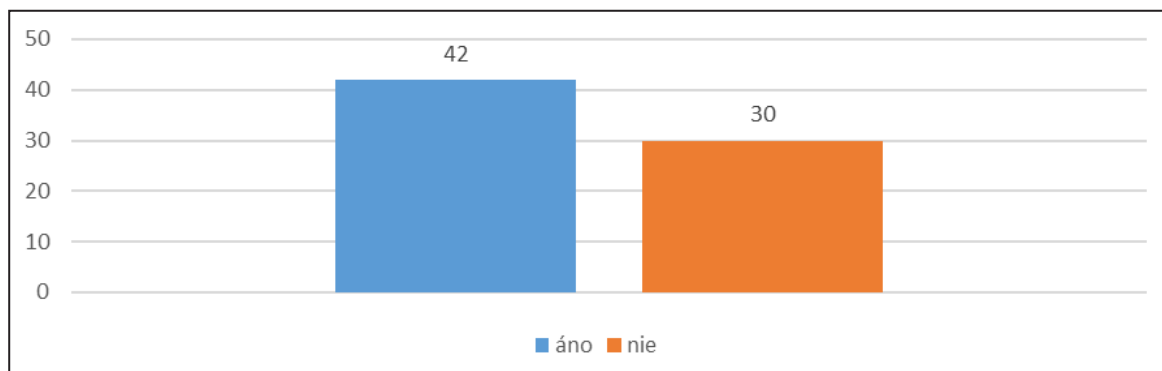
Graf 12: Vplyv inkontinencie na kvalitu života



Graf 13: Typy porúch menštruačného cyklu



Graf 14: Návštevnosť gynekologickej ambulancie pri poruchách menštruačného cyklu

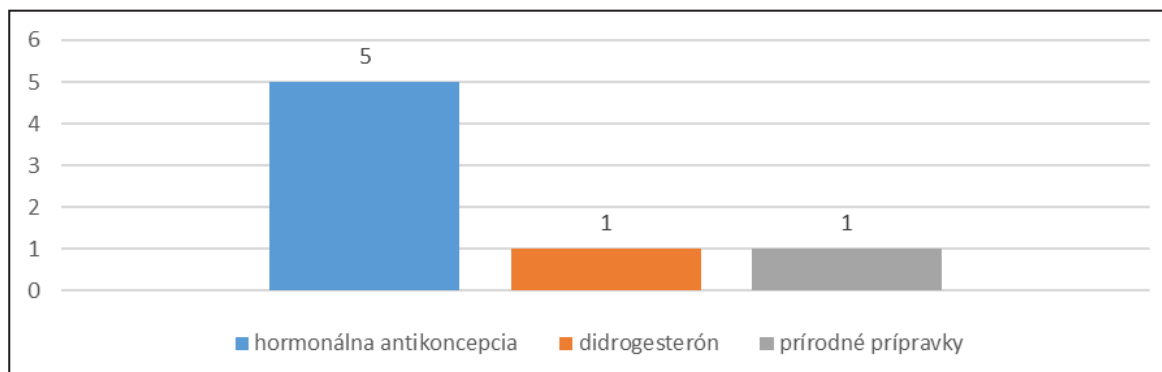


číslo na stupnici od 1 do 10, pričom 1 znamenalo vôbec a 10 znamenalo veľmi. Možnosť 1/10 označilo 19 žien, za tým nasledovala možnosť 2/10 (10). 3-krát boli označené možnosti 5/10 a 3/10. 2-krát boli označené možnosti 9/10 a 8/10 a po 1 odpovedi boli označené možnosti 10/10, 6/10 a 4/10. Z uvedeného vyplýva, že močová inkontinencia má prevažne men-

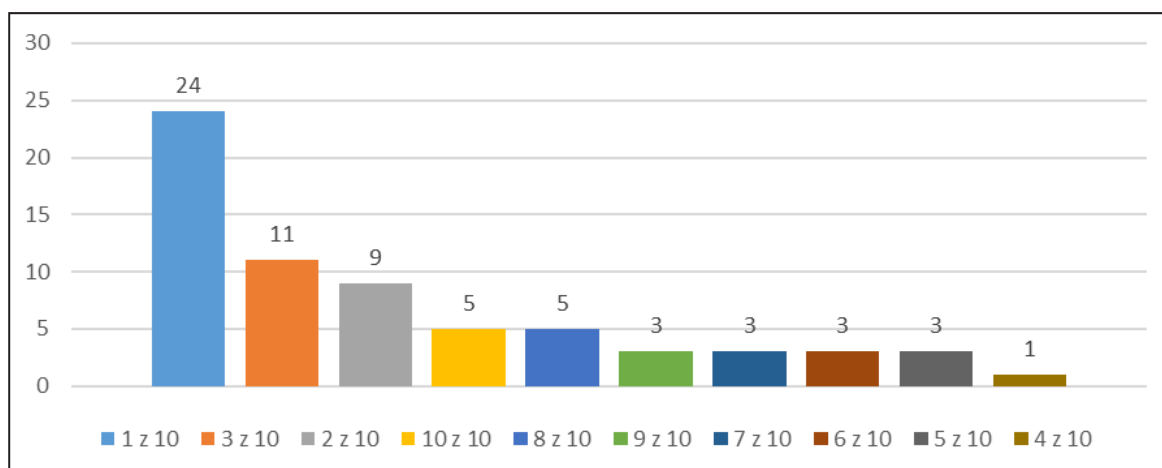
ší vplyv na kvalitu života (viď graf 12).

Najčastejšie označovanou poruchou bolo vynechanie menštruácie (amenorea) (44), za ňou nasledovalo nadmerné krvácanie (menoragia) (20), následne častejšia menštruácia (13). V menšom počte boli zastúpené: nedostatočné krvácanie (5) a veľmi bolestivá menštruácia (dysmenorea) spojená s hnačkami

Graf 15: Farmakologická liečba porúch menštruačného cyklu



Graf 16: Vplyv porúch menštruačného cyklu na kvalitu života



a zvracaním (1) (viď graf 13).

42 respondentiek gynekológa navštívilo a 30 respondentiek označilo možnosť „nie“ (viď graf 14).

5 respondentiek užívalo hormonálnu antikoncepciu, 1 respondentka užívala liek s obsahom dydrogesterónu a 1 respondentka užívala prípravok s obsahom extraktu z vitexu jahňacieho a zároveň prípravok s obsahom kyseliny listovej (viď graf 15).

V tejto otázke mali pacientky možnosť označiť číslo na stupnici od 1 do 10, pričom 1 znamenalo vôbec a 10 znamenalo veľmi. Možnosť 1/10 bola označená 24-krát. V menšom zastúpení nasledovali možnosti 3/10 (11), 2/10 (9), 10/10 (5), 8/10 (5). 3 odpovede obsahovali možnosti 9/10, 7/10, 6/10 a 5/10. Možnosť 4/10 bola označená 1-krát. Z uvedeného vyplýva, že poruchy menštruačného cyklu majú o niečo väčší vplyv na kvalitu života žien (viď graf 16).

Klinické prípady

Kazuistika 1 – bakteriálna vaginóza

U pacientky (26 r., bezdetná, stály partner) boli prítomné príznaky ako dysúria, svrbenie a pálenie pošvy a zápachajúci výtok. Tieto príznaky sa u nej vyskytovali pravidelne s malými prestávkami po dobu 2 mesiacov, no predošlá liečba zahŕňala len samoliečbu pomocou voľnopredajných prípravkov prevažne s obsahom klotrimazolu a pomocou prírodných prípravkov. Pacientka mala stáleho partnera a pri pohlavnom styku používala ochranu. V minulosti bola pacientka liečená omeprazolom na gastroezofageálny reflux a pred 2 mesiacmi bola liečená antibiotikami s obsahom cefixímu v dávke 400 mg/deň po dobu 7 dní z dôvodu prítomnosti bronchitídy. O niekoľko dní po ukončení liečby sa u pacientky prvýkrát vyskytli

spomínané príznaky.

Výšetrenie pošvy a vulvy ukázalo začervenanie a podráždenie. Pacientke bol predpísaný metronidazol vo forme perorálnych tabliet v dávke 500 mg dvakrát denne počas 7 dní. Zároveň bolo pacientke odporúčané užívať pravidelne probiotiká.

Napriek prvej liečbe sa symptómy celkom nevytratil a pacientka sa o mesiac vrátila s rovnakým problémom. Kultivácia preukázala znížené množstvo laktobacilov. Pacientke v tomto prípade neboli predpísané žiadne antibiotiká. Postup zahŕňal vaginálne probiotiká a úpravu režimu. Pacientke bol predpísaný prípravok Gynoflor®, ktorý je vo forme vaginálnych tabliet s obsahom 10 miliónov životaschopných baktérií *Lactobacillus acidophilus* a 0,03 mg estriolu. Je to liek indikovaný aj na obnovu vaginálnej mikroflóry laktobacilov po terapii protiinfekčnými alebo chemoterapeutickými liečivami. Dávkovanie: 2 tablety denne zaviesť do pošvy po dobu 10 dní.

Po ukončení liečby bolo pacientke odporúčané zakúpiť si vaginálne čapíky Floragyn®, ktoré obsahujú živé kmene *Lactobacillus bulgaricus*, *L. biphilus*, *L. acidophilus*, *L. thermophilus*, *L. casei* a *L. plantarum*, kyselinu mliečnu, extrakt z morských rias *Laminaria ochroleuca* a iné. Tento prípravok bol určený na prevenciu vzniku ďalších epizód bakteriálnej vaginózy. Dávkovanie: 1 vaginálny čapík za týždeň večer pred spaním alebo podľa potreby. Pacientke bolo odporúčané užívať len neirritujúce prípravky na intímnu hygienu bez obsahu parfumácie, napríklad Lactacyd® a prispôbiť hygienické návyky tak, aby hygiena nebola nedostatočná, ale ani prehnaná. Zároveň bola poučená, aby nenosila tesné oblečenie, užívala probiotiká aj perorálne. Pri týchto problémoch je vhodná aj úprava stravy, najmä zníženie cukru v strave a zvýšenie pohybovej aktivity. Pacientke bolo odporúčané ešte si zakúpiť a užívať enzýmy, ako napríklad Wobenzym®.

Pacientka bola kontrolovaná po 10 dňoch, 1 mesiaci, 6 mesiacoch a 1 roku po začiatku liečby a táto infekcia sa u nej už ďalej nevyskytla.

Kazuistika 2 – vulvovaginálna kandidóza

Pacientka (33 r., 2 deti, vydatá) sa sťažovala na prítomnosť opakovanej vaginálnej mykózy po dobu viac ako 2 rokov aj s dyspareuniou (bolestivý pohlavný styk).

Predtým bola celkom zdravá a v minulosti nemala žiadnu skúsenosť s akoukoľvek vaginálnou infekciou a jej manžel taktiež nemal v minulosti žiadne infekčné alebo mykotické ochorenia. Vulva bola normálna bez hyperémie alebo krémovitého výtoku. Ďalšie podrobnejšie výšetrenia ukázali prítomnosť spór vytvorených kandidami. Boli vykonané aj výšetrenia na prítomnosť *Neisseria gonorrhoeae* a *Trichomonas vaginalis*, ktoré vyšli negatívne. Na základe opakovania problémov pacientky a výšetrení, ktoré opakovane preukazovali porušenie vaginálnej mikroflóry a premnoženie mikroorganizmu *C. albicans* bola pacientke diagnostikovaná rekurentná forma vulvovaginálnej kandidózy.

Liečba pozostávala z nasledujúcich liečiv: 150 mg flukonazolu podávaného perorálne po dobu 3 dní, potom sa prešlo na udržiavaciu dávku 150 mg p.o. každý 3. deň po dobu 1 týždňa, následne pokračovala udržiavacia dávka 150 mg 1x týždenne po dobu 6 mesiacov; lokálne bol použitý prípravok Macmiror® complex 500, ktorý obsahuje 500 mg nifuratelu a 200 000 IU nystatínu vo forme mäkkých vaginálnych kapsúl s dávkovaním 1 vaginálna kapsula večer pred spaním po dobu 10 dní a masť Fungicidin. Liečiva s obsahom nystatínu, ktorá sa mala nanášať na postihnuté miesta ráno a večer do vyhojenia. Okrem antimykotických liečiv užívala pacientka aj probiotiká Pearls IC™ s obsahom živých kultúr *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus rhamnosus* s dávkou 1x denne. Počas liečby pacientka užívala vaginálny gél Multi-Gyn® FloraPlus na podporu liečby a obnovy prirodzenej vaginálnej mikroflóry ako prebiotikum (látka podporujúca rast a aktivitu mikroorganizmov). Po ukončení liečby užívala pacientka 1x týždenne večer pred spaním prípravok Floragyn® s obsahom živých kmeňov *Lactobacillus* spp., kyselinou mliečnou

a ďalšími.

Okrem užívania liekov pacientka upravila svoju životosprávu, znížila množstvo cukru v strave a začala pravidelne cvičiť. Snažila sa nosiť voľnejšie oblečenie a bavlnenú spodnú bielizeň a zároveň používala antialergické prípravky na pranie a taktiež prestala používať obyčajný sprchový gél aj na intímnu hygienu a zakúpila si neдрáždivý prírodný gél určený na intímnu hygienu. Pacientka sa sama rozhodla, že bude užívať aj prírodné prípravky na podporu imunity.

Kontrola prebehla po 10 dňoch liečby, neskôr po 1 mesiaci, 3 mesiacoch, 6 mesiacoch a po 1 roku. Počas kontroly bol vaginálny výtok normálnej farby a v primeranom množstve a vaginálny ekosystém sa kompletne obnovil. Prítomné neboli ani spóry. U pacientky sa počas tejto doby už problémy nevyskytli.

Kazuistika 3 – močová inkontinencia

Pacientka (35 r., 3 deti, vydatá) prišla do ambulancie s problémom, ktorý sa začal pred 5 mesiacmi, po narodení jej tretieho dieťaťa. Uviedla, že sa pomočuje pri kašli alebo kýchaní. Na základe toho zredukovala denný príjem tekutín a snažila sa močiť častejšie, aby sa uistila, že má prázdny močový mechúr, pretože pri jeho naplnení je množstvo uniknutého moču väčšie. Pri silnom kašli alebo kýchaní stále dochádzalo k úniku malého množstva moču a taktiež sa jej to stávalo pri dvíhaní jej 2-ročnej dcéry (10 kg). Pacientka začala používať slipové vložky. Po opýtaní sa na frekvenciu pacientka uviedla, že jej moč uniká približne 2-krát denne a vložky si musí meniť v priemere 3-krát denne.

Pacientka nemala žiadne črevné problémy, menštruáciu mala pravidelnú, všetky jej pôrody prebehli prirodzenou cestou bez komplikácií a bez úniku moču po prvých dvoch pôrodoch. Pacientka nepodstúpila v minulosti žiadne operácie, neužívala žiadne lieky a netrpela žiadnym chronickým ochorením, nefajčila a alkohol konzumovala len príležitostne, ale nie počas posledných 18 mesiacov pred vyšetrením. Pacientka mala určiť na stupnici od 1 do 10, ako veľmi vplýva únik moču na jej život, pričom 1 znamenalo vôbec a 10 znamenalo veľmi a uviedla číslo 6. Pacientka

v tom čase pracovala ako sekretárka, teda mala sedavé zamestnanie a zároveň z časových dôvodov vôbec necvičila. BMI pacientky bolo v norme (23).

Pri prvom vyšetrení sa zistilo nasledovné: nebola zaznamenaná žiadna citlivosť brucha alebo nadúvanie, neboli zaznamenané žiadne perineálne abnormality (iritácia alebo začervenanie), pozorovaná bola malá, zahojená jazva po mediolaterálnej epiziotómii a prítomný bol aj perineálny zostup.

Po zhodnotení skutočností sa pacientke predbežne diagnostikovala stresová inkontinencia. Pacientka následne dostala mikčňý denník, kde si zapisovala jej toaletné návyky a denný príjem tekutín a kofeínu. Ďalšie vyšetrenie bolo naplánované o týždeň neskôr.

Po analýze mikčňého denníka počas druhej návštevy boli zistené nasledujúce skutočnosti: priemerný počet močení za deň = 8, priemerný počet úniku moču = 2, výmena vložiek bola priemerne 3-krát denne, maximálny vylúčený objem moču = 300 ml, minimálny objem vylúčeného moču bol < 50 ml a nočné močenie alebo únik moču neboli prítomné. Z denníka vyplývalo aj to, že pacientka konzumovala 2x denne kávu. Vykonané bolo aj vyšetrenie pošvy na zistenie sily svalstva a zistilo sa, že svalstvo je oslabené a pacientka následkom toho nebola schopná načasovať kontrakciu svalstva pri kašli alebo námahe.

Na základe objektívneho vyšetrenia a rozhovoru s pacientkou sa potvrdila stresová inkontinencia a pacientke sa nastavil nasledujúci liečebný plán. Začalo sa najprv konzervatívnou liečbou a zmenou v návykoch. Pacientka mala postupne zväčšovať časový interval medzi močením na približne 2 až 4 hodiny a znížiť denný príjem kofeínu.

Zároveň boli pacientke vysvetlené cvičenia na posilnenie svalov panvového dna, ktoré mala oslabené. Potrebné je sťahovať zvieracie svaly smerom k sebe alebo „do seba“ (ide o podobnú činnosť ako pri zastavení močenia). Nesmú sa sťahovať iné svaly, ako napr. sedacie, stehenné, chrbtové či brušné. Ak sú do cvičenia zapojené správne svaly, je cítiť pod panvou pohyb svalstva akoby smerom nahor. Pri cvičení je potrebné pravidelne dýchať a nezadržiavať dych. Cvičenie pozostáva zo 4 rýchlych 1-sekundových sťahov

a 7 sťahov, ktoré je potrebné udržať aspoň 5 sekúnd. Toto cvičenie je potrebné opakovať 3-krát denne. Postupne je potrebné zvyšovať počet sťahov, kým nie je dosiahnutý počet 10 a postupne je potrebné zvyšovať aj dĺžku udržania kontrakcie na 10 sekúnd.

Kontrolné vyšetrenia boli uskutočnené po 3 týždňoch a následne vždy raz za mesiac. Na prvej kontrole bolo viditeľné malé zlepšenie. Na druhej kontrole sa zisťoval znovu vplyv úniku moču na stupnici od 1 do 10, pričom pacientka uviedla hodnotu 4. Úspešne sa podarilo pacientke zväčšiť interval medzi močením na 75 minút a mala len 3 epizódy nedobrovoľného úniku moču, ktoré popísala len ako pár kvapiek. Na tretej kontrole uviedla hodnotu 1 pri otázke vplyvu úniku moču na stupnici od 1 do 10, nedošlo u nej už k úniku moču a interval medzi močením zvýšila na 2 hodiny. Pacientka sa už na ďalšie kontroly nedostavila, ale počas preventívnych prehliadok vykonávaných raz ročne sa u nej už únik moču nevyskytol. Pacientka po vyliečení preventívne cvičila aspoň 4-krát do týždňa cviky na posilnenie panvového dna a zvýšila pohybovú aktivitu a cvičí 2-krát do týždňa.

Kazuistika 4 – sekundárna amenorea

Do gynekologickej ambulancie prišla pacientka (22 r., bezdetná, slobodná), ktorej meškala menštruácia viac ako mesiac. Na základne anamnézy neboli zistené žiadne iné problémy, užívanie iných liekov ani prítomnosť chronických ochorení. Pacientka sa nesťažovala na bolesti a vyšetrenie pošvy nevykazovalo žiadne abnormality. V minulosti mala pacientka vždy presný menštruačný cyklus.

Ako prvé bolo u pacientky potrebné vylúčiť tehotenstvo. Zo samotestov, ktoré si urobila pacientka, nebolo jasné, či je tehotná, nakoľko jeden test bol pozitívny a jeden negatívny. Preto bola pacientke odobratá krv na zistenie prítomnosti ľudského choriogonadotropínu (hCG). Výsledky ukázali, že hladina bola u pacientky v norme (do 5,0 mIU/ml) a na základe výsledkov a ďalších vyšetrení sa u pacientky vylúčilo tehotenstvo.

Ďalším krokom bola kontrola pomocou ultrazvuku. Ultrazvuk ukázal prítomnosť cysty na pravom

vaječníku vo veľkosti 4 x 4 cm. Na základe toho bola pacientke určená liečba pomocou prípravku Duphaston®, ktorý obsahuje 10 mg didrogesterónu. Tento liek užívala pacientka po dobu 10 dní.

Pacientke sa po liečbe menštruačný cyklus upravil a na kontrolnom ultrazvukovom vyšetrení o 3 mesiace nebola zistená prítomnosť cysty.

DISKUSIA

Pri porovnaní štatistiky výskytu gynekologických ochorení z košickej gynekologickej ambulancie a výsledkov z dotazníka sme zistili, že odpovede respondentiek potvrdili najčastejší výskyt spomínaných ochorení. Najrozšírenejšie z nich sú gynekologické infekcie. Liečba týchto infekcií je veľmi podobná. Potrebné je použiť liečivo proti patogénom, ktoré ich spôsobujú a zároveň zabezpečiť obnovu normálnej vaginálnej mikroflóry prostredníctvom prípravkov obsahujúcich živé kultúry a úpravou životného štýlu. Najčastejšie predpisovaným liečivom pri vulvovaginálnom dyskomforte je klotrimazol. Z uvedeného vyplýva, že častejšie sa vyskytuje kvasinková infekcia. Inkontinencia sa lieči prevažne konzervatívne, ak je to možné. Najčastejšie sa vyskytuje najľahšia forma inkontinencie (moč uniká len po kvapkách) a prevažná väčšina respondentiek nepotrebuje používať inkontinenčné pomôcky. Z porúch menštruačného cyklu je najbežnejším problémom vynechanie menštruácie, čo môže mať rôzne príčiny. Liečba sa líši na základe príčin vzniku týchto porúch. Ženy, ktoré vyplnili dotazník, uviedli len liečbu hormonálnou antikoncepciou alebo didrogesterónom, no počet odpovedí bol veľmi malý. Z uvedeného môžeme predpokladať, že častou príčinou sekundárnej amenorey boli poruchy na úrovni ovárií a tiež, že liečba tohto ochorenia je nízka. Vplyv týchto ochorení na život žien nie je až tak obmedzujúci, no vyskytujú sa ťažšie prípady, kedy tieto ochorenia veľmi negatívne ovplyvňujú život pacientky.

Vo vybraných kazuistikách boli 4 pacientky trpiace bakteriálnou vaginózou, rekurentnou formou vulvovaginálnej kandidózy, stresovou inkontinenciou a se-

kundárnou amenoreou.

Prvá kazuistika (žena, 26 rokov) sa týkala bakteriálnej vaginózy. Bakteriálna vaginóza je ochorenie spôsobené premnožením niektorých baktérií v pošve. V tomto prípade bola pacientke najprv nastavená liečba metronidazolom. Metronidazol je chemoterapeutikum zo skupiny nitroimidazolov (Kónyová, 2019). Hlavnými indikáciami metronidazolu sú anaeróbne infekcie, trichomoniázy, protozoálne a gastrointestinálne infekcie spôsobené najmä *Helicobacter pylori* a *Clostridium difficile*. Pri podávaní metronidazolu intravaginálne sa približne 20 % dávky vstrebáva do systémového obehu a po vonkajšej aplikácii krémov sa takmer neabsorbuje. Metronidazol nie je účinný, ale v anaeróbných podmienkach sa mení na svoj účinný metabolit. Metronidazol dokáže ľahko preniknúť do jednobunkových mikroorganizmov, protozoi a baktérií, ale nie do cicavčích buniek. Po premene na aktívnu formu má výrazné baktericídne vlastnosti proti: anaeróbnym gramnegatívnym baktériám *Bacteroides* spp. a *Fusobacterium* spp.; anaeróbnym grampozitívnym kmeňom typu *Eubacterium* alebo *Clostridium* a grampozitívnym kokom (*Peptococcus* spp. a *Peptostreptococcus* spp.). Účinkuje aj proti rôznym druhom protozoi vrátane *Trichomonas vaginalis*. In vivo účinok vykazuje voči nasledujúcim vaginálnym baktériám: *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp. a *Mycoplasma hominis* (Mirossay, 2021). Odporúčané dávkovanie metronidazolu na Slovensku pri bakteriálnych infekciách je u dospievajúcich vo veku 12 – 17 rokov 500 mg 2-krát denne počas 5 – 7 dní alebo jednorazovo 2000 mg a u dospelých je 500 mg 2-krát denne počas 7 dní alebo jednorazovo 2000 mg.

Liekom prvej voľby podľa WHO (World Health Organization) pri liečbe bakteriálnej vaginózy je metronidazol 500 mg užívaný 2-krát denne po dobu 7 dní, no táto liečba môže spôsobovať nežiaduce účinky ako nauzea, zvracanie a bolesti gastrointestinálneho traktu. Ďalšie možnosti terapie bakteriálnej vaginózy zahŕňajú 300 mg klindamycínu podávaného p.o. 2-krát denne po dobu 7 dní, 100 mg klindamycínu vo forme vaginálnych guličiek podávaných do pošvy raz denne po dobu 5 dní a aplikácia 0,75 % intravaginálneho

gélou s obsahom metronidazolu po dobu 5 dní alebo 2 % krém s obsahom klindamycínu aplikovaného do pošvy večer pred spaním po dobu 7 dní. Potrebné je zdôrazniť, že lokálna aplikácia klindamycínu môže poškodiť produkty na báze latexu (napr. prezervatív) a môžu spúšťať pseudomembranóznu kolitídu. Ak liečba metronidazolom alebo klindamycínom nie je tolerovaná, môže sa použiť liečivo tinidazol (látka podobná metronidazolu) vo forme perorálnych prípravkov s dávkou buď 2 g/deň počas 2 dní alebo 1 g/deň počas 5 dní. Niektoré zdroje uvádzajú efektivitu aj iných antimikrobiálnych látok, ako napríklad azitromycín, secnidazol, ornidazol alebo rifaximín. Secnidazol preukázal aktivitu podobnú používaným nitroimidazolom a zároveň neničí laktobacily, čo má výhodu pri liečbe bakteriálnej vaginózy. Rifaximín môže byť tiež prospešný pri liečbe, pretože dokáže obnovovať laktobacily a zvyšovať množstvo kyseliny mliečnej. Perorálna alebo lokálna liečba bakteriálnej vaginózy týmito liečivami má približne rovnakú efektivitu s úspešnosťou liečby v rozmedzí 58 % až 92 % po 1 mesiaci liečby. Tieto výsledky sú veľmi často len dočasné a infekcia sa vráti vo viac ako 50 % prípadoch do 6 až 12 mesiacov od liečby (Chacra, Fenollar, Diop, 2022).

Nakoľko liečba metronidazolom nebola pre pacientku dostatočná, čo mohlo byť spôsobené rôznymi príčinami, začala užívať probiotiká perorálne aj lokálne zavedením do pošvy. Probiotiká sú významnou súčasťou manažmentu stavov, kedy je u pacientky prítomný vulvovaginálny dyskomfort, teda porušenie rovnováhy mikroorganizmov vaginálneho prostredia, ktoré vedú k príznakom ako svrbenie, pálenie, výtoky alebo opuchy vulvovaginálnej oblasti. Sú vhodné preto aj pri bakteriálnej vaginóze, ale využitie majú aj pri vulvovaginálnej kandidóze. Ich využitie je vhodné z dôvodu ich schopnosti priamo alebo nepriamo redukovať počet ostatných mikroorganizmov v pošve, tým znižujú počet možných iritantov a zabraňujú prehnanej reakcii epitelu a podslizničných imunitných štruktúr. V dôsledku toho, že zloženie vaginálnej mikroflóry je odlišné u každej ženy, môžu mať probiotické prípravky u žien rôzny účinok, preto je

dôležitý individuálny prístup pri výbere probiotika. Podstatný je hlavne klinický efekt. Na základe štúdií bolo zistené, že lepšie výsledky dávajú kombinácie probiotík s inými liečivami v porovnaní s liečbou iba samotnými probiotikami. Probiotiká majú využitie skôr ako podporná liečba pri antimikrobiálnej terapii aj v dôsledku rôzneho zloženia mikrobioty žien a s tým spojeným rôznym účinkom jednotlivých prípravkov s obsahom probiotík (Jílek, Leško, Kestřánek, 2020).

Druhá kazuistika (žena, 33 rokov) sa týkala rekurentnej formy vulvovaginálnej kandidózy. Pri vulvovaginálnej kandidóze dochádza k premnoženiu *Candida* spp., pričom u tejto pacientky bola prítomná *C. albicans*. Pacientke bola predpísaná antimykotická liečba pozostávajúca z p. o. podávaného flukonazolu a lokálne podaného nystatínu v kombinácii s nifuratelom. Flukonazol patrí medzi azolové antimykotiká. Sú to syntetické zlúčeniny, ktoré majú spoločný základ, imidazolové jadro. K tejto skupine liečiv patria rôzne látky, ktoré sa používajú buď lokálne alebo systémovo. K systémovo pôsobiacim azolovým antimykotikám patrí okrem flukonazolu aj itraconazol, vorikonazol alebo posakonazol. Lokálne podávané azolové antimykotiká sú: ketokonazol, klotrimazol, flutrimazol, mikonazol a iné. Azolové antimykotiká majú fungistatický až fungicídny účinok. Ich hlavným mechanizmom účinku je poškodenie bunkovej membrány húb, hlavne cieleným narušením biosyntézy sterolov. Spôsob, ktorým to zabezpečujú, je inhibícia 14- α -demetylázy, čo je enzým cytochrómu P450, potrebný na premenu lanosterolu na ergosterol. Inhibíciou ergosterolu dochádza k porušeniu membrány fungálnej bunky a následne dochádza k stratám intracelulárneho draslíka. Na azolové antimykotiká môže vzniknúť rezistencia zmenou kvality alebo množstva cieľového enzýmu (lanosterol 14- α -demetylázy), znížením prístupu k tomuto enzýmu alebo ich kombináciou (Mirossay, 2021). Odporúčané dávkovanie flukonazolu na Slovensku je 150 mg ako jednorazová dávka, potom každý tretí deň 150 mg, následne udržiavacia dávka 150 mg raz týždenne po dobu 6 mesiacov.

Na lokálnu liečbu bol u pacientky použitý nystatín, ktorý patrí medzi polyénové antimykotiká. Je to širokospektrálne antimykotikum produkované *Streptomyces noursei*. Nystatín pôsobí fungistaticky alebo fungicídne, čo závisí od koncentrácie liečiva a citlivosti plesní k tomuto liečivu. Mechanizmus účinku spočíva vo väzbe na steroly. Môže sa viazať na steroly cicavčích aj fungálnych buniek, ale vyššiu afinitu má k ergosterolu kvasiniek ako cholesterolu u človeka. Touto väzbou vznikajú v membráne plesní póry a dochádza cez nich k úniku makromolekúl a iónov z bunky, čoho následkom je zánik bunky. Spektrum jeho účinku zahŕňa kvasinkové mikroorganizmy rodu *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon* a mykomycéty rodu *Aspergillus*. Daný prípravok obsahoval aj liečivo nifuratel, čo je chemoterapeutikum s výraznými antitrichomonádovými, antimykotickými a antibakteriálnymi účinkami. Využitie má pri vulvovaginálnych infekciách a výtokoch spôsobených rôznymi patogénmi, infekciách močových ciest a črevnej amebiáze a giardiáze (Mirossay, 2021).

Komplikovaná/rekurentná forma vulvovaginálnej kandidózy si vyžaduje dlhodobú liečbu na rozdiel od nekomplikovanej formy, kedy vo väčšine prípadov postačuje lokálna jednorazová liečba. V súčasnosti existuje viac možností liečby vulvovaginálnych kandidóz. V daných farmakologických skupinách je viac liečiv, ktoré je možné v týchto prípadoch použiť. Medzi konkrétnymi liečivami nie je významný rozdiel v úľave od symptómov a úspešnosť liečby je v týchto skupinách približne rovnaká. Na lokálnu liečbu pri miernych až normálnych symptómoch je možné použiť:

1. klotrimazol – 200 mg vaginálne tablety, raz denne (3 dni) alebo 500 mg vaginálne tablety jednorazovo
2. ekonazol – 150 mg vaginálne čapíky buď raz denne (3 dni) alebo 2 čapíky (1 deň)
3. fentikonazol – 600 mg vaginálna kapsula jednorazovo (pri relapse opakovať)
4. isokonazol – 150 mg vaginálne čapíky 2-krát denne (1 deň) alebo raz denne (3 dni), 600 mg vaginálne čapíky jednorazovo.

Alternatívna liečba pri ťažkej forme vulvovaginálnej kandidózy zahŕňa:

1. flukonazol – 150 mg p. o. jednorazovo, 50 mg p. o. raz denne (7 – 14 dní) alebo 100 mg p. o. raz denne (14 dní) pre pacientov s oslabenou imunitou
2. itrakonazol – 100 mg p. o. 2 x 2 kapsuly (1 deň) alebo 100 mg p. o. 1 x 2 kapsuly (3 dni)
3. nystatín – 100 000 IU vaginálne tablety (14 dní) alebo 200 000 IU vaginálne tablety (6 dní)
4. ciklopiroxolamín – 50 mg aplikátor, raz denne (6 – 14 dní).

Ak postihnú kvasinky aj vonkajšie orgány, odporúča sa použiť antimykotický krém (napr. klotrimazol) dvakrát denne počas 7 dní. Lokálna liečba v kombinácii s intravaginálnymi prípravkami dosahuje v praxi lepšie výsledky úľavy ako samostatná liečba, no zatiaľ je málo štúdií, ktoré by to mohli potvrdiť. To platí aj v opačnom prípade, pretože samostatná topická liečba krémom síce dočasne uľaví od symptómov, ale nemusí viesť k úplnému vyliečeniu a vyhubeniu plesní (Farr a kol., 2021).

Je dokázané, že vyvážená strava (zredukovanie cukru, zvýšená konzumácia ovocia, zeleniny a mliečnych výrobkov) má významnú úlohu pri liečbe vulvovaginálnych kandidóz. Z hľadiska správnej funkcie pohlavných orgánov a prevencie zápalov je dôležité, aby orgány dostávali z krvi produkty látkovej premeny: tuky, bielkoviny a sacharidy. Z metabolických produktov z krvi vzniká hlien, ktorý je potrebný na hydratáciu pošvy. Prevaha sacharidov, najmä jednoduchých cukrov, podporuje rozvoj abnormálnej vaginálnej mikroflóry a vytvára priaznivé prostredie pre množenie kvasiniek (Mizgier a kol., 2020). Ako bolo spomenuté, využitie pri liečbe majú aj probiotiká. Bolo vykonaných viac štúdií, ktoré potvrdili, že liečba antimykotikami v kombinácii s probiotikami bola efektívnejšia ako samostatná liečba antimykotikami (Shenoy a Gottlieb, 2019).

V tretej kazuistike (žena, 35 rokov) pacientka trpela stresovou inkontinenciou. Prvou voľbou v terapii tohto ochorenia bola konzervatívna liečba, ktorá

zahŕňala úpravu pitného režimu, zníženie frekvencie močenia a posilnenie svalov panvového dna.

Na posilnenie svalov panvového dna sa využívajú cviky nazývané aj Kegelove cviky. Tieto cviky sa môžu vykonávať kedykoľvek a v rôznych polohách. Môžu sa cvičiť v sede, v ľahu aj pri státí. Tieto cviky pomáhajú spevniť svaly nachádzajúce sa pod maternicou, močovým mechúrom a črevami. Princíp cvičenia je v kontrakcii správnych svalov, preto je dôležité v prvom rade zistiť, ktoré svaly je potrebné pri cvičení použiť. Nesmú sa zapájať sedacie, brušné ani stehenné svaly. Existuje viac spôsobov, ako zistiť, ktoré svaly je potrebné zapájať do cvičenia. Najjednoduchším spôsobom je predstaviť si, že chceme zastaviť močenie. Svaly, ktoré pri tom zapojíme sú presne tie, ktoré je potrebné pri cvičení sťahovať. Neodporúča sa však tieto kontrakcie prevádzať počas močenia, pretože by to mohlo viesť k ešte väčšiemu oslabeniu svalov a nedostatočnému vyprázdneniu močového mechúra. Ďalším spôsobom je vložiť si do pošvy prst a pokúsiť sa okolo neho zatnúť svaly. Tie isté svaly potom využívame počas cvičenia. Pred začiatkom cvičenia sa odporúča nájsť si pohodlnú polohu a príjemné prostredie. Väčšina ľudí preferuje cvičenie Kegelových cvikov pri ležaní na posteli alebo sedení na stoličke. Ak má pacientka s týmito cvikmi dostatočné skúsenosti, je možné ich vykonávať kedykoľvek, napríklad aj v autobuse, obchode a podobne. Cviky je potrebné vykonávať s prázdny močovým mechúrom. Postup pri cvičení je nasledovný: 1. hlboko sa nadýchneme nosom, pričom svaly panvového dna ostávajú relaxované, 2. pomaly a plynulo vydýchneme ústami a zároveň jemne sťahujeme svaly panvového dna, 3. svaly udržíme stiahnuté 3 až 6 sekúnd (kým sa svaly nezačnú unavovať) počas toho, ako vydychujeme (tento krok sa nazýva kontrakcia), 4. znovu sa nadýchneme a uvoľníme kontrakciu svalov, 5. svaly necháme oddýchnuť 6 až 10 sekúnd. Je veľmi dôležité kompletne relaxovať svaly medzi každou kontrakciou a nezadržiavať dych. Vždy je potrebné mať svaly uvoľnené rovnaký alebo dlhší čas ako boli stiahnuté. Toto cvičenie opakujeme 10-krát za sériu. Ak svaly nie sú unavené po 3 – 6 sekundovej kontrakcii,

zvýšime tento čas na 6 – 10 sekúnd s následnou 10 sekundovou relaxáciou. Cieľom je zväčšovať dĺžku kontrakcií a dokázať držať silnú kontrakciu počas 10 sekúnd 10-krát po sebe. Denne by sa malo vykonať približne 30 – 40 cvičení rozdelených na viac častí (nie všetky naraz). Vhodné je praktikovať aj krátke (2 – 3 sekundové) kontrakcie a uvoľnenia. Pri stresovej inkontinencii je možné toto cvičenie použiť aj tesne pred zakašľaním, kýchnutím alebo dvíhnutím predmetu, a tým zabrániť úniku moču. Najdôležitejšie je s týmito cvikmi neprestať aj po odznení ťažkostí, pretože svaly môžu znovu ochabnúť a znovu spôsobovať únik moču (MedlinePlus, 2021).

Kedysi sa pri stresovej inkontinencii predpisovali aj α -adrenergickí agonisti (napr. pseudoefedrín, fenylefrín), pretože majú efekt na receptory v močovej trubici a močovom mechúri. Podľa FDA (Food and Drug Administration) nie je pri stresovej inkontinencii odporúčaná žiadna farmakologická liečba v dôsledku nežiaducich účinkov a vyššej účinnosti konzervatívnej liečby v porovnaní s α -adrenergickými agonistami (Hu a Pierre, 2019). Napriek tomu autori (Handler a Rosenman, 2019) uvádzajú, že vplyv na zlepšenie symptómov pri stresovej inkontinencii má estrogén podávaný intravaginálne, ktorý prispieva k zvýšenému prekrveniu uretry. Odporúčané dávkovanie je každý večer pred spaním po dobu niekoľkých týždňov a následne aspoň dvakrát týždenne. Systémovo pôsobiace estrogény nie sú účinné a môžu naopak zhoršiť priebeh stresovej inkontinencie.

Štvrtá kazuistika (žena, 22 rokov) sa zaoberá pacientkou so sekundárnou amenoreou. Existuje množstvo príčin, ktoré môžu mať za následok zastavenie menštruácie. Najčastejšou príčinou sekundárnej amenorey je prítomnosť cysty na vaječníku, čo sa obvykle rieši podaním dydrogesterónu.

Dydrogesterón je syntetický analóg progesterónu, čo je hormón produkovaný vaječníkmi z *corpus luteum* po ovulácii a vo veľmi malých množstvách je produkovaný aj kôrou nadobličiek. Molekulový mechanizmus účinku všetkých steroidných hormónov je podobný. Progesterón dokáže interagovať s receptorami estrogénov, androgénov aj glukokortikoidov. Es-

trogénové receptory sú situované priamo v jadre bunky. Aktivované estrogénové receptory v jadre bunky ER α a ER β spôsobujú spustenie transkripčných a signalizačných procesov, ktoré kontrolujú expresiu zodpovedajúcich génov (Mirossay, 2021). Odporúčané dávkovanie dydrogesterónu na Slovensku na liečbu sekundárnej amenorey je 10 mg alebo 20 mg denne počas 14 dní v druhej polovici predpokladaného menštruačného cyklu.

Liečba ovariálnych cýst má niekoľko možností, ale v konečnom dôsledku manažment tohto ochorenia je závislý od veku pacientky, veľkosti cysty a od prípadnej malignity. Unilokulárne (jednokomorové) cysty menšie ako 10 cm sú zvyčajne benígne bez ohľadu na vek pacientky, a preto, keď je pacientka asymptomatická, je možné ju sledovať pomocou ultrazvuku a nie je potrebný žiadny zásah, pretože väčšina cýst časom spontánne zmizne. Ak cysta po niekoľkých menštruačných cykloch nevymizne, je nepravdepodobné, že ide o funkčnú cystu a je indikované ďalšie vyšetrenie. Indikácie pre chirurgické odstránenie cysty zahŕňajú podozrenie na torziu/priškrtenie vaječníkov, pretrvávajúca adnexálna hmota, akútna bolesť v oblasti brucha a podozrenie na malignitu. Tento zákrok sa vykonáva najčastejšie laparoskopicky. U predmenopauzálnych žien sa počas chirurgického zákroku dáva dôraz na zachovanie plodnosti pacientky, a preto sa vždy odstraňuje čo najmenšie možné množstvo tkaniva vaječníkov (Mobeen a Apostol, 2021).

ZÁVER

Gynekologické ochorenia najčastejšie postihujú ženy v reprodukčnom veku, kedy je pohlavná sústava ženy najaktívnejšia, čo sa potvrdilo aj pomocou prieskumu. Zistili sme, že 64 % žien, u ktorých sa vyskytlo gynekologické ochorenie v priebehu 5 rokov (2016 – 2021) bolo v reprodukčnom veku (15 – 45 rokov). Faktom ostáva aj skutočnosť, že najviac vyskytujúcim sa ochorením sú gynekologické infekcie, ktoré predstavovali 31 %. Výskyt inkontinencie a porúch menštruačného cyklu bol v tomto prípade nižší. Poruchy menštruačného cyklu sa vyskytli u 20

% žien, inkontinencia u 17 % žien a ostatné ochorenia tvorili podiel 15 %.

Terapeutické postupy vybraných gynekologických ochorení používaných na Slovensku v porovnaní so zahraničnou literatúrou sa líšia len minimálne. Na terapiu gynekologických infekcií sú používané liečivá s účinkom proti konkrétnym patogénom spôsobujúcim tieto ochorenia. Pri terapii inkontinencie sa uprednostňuje konzervatívna liečba. Z výsledkov dotazníka vyplýva, že farmakologickú alebo viac invazívnu terapiu podstúpilo len 15 % žien a prevažná väčšina buď tento problém neriešila, alebo im pomohla úprava režimu. Diagnostika a terapia sekundárnej amenorey je zložitá v dôsledku množstva príčin, ktoré ju môžu spôsobovať. Na základe prieskumu v gynekologickej ambulancii sme zistili, že najčastejšou príčinou sekundárnej amenorey boli cysty na vaječníku. Považujeme za potrebné poukázať na množstvo žien (viac ako polovica respondentiek), ktoré s týmto problémom nenavštívili lekára. Predpokladáme, že tento trend je podobný aj pri ostatných gynekologických ochoreniach.

Niektorým ochoreniam sa dá predchádzať aj správnu úpravou stravovania, zvýšením pohybovej aktivity, znížením hmotnosti, úpravou zvykov alebo užívaním doplnkov stravy (napr. probiotiká).

Mnohé ochorenia reprodukčného systému žien môžu spôsobiť infertilitu až sterilitu, a preto považujeme za dôležité, aby boli ženy dostatočne informované o funkcii reprodukčného systému, nemali zábrany a v prípade potreby vyhľadali odbornú pomoc.

ZOZNAM LITERATÚRY

Chacra, L. A., Fenollar, F., Diop, K.: Bacterial vaginosis: what do we currently know? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 11, 672–429.

Farr, A., Effendy, I., Frey Tirri, B., Hof, H., Mayser, P., Petricevic, L., Ruhnke, M., Schaller, M., Schaefer, A. P. A., Sustr, V., Willinger, B., Mendling, W.: Guideline: Vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072, level S2k). *Mycoses*, 2021, 64 (6), 583 –

602.

Handler, S. J., Rosenman, A. E.: Urinary incontinence: evaluation and management. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 2019, 62 (4), 700 – 711.

Hu, J. S., Pierre, E. F.: Urinary incontinence in women: evaluation and management. *American Family Physician*, 2019, 100 (6), 339 – 348.

Jílek, P., Leško, D., Kestránek, J.: Probiotika v gynekológii [Probiotics in gynecology]. *Praktické lékárenství*, 2020, 16 (1), 12 – 16.

Kalia, N., Singh, J., Kaur, M.: Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2020, 19, 5.

Klein, D. A., Paradise, S. L., Reeder, R. M.: Amenorrhea: a systematic approach to diagnosis and management. *American Family Physician*, 2019, 100 (1), 39 – 8.

Kónyová, Z.: Systematika antibiotík [Systematics of antibiotics], 2019. <<https://www.ruvztn.sk/systematika%20ATB.pdf>>. [cit. 2022-03-10].

MedlinePlus, *Kegel exercises – self-care*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), 2021. <<https://medlineplus.gov/ency/patientinstructions/000141.htm>>. Accessed March 8, 2022.

Mirossay, L., Mojžiš, J.: *Základná farmakológia a farmakoterapia* [Basic Pharmacology and Pharmacotherapy]. 2. vyd. Košice: Equilibria, 2021, 1162 s.

Mizgier, M., Jarzabek-Bielecka, G., Mruczyk, K., Kedz, W.: The role of diet and probiotics in prevention and treatment of bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis in adolescent girls and non-pregnant women. *Ginekologia Polska*, 2020, 97 (7), 412 – 416.

Mobeen, S., Apostol, R.: *Ovarian cyst. StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560541/>>. Accessed January 10, 2022.

Shenoy, A., Gootlieb, A.: Probiotics for oral and vulvovaginal candidiasis: A review. *Dermatologic therapy*, 2019, 32 (4), 2970.



FARMAKOTERAPIA VYBRANÝCH UROGENITÁLNYCH INFEKCIÍ V GRAVIDITE

PHARMACOTHERAPY OF SELECTED UROGENITAL INFECTIONS IN PREGNANCY

¹Takáč, Peter; ²Kužmová, Sofia

¹Katedra farmakológie a toxikológie
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73,
041 81 Košice

²Lekáreň Dr. Max 95 s. r. o., Košická 6, 080 01 Prešov
Slovenská republika

peter.takac@uvlf.sk

ABSTRAKT

Infekcie urogenitálneho traktu sú problémom, s ktorým sa stretávajú tisíce ľudí po celom svete. Urogenitálne infekcie postihujú vo veľkej miere aj tehotné ženy a predstavujú veľkú terapeutickú výzvu kvôli komplikáciám, ktoré prinášajú vysoké riziko ako pre matku, tak i pre jej dieťa. Samotné tehotenstvo je stav, ktorý súvisí s fyziologickými, štrukturálnymi a funkčnými zmenami močových ciest. Tieto zmeny následne môžu podporovať vzostupné infekcie z močovej trubice od asymptomatickej bakteriúrie po štádium akútnej pyelonefritídy.

V tejto štúdii sa zaoberáme farmakoterapiou používanou pri jednotlivých klinických formách infekcií močových ciest, jej správnosťou a bezpečnosťou. Taktiež skúmame potenciál probiotík v prevencii a liečbe urogenitálnych infekcií.

Kľúčové slová: antibiotiká; gravidita; probiotiká; urogenitálne infekcie

ABSTRACT

Urogenital tract infections are a problem facing thousands of people around the world. Urogenital infections also affect pregnant women to a large extent and pose a major therapeutic challenge due to complications that pose a high risk to both the mother and her baby. Pregnancy itself is a condition associated with physiological, structural and functional changes in the urinary tract. These changes may subsequently promote ascending urinary tract infections from asymptomatic bacteriuria to the stage of acute pyelonephritis.

In this study we deal with the use of pharmacotherapy for individual clinical forms of urinary tract infections, its correctness and safety. We also

investigate the potential of probiotics in the prevention and treatment of urogenital infections.

Key words: antibiotics; pregnancy; probiotics; urogenital infections

ÚVOD

Urogenitálne infekcie postihujú častejšie ženy, a to najmä ženy v reprodukčnom veku a v období tehotenstva kvôli predispozičným fyziologickým a štrukturálnym zmenám (kratšia močová trubica, stáza moču). U tehotných žien rozlišujeme asymptomatickú formu bakteriúrie, cystitídu a pyelonefritídu. Všetky infekcie sa u gravidných žien klasifikujú ako komplikované a mali by byť vždy liečené (liečba je obmedzená oproti bežnej populácii). Včasná diagnostika (9. až 17. týždeň) a adekvátne liečba asymptomatických infekcií znižuje riziko komplikácií u matky a plodu (pyelonefritída, sepsa, predčasný pôrod a nízka pôrodná hmotnosť).

Konvenčná stratégia liečby UTI (urogenitálne infekcie) zahŕňa empirickú alebo prispôbenú antibiotickú terapiu. Antibiotiká (ATB) predstavujú v tomto prípade štandardnú liečbu a výber správneho antibiotického režimu závisí od typu uropatogénu, jeho rezistencie, gestačného veku, recidív a klinického úsudku, pričom treba brať ohľad aj na zmeny farmakokinetiky liečiva v gravidite. Ich nadmerné užívanie však môže prispieť k rozvoju antimikrobiálnej rezistencie. V rámci doplnkovej terapie je relatívne bezpečná prírodná liečba a v poslednej dobe sa umocňuje aj postavenie probiotík v prevencii a terapii urogenitálnych infekcií. Veľmi dobré výsledky prináša kombinovaná liečba probiotík s antibiotikami a antimykotikami. Preventívne správanie je v súčasnosti najlepšou možnosťou, ako znížiť výskyt UTI a vyhnúť sa užívaniu antibiotík v tehotenstve.

MATERIÁL A METÓDY

Dáta o aktuálnej farmakoterapii urogenitálnych infekcií v gravidite sme získali skúmaním a porovnáva-

ním informácií z 3 oblastí:

- analýza vybraných kazuistík
- analýza preskripcie
- online dotazník.

Pod vedením odbornej konzultantky z klinickej praxe, pani doktorky MUDr. Zuzany Luteránovej, sme použili 4 kazuistiky tehotných žien podstupujúcich liečbu a hospitalizácie kvôli UTI. Okrem údajov z použitej ambulantnej terapie sme použili aj doložené lekárske správy z hospitalizácií v nemocnici, vďaka čomu sme vedeli zhodnotiť nasledovnú nasadenú terapiu. Informácie boli čerpané z liekových kariet pacientok pod dohľadom a so súhlasom pani doktorky a všetko prebiehalo v súlade s o zákonom č.18/2018 Z. z o ochrane osobných údajov a o zmene a doplnení niektorých zákonov.

Z pozície farmaceuta pracujúceho v lekární (Dr. Max) sme preskúmali a získali dáta z lekárskeho receptov (121 receptov) o type a frekvencii predpisovaných liečiv ako aj o veku postihnutých žien. Jednotlivé údaje z lekárskeho predpisov sme zhrnuli do tabuľky pomocou Microsoft Word. Zber údajov sa uskutočnil od septembra 2021 do augusta 2022.

Online dotazník doplnkovo slúžil na porovnanie a potvrdenie alebo vyvrátenie typu liečiv predpisovaných na liečbu UTI v tehotenstve. Nejedná sa o štandardizovaný dotazník. Otázky boli zostavené podľa potreby porovnávania a nášho uvažovania. Dotazník bol dostupný na internete od marca 2022 do augusta 2022, pričom ho vyplnilo 120 žien. Bol vytvorený na stránke www.survio.sk. Otázky boli zamerané na vek, štádium tehotenstva, postup liečby a prevenciu. Jednotlivé odpovede sme spracovali pomocou tabuliek a grafov s využitím Microsoft Excel a Microsoft Word.

VÝSLEDKY

Výsledky štúdie prezentujeme v tabuľkách 1 – 4.

1. Analýza kazuistík

Tab. 1: Kazuistiky

Kazuistika	Vek	Štádium tehotenstva	Symptómy	Hospita-lizácia	Terapia
Pacientka s hydronefrózou	25 rokov	25. týždeň 2. trimester	kolika, horúčka	1x	ATB, spazmolytiká
Pacientka so zavedením stentom a suspekciou na PLN	34 rokov	23. týždeň 2. trimester	kolika, horúčka, triaška (s postupným vymiznutím)	nie	ATB, zavedenie stentu
Pacientka s vrodenou hydronefrózou po IMC	38 rokov	7. týždeň	bolesť v pravom boku bez horúčky	áno opakovane	ATB celkové a lokálne, spazmolytiká, stent
Pacientka s GBS	34 rokov	29. týždeň 3. trimester	výtok bez iných príznakov	nie	ATB celkové a lokálne

2. Online dotazník

Tab. 2: Údaje z online dotazníka

Vek		Štádium tehotenstva		Urogenitálne infekcie			Terapia	Prevencia	
18 – 25 rokov	23,33 %	1. trimester	5 %	mimo tehotenstva		počas tehotenstva	atb	áno	76,66 %
				áno	54 %	50 %	atb + probiotiká	nie	23,33 %
26 – 35 rokov	58,33 %	2. trimester	9 %	nie	38 %	45 %	probiotiká		
36 – 40 rokov	8,3 %	3. trimester	18 %	neviem	8 %	5 %	bez liečby		
41 rokov	10 %	aktuálne bez gravidity	68 %						

3. Analýza lekárskeho predpisov

Tab. 3: Vek pacientok z receptov

Vek	Počet pacientok
18 – 25 rokov	36 (29,75 %)
26 – 35 rokov	81 (66,94 %)
36 – 40 rokov	5 (4,13 %)

DISKUSIA

V tabuľke 4 sú uvedené liečivá najviac uvádzané v dotazníku a predpisované lekármi na receptoch.

Kontrolné laboratórne vyšetrenie moču je súčasťou vstupného vyšetrenia v poradni tehotných žien. Bak-
terie odhalené kultiváciou moču vieme identifikovať

Tab. 4: Liečivá používané v tehotenstve

Liečivo	Liek	Lekársky predpis	Online dotazník
Nifuratel + nystatín	Macmiror complex	23	20
Trimetoprim + sulfametoxazol	Biseptol	13	4
Cefuroxim Cefprozil (2. generácia)	Zinnat, Xorimax Cefzil	11	14
Fosfomycín tromentadol	Monural	12	5
Aminopenicilín + inhibitor betalaktamázy	Unasyn, Amoksiklav, Augmentin, Medoclav, Penlac, Betaclav, Megamox	9	5
Aminopenicilíny	Duomox, Ospamox	3	3
Metronidazol	Entizol supp.	4	3
Klindamycín	Dalacin 2 % crm. vag.	5	0
Ciprofloxacín	Ciphin, Ciplox, Ciprinol, Medociprin, Ciprofloxacín Sandoz a Teva	1	0
Norfloxacín	Nolicín	0	2
Klotrimazol	Candibene tbl. vag./crm., Canesten tbl. vag./crm., Clotrimazol AL 100 tbl. vag., Clotrimazol AL 200 tbl. vag.	17	2
Butokonazol	Gynazol 2 % crm. vag.	7	2
Fentikonazoliumnitrát	Lomexin 2 % crm. vag.	2	0
Nifuratel + polymyxín B + nystatín	Polygynax cps. vag.	6	0
Dekvalíniumchlorid	Fluomizín tbl. vag.	2	0

kvalitatívne, ale aj kvantitatívne a následne stanovením ich citlivosti na rôzne antibiotické liečivá získavame údaje pre racionálnu terapiu.

Veľmi častou komplikáciou súvisiacou s UTI sa ukázala v kazuistikách hydronefróza. Fyziologická hydronefróza sa objavuje u 80 % žien. Je to spôsobené tým, že obličky sa počas gravidity zväčšujú v dĺžke i objeme (Cheung a Lafayette, 2013). Zväčšenie obličiek v priemere o 30 % sa pripisuje zvýšenému prietoku krvi, objemu tekutiny v interstíciu a dilatácii močových ciest. Najmä mechanickým tlakom dochádza k stavu fyziologickej hydronefrózy (až 300 ml) viac vpravo a možnej pyelonefritíde (Kohlhepp a kol., 2018). Chavan s kolektívom (2021) uvádzajú, že aj fyziologicky prítomná dilatácia močových ciest môže prejsť do symptomatickej fázy s prejavom

koliky, čo bolo prítomné aj v kazuistikách. Režimové opatrenia na zmiernenie hydronefrózy v prípade druhej pacientky nedosahovali požadovanú úľavu, a preto bolo potrebné zvoliť liečbu chirurgickú (zavedenie JJ stentu). Zavedenie JJ stentu počas gravidity je bezpečné, účinné, málo invazívne a prebieha v lokálnej anestézii. Iracká štúdia z roku 2013 a nová štúdia z Indie odporúča aplikovanie stentu ako liečbu prvej línie u tehotných žien s kolikami a rezistenciou na farmakoterapiu (Ngai, 2013; Chavan a kol., 2021). Klinické štúdie uvádzajú, že hydronefróza sa najčastejšie diagnostikuje koncom druhého a začiatkom tretieho trimestra s pravostrannou prevahou, čo je aj prípad našich kazuistík (Wang a kol., 2022). Následné pozitívne bakteriologické kultúry v moči druhej pacientky a pretrvávajúce symptómy si vyža-

dovali dlhodobú liečbu antibiotikami až do pôrodu s následným používaním imodulancií v dôsledku recidív. Imunomodulanciá s obsahom lyzátov *E. coli* v klinických štúdiách preukazujú vysokú, viac ako 50 % účinnosť voči rekurentným IMC (Krčméry a kol., 2010). Nebezpečnú kolonizáciu v tehotenstve spôsobuje okrem iných *Streptococcus agalactiae*. Skrining infekcie GBS by mal byť vykonaný u všetkých tehotných žien (35. – 38. týždeň) okrem tých, ktoré mali pozitívny výsledok na GBS kedykoľvek počas tehotenstva. V prípade pozitívneho výsledku nie je indikovaná liečba pred pôrodom, pretože v takomto prípade je vždy nutné podať antibiotiká intravenózne od prijmu na pôrodnú sálu (najlepšie 4 hodiny pred pôrodom) až do pôrodu. Táto intravenózna liečba sa zahajuje aj pri predčasnom odtoku plodovej vody hneď po prijme na sálu (Hájek a kol., 2014).

Štádium tehotenstva značne ovplyvňuje možnosti farmakoterapie v prípade výskytu urogenitálnych, ale aj iných infekcií. Najrizikovejší je prvý trimester tehotenstva, kedy prebieha najdôležitejšia časť vývoja plodu.

Nadpolovičná väčšina (54 %) opýtaných žien už pred tehotenstvom mala skúsenosť s výskytom infekcie urogenitálneho aparátu, čo je možné dať do súvislosti s náchylnosťou k UTI počas tehotenstva. Dotazník ukázal, že výskyt urogenitálnych infekcií v období tehotenstva je pomerne vyrovnaný s neprítomnosťou infekcie. Štúdia Naidoo a kolektívu z Južnej Afriky (2021) zahŕňala 416 receptov (184 tehotných žien), ktoré boli liečené antibiotikami. Bolo zistené, že UTI sú tretou najčastejšie liečenou infekciou v tehotenstve použitím antibiotík.

Najväčšie percento infekcií postihovalo ženy v 2. trimestri gravidity. Tretí trimester gravidity bol u 32 % tehotných žien obdobím výskytu infekcie oproti 27 %, ktoré zažili UTI v prvom trimestri. Porovnateľné s týmito výsledkami boli aj kazuistiky, kde u dvoch žien prebiehala infekcia v období druhého trimestra. Ďalšiu rodičku zasiahla UTI v prvom trimestri, ale pokračovala až do druhého trimestra a jedna z nich prekonal UTI v treťom trimestri. V porovnaní so štúdiou zo zahraničia sa údaje trochu líšia. Údaje získané

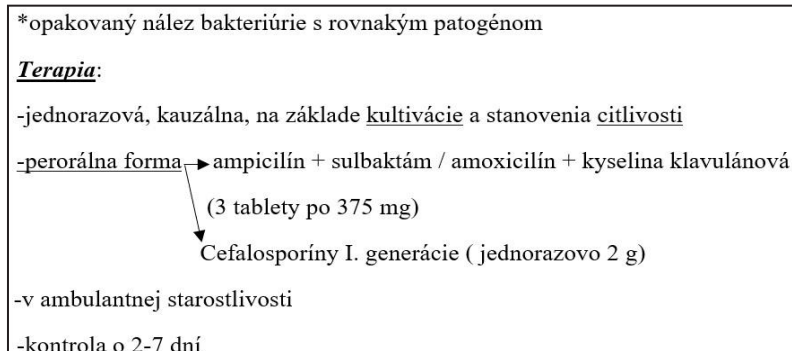
z veľkej štúdie zas preukázali najvyššie percento (41 %) infekcie urogenitálneho traktu u tehotných žien v prvom trimestri, 22 % v období druhého trimestra a 11,8 % v treťom trimestri (Allen, 2018). Viaceré štúdie neodporúčajú užívanie liekov v prvom trimestri, pretože plod sa stále vyvíja. Nedávny prehľad Cochrane hodnotil používanie antibiotík v druhom a treťom trimestri a zistilo sa, že riziko sa nezvýšilo v období týchto trimestrov. Spoločný záver autorov však poukazuje na to, že dôkazy nie sú dostatočné na úplné vyhodnotenie možného poškodenia plodu (Thinkhamrop a kol., 2015).

Napriek týmto výsledkom sme zistili, že ženy sa v 23 % prípadov liečia bez odbornej konzultácie lekárom a spoliehajú sa na to, že infekcie ustúpia samé, resp. že ich dokážu potlačiť domácou liečbou. Podstatná časť žien volí správnu voľbu pri výskyte UTI a tou je návšteva lekára, ktorý môže hneď v začiatku zahájiť logickú liečbu na základe získaných výsledkov. Lekár má k dispozícii možnosti presnej diagnostiky, čo zamedzí nesprávnemu určeniu diagnózy a zbytočnej liečbe. Iba 9 % navštívi lekárňu, ktorá je miestom prvého kontaktu, kde lekárnici vedľa odborne poradiť a zvoliť typ liečiva. Avšak v lekárni sa lieky volia na základe symptómov udávaných pacientom, ktoré môžu byť často nepresné a zvolená liečba sa môže stať neúčinnou. 4 % žien sa nelieči pri výskyte infekcií urogenitálneho traktu.

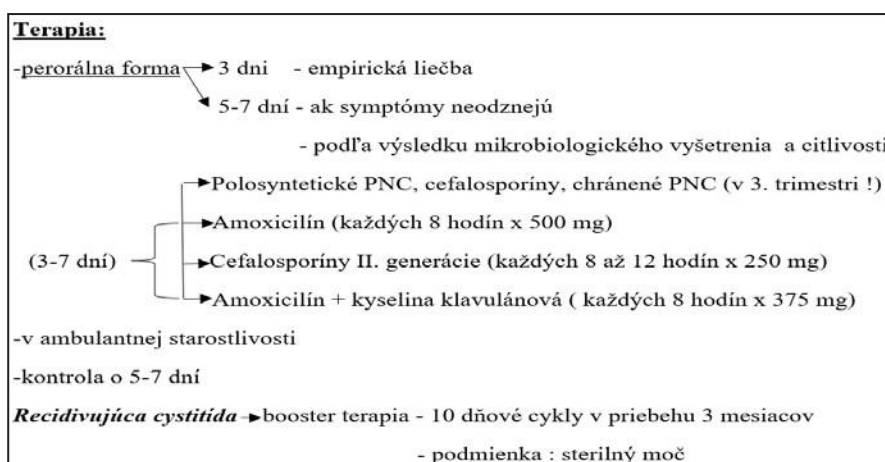
Návšteva lekára a nasadenie antibiotík bola najčastejšou odpoveďou v otázke o liečbe. Početnosťou rovnaké zastúpenie mali lokálne probiotiká, ktoré si ženy vedľa vyzdvihnúť v lekárni bez predpisu na odporúčanie lekárničky alebo lekára. Druhou najčastejšou odpoveďou bolo užívanie kombinácie antibiotika a probiotika.

Dnešná doba ukazuje, že užívanie antibiotík v tehotenstve exponenciálne rastie. Zo štúdií vyplýva, že každá štvrtá tehotná žena má predpísané antibiotikum (Bookstaver a kol., 2015). V štúdiu z Južnej Afriky boli ako najčastejšie predpisované antibiotiká hlásené penicilíny (39,7 %); makrolidy (13,0 %) a kombinované penicilíny s inhibítormi beta-laktamázy (12,3 %) (Naidoo a kol., 2021). Ďalšie literárne zdroje uvá-

Obr. 1: Zásady terapie asymptomatickej bakteriúrie



Obr. 2: Zásady terapie cystitídy



dzajú, že beta-laktámové antibiotiká tvoria približne 65 % všetkej antibiotickej liečby používanej počas tehotenstva, pričom 30 % zastupujú penicilíny (Bookstaver a kol., 2015). Štúdiá vykonaná profesorkou Allen v roku 2018, pod záštitou Centra pre kontrolu a prevenciu chorôb, zastrešuje 34 864 tehotných žien, u ktorých sa vyskytli UTI. Ako najfrekvencovanejšie predpisovanými antibiotikami počas tehotenstva sa v tejto štúdií ukázali nitrofurantoin, cefalosporíny a penicilíny. Kazuistiky, dotazník a aj lekárske predpisy preukázali pomerne rovnaké zastúpenie predpisovaných antibiotických liečiv určených na terapiu.

Najčastejšie uvádzanou diagnózou na lekárske predpisoch bola diagnóza O 23.9 (Iná a nešpecifiko-

vaná infekcia močovopohlavnej sústavy v ťarchavosti).

Vhodné antibiotikum pre tehotné ženy by malo spĺňať všeobecné kritériá, ako je dobrá vstrebateľnosť po perorálnom podaní, následne vysoké koncentrácie liečiva v moči a samozrejme čo najmenej nežiaducich účinkov a nízky stupeň toxicity (Mašata a kol., 2006). Európska asociácia urológov najnovšie odporúča využívať 3 – 5-dňové režimy namiesto 7-dňových (Bonkat a kol., 2022). Podľa získaných údajov zo štúdií a odporúčaní sme spracovali zásady liečby jednotlivých UTI, ktoré sú uvedené na obrázkoch nižšie.

Ľahšou cestou, ako liečiť infekcie urogenitálneho

Obr. 3: Zásady terapie pyelonefritídy

Terapia:	
-hospitalizácia + odber moču cievkovaním na kultiváciu	
-bezodkladná <u>intravenózna</u> liečba; empiricky, pokiaľ nebudú dostupné výsledky kultivácie	
-pokoľový režim na lôžku + hydratácia pacientky (pitný režim a intravenózne 150ml/hod)	
-antipyretická liečba (paracetamol 500-1000 mg 3 až 4 x denne, maximálne 4000mg)	
- i.v. terapia do vymiznutia klinických príznakov s následnou pokračovacou p.o. liečbou = 14 dní	
-kontrola po 2 dňovej i.v. terapii	} opakovať kultiváciu spontánnym vymočením
po 4 dňovej terapii	
2-3 dni pred koncom p.o. terapie	
- <u>odporúčanie po skočení liečby</u> : tzv. NOČNÉ KRYTIE (2-4 týždne podávať rovnaké ATB v p.o. forme v dávke ako pri jednorazovej terapii)	
Zvážiť súčasné/ následné používanie imunoterapeutiká	
Cefalosporíny II. a III. generácie	} + i.v. aminoglykozidy (gentamycín)
Cefalosporíny IV. generácie (len septické stavy)	
Chránené PNC (druhá polovica gravidity, 3. trimester)	
Recidivujúca pyelonefritída	
-terapia ako pri 1. vzplanutí, no <u>cielená</u> na základe zistenej citlivosti + imunoterapia	
-po prepustení z nemocnice → dlhodobá profylaxia = nočné krytie (ATB+ imunomodulans)	

traktu, je úspešne im predchádzať. Respondentky ako najčastejšiu možnosť preventívnych opatrení uvádzajú pravidelnú intímnu hygienu s vhodným intímnym gélom na to určeným. Ako ďalšie možnosti uviedli pravidelné lekárske prehliadky a preventívne užívanie probiotík.

Pri každej liečbe antibiotikami je nielen vhodné, ale aj potrebné človeku odporučiť užívanie probiotík, aby sa predišlo nežiaducim účinkom antibiotík na mikroflóru čreva a vagíny. Medzi antibiotikom a probiotikom je potrebné dodržať časový odstup ideálne 2 až 4 hodiny, aby sa zabránilo zneškodneniu probiotického obsahu antibiotikom. Najčastejšie sa na obnovenie vaginálnej mikroflóry používajú probiotiká obsahujúce *Lactobacillus rhamnosus*, *fermentatum*, *acidophilus*, *plantarum*, *casei*, *delbrueckii*, *gasseri*. Výsledky klinických štúdií skúmajúcich použitie probiotík na prevenciu a liečbu iných ochorení nie sú postačujúce, ale predpokladá sa rovnako prospešný účinok aj pri liečbe urogenitálnych infekcií, alergií, či iných gas-

trointestinálnych ochorení alebo infekcií dýchacích ciest (Hanson a kol., 2016).

ZÁVER

Farmakoterapia a postupy skúmané v kazuistikách boli v súlade s celosvetovými usmerneniami a štúdiami. V prípade jednej kazuistiky sme odhalili neopodstatnenú liečbu antibiotickým liečivom. Takéto situácie nadbytočnej a zbytočnej terapie by mali byť eliminované, pretože nadmerné a nesprávne užívanie antibiotík podporuje rozvoj antimikrobiálnej rezistencie (AMR).

Informácie získané od laickej verejnosti formou neštandardizovaného dotazníka nám ukázali, ako ženy postupujú pri riešení komplikácií zdravotného stavu a koľko z nich využíva možnosti racionálnej farmakoterapie. Návšteva lekára je stále prvou voľbou pri výskyte dyskomfortu u tehotných žien a návšteva lekární je podstatne menej často využívaná voľba.

Liečivá, ktoré ženy uvádzali, sú pomerne bezpečné, ale napriek tomu sa vyskytli 2 prípady antibiotického liečiva s kontraindikáciou v tehotenstve. Probiotická profylaxia a liečba majú veľký potenciál v budúcnosti v oblasti urogenitálnych infekcií. Ich najväčšou výhodou je, že sa môžu používať bez nejakých vážnejších obmedzení, čiže aj počas tehotenstva.

Pri analýze preskripcie na jednotlivých lekárskech predpisoch nebola nami zistená žiadna chybná preskripcia. Na kontrolu bezpečnosti liečiv v tehotenstve sme využívali 3 hodnotiace systémy (FDA, ADEC a SPC). Podľa nášho názoru je FDA klasifikácia najvhodnejšia na hodnotenie rizika v tehotenstve. Čo sa týka klasifikácie rizika liečiv, tak najprísnejší je súhrn charakteristických vlastností lieku. Avšak na druhej strane je aj veľmi všeobecný, nepresný a príliš opatrný v tvrdeniach. Neuvádza presné informácie o riziku použitia liečiva v tehotenstve a skoro pri všetkých skúmaných liečivách je uvedený rovnaký text o obmedzených údajoch o bezpečnosti, ktorý uvádza, že odporúča užívanie liečiva len ak to zväží lekár a benefit preváži riziko. Dôvodom týchto chýbajúcich informácií sú etické obavy, ktoré obmedzujú dostupnosť klinických dôkazov.

Súhrne možno povedať, že liečba infekcií urogenitálneho traktu u tehotných žien na Slovensku má ešte značné medzery. Neexistuje vhodné usmernenie na určenie bezpečnosti liečiv a taktiež postup pre ambulantnú a nemocničnú terapiu. Niekedy sa liečba nezákladá na výsledkoch klinických štúdií, ale na zvyku lekárov.

ZOZNAM LITERATÚRY

Allen, R. H.: Which antibiotics are safe in the first trimester of pregnancy? *OB/GYN. Clinical Alert*, 2018. <<https://www.reliasmedia.com/articles/142236-which-antibiotics-are-safe-in-the-firsttrimester-of-pregnancy>>. Accessed September 2, 2021.

Bonkat, G., Bartoletti, R., Bruyère, F., Cai, T., Geerlings, S. E., Köves, B., Schubert, S., Pilatz, A., Veeratterapillay, R., F., Wagenlehner Guidelines

Associates: Devlies, W., Horváth, J., Mantica, G., Mezei, T., Pradere, B., Guidelines Office: Smith, E. J.: EAU Guidelines on Urological Infections. *European Association of Urology*, 2022. <<https://uroweb.org/guidelines/urological-infections>>. Accessed August 24, 2022.

Bookstaver, P. B., Bland, C. M., Griffin, B., Stover, K. R., Eiland, L. S., McLaughlin, M.: A review of antibiotic use in pregnancy. *Pharmacotherapy*, 2015, 35 (11), 1052 – 1062. <<https://acpjournalsonline.wiley.com/doi/full/10.1002/phar.1649>>. Accessed August 24, 2022.

Hájek, Z. a kol.: *Porodnictví 3* [Obstetrics 3]. Praha: Grada Publishing, a. s, 2014. 372 – 383.

Hanson, L., VandeVusse, L., Jermé, M., Abad, C. L., Safdar, N.: Probiotics for treatment and prevention of urogenital infections in women: a systematic review. *Journal of Midwifery & Women's Health*, 2016, 61 (3), 339 – 355. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jmwh.12472>>. Accessed January 17, 2022.

Chavan, N. N., Shikhanshi, Chouhan, T., Kampoowale, S.: A rare case report on double J stenting in a rare case antepartum patient with right sided hydronephrosis and hydroureter. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*, 2021, 10 (10), 3989 – 3991. <<https://dx.doi.org/10.18203/2320-1770.ijrcog20213877>>. Accessed April 13, 2022.

Cheung, K. L., Lafayette, R. A.: Renal physiology of pregnancy. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 2013, 20 (3), 209 – 214. <[https://www.ackd-journal.org/article/S1548-5595\(13\)000268/fulltext](https://www.ackd-journal.org/article/S1548-5595(13)000268/fulltext)>. Accessed May 11, 2022.

Kohlhepp, L. M., Hollerich, G., Vo, L., Hofmann-Kiefer, K., Rehm, M., Louwen, F., Zacharowski, K., Weber, C. F.: Physiologische Veränderungen in der Schwangerschaft. *Anaesthesist*, 2018, 67 (5), 383 – 396. <<https://epub.ub.uni-muenchen.de/64894/>>. Accessed June 3, 2022.

Krčmery, S., Hromec, J.: Imunoterapia a dlhodobá chemoprofylaxia v prevencii recidivujúcich uroinfekcií u žien [Long-term chemoprophylaxis and

imunotherapy in prevention of recurrent uroinfections in women]. *Vnitřní lékařství*, 2010, 56 (9), 955 – 960. <<https://www.prolekare.cz/casopisy/vnitri-lekarstvi/archiv-cisel/2010-9>>. Accessed December 14, 2021.

Mašata, J. a kol.: *Infekce v gynekologii* [Infections in Gynecology]. Praha: Maxdorf, 2006. s. 110 – 121.

Naidoo, S., Bangalee, V., Oosthuizen, F.: Antibiotic use amongst pregnant women in a public hospital in KwaZulu-Natal. *Health SA Gesondheid*, 2021, 26, 1516. <<https://doi.org/10.4102/hsag.v26i0.1516>>. Accessed August 10, 2021.

Ngai, H. Y., Salih, H. Q., Albeer, A., Aghaways, I., Buchholz, N.: Double-J ureteric stenting in pregnancy: a single-centre experience from Iraq. *Arab Journal of Urology*, 2013, 11 (2), 148 – 151. <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1016/j.aju.2013.02.002>>. Accessed August 31, 2022.

Thinkhamrop, J., Hofmeyr, G. J., Adetoro, O., Lumbiganon, P., Ota, E.: Antibiotic prophylaxis during the second and third trimester to reduce adverse pregnancy outcomes and morbidity. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015, 6. <<https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD002250.pub3/abstract>>. Accessed May 21, 2022.

Wang, L., Wu, Q., Pu, W., Ge, J., Gao, F., Zhang, G., Lu, D.: Clinical characteristics and treatment methods for symptomatic hydronephrosis during pregnancy. *Journal of Clinical Medicine in Practice*, 2022, 26 (9), 45 – 49. <<http://jcmp.yzu.edu.cn/en/article/doi/10.7619/jcmp.20214834>>. Accessed February 2, 2022.



ANTIBIOFILMOVÁ ÚČINNOSŤ KOMBINÁCIE ANTIMYKOTÍK A RASTLINNÝCH SILÍC VOČI *CANDIDA ALBICANS*

ANTIBIOFILM EFFICACY OF A COMBINATION OF ANTIMYCOTIC AND PLANTS ESSENTIAL OILS AGAINST *CANDIDA ALBICANS*

Višňovská, Martina; Čonková, Eva

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

eva.conkova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Candida albicans, neškodný komenzál sliznice ústnej dutiny, gastrointestinálneho a urogenitálneho traktu, môže spôsobiť infekcie, ktoré sú často spojené s tvorbou biofilmu na povrchu hostiteľských tkanív alebo zdravotníckych pomôckach. Biofilmy vykazujú zvýšenú rezistenciu na antimykotiká, čo vedie k potrebe hľadať nové možnosti terapie. V našej štúdii sme sa zamerali na testovanie antibiofilmovej účinnosti antimykotík (flukonazol, klotrimazol a nystatín) a rastlinných silíc (čajovníková, eukalyptová, muškátová, klinčeková a pamajoránová) a ich kombinácií na 21 klinických izolátoch *C. albicans*. Stanovenie MIC bolo vykonané pomocou štandardnej mikrodilučnej metódy M27-A2 (CLSI, 2002). Na testovanie účinnosti kombinácie bol použitý šachovnicový test. Planktonické

bunky vykazovali vysokú rezistenciu voči nystatínu (100 %) a flukonazolu (95,2 %). Účinnejší bol klotrimazol, na ktorý boli citlivé 3 izoláty (14, 3 %) a 18 kmeňov (85,7 %) bolo rezistentných. Pri siliciach sme najlepšiu antifungálnu aktivitu zaznamenali pri pamajoránovej ($MIC_{90} = 400 \mu\text{g.ml}^{-1}$) a klinčekovej silici ($MIC_{90} = 400 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Nižšia účinnosť bola zistená pri čajovníkovej silici ($MIC_{90} = 50\,000 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Na testovanie účinnosti kombinácií bol vybraný klotrimazol, pamajoránová a čajovníková silica. Obidve kombinácie boli dostatočne účinné. Kombináciou klotrimazolu s čajovníkovou silicou bol dosiahnutý synergický účinok pri 7 izolátoch (33,3 %) a aditívny účinok pri 4 izolátoch (19,1 %). Kombináciou klotrimazolu s pamajoránovou silicou bol zaznamenaný synergický účinok pri 5 kmeňoch (23,8 %) a aditívny účinok pri 10 izolátoch (47,6 %). Tieto kombinácie boli použité na testova-

nie antibiofilmovej účinnosti. Kombináciou klotrimazolu s pamajoránovou silicou na 0-hodinový biofilm (adherenčná fáza) bol dosiahnutý aditívny účinok pri 5 izolátoch (50 %) a indiferentný účinok pri 5 izolátoch (50 %). Pri vytvorení, 48-hodinovom biofilme bol zistený 100 % indiferentný účinok (10 kmeňov). Kombináciou klotrimazolu s čajovníkovou silicou bol pri 0-hodinovom biofilme dosiahnutý aditívny účinok pri 3 izolátoch (42,9 %) a indiferentný účinok pri 4 kmeňoch (57,1 %). Pri 48-h biofilme bol pri tejto kombinácii zaznamenaný aditívny účinok pri 4 kmeňoch (57,1 %) a indiferentný účinok pri 3 izolátoch (42,9 %). Výsledky štúdie naznačujú, že rastlinné silice predstavujú látky vhodné pre kombináciu s antimykotikami proti biofilm tvoriacim kvasinkám *Candida albicans*.

Kľúčové slová: antimykotiká; biofilm; *Candida albicans*; rastlinné silice

ABSTRACT

Candida albicans, a harmless commensal of the oral mucosa, gastrointestinal and urogenital tract, can cause infections that are often associated with biofilm formation on the surface of host tissues or medical devices. Biofilms show increased resistance to antifungals which leads to need to look for new treatment options. In our study, we focused on testing the antibiofilm efficacy of antifungals (fluconazole, clotrimazole and nystatin) and plant essential oils (tea tree, eucalyptus, nutmeg, clove and oregano) and their combinations on 21 clinical isolates of *C. albicans*. The MIC was determined using the standard microdilution method M27-A2 (CLSI, 2002). A checkerboard test was used to test the effectiveness of the combination. Planktonic cells showed high resistance to nystatin (100 %) and fluconazole (95.2 %). Clotrimazole was more effective, to which 3 isolates (14.3 %) were sensitive and 18 strains (85.7 %) were resistant. For essential oils, the best antifungal activity was recorded for oregano ($MIC_{90} = 400 \mu\text{L.g}^{-1}$) and clove

essential oil ($MIC_{90} = 400 \mu\text{L.g}^{-1}$). Lower efficacy was found for tea tree essential oil ($MIC_{90} = 50\,000 \mu\text{L.g}^{-1}$). Clotrimazole, oregano and tea tree essential oils were selected to test the efficacy of the combinations. Both combinations were sufficiently effective. The combination of clotrimazole with tea-tree oil resulted in a synergistic effect in 7 isolates (33.3 %) and an additive effect in 4 isolates (19.1 %). The combination of clotrimazole with oregano essential oil showed a synergistic effect in 5 strains (23.8 %) and the additive one to 10 isolates (47.6 %). These combinations were used to test the antibiofilm activity. The combination of clotrimazole with oregano essential oil on 0-hour biofilm (adherence phase) achieved an additive effect in 5 isolates (50 %) and an indifferent effect in 5 isolates (50 %). With the formed 48-hour biofilm, a 100 % indifferent effect was found (10 strains). The combination of clotrimazole with tea tree essential oil achieved an additive effect in 3 isolates (42.9 %) and an indifferent effect in 4 strains (57.1 %) on 0-hour biofilm. On 48-hour biofilm, an additive effect was observed in 4 strains (57.1 %) and an indifferent effect in 3 isolates (42.9 %) by using this combination. The results of the study suggest that plant essential oils are potential substances suitable in combination with antifungals against the biofilm-forming yeast *Candida albicans*.

Key words: antimycotics; biofilm; *Candida albicans*; plants essential oils

ÚVOD

Candida albicans je najčastejšie izolovanou kvasinkou, ktorá spôsobuje rôzne infekcie, od povrchových mukózných až po systémové mykózy (Čabarkapa a kol, 2015).

Tvorba biofilmu je hlavným faktorom virulencie v patogenite kandid (Angiolella a kol., 2024). Infekcie, ktoré sprevádza tvorba biofilmu sú hrozbou pre ľudské zdravie, pretože biofilmy sú vysoko rezistentné voči antimykotikám. *Candida albicans* môže vy-

tvárať biofilmy na rôznych lekárskech protetických zariadeniach ako sú umelé srdcové chlopne, kardiostimulátory, protézy, protetické kĺby, vnútromaternicové telieska alebo katétre. Biofilmy sú komplexné trojrozmerné štruktúry pozostávajúce z kvasinkovej a hyfálnej formy, uzavretej v extracelulárnej polymérnej matrici, vďaka ktorej sú nedostupné pre liečivá a vytvárajú obranu pred hostiteľom (Jadhav a Karuppayil, 2017).

Na liečbu kandidózy sa najčastejšie využívajú polyény ako je nystatín a amfotericín B a azolové antimykotiká vrátane klotrimazolu alebo flukonazolu (de Oliveira Santos a kol., 2018; Quindos a kol., 2019). Ich opakované podávanie vedie často k vývoju rezistencie, najmä pri kandidózach spojených s tvorbou biofilmu (Massey a kol., 2023). Je preto potrebné hľadať nové možnosti liečby, ktoré umožnia zvýšiť antifungálnu a antibiofilmovú účinnosť konvenčných liečiv. Niektoré štúdie poukazujú na perspektívne využitie rastlinných silíc v kombinácii so syntetickými liečivami (Ngo-Mback a kol., 2020).

Rastlinné silice sú prechavé prírodné zlúčeniny produkované aromatickými rastlinami s rôznymi biologickými vlastnosťami (Peixoto a kol., 2017). Silice získané z kôry, listov a kvetov sú v ľudovom liečiteľstve používané často, pretože predstavujú lacnú alternatívu k moderným liekom. V poslednej dobe sa stali predmetom vedeckého záujmu kvôli ich antibakteriálnym a antifungálnym účinkom, ktoré pravdepodobne súvisia s ich obsahovým zložením (Manoharan a kol., 2017).

Táto štúdia bola zameraná na testovanie antifungálnej aktivity vybraných antimykotík a rastlinných silíc a ich možných kombinácií voči biofilm tvoriacim kvasinkám *C. albicans*.

MATERIÁL A METÓDY

Testovanie antifungálnej účinnosti antimykotík a silíc

Do experimentu bolo zaradených 21 klinických izolátov a referenčný kmeň *Candida albicans* CCM 8320 (Česká sbírka mikroorganizmů, Brno, Česká

republika), ktorý bol použitý na validáciu kvality testovania. Klinické izoláty boli získané z Ústavu lekárskej a klinickej mikrobiológie Univerzitnej nemocnice Louisa Pasteura v Košiciach.

Antimykotická účinnosť vybraných antimykotík (klotrimazol, flukonazol a nystatín; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a silíc (eukalyptová, klinčeková, muškátová, pamajoránová, čajovníková; Calendula a. s., Nová Ľubovňa, SR); bola testovaná štandardnou mikrodilučnou metódou M27-A2 (CLSI, 2002); s menšími modifikáciami.

Testovanie bolo vykonané v 96-jamkových platničkách. Jednotlivé koncentrácie antimykotík o objeme 100 μ l boli pripravené dvojkovým riedením priamo v jamkách 1 – 10 mikrotitračnej platničky v rozpätí 64 – 0,0125 μ g.ml⁻¹ (klotrimazol, nystatín), resp. 128 – 0,25 μ g.ml⁻¹ (flukonazol). K nariedeným antimykotikám bolo pridané inokulum kvasiniek v množstve 100 μ l, ktoré zodpovedalo hustote 10³ CFU.ml⁻¹. Ako živné médium pri riedení antimykotík aj inokula bol použitý Sabouraud dextrózový agar s chloramfenikolom (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Bombaj, India). Jamka 11 obsahovala iba 200 μ l média (negatívna kontrola). Jamka 12 (pozitívna kontrola) obsahovala médium (100 μ l) a inokulum (100 μ l). Po pridaní inokula predstavovali výsledné koncentrácie pri klotrimazole a nystatíne 32 – 0,0625 μ g.ml⁻¹ a pri flukonazole 64 – 0,125 μ g.ml⁻¹. Platničky boli inkubované 24 hod pri 35 °C a následne bola odčítaná hodnota minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) antimykotík.

Podobne sa postupovalo aj pri testovaní rastlinných silíc. Základná, 40 % koncentrácia silice (eukalyptová – *Eucalypti aetheroleum* (*Eucalyptus globulus*, *Myrtaceae*), klinčeková – *Caryophylli floris aetheroleum* (*Syzygium aromaticum*, *Myrtaceae*), muškátová – *Myristicae aetheroleum* (*Myristica fragrans*, *Myristicaceae*), pamajoránová – *Origanum aetheroleum* (*Origanum vulgare*, *Lamiaceae*), čajovníková – *Melaleuca alternifolia*, *Myrtaceae* (Calendula a. s., Nová Ľubovňa, SR); bola pripravená vo forme emulzie, použitím arabskej gummy, ktorá predstavovala 30 % z objemu silice. Sterilita emulzie sa zabezpečila

Tab. 1: Interpretačné kritériá pre hodnotenie tvorby biofilmu

Priemerná hodnota OD	Produkcia biofilmu
$OD < OD_c$	Žiadna
$OD_c < OD < 2 \times OD_c$	Slabá
$2 \times OD_c < OD < 4 \times OD_c$	Mierna
$OD > 4 \times OD_c$	Silná

OD – optická denzita vzorky, OD_c – priemerná hodnota negatívnej kontroly + 3x SD negatívnej kontroly

prefiltrovaním cez 0,22 μm sterilný filter. V mikrotitračnej platničke boli dvojkovým riedením pripravené koncentrácie v rozpätí 40 – 0,08 % (400 000 – 800 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), ktoré sa po pridaní inokula znížili o polovicu na koncentráciu 20 – 0,04 % (200 000 – 400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$).

Hodnoty MIC antimykotík a silíc boli odčítané vizuálne. Rast kvasiniek sa prejavil zákalom v jamke, ktorý sme porovnávali s pozitívnou, resp. negatívnou kontrolou. Opticky číra, nezakalená jamka prezentovala inhibíciu rastu. Hodnota MIC bola odčítaná v jamke, v ktorej nedošlo k viditeľnému zákalu.

Citlivosť izolátov a referenčného kmeňa *C. albicans* na antimykotiká bola v prípade flukonazolu vyhodnotená podľa interpretačných kritérií M27-A2 (CLSI, 2002): citlivý (S) – MIC < 8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; citlivý v závislosti od dávky (SDD) – MIC 16 – 32 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; rezistentný (R) – MIC > 64 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Keďže pre nystatín nie sú dostupné kritériá, hodnotili sme ho ako amfotericín B: citlivý (S) – MIC $\leq$ 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; rezistentný (R) – MIC > 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Pri klotrimazole boli použité interpretačné kritériá podľa Nelsona: citlivý (S) – MIC < 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; rezistentný (R) – MIC > 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Testovanie tvorby biofilmu

Tvorba biofilmu bola testovaná podľa metodiky opísanej Jinom a kol. (2003). Suspenzia kvasiniek (10^7 CFU.ml⁻¹) bola pripravená po 18-hodinovej kultivácii kvasiniek v 20 ml SBG (Sabouraud glukózové médium), pri 35 °C na orbitálnej trepačke pri 80 rpm. Kultúra kvasiniek bola 2x scentrifugovaná (1000 rpm 10 minút) a premytá s 5 ml fosfátového tlmivého roz-

toku (PBS). Z každého izolátu a referenčného kmeňa sa nanieslo 100 μl suspenzie do 3 jamiek mikrotitračnej platničky. Tri jamky však ostali prázdne, bez suspenzie a slúžili ako kontrola. Po 1,5 hod inkubácie (fáza adherencie) pri 35 °C a 80 rpm boli jamky 2-krát premyté so 150 μl PBS a do každej jamky sa pridalo 200 μl SBG. Platnička bola inkubovaná 66 hod pri 35 °C a 80 rpm. Po 66 hodinách bol vytvorený biofilm ofarbený kryštálovou fialou a pomocou Elisa readera (Dynex, Česká republika) bola odmeraná absorbanca pri 630 nm.

Intenzita tvorby biofilmu (viď tab. 1) sa hodnotila na základe interpretačných kritérií podľa Ruchi a kol. (2015).

Testovanie účinnosti kombinácie antimykotík a silíc na planktonické a biofilm tvoriace bunky

Na testovanie bol použitý šachovnicový test. Z antimykotík bol pre testovanie vybratý klotrimazol a zo silíc pamajoránová a čajovníková silica.

Účinnosť kombinácie na planktonické bunky

Jednotlivé koncentrácie klotrimazolu, pripravené na základe hodnôt MIC, boli aplikované v platničke vertikálne, do stĺpcov 1 – 9 v množstve 50 μl a predstavovali hodnoty MIC x 8, MIC x 4, MIC x 2, MIC a MIC : 2, MIC : 4, MIC : 8, MIC : 16, MIC : 32. K nim boli pridané jednotlivé koncentrácie silíc (pamajoránová, resp. čajovníková silica), v množstve 50 μl , horizontálne do jamiek A – G, ktoré sa rovnali hodnotám MIC x 8, MIC x 4, MIC x 2, MIC a MIC : 2, MIC

: 4, MIC : 8. Následne sa do každej jamky pridalo 100 µl inokula *C. albicans*, s obsahom 10^3 CFU.ml⁻¹. Jamky v stĺpci 10 obsahovali jednotlivé koncentrácie testovanej silice (50 µl), 50 µl SBG a 100 µl inokula. Jamky v riadku H obsahovali jednotlivé koncentrácie antimykotika (50 µl), 50 µl SBG a 100 µl inokula. Do jamiek v stĺpci 11 (negatívna kontrola) bolo nanesené iba SBG (200 µl). Do jamiek v stĺpci 12 (pozitívna kontrola) bolo aplikované SBG a inokulum v množstve po 100 µl. Po 24-hodinovej inkubácii pri 35 °C bola odčítaná minimálna inhibičná koncentrácia kombinácie (MICC).

Účinnosť kombinácie bola hodnotená na základe FICI, pri výpočte ktorého bol použitý nasledujúci vzorec:

$$FICI = \frac{MICC}{MIC} \text{silica} + \frac{MICC}{MIC} \text{antimykotikum}$$

Na základe hodnoty FICI bol výsledný efekt kombinácie interpretovaný ako synergický (FICI < 0,5); aditívny (FICI 0,5 – < 1,0); indiferentný (FICI ≥ 1,0 – < 4,0) alebo antagonistický (FICI > 4,0) (Silva a kol., 2016).

Účinnosť kombinácie antimykotika so silicou na biofilm tvoriace bunky

Obdobne ako pri stanovení citlivosti planktonických buniek na kombináciu antimykotík a silíc, aj v tomto experimente bol použitý šachovnicový test. Testovanie bolo vykonané v mikrotitračných platničkách s plochým dnom.

Suspenzia inokula (10^7 CFU.ml⁻¹), pripravená rovnako ako pri testovaní tvorby biofilmu, bola aplikovaná do jamiek stĺpcov 1 až 10 a do stĺpca 12 (pozitívna kontrola). Do stĺpca 11 (negatívna kontrola) nebolo inokulum nanesené. Po 1,5 h inkubácii pri 35 °C na orbitálnej trepačke pri 80 rpm (fáza adherencie) boli jamky 2x premyté so 150 µl PBS.

K adherovaným bunkám (0 h biofilm) bol pridaný klotrimazol vertikálne, do stĺpcov 1 – 9 v koncentráciách MIC x 8, MIC x 4, MIC x 2, MIC a MIC : 2, MIC : 4, MIC : 8, MIC: 16, MIC : 32, v množstve

50 µl. Silice boli aplikované horizontálne, do jamiek riadkov A – G, po stĺpec 10, v koncentráciách MIC x 8, MIC x 4, MIC x 2, MIC a MIC : 2, MIC : 4, MIC : 8, v množstve 50 µl. Do všetkých jamiek v stĺpcoch 1 – 10 bolo následne pridané ešte po 100 µl SBG, a do jamiek v stĺpci 11 a 12 bolo nanesené po 200 µl média. Platničky boli inkubované 48 h pri 35 °C a 80 rpm. Pre lepšiu vizualizáciu výsledkov sa 4 hod pred ich odčítaním do všetkých jamiek platničky pridal 0,15 % resazurín.

Pri testovaní 48-h biofilmu bolo najprv k adherovaným bunkám pridané médium (200 µl SBG) a platničky boli inkubované 48 h pri 35 °C a 80 rpm. Po 48 hod bol obsah platničky odsatý a platnička bola premytá 2-krát, so 150 µl PBS. Následne bolo do platničky pridané antimykotikum a silica, v rovnakej schéme ako pri 0-h biofilme. Platničky boli inkubované 48 h pri 35 °C a 80 rpm. Rovnako ako pri 0 h biofilme aj k 48-h biofilmu bol 4 hod pred odčítaním výsledkov pridaný 0,15 % resazurín.

Základné štatistické parametre výsledkov boli spracované pomocou programu Excel Microsoft Office. Pri hodnotách MIC a MICC boli stanovené: aritmetický priemer (x), smerodajná odchýlka (SD), modus (Mo) a medián (Me).

VÝSLEDKY

Štatistické vyhodnotenie MIC (µl.ml⁻¹) testovaných antimykotík dokumentuje tabuľka 2. Najvyššiu účinnosť na planktonické bunky vykazoval klotrimazol. Po 24-h expozícii boli hodnoty MIC v rozpätí 0,0625 – 16 µg.ml⁻¹ a po 48 h dosahovali 2 – 16 µg.ml⁻¹. Hodnota MIC₅₀ po 24 h predstavovala 2 µg.ml⁻¹ a po 48 h 4 µg.ml⁻¹. Hodnota MIC₉₀ sa zvýšila z hodnoty 4 µg.ml⁻¹ po 24 h na 16 µg.ml⁻¹ po 48 h. Po 24 h boli na klotrimazol citlivé 3 izoláty (14,3 %); 18 izolátov bolo rezistentných (85,7 %). Po 48 h boli však na klotrimazol rezistentné všetky kmene (100 %).

Menej účinný bol flukonazol, na ktorý bola po 24 h zistená citlivosť iba pri 1 testovanom kmeni (4,8 %); 20 kmeňov (95,2 %) bolo rezistentných. Po 48 hodinách bola zaznamenaná rezistencia pri všetkých

Tab. 2: Štatistické vyhodnotenie MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) antimykotík

Parameter	Klotrimazol		Flukonazol		Nystatín	
	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod	24 hod	48 hod
min – max	0,0625 – 16	2 – 16	2 – 16	32 – 64	4 – 16	4 – 8
x	3,0	9,2	54,2	62,5	5,3	6,1
SD	3,5	6,1	21,4	7,0	2,9	2,0
Mo	4	4	64	64	4	8
Me	2	4	64	64	4	8
MIC ₅₀	2	4	64	64	4	8
MIC ₉₀	4	16	64	64	8	8

min – max – minimálna a maximálna hodnota MIC, x – aritmetický priemer, SD – smerodajná odchýlka, Mo – modus, Me – medián, MIC₅₀ a MIC₉₀ – koncentrácie označujúce 50 % a 90 % inhibíciu izolátov, S – citlivé, S-DD – citlivé v závislosti od dávky, R – rezistentné

Tab. 3: Štatistické vyhodnotenie MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) silíc

Parameter	Silica									
	Pamajorán		Klinček		TTO		Eukalyptus		Muškát	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
min	400	400	400	400	3130	12500	6250	25000	12500	50000
max	400	400	400	400	100000	50000	100000	200000	200000	200000
x	400	400	400	400	34673	33929	31548	114286	73810	295238
SD	0	0	0	0	22095	16366	22139	68269	54329	58043
Mo	400	400	400	400	50000	50000	25000	100000	100000	200000
Me	400	400	400	400	25000	25000	25000	100000	50000	200000
MIC ₅₀	400	400	400	400	25000	25000	25000	100000	50000	200000
MIC ₉₀	400	400	400	400	50000	50000	50000	200000	100000	200000

min/max – minimálna, resp. maximálna hodnota MIC, x – aritmetický priemer, SD – smerodajná odchýlka, Mo – modus, Me – medián, MIC₅₀ a MIC₉₀ – koncentrácie, označujúce 50 % a 90 % inhibíciu izolátov, TTO – čajovníková silica

izolátoch (100 %). Hodnoty MIC po 24 h predstavovali 2 – 16 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a po 48 h boli v rozpätí 32 – 64 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Hodnoty MIC₅₀ a MIC₉₀ boli rovnaké po 24 aj 48 h (64 $\mu\text{g.ml}^{-1}$).

Pri nystatíne bola pozorovaná najnižšia účinnosť. Po 24 h aj po 48 h boli na nystatín rezistentné všetky testované izoláty (100 %). Hodnoty MIC boli po 24 h v rozmedzí 4 – 16 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a po 48 h 4 – 8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. MIC₅₀ predstavovala po 24 h 4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a po 48 h 8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Hodnoty MIC₉₀ boli rovnaké po 24 aj 48 h, 8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

V tabuľke 3 je uvedené štatistické vyhodnotenie

MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) testovaných silíc po 24 a 48 hodinách. Najnižšia účinnosť bola zaznamenaná pri muškátovej a eukalyptovej silici, pri ktorých hodnoty MIC₉₀ po 48 h dosahovali 200 000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Nízku účinnosť vykazovala aj čajovníková silica, pri ktorej MIC₉₀ po 24 h aj 48 h predstavovala 50 000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Najvyššia účinnosť bola pri planktonických bunkách zistená pri pamajoránovej a klinčekovej silici, s hodnotami MIC₉₀ 400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, a to po 24 h aj 48 h.

Tabuľka 4 uvádza štatistické údaje hodnôt MICC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) kombinácií klotrimazolu s pamajoránovou a čajovníkovou silicou pri planktonických bunkách.

Tab. 4: Vyhodnotenie MICC ($\mu\text{L.g}^{-1}$) kombinácií klotrimazolu a silíc

Parameter	Klotrimazol	Pamajoránová silica	Klotrimazol	Čajovníková silica
min – max	0,0313 – 32	50 – 200	0,0125 – 8	400 – 6250
x	4,51	100	2	3497
SD	7,58	27	3,41	2187
Mo	8	100	8	6250
Me	1	100	0,125	3130

min – max – minimálna a maximálna hodnota MIC, x – aritmetický priemer, SD – smerodajná odchýlka, Mo – modus, Me – medián, MIC_{50} a MIC_{90} – koncentrácie označujúce 50 % a 90 % inhibíciu izolátov

Tab. 5: Vyhodnotenie účinku (FICI) kombinácie klotrimazolu a silíc na planktonické bunky

FICI	Klotrimazol	
	Pamajoránová silica n/%	Čajovníková silica n/%
Synergický účinok < 0,5	5/23,8	7/33,3
Aditívny účinok 0,5 – < 1,0	10/47,6	4/19,1
Indiferentný účinok $\geq 1,0$ – < 4,0	6/28,6	10/47,6
Antagonistický účinok > 4,0	0/0	0/0

FICI – index frakčnej inhibičnej koncentrácie

MICC klotrimazolu s pamajoránovou silicou boli v rozpätí $0,0313 - 32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a v kombinácii s čajovníkovou silicou $0,0125 - 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Pri pamajoránovej silici boli hodnoty MICC v rozmedzí $50 - 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a pri čajovníkovej silici od $400 - 6250 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Vyhodnotenie účinnosti kombinácie klotrimazolu a silíc na základe indexu frakčnej inhibičnej koncentrácie (FICI) uvádza tabuľka 5.

Kombináciou klotrimazolu s pamajoránovou silicou bol zaznamenaný hlavne aditívny účinok (10 izolátov; 47,6 %). Indiferentný účinok bol pozorovaný pri 6 kmeňoch (28,6 %) a synergický účinok len pri 5 kmeňoch (23,8 %). V prípade kombinácie klotrimazolu s čajovníkovou silicou synergický efekt vykazovalo 7 izolátov (33,3 %). Pri 10 izolátoch (47,6 %) bol zistený indiferentný účinok a pri 4 izolátoch (19,1 %) aditívny účinok.

Antagonistický účinok nebol zaznamenaný ani pri jednej z testovaných kombinácií.

Na testovanie citlivosti biofilm tvoriacich buniek bolo vybraných 13 izolátov (61,9 %); ktoré vytvárali biofilm a zároveň ako planktonické bunky vykazovali synergický alebo aditívny účinok pri kombinácii antimykotika so silicou.

Výsledky štatistického vyhodnotenia MICC, zistené pri testovaní účinku kombinácie klotrimazolu a silíc na 0-h biofilm (fáza adherencie) a 48-h biofilm (zrelý biofilm) dokumentuje tabuľka 6.

Kombinácia klotrimazolu s pamajoránovou silicou bola testovaná na 10 kmeňoch. Pri 0 h biofilme boli hodnoty MICC pri klotrimazole v rozmedzí $0,0313 - 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a pri 48-h biofilme $0,5 - 16 \mu\text{g.mL}^{-1}$. MICC pamajoránovej silice boli pri 0-h biofilme v rozpätí $100 - 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a pri 48-h biofilme $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tab. 6: Vyhodnotenie MICC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) klotrimazolu a silíc na biofilm tvoriace bunky

Parameter	Klotrimazol		Pamajorán		Klotrimazol		TTO	
	0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h
min – max	0,0313 – 8	0,5 – 16	100 – 200	800	0,5 – 2	0,0625 – 1	400 – 12500	12500
x	2,70	2,86	140	800	1,21	0,42	5571	12500
SD	3,01	4,46	52	0	0,57	0,43	5302	0
Mo	0,5	1	100	800	1	0,0625	6000	12500
Me	1,5	1	100	800	1	0,25	6000	12500

min – max – minimálna a maximálna hodnota MIC, x – aritmetický priemer, SD – smerodajná odchýlka, Mo – modus, Me – medián, MIC₅₀ a MIC₉₀ – koncentrácie označujúce 50 % a 90 % inhibíciu izolátov, TTO – tea tree oil

Tab. 7: Vyhodnotenie účinku (FICI) kombinácie klotrimazolu a silíc na biofilm tvoriace bunky

FICI	Klotrimazol			
	Pamajoránová silica n/%		Čajovníková silica n/%	
	0 h	48 h	0 h	48 h
Synergický účinok < 0,5	0/0	0	0/0	0/0
Aditívny účinok 0,5 – < 1,0	5/50	0	3/42,9	4/57,1
Indiferentný účinok ≥ 1,0 – < 4,0	5/50	10/100	4/57,1	3/42,9
Antagonistický účinok > 4,0	0/0	0	0/0	0/0

FICI – index frakčnej inhibičnej koncentrácie

Kombinácia klotrimazolu s čajovníkovou silicou, testovaná na 7 izolátoch, dosahovala hodnoty MICC klotrimazolu pri 0-h biofilme 0,5 – 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a pri 48-h 0,0625 – 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Pri čajovníkovej silici predstavovali hodnoty MICC pri 0-h biofilme 400 – 12 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a pri 48-h biofilme 12 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Účinok kombinácie klotrimazolu a silíc, hodnotený podľa indexu frakčnej inhibičnej koncentrácie (FICI), dokumentuje tabuľka 7.

Pri 0-h biofilme bol pri kombinácii klotrimazolu s pamajoránovou silicou zaznamenaný aditívny účinok pri 5 izolátoch (50 %) a indiferentný účinok pri 5 kmeňoch (50 %). Účinok na 48-h biofilm bol indiferentný pri všetkých 10 kmeňoch (100 %).

Kombinácia klotrimazolu s čajovníkovou silicou preukázala lepší antibiofilmový efekt. Pri 0-h biofil-

me bol zistený aditívny účinok pri 3 kmeňoch (42,9 %) a indiferentný účinok pri 4 izolátoch (57,1 %). Pri 48-h biofilme bol zaznamenaný aditívny účinok pri 4 izolátoch (57,1 %) a indiferentný efekt pri 3 izolátoch (42,9 %). Synergický a antagonistický účinok sa nezistil ani pri jednej z testovaných kombinácií.

DISKUSIA

Candida albicans je súčasťou prirodzenej ľudskej mikrobioty, ale zároveň aj najčastejší ľudský kvasinový patogén spôsobujúci mykotické ochorenia slizníc až po systémové infekcie. Dôležitým faktorom virulencie *C. albicans* je schopnosť vytvárať biofilmy na abiotických alebo biotických povrchoch. Biofilm je súbor povrchovo asociovaných buniek, ktorý je

uzavretý v extracelulárnej polymérnej matrici (Wang a kol., 2018).

Biofilmy vykazujú zvýšenú rezistenciu voči antimykotikám, čo vedie k zlyhaniu konvenčnej antimykotickej terapie. Na liečbu kandidóz sa najčastejšie využívajú polyénové a azolové antimykotiká. Ich účinnosť je ale v mnohých prípadoch obmedzená nielen z dôvodu rozvoja rezistencie, ale aj slabej penetračnej schopnosti prechádzať cez matrix biofilmu (Jafri a Ahmad, 2020).

Z polyénových antimykotík sa v terapii kandidóz často používa nystatín v topických formách. Viaz sa na ergosterol, ktorý je súčasťou cytoplazmatickej membrány húb a spôsobuje zmeny v permeabilite buniek (Scheibler a kol., 2018). El-Houssaini a kol. (2019) zistili 100 % citlivosť izolátov *C. albicans* na amfotericín B, nystatín a mikafungín. Naopak, v našej štúdii mal nystatín najnižšiu účinnosť, nakoľko po 24-hod a 48-hod expozícii vykazovali na nystatín všetky testované izoláty rezistenciu (100 %). Na druhej strane podobne ako v našej práci, aj títo autori konštatujú vysokú rezistenciu na flukonazol (98,5 %) a vorikonazol (97 %).

Klotrimazol, širokospektrálne azolové antimykotikum sa používa na lokálnu liečbu *tinea pedis*, ako aj pri vulvovaginálnej alebo orofaryngeálnej kandidóze. Patrí k veľmi dobre tolerovaným liečivám, s minimálnymi vedľajšími účinkami (Crowley a Gallagher, 2014). V našich experimentoch sme zaznamenali citlivosť na klotrimazol iba pri 3 izolátoch (14,3 %); 18 kmeňov (85,7 %) bolo rezistentných. Rovnako ďalší azolový derivát, flukonazol, vykazoval nízku účinnosť, citlivý bol iba 1 kmeň (4,8 %). Podobné výsledky uvádzajú aj Mikaeili a kol. (2015), ktorí pri testovaní klinických izolátov zistili lepší účinok klotrimazolu ako flukonazolu.

Rezistencia kandid voči azolom môže byť prirodzená alebo získaná. Je daná samotným charakterom buniek alebo rastom kvasiniek vo forme biofilmu (Niimi a kol., 2010). Bunky biofilmu sú voči antifungálnym liečivám odolnejšie ako planktonické bunky. Faktory, ktoré prispievajú k rezistencii biofilmu zahŕňajú jeho štrukturálne zloženie, prítomnosť extracelulár-

nej matrice alebo zvýšenú expresiu génov efluxnej pumpy (Fanning a Mitchell, 2012). Hľadáajú sa preto spôsoby pre zabezpečenie úspešnej liečby infekcií spojených s tvorbou biofilmu. V klinickej praxi sa uplatňuje najmä kombinovaná antimykotická terapia, výhodou ktorej je rozšírenie antifungálneho spektra, zvýšená účinnosť liečiva, rýchlejší fungicídny účinok, zníženie dávky liečiva a znížené riziko vývoja rezistencie (Bink a kol., 2011).

V súvislosti s tvorbou biofilmu kvasinkami *C. albicans* vzrástol záujem o biologické účinky prírodných produktov (Ourabah a kol., 2020). Fytoterapia predstavuje účinnejšiu a menej toxickú alternatívu k štandardným antifungálnym liečivám. Silice a ich obsahové látky pôsobia prevažne na bunkovom povrchu a spôsobujú narušenie integrity bunkovej membrány kandid. V niektorých prípadoch úplne menia morfológiu buniek. Synergické interakcie silíc s antimykotikami sa považujú za novú terapeutickú alternatívu na zvýšenie účinnosti antimykotík a prekonanie rezistencie *C. albicans* (Essid a kol., 2017).

Silná antifungálna aktivita niektorých hlavných zložiek silíc je pripisovaná hlavne terpénom (Dalleau a kol., 2008). Hlavnými obsahovými látkami pamajoránovej silice, ktorá v našom experimente dosiahla najlepší antifungálny účinok na planktonické bunky, sú monocyklické monoterpény karvakrol a tymol. Monoterpény deštruujú mikrobiálnu cytoplazmatickú membránu, ktorá tak stráca svoju permeabilitu a oslabená je nielen jej funkcia ako bariéry, ale aj jej funkcia matrice pre enzýmy a transportu energie (Bink a kol., 2011). Silnú antifungálnu aktivitu pamajoránovej silice potvrdzuje aj štúdia Cleffa a kol. (2010), ktorí hodnotili *in vitro* aktivitu silice proti 16 izolátom rodu *Candida*. Všetky testované izoláty boli na silicu z pamajoránu obyčajného (*O. vulgare*) citlivé.

Perspektívne využitie ako lokálne pôsobiaca fungicídna látka má aj čajovníková silica. Klinické štúdie poukazujú na jej účinnosť v terapii seberey alebo orálnej kandidózy. Údaje z testovania na zvieratách tiež naznačujú, že môže byť účinná pri liečbe vaginálnej kandidózy. Tieto klinické štúdie sú podporova-

né množstvom údajov o citlivosti *in vitro* (Hammer, 2004). MIC₉₀ čajovníkovej silice v našom experimente predstavovala 50 000 µg.ml⁻¹, kým pri pamajoránovej silici 400 µg.ml⁻¹.

Pri viacerých siliciach bol testovaný synergický účinok s konvenčnými antimykotikami a zistilo sa, že silne potenciujú účinok antifungálnych liečiv. Výhodou synergického účinku je minimalizácia účinnej dávky antimykotika, ktorá má pri bežnej terapeuticko-vej dávke toxické účinky (Natu a Tatke, 2019).

Pri testovaní citlivosti planktonických buniek na kombinácie antimykotík a silíc sme zaznamenali synergický účinok pri kombinácii klotrimazolu s pamajoránovou silicou pri 5 izolátoch (23,8 %) a s čajovníkovou silicou pri 7 kmeňoch (33,3 %).

Carbone a kol. (2019) testovali kombináciu troch silíc (rozmarín lekársky – *Rosmarinus officinalis*, levanduľa prostredná – *Lavandula x intermedia* „Sumian“, pamajorán obyčajný – *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) vo forme lipidových nanočastíc pre podávanie klotrimazolu a zisťovali potenciálne synergické účinky pri *C. albicans*, *C. krusei* a *C. parapsilosis*. Štúdia *in vitro* ukázala zvýšenie antifungálnej aktivity nanočastíc s obsahom klotrimazolu.

Rosato a kol. (2008) testovali možný synergický účinok medzi silicami z *Melaleuca alternifolia*, *Origanum vulgare* a *Pelargonium graveolens* a amfotericínom B na kandidách. Pri všetkých kmeňoch bol zaznamenaný synergický účinok, pričom najúčinnější bol *P. graveolens*. Kombinácie so silicami z *Origanum vulgare* a *Melaleuca alternifolia* boli menej účinné.

Pri testovaní 0-h biofilmu sme pri kombinácii klotrimazolu s pamajoránovou silicou zaznamenali aditívny účinok pri 5 izolátoch (50 %) a indiferentný účinok pri 5 kmeňoch (50 %). Pri 48-hodinovom biofilme sa touto kombináciou dosiahol pri všetkých izolátoch indiferentný účinok (100 %), čo potvrdzuje fakt, že zrelý biofilm je voči antimykotikám viac rezistentný.

Potvrdzuje to aj štúdia Doke a kol. (2014), ktorej cieľom bolo vyhodnotiť účinnosť troch terpenoidov (karvakrol, eugenol a tymol) v kombinácii s flukona-

zolom voči planktonickým bunkám a zrelom biofilme *C. albicans*. Na planktonických bunkách zistili synergický účinok pri kombinácii flukonazolu s karvakrolom (FICI = 0,111) a eugenolom (FICI = 0,25); zatiaľ čo pri kombinácii s tymolom bol účinok indiferentný. Biofilmy vykazovali vysokú rezistenciu na flukonazol, ale na terpenoidy boli citlivé. Pri zrelom biofilme mali všetky testované kombinácie indiferentný účinok. Štúdia ukázala, že kombinácie karvakrolu a eugenolu s flukonazolom by mohli predstavovať potenciálnu stratégiu v prevenciu infekcií *C. albicans* spojených s tvorbou biofilmu.

V našej štúdii sme pri zrelom 48-h biofilme zaznamenali lepšiu antibiofilmovú účinnosť pri kombinácii klotrimazolu s čajovníkovou silicou, kedy aditívny účinok vykazovali 4 izoláty (57,14 %) a pri 3 izolátoch (42,86 %) bol zistený indiferentný efekt. To poukazuje na skutočnosť, že účinnosť klotrimazolu sa v kombinácii so silicou výrazne zlepšila, nakoľko pri pôsobení samotného antimykotika na planktonické bunky bola zistená až 85,7 % rezistencia.

Uvedené štúdie, ako aj naše experimenty potvrdzujú dôležitosť skúmania rastlinných silíc nielen pre ich antifungálne, ale aj pre antibiofilmové účinky.

ZÁVER

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme skonštatovať, že testované rastlinné silice majú potenciál nielen ako antifungálne látky proti *C. albicans*, ale aj ako synergické liečivá spolu s konvenčnými antimykotikami na biofilm tvoriace kmene *C. albicans*. S rastúcim záujmom o používanie rastlinných silíc vo farmaceutickom priemysle je stále dôležitejšie nové skúmanie ich antifungálnych a antibiofilmových vlastností.

POĎAKOVANIE

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

ZOZNAM LITERATÚRY

- Angiolella, L., Rojas, F., Giammarino, A., Bellucci, N., Giusiano, G.: Identification of virulence factors in isolates of *Candida haemulonii*, *Candida albicans* and *Clavispora lusitaniae* with low susceptibility and resistance to fluconazole and amphotericin B. *Microorganisms*, 2024, 12 (1), 212. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010212>. Accessed March 20, 2024.
- Bink, A., Pellens, K., Cammue, B. P. A., Thevissen, K.: Anti-biofilm strategies: how to eradicate *Candida* biofilms? *The Open Mycology Journal*, 2011, 5, 29 – 38.
- Carbone, C., Teixeira, M. do C., Sousa, M. do C., Martins-Gomes, C., Silva, A. M., Souto, E. M. B., Musumeci, T.: Clotrimazole-loaded mediterranean essential oils NLC: a synergic treatment of *Candida* skin infections. *Pharmaceutics*, 2019, 11, 231.
- Cleff, M. B., Meinerz, A. R., Xavier, M. Schuch, L. F., Meireles, M. C. A., Rodrigues, M. R. A., de Mello, J. R. B.: *In vitro* activity of origanum vulgare essential oil against *Candida* species. *Brazilian Journal of Biology*, 2010, 41, 116 – 123.
- M27-A2 (CLSI). *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – Second edition. Wayne, Pennsylvania, 2002, 22 p.
- Crowley, P. D., Gallagher, H. C.: Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J. Appl. Microbiol.*, 2014, 117, 611 – 617.
- Čabarkapa, I. S., Škrinjar, M. M., Lević, J. D., Blagojev, N. T., Kokić, B. M., Plavšić, D. V., Suvajdžić, L. D.: Influence of thymol and carvacrol on initial cell attachment and biofilm of *Candida albicans*. *Food and Feed Research*, 2015, 42, 23 – 30.
- Dalleau, S., Cateau, E., Bergès, T., Berjeaud, J.-M., Imbert, C.: *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2008, 31, 572 – 576.
- Doke, S. K., Raut, J. S., Dhawale, S., Karuppayil, S. M.: Sensitization of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2014, 60, 163 – 168.
- El-Houssaini, H. H., Elnabawy, O. M., Nasser, H. A., Elkhatib, W. F.: Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens. *Microb. Pathog.*, 2019, 128, 13 – 19.
- Essid, R., Hammami, M., Gharbi, D., Karkouch, I., Hamouda, T., Elkahoui, S., Limam, F., Tabbene, O.: Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, 101, 6993 – 7006.
- Fanning, S., Mitchell, A. P.: Fungal biofilms. *PLoS Pathogens*, 2012, 8, 1 – 4.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V.: Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, 53, 1081 – 1085.
- Jadhav, A., Karuppayil, S. M.: Chapter 13 – *Candida albicans* biofilm as a clinical challenge. In Satyanarayana, T., Deshmukh, S., Johri, B. (Eds). *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*. Singapore: Springer, 2017. 247 – 264.
- Jafri, H., Ahmad, I.: *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J. Mycol. Med.*, 2020, 30, 1 – 18.
- Jin, Y., Yip, H. K., Samaranayake, Y. H., Yau, J. Y., Samaranayake, L. P.: Biofilm forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 4, 2961 – 2967.
- Manoharan, R. K., Lee, J.-H., Lee, J.: Antibiofilm and antihyphal activities of cedar leaf essential oil, camphor, and fenchone derivatives against *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8, 1476.

- Massey, J., Zarnowski, R., Andes, D.: Role of the extracellular matrix in *Candida* biofilm antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 2023, 47 (6), 1 – 6. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad059>. Accessed March 20, 2024.
- Mikaeili, A., Modareesi, M., Maleki, M.: Anti-candida effects of ecotrimazole and fluconazole against isolated *C. albicans* from patinetso candidiasis admitted in Medical Mycology Lab of special clinic of Kermanshah University of Medical Sciences. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 2015, 8, 2931 – 2935.
- Natu, K. N., Tatke, P. A.: Essential oils – prospective candidates for antifungal treatment? *Journal of Essential Oil Research*, 2019, 31, 347 – 360.
- Nelson, M., Wanjiru, W. M., Margaret, M.: Identification and susceptibility profile of vaginal *Candida* species to antifungal agents among pregnant women attending the Antenatal Clinic of Thika District Hospital, Kenya. *Open Journal of Medical Microbiology*, 2013, 3, 239 – 247.
- Ngo-Mback, M. N. L., Babii, C., Dongmo, P. J., Toghuo, M. K., Stefan, M., Boyom, F. F.: Anticandidal and synergistic effect of essential oil fractions from three aromatic plants used in Cameroon. *Journal de Mycologie Medicale*, 2020, 30 (2), 100 940.
- Niimi, M., Firth, N. A., Cannon, R. D.: Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology*, 2010, 98, 15 – 25.
- de Oliveira Santos, G. C., Vasconcelos, C. C., Lopes, A. J. O., de Sousa Cartágenes, M. D. S., Filho, A. K. D. B., do Nascimento, F. R. F., Ramos, R. M., Pires, E. R. R. B., de Andrade, M. S., Rocha, F. M. G., de Andrade Monteiro, C.: *Candida* infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Front Microbiol.*, 2018, 3 (9), 1351.
- Ourabah, A., Atmani-Kilani, D., Debbache-Benaida, N., Kolesova, O., Azib, L., Yous, F., Benloukil, M., Botta, B., Atmani, D., Simonetti, G.: Anti-*Candida albicans* biofilm activity of extracts from two selected indigenous Algerian plants: *Clematis flammula* and *Fraxinus angustifolia*. *Journal of Herbal Medicine*, 2020, 20, 1 – 26.
- Peixoto, L. R., Rosalen, P. L., Ferreira, G. L. S., Freires, I. A., de Carvalho, F. G., Castellano, L. R., de Castro, R. D.: Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Archives of Oral Biology*, 2017, 73, 179 – 185.
- Quindos, G., Gil-Alonso, S., Marcos-Arias, C., Sevillano, E., Mateo, E., Jauregizar, N., Eraso, E.: Therapeutic tools for oral candidiasis: current and new antifungal drugs. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, 2019, 24, 172 – 180.
- Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L., Mallamaci, R.: The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, 2008, 15, 635 – 638.
- Ruchi, T., Sujata, B., Anuradha, D.: Comparison of phenotypic methods for the detection of biofilm production in uro-pathogens a Tertiary Care Hospital in India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2015, 4, 840 – 849.
- Scheibler, E., da Silva, R. M., Leite, C. E., Campos, M. M., Figueiredo, M. A., Salum, F. G., Cherubini, K.: Stability and efficacy of combined nystatin and chlorhexidine against suspensions and biofilms of *Candida albicans*. *Arch. Oral Biol.*, 2018, 89, 70 – 76.
- Silva, I. C. G., Pontes Santos, H. B., Cavalcanti, Y. W., Nonaka, C. F. W., Sousa, A., Castro, R. D.: Antifungal activity of eugenol and its association with nystatin on *Candida albicans*. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clinica Integrada*, 2016, 17, 3235.
- Wang, T., Xie, X., Li, K., Deng, Y., Chen, H.: Alternative oxidase promotes biofilm formation of *Candida albicans*. *Curr. Med. Sci.*, 2018, 38, 443 – 448.



ANTIOXIDAČNÉ A ANTIPROLIFERATÍVNE ÚČINKY TINKTÚRY ZO ZELENEHO ORECHA KRÁLOVSKÉHO

ANTIOXIDANT AND ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF THE TINCTURE FROM IMMATURE GREEN WALNUT FRUITS

¹Sovíková, Simona; ¹Marcinčáková, Dana; ¹Kolesárová, Mária;
²Milek, Michał; ¹Legáth, Jaroslav

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

²Department of Chemistry and Food Toxicology
Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszów, Ćwiklinskiej 1a, 35-601 Rzeszów
Poland

dana.marcincakova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Tinktúry pripravené zo zelených plodov orecha kráľovského (*Juglans regia* L.) maceráciou v 40 % etanole na svetle a v tme boli testované z pohľadu ich antioxidačných a cytotoxických vlastností. Tinktúry preukázali dobrú protiradikálovú kapacitu a tiež vysoké množstvo celkových fenolov a flavonoidov, obzvlášť v tinktúre macerovanej v tme. Cytotoxický účinok tinktúr bol sledovaný pomocou epiteliálnych buniek opičích obličiek (VERO – ATCC-CRL 1586), u ktorých bola hodnotená zmena v proliferácii analýzou buniek v reálnom čase (systém xCELLigence). Súbežne bola hodnotená aj metabolická aktivita buniek (MTS test). Nižšie koncentrácie neznížili bunkovú proliferáciu a dokonca bol zaznamenaný jej nárast v porovnaní s kontrolným

mi bunkami. Metabolická aktivita poklesla u všetkých sledovaných buniek. Naše zistenia potvrdzujú priaznivý účinok tinktúr. Pre bezpečnosť konzumentov je potrebné vhodné dávkovanie tinktúr.

Kľúčové slová: antioxidačná aktivita; flavonoidy; macerát; MTS test; polyfenoly; bunková línia VERO; xCELLigence systém

ABSTRACT

Tinctures prepared from green walnut fruits (*Juglans regia* L.) by maceration in 40 % ethanol in the light and in the dark were tested for their antioxidant and cytotoxic properties. The tinctures showed good antiradical capacity and also high amounts of total phenolics and flavonoids,

especially in the tincture macerated in the dark. The cytotoxic effect of the tinctures was monitored using monkey kidney epithelial cells (VERO – ATCC-CRL 1586), in which the change in proliferation was assessed by real-time cell analysis (xCELLigence system). Cell metabolic activity (MTS test) was also evaluated at the same time. Lower concentrations did not reduce cell proliferation and even an increase was noted compared to control cells. Metabolic activity decreased in all monitored cells. Our findings confirm the beneficial effect of tinctures. Appropriate dosing of tinctures is necessary for the safety of consumers.

Key words: antioxidant activity; flavonoids; macerate; MTS test; polyphenols; VERO cell line; xCELLigence system

ÚVOD

Prípravky na rastlinnej báze sú široko používané v tradičnej medicíne. Kvôli bohatstvu bioaktívnych látok sú takéto produkty zaujímavé pre vedu. Jednou z foriem rastlinných prípravkov sú tinktúry, ktoré predstavujú extrakty pripravené maceráciou alebo perkoláciou len s použitím etanolu vo vhodnej koncentrácii na extrakciu rastlinnej drogy (Hudz a kol., 2020). Zelené orechy sa používajú v ľudovom liečiteľstve a farmakológii aj v potravinárstve na výrobu džemov a likérov (Tiurikova a Peresichnyi, 2015; Petrović a kol., 2021). Priaznivé účinky nezrelých orechov *Juglans regia* na zdravie popísali mnohí autori (Soto-Maldonado a kol., 2019; Pycia a kol., 2019). Vďaka tomu majú zelené orechy veľký potenciál pri výrobe funkčných potravín, najmä alkoholických nápojov, ktoré tvoria dôležitú súčasť celkovej výživy. Nápoje sa pripravujú z tradičných surovín, ako je ovocie a zelenina, avšak zavedenie nových, nezvyčajných rastlinných materiálov, ako sú vlašské orechy v štádiu zrelosti mliečneho vosku, je atraktívne a tiež prospešné (Tiurikova a Peresichnyi, 2015). Tinktúry z nezrelých vlašských orechov – plodov *Juglans regia* L. sú známe a používané po celom svete.

Zelené orechy a zelené šupky orechov vykazujú množstvo biologických účinkov vďaka ich mimoriadne bohatému fytochemickému zloženiu. Sú bohaté na zlúčeniny zo skupiny polyfenolov, naftochinónov, steroidov, ako aj vitamínov a minerálov (Cosmulescu a kol., 2014). Extrakty zo zelených orechov majú antioxidačné, antimikrobiálne a antiparazitické vlastnosti (Croitoru a kol., 2019). Antiproliferatívna aktivita bola zistená aj proti bunkám leukémie HL-60 (Carvalho a kol., 2010).

Cieľom tejto štúdie bolo sledovať antioxidačné a proliferatívne vlastnosti tinktúr nezrelého zeleného orecha pripravených podľa tradičných receptúr, pričom macerácia orechov prebehla v 40 % etanole na svetle, alebo bez prítomnosti svetla. Okrem toho bol hodnotený aj účinok tinktúr na bunky *in vitro*. Zatiaľ čo protinádorovú aktivitu opísali mnohí autori (Carvalho a kol., 2010; Soto-Maldonado a kol., 2019), náš výskum je zameraný na hodnotenie účinku na normálne epiteliálne obličkové bunky s cieľom posúdiť bezpečnosť používania zelených orechov na výrobu nápojov.

MATERIÁL A METÓDY

Príprava vzoriek

Nezrelé orechy *Juglans regia* L. boli nazbierané v júni 2022 v lokalite Košice (Slovenská republika). Plody boli nakrájané na štvrtiny a zaliaté 40 % etylalkoholom v pomere 1 : 1. Tinktúry sa nechali zrieť v sklenených nádobách 2 mesiace pri izbovej teplote s vystavením slnečnému žiareniu (vzorka 1) a v tme (vzorka 2). Po uplynutí tejto doby sa prefiltrovali pomocou filtračného papiera.

Stanovenie antioxidačnej aktivity

Celkový obsah fenolových zlúčenín

Celkový obsah fenolových zlúčenín bol stanovený metódou podľa Singleton a Rossi (1965) upravenej tak, aby umožňovala meranie pomocou čítačky mikroplošných. Vzorky tinktúry v množstve 20 µl boli napietované do jamiek 96-jamkovej platne (Greiner Bio

One, Nemecko), potom sa do jamiek pridalo 100 μl 10 x zriedeného Folin-Ciocalteuovho činidla a nakoniec sa pridalo 80 μl 7,5 % roztoku Na_2CO_3 (Sigma Aldrich, Nemecko). Platňa bola umiestnená na tmavé miesto po dobu 1 hodiny. Po tomto čase bola meraná absorbančia pomocou spektrofotometra (EPOCH2, Biotek, Winooski, VT, USA) pri vlnovej dĺžke 760 nm oproti slepej vzorke (vzorka nahradená rovnakým objemom destilovanej vody). Výsledky boli vyjadrené ako ekvivalenty kyseliny galovej (GAE) podľa pripravenej štandardnej krivky v rozsahu 0 – 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Celkový obsah flavonoidov

Celkový obsah flavonoidov bol stanovený metódou Biju (2013) s modifikáciou umožňujúcou meranie pomocou spektrofotometra. Do jamiek bolo napipetovaných 100 μl vzoriek tinktúr, potom 100 μl 2 % metanolového roztoku AlCl_3 . Platňa bola uložená na tmavé miesto na 10 minút. Po tomto čase bola meraná absorbančia ($A = 415\text{ nm}$) oproti slepej vzorke (vzorka nahradená rovnakým objemom destilovanej vody). Výsledky boli vyjadrené v mg ako ekvivalenty kvercetínu (QE) pomocou pripravenej štandardnej krivky (0 – 120 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Antioxidačná kapacita – metóda DPPH

Antioxidačná aktivita bola meraná metódou DPPH podľa autora Blois (1958) s modifikáciou umožňujúcou meranie pomocou spektrofotometra v 96-jamkových platničkách. Do jamiek bolo napipetovaných 20 μl tinktúry a potom 180 μl DPPH činidla (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) zriedeného metanolom. Platňa sa umiestnila na 30 minút na tmavé miesto. Absorbančia (A) bola meraná pri 517 nm proti slepej vzorke (čistý metanol) s použitím spektrofotometra Biotek EPOCH2. Percento vychytávania DPPH radikálov (DPPH %) bolo vypočítané podľa vzorca:

$$\text{DPPH \%} = [(A \text{ kontroly} - A \text{ vzorky}) / A \text{ kontroly}] \times 100$$

Získané výsledky boli prepočítané na ekvivalent

Troloxu (TE) na základe pripravenej kalibračnej krivky v rozsahu 0 – 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($r^2 = 0,9970$).

Stanovenie antiproliferatívnych účinkov

Bunkové kultúry a médiá

Na tento *in vitro* experiment boli použité opičie epitelálne obličkové bunky VERO (ATCC-CRL 1586). Bunky boli kultivované v rastovom médiu (MEM – Minimum Essential Medium Eagle) obohatenom o 10 % fetálneho bovinného séra, 1 % glutamínu a 0,1 % gentamicínu (Sigma Aldrich, Nemecko). Kultivácia buniek prebiehala v inkubátore so zvlhčenou atmosférou 37 °C a 5 % CO_2 . Bunky boli pasážované každé 3 – 4 dni. Pravidelne bola kontrolovaná neprítomnosť kontaminácie mykoplazmami.

Analýza buniek v reálnom čase

Sledovanie odozvy buniek po expozícii testovaným látkam sa uskutočňovalo pomocou systému xCELLigence (Real-Time Cell Analyzer – RTCA, Acea Biosciences Inc., San Diego, CA, USA). Systém umožňuje sledovanie správania sa buniek (adhézia, proliferácia, rast a morfológia) bez značenia počas celej doby liečby. Základným princípom je meranie impedancie na zlatých elektródach na dne jamiek mikroplošných. Čím väčší je počet adherovaných buniek, tým vyššia je impedancia. Hodnoty boli vyjadrené ako bezrozmerný bunkový index (CI) a zaznamenávané sú v krivkách každú hodinu počas experimentu. Princíp experimentu bol popísaný viacerými autormi (Mišek a kol., 2019; Sowa a kol., 2020; Stefanowicz-Hajduk a Ochocka, 2020). V tomto experimente boli bunky napipetované v množstve 5000 buniek na jamku do troch 16-jamkových E-platní (Acea Biosciences, San Diego, CA, USA) a následne inkubované počas 20 hodín. Testované vzorky tinktúr boli nariadené médiom krátko pred pridaním k bunkám tak, aby v jamke dosiahli finálne koncentrácie 125 – 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Zásobné roztoky boli 10 x koncentrované (1,25 – 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), keďže k bunkám sa pridávali v pomere 1 : 10. Bunky bez ošetrovania slúžili ako kontrola a ich proliferácia bola považovaná za 100 %. Percentuálna

Tab. 1: Hodnotenie antioxidačných vlastností tinktúr orecha

tinktúra orecha	celkové fenoly (mg GAE.ml ⁻¹)	flavonoidy (mg QE.ml ⁻¹)	DPPH (μmol TE.ml ⁻¹)
na svetle	2.42 ± 0.02 ^a	1.71 ± 0.06 ^a	12.52 ± 0.14 ^a
v tme	3.40 ± 0.04 ^b	1,98 ± 0.01 ^b	14.06 ± 0.36 ^b

GAE – ekvivalent kyseliny galovej, QE – ekvivalent kvercetínu, TE – ekvivalent Troloxu

^{a, b} – hodnoty v stĺpcoch s odlišným označením sú štatisticky odlišné (P < 0,05)

zmena v proliferačnej aktivite (PA) bola vypočítaná pomocou vzorca:

$$\% PA = (vzorka CI / kontrola CI) \times 100$$

Test metabolickej aktivity buniek (MTS test)

Na meranie metabolickej aktivity buniek po expozícii testovaným látkam bol vykonaný test MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA), v rovnakom čase ako RTCA s použitím buniek z rovnakej pasáže. Bunky boli nasadené do 96-jamkovej platne (Greiner-Bio-One, Kremsmünster, Rakúsko) s hustotou 8,6 x 10³ buniek/jamku v konečnom objeme 100 μl média. Po 20 hodinách boli pridané testované látky v pomere 1 : 10 s médiom, aby bola dosiahnutá testovaná koncentrácia 125 – 1000 μg ml⁻¹. Ošetrovanie buniek tinktúrami trvalo 48 hodín. Nakoniec sa do každej jamky napipetovalo 20 μl roztoku MTS a po 4 hodinách inkubácie bola meraná absorbancia (A) pri 490 nm (reader Synergy HT; Biotek, Winooski, VT, USA). Bunky bez ošetrovania boli považované za kontrolu so 100 % metabolickou aktivitou (MA). Zmena v MA bola vyjadrená percentuálne pomocou vzorca:

$$\% MA = (vzorka CI) / (kontrola CI) \times 100$$

Štatistické hodnotenie

Výsledky sú prezentované ako priemer ± štandardná odchýlka (SD; n = 3). Získané dáta boli štatisticky vyhodnotené softvérom Graph Pad Prism 8.3.1 (USA). Na vyhodnotenie celkového obsahu fenolov a antioxidačnej aktivity testovaných vzoriek sa použila

jednosmerná analýza rozptylu (ANOVA) nasledovaná Tukeyho viacnásobným porovnávacím testom a na vyhodnotenie výsledkov získaných v MTS teste a analýzou RTCA bol použitý Dunnettov porovnávací test. Hladina významnosti bola nastavená na P < 0,05. Všetky experimenty sa uskutočnili v troch opakovaníach.

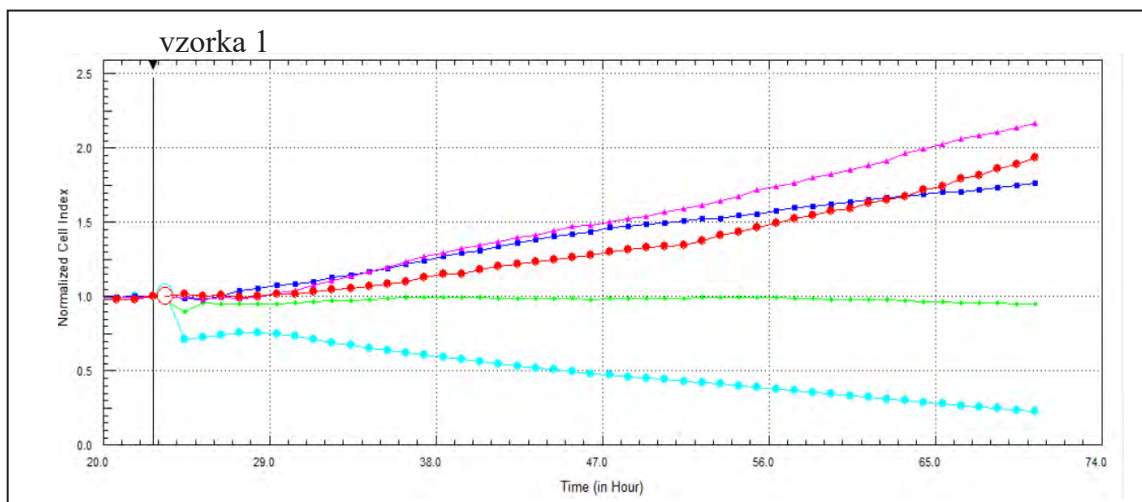
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Antioxidačná aktivita

Hodnotenie antioxidačnej aktivity bolo vykonávané pomocou troch metód. Výsledky sú zosumarizované v tabuľke 1. Pri meraní množstva celkových fenolov a flavonoidov sme zaznamenali vyššie množstvá vo vzorke tinktúry, ktorá bola macerovaná bez prístupu svetla v porovnaní s tinktúrou vystavenou svetlu (P < 0,05). Rovnako boli lepšie hodnoty zaznamenané u tinktúry pripravenej bez prístupu svetla aj pri hodnotení antioxidačnej kapacity pomocou DPPH radikálu (P < 0,05).

Získané výsledky sú porovnateľné s údajmi dostupnými v literatúre o tradičných likéroch zo zeleného orecha (Nocino), ktoré obsahovali od 1,18 do 3,52 mg ekvivalentov katechínu na 1 ml. V komerčných tinktúrach bola variabilita väčšia, od 0,23 do 3,88 mg ekvivalentov katechínu na ml (Alamprese a kol., 2005). Podľa týchto údajov tvoria väčšinu polyfenolov taniny. Antiradikálová aktivita stanovená metódou DPPH podľa literatúry bola od 0,019 do 2,38 μmol TE.ml⁻¹ pre komerčné vzorky a do 8,94 μmol TE.ml⁻¹ pre likéry pripravené infúznou metódou (Alamprese a kol., 2005). Testovanie antioxidačného potenciálu tinktúr

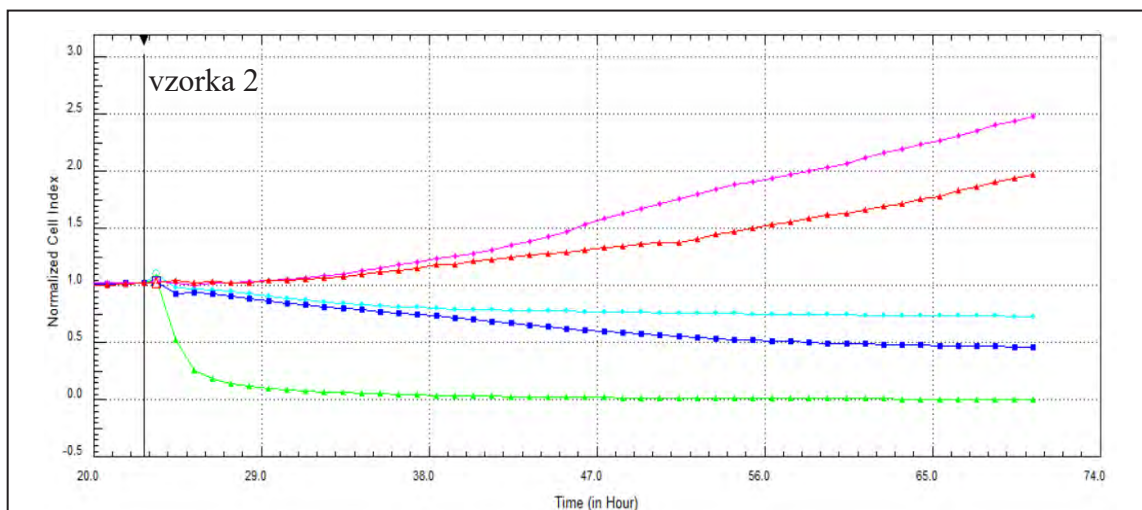
Graf 1: Zmeny proliferácie buniek počas 48 h pôsobenia tinktúry macerovanej v tme



● 125 µg.ml⁻¹, ● 250 µg.ml⁻¹, ● 500 µg.ml⁻¹, ● 1000 µg.ml⁻¹, ● kontrola

Zdroj: xCELLigence softvér

Graf 2: Zmeny proliferácie buniek počas 48 h pôsobenia tinktúry macerovanej na svetle



● 125 µg.ml⁻¹, ● 250 µg.ml⁻¹, ● 500 µg.ml⁻¹, ● 1000 µg.ml⁻¹, ● kontrola

Zdroj: xCELLigence softvér

vyrobených z úrody v rôznych štádiách zrelosti (začiatkom a koncom júla), ako aj zo zelených šupiek a listov orecha kráľovského preukázalo, že najaktívnejšie boli tinktúry z orechov zozbieraných 25. júla a zelené šupky (Gawlik-Dziki a kol., 2014).

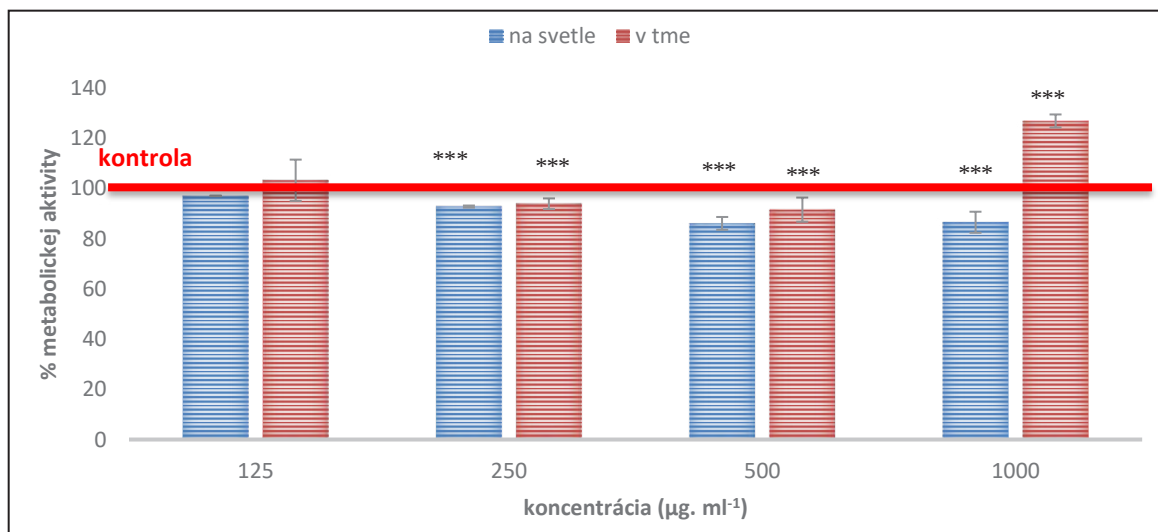
Vplyv tinktúr na proliferáciu buniek

Proliferácia a adherencia buniek bola sledovaná

v reálnom čase v priebehu celého experimentu pomocou xCELLigence systému (RTCA). Priebeh zmien bol zaznamenaný ako bunkový index (CI) do grafov pomocou softvéru xCELLigence. Výsledky monitorovania sú znázornené v grafoch 1 a 2.

Vzhľadom na možnosť použitia pri príprave jedál a nápojov sme sa zamerali na hodnotenie účinku pripravených tinktúr z orecha zeleného na normálne opi-

Graf 3: Zmeny metabolickej aktivity buniek po ošetrovaní tinktúrami orecha (48 h)



*** – hodnoty sú štatisticky odlišné v porovnaní s kontrolou $P < 0,001$

čie epitelové obličkové bunky (VERO), keďže obličky sú cieľový orgán vylučovania látok z tela. Bunky VERO sa používajú pri testovaní toxicity chemických zlúčenín, ako aj pri hodnotení biologickej bezpečnosti nových látok používaných v terapii a v potravinárskom priemysle (Postnikova a kol., 2018; Tam a kol., 2018). Účinok tinktúr na bunky VERO bol hodnotený v reálnom čase pomocou systému xCELLigence, ktorý umožňuje nepretržité sledovanie stavu buniek počas celej doby expozície buniek testovaným látkam. Špecifické výsledky monitorovania pomocou RTCA u buniek VERO vystavených testovaným tinktúram sú uvedené v grafoch 1 a 2.

Najvyššie koncentrácie testovaných tinktúr spôsobili pokles CI, čo naznačuje, že žiadne bunky nepriľnuli ku dnu jamky ($CI = 0$), alebo že nenastala inhibícia bunkovej proliferácie (CI sa nemení v čase); bunky sú stále živé, ale nemnožia sa. Fenolové zlúčeniny prítomné v orechoch vykazujú schopnosť znižovať výskyt nádorov, čo bolo publikované mnohými autormi (Atienzar a kol., 2011; Erisen a kol., 2020). Je zaujímavé, že nižšie koncentrácie 125 a 250 µg. ml⁻¹ vo vzorke 1 a koncentrácia 125 µg. ml⁻¹ vzorky 2 neovplyvnili nepriaznivo bunkovú proliferáciu, skôr

ju podporili, čo môže naznačovať, že tinktúry nemajú cytotoxický účinok a naopak majú potenciál pre bezpečné použitie v nápojoch.

Výsledky hodnotenia zmien metabolickej aktivity MTS testom

Na vyhodnotenie zmien v životaschopnosti buniek meraním metabolickej aktivity bol použitý MTS test. Táto analýza sa uskutočnila po 48 hodinách ošetrovania buniek. Testované vzorky spôsobujú pokles metabolickej aktivity ($P < 0,05$); okrem najnižšej koncentrácie 125 µg. ml⁻¹ ($P > 0,05$) a najvyššej koncentrácie 1000 µg. ml⁻¹ tinktúry macerovanej v tme, kde naopak došlo k nárastu aktivity ($P < 0,001$). Pokles metabolickej aktivity vykazuje trend závislý od dávky. Zmeny v metabolickej a proliferačnej aktivite 48 hodín po ošetrovaní buniek sú znázornené v grafe 3.

Extrakty z orecha sa už predtým ukázali ako cytotoxické pre rôzne typy buniek vrátane nádorových buniek. Triterpénové zlúčeniny boli identifikované ako zložky šupiek zelených orechov, ktoré sú zodpovedné za cytotoxické účinky. Ich štruktúra má dôležitý vplyv na protinádorovú aktivitu (Zhou a kol., 2015). Polyfenoly vykazujú cytotoxickú alebo protinádoro-

vú aktivitu prostredníctvom radu mechanizmov, napr. indukciou bunkovej apoptózy, zmenami v bunkovom cykle alebo prostredníctvom modifikácie signálnych dráh (Bhosale a kol., 2020). Na druhej strane polyfenoly patria k fytochemikáliám, ktoré produkujú rastliny ako súčasť ich obrany pred environmentálnym stresom. Sú schopné chrániť bunky pred oxidačným stresom vyvolaným toxickými látkami (Thomford a kol., 2018).

Cytotoxické účinky fytochemikálií môžu byť zdrojom vedľajších účinkov pri užívaní liekov prírodného pôvodu a funkčných potravinových produktov. Preto je dôležité testovať takéto produkty na výkon v rámci prijateľných koncentrácií a selektivity pôsobenia.

ZÁVER

Pozitívne účinky zeleného orecha na zdravie boli preukázané mnohými štúdiami. Je dôležité správne zvoliť formu pridávania týchto prospešných látok do výživy ľudí, či už v podobe extraktov, alebo macerátov. Výťažky nezrelých plodov orecha kráľovského preukázali vysokú antioxidačnú kapacitu a pri správne zvolenej koncentrácii predstavujú sľubný zdroj zložiek podporujúcich zdravie a prevenciu ochorení. Cytotoxické účinky týchto látok boli preukázané pri vyšších koncentráciách, čo môže byť prospešné pri aplikácii na nádorové bunky, ale musí sa zachovať rovnováha medzi terapeutickým účinkom a bezpečnosťou pre normálne bunky.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla vďaka podpore národného referenčného centra pre pesticídy Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Alamprese, C., Pompei, C., Scaramuzzi, F.: Characterization and antioxidant activity of nocino liqueur. *Food Chem.*, 2005, 90 (4), 495 – 502. Doi:10.1016/j.foodchem.2004.05.011.

Atienzar, F. A., Tilmant, K., Gerets, H. H., Toussaint, G., Speeckaert, S., Hanon, E., Depelchin, O., Dhalluin, S.: The use of real-time cell analyzer technology in drug discovery: defining optimal cell culture conditions and assay reproducibility with different adherent cellular models. *J. Biomol. Screen.*, 2011, 16 (6), 575 – 587. Doi:10.1177/1087057111402825.

Bhosale, P. B., Ha, S. E., Vetrivel, P., Kim, H. H., Kim, S. M., Kim, G. S.: Functions of polyphenols and its anticancer properties in biomedical research: a narrative review. *Transl. Cancer Res.*, 2020, 9 (12), 7619 – 7631. Doi:10.21037/tcr-20-2359.

Biju, J., Reddy, V., Sulaiman, C. T.: Total phenolics and flavonoids in selected *Justicia* species. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 2013, 2 (4), 51 – 52.

Blois, M. S.: Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958, 181 (4617), 1199 – 1200. Doi:10.1038/1811199a0.

Carvalho, M., Ferreira, P. J., Mendes, V. S., Silva, R., Pereira, J. A., Jerónimo, C., Silva, B. M.: Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food Chem. Toxicol.*, 2010, 48 (1), 441 – 447. Doi:10.1016/j.fct.2009.10.043.

Cosmulescu, S., Trandafir, I., Nour, V., Ionica, M., Tutulescu, F.: Phenolics content, antioxidant activity and color of green walnut extracts for preparing walnut liquor. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca*, 2014, 42 (2), 551 – 555. DOI:10.15835/nbha4229649

Croitoru, A., Fikai, D., Craciun, L., Fikai, A., Andronescu, E.: Evaluation and exploitation of bioactive compounds of walnut, *Juglans regia*. *Curr. Pharm. Des.*, 2019, 25 (2), 119 – 131. Doi:10.2174/1381612825666190329150825.

Erisen, S., Arasoğlu, T., Mansuroglu, B., Kocacaliskan, I., Derman, S.: Cytotoxic and mutagenic potential of juglone: a comparison of free and nano-encapsulated form. *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 2020, 71 (1), 69 – 77. Doi:10.2478/aiht-2020-71-3344.

Gawlik-Dziki, U., Durak, A., Pecio, Ł., Kowalska, I.: Nutraceutical potential of tinctures from fruits, green husks, and leaves of *Juglans regia* L. *Sci.*

World J., 2014, 2014. Doi:10.1155/2014/501392.

Hudzyński, N., Makowicz, E., Shanaida, M., Białon, M., Jasicka-Misiak, I., Yezerska, O., Svydenko, L., Wieczorek, P. P.: Phytochemical evaluation of tinctures and essential oil obtained from *satureja montana* herb. *Molecules*, 2020, 25 (20), 1 – 20. Doi:10.3390/molecules25204763.

Milek, M., Marcinčáková, D., Legáth, J.: Polyphenols content, antioxidant activity, and cytotoxicity assessment of *Taraxacum officinale* extracts prepared through the micelle-mediated extraction method. *Molecules*, 2019, 24 (6), 1025. Doi:10.3390/molecules24061025.

Milek, M., Marcinčáková, D., Kolesárová, M., Legáthová, D., Džugan, M.: The effect of adding spices to green walnut tinctures on their polyphenolic profile, antioxidant capacity and action on renal cells. *Applied Sciences*, 2022, 12 (7), 3669.

Nour, V., Trandafir, I., Cosmulescu, S.: Influence of preparing method on antioxidant activity and polyphenols content of green walnuts comfiture. *South-west J. Hortic. Biol. Environ.*, 2014, 5, 83 – 94.

Petrović, M., Pastor, F., Đurović, S., Veljović, S., Gorjanović, S., Sredojević, M., Vukosavljević, P.: Evaluation of novel green walnut liqueur as a source of antioxidants: Multi-method approach. *J. Food Sci. Technol.*, 2021, 58, 2160 – 2169. Doi:10.1007/s13197-020-04726-6.

Postnikova, E., Cong, Y., Dewald, L. E., Dyllal, J., Yu, S., Hart, B. J., Zhou, H., Gross, R., Logue, J., Cai, Y., Deiuliis, N., Michelotti, J., Honko, A. N., Bennett, R. S., Holbrook, M. R., Olinger, G. G., Hensley, L. E., Jahrling, P. B.: Testing therapeutics in cell-based assays: factors that influence the apparent potency of drugs. *PLoS One*, 2018, 13 (3), 1 – 18. Doi:10.1371/journal.pone.0194880.

Pycia, K., Kapusta, I., Jaworska, G.: Impact of the degree of maturity of walnuts (*Juglans regia* L.) and their variety on the antioxidant potential and the content of tocopherols and polyphenols. *Molecules*, 2019, 24 (16), 2936. Doi:10.3390/molecules24162936.

Singleton, V. L., Rossi, J. A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, 16 (3), 144 – 158.

Soto-Maldonado, C., Vergara-Castro, M., Jara-Quezada, J., Caballero-Valdés, E., Müller-Pavez, A., Zúñiga-Hansen, M. E., Altamirano, C.: Polyphenolic extracts of walnut (*Juglans regia*) green husk containing juglone inhibit the growth of HL-60 cells and induce apoptosis. *Electron. J. Biotechnol.*, 2019, 39, 1 – 7. Doi:10.1016/j.ejbt.2019.02.001.

Sowa, P., Marcinčáková, D., Milek, M., Sidor, E., Legáth, J., Džugan, M.: Analysis of cytotoxicity of selected *Asteraceae* plant extracts in real time, their antioxidant properties and polyphenolic profile. *Molecules*, 2020, 25 (23), 5517. Doi:10.3390/molecules25235517.

Stefanowicz-Hajduk, J., Ochocka, J. R.: Real-time cell analysis system in cytotoxicity applications: usefulness and comparison with tetrazolium salt assays. *Toxicol. Reports*, 2020, 7, 335 – 344. Doi:10.1016/j.toxrep.2020.02.002.

Tam, C. C., Henderson, T. D., Stanker, L. H., Cheng, L. W.: Influence of food matrices on the stability and bioavailability of abrin. *Toxins*, 2018, 10 (12), 502. Doi:10.3390/toxins10120502.

Thomford, N. E., Senthilane, D. A., Rowe, A., Munro, D., Seele, P., Maroyi, A., Dzobo, K.: Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, 19 (6), 1578. Doi:10.3390/ijms19061578.

Tiurikova, I., Peresichnyi, M.: Prospects of using walnut in technologies of drinks. *Acta Univ. Cibiniensis. Ser. E. Food Technol.*, 2015, 19 (2), 39 – 50. Doi:10.1515/auceft-2015-0013.

Zhou, Y., Yang, B., Liu, Z., Jiang, Y., Liu, Y., Fu, L., Wang, X., Kuang, H.: Cytotoxicity of triterpenes from green walnut husks of *Juglans mandshurica* Maxim in HepG-2 cancer cells. *Molecules*, 2015, 20 (10), 19 252 – 19 262. Doi:10.3390/molecules201019252.



DIAGNOSTIKA OCHORENIA DNA (*ARTHRITIS URICA*) A JEJ PRIDRUŽENÝCH KOMPLIKÁCIÍ

DIAGNOSTICS OF GOUT DISEASE (*ARTHRITIS URICA*) AND ITS ASSOCIATED COMPLICATIONS

Valko-Rokytovská, Marcela; Mateszová, Nikoleta

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

marcela.valko-rokytovska@uvlf.sk

ABSTRAKT

Dna je chronické metabolické ochorenie charakterizované hyperurikémiou a následným ukladaním kryštálov sodnej soli kyseliny močovej do kĺbov a vnútorných orgánov. V súčasnosti má dna vysokú prevalenciu, čo súvisí s vysokým výskytom jej pridružených komorbidít.

Cieľom tejto štúdie bolo využitie metabolomiky ako nástroja neinvazívnej diagnostiky samotnej dny, a taktiež jej pridruženej komorbidity – nefropatie. Metabolomická profilácia bola uskutočnená pomocou ultra-vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (UHPLC), ktorá predstavovala simultánne kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie vybraných metabolitov v moči pacientov s diagnostikovanou dnou. Súčasťou štúdie bolo vyhodnotenie výsledkov v asociácii s nefropatiou a vyhodnotenie účinnosti urikostatickej liečby u študovaných pacientov.

Výsledky metabolomickej profilácie moču pacientov s diagnostikovanou dnou v porovnaní so zdravou kontrolnou skupinou poukázali na zvýšené vylučovanie kyseliny močovej ($p < 0,01^{**}$); kyseliny 5-hydroxyindolactovej, kyseliny kynurenovej, kynurenínu, serotonínu ($p < 0,001^{***}$); tyrozínu a fenylalanínu ($p < 0,01^{**}$). Koncentrácie kyseliny močovej boli vyhodnotené aj v krvnom sére pacientov. V niektorých prípadoch boli detegované zvýšené hodnoty v porovnaní s fyziologickým rozmedzím. Na základe posúdenia všetkých stanovených parametrov bola vyhodnotená urikostatická liečba u študovaných pacientov za postačujúcu.

Za účelom posúdenia možnej spojitosti ochorenia dny s nefropatiou boli vyhodnotené vybrané pomery metabolitov Kyn/Trp ($p = 0,0265^{*}$); Tyr/Phe ($p = 0,1430$); rýchlosť glomerulárnej filtrácie, koncentrácia kreatinínu, semikvantitatívne vyšetrenie moču a C-reaktívny proteín. Výsledky štúdie

nepreukázali vznik chronického poškodenia obličiek.

Využitie UHPLC a metabolomický prístup vybraných metabolitov v moči v asociácii s ochorením dny môže mať v blízkej budúcnosti veľký prínos v klinicko-biochemickej praxi. Výsledky štúdie môžu slúžiť ako užitočné informácie pre diagnostiku, liečbu a zároveň prevenciu či už samotnej dny, alebo aj jej komorbidít.

Kľúčové slová: diagnostika; dna; komorbidita; metabolomika; UHPLC

ABSTRACT

Gout is a chronic metabolic disease characterized by hyperuricemia and the subsequent deposition of sodium uric acid crystals in the joints and internal organs. Currently, gout has a high prevalence, which is related to the high incidence of its associated comorbidities.

The goal of this study was to use metabolomics as a tool for non-invasive diagnosis of gout itself, as well as its associated comorbidity – nephropathy. Metabolomic profiling was performed using ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC), which represented the simultaneous qualitative and quantitative determination of selected metabolites in the urine of patients with diagnosed gout. Part of the work was the evaluation of results in association with nephropathy and the evaluation of the effectiveness of uricostatic treatment.

The results of metabolomic profiling of patients' urine diagnosed with gout compared to the healthy control group showed an increased excretion of uric acid ($p < 0.01^{**}$), 5-hydroxyindoleacetic acid, kynurenic acid, kynurenine, serotonin ($p < 0.001^{***}$), tyrosine and phenylalanine ($p < 0.01^{**}$). Uric acid concentrations were also evaluated in the patients' blood serum. In some cases, elevated values compared to the physiological range were detected. Based on the assessment of

the determined parameters, we can evaluate the uricostatic treatment in the studied patients as sufficient.

In order to assess the possible connection between gout and nephropathy, selected metabolite ratios Kyn/Trp ($p = 0.0265^{*}$), Tyr/Phe ($p = 0.1430$), glomerular filtration rate, creatinine concentration, semiquantitative urine analysis and C-reactive protein were evaluated. The results of the study did not demonstrate the occurrence of chronic kidney damage.

The use of UHPLC and the metabolomic approach of selected metabolites in urine in association with gout disease may have a great benefit in clinical-biochemical practice in the near future. The results of the study can serve as useful information for the diagnosis, treatment and at the same time prevention of either gout itself or its comorbidities.

Key words: diagnostics; gout; comorbidity; metabolomics; UHPLC

ÚVOD

Hyperurikémia je zvýšená koncentrácia kyseliny močovej (KM) v krvi, ktorá je dôležitým markerom dny ako ochorenia. Hyperurikémia sa považuje za stav organizmu, ku ktorému sa často pridružujú aj iné komorbidity, ako hypertenzia, ochorenie obličiek, *diabetes mellitus*, kardiovaskulárne ochorenia alebo dokonca metabolický syndróm (McCracken a kol., 2018). Obličky zohrávajú najdôležitejšiu úlohu v udržiavaní homeostázy sérovej koncentrácie KM, pretože práve obličkami sa realizuje exkrécia dvoch tretín vytvorenej KM. Zápalová manifestácia dny je vyvolaná depozitom nerozpustných kryštálov sodnej soli KM, ktoré sa ukladajú v tkanivách, napríklad v obličkách, kde prebieha proces reabsorpcie. Hyperurikémia sa považuje za riziko vzniku a progresu niektorej existujúcej nefropatie (Tausche a Aringer, 2016).

V dôsledku úzkeho prepojenia hyperurikémie a ochorenia obličiek je dôležitá včasná diagnostika,

aby sa dokázal spomaliť vznik nefropatií, alebo sa im predchádzalo indikáciou správnej liečby. Dôležitou súčasťou prevencie je pravidelné monitorovanie chronických pacientov aj s dobre tolerovanou urikozurickou alebo urikostatickou liečbou. Prevencia možných komorbidít dny je nevyhnutnou súčasťou liečby pacientov s chronickou formou ochorenia.

MATERIÁL A METÓDY

Chemikálie

Kreatinín, kyselina močová (KM), tryptofán (Trp), kyselina kynurénová (KYNA), kynurenín (Kyn), serotonin (Ser), tyrozín (Tyr), fenylalanín (Phe), kyselina 5-hydroxyindolactová (5-HIAA) a kyselina mravčia boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich (USA). Metanol a deionizovaná voda HPLC kvality boli zakúpené od firmy Fisher (Fisher Scientific UK Ltd., Loughborough, UK). Mobilná fáza bola pripravená z deionizovanej vody s prídavkom 0,1 % kyseliny mravčej. Zásobné roztoky kreatinínu, Phe, Tyr, Trp, Ser, 5-HIAA, Kyn, KYNA boli pripravené v deionizovanej vode o koncentrácii 1 mg.ml⁻¹. Zásobný roztok kyseliny močovej (1 mg.ml⁻¹) bol pripravený v deionizovanej vode s prídavkom 0,1 M NaOH z dôvodu vyššej rozpustnosti.

Prístrojové a softvérové vybavenie

Separácia vzoriek bola uskutočnená pomocou UHPLC Dionex UltiMate 3000 RS (Thermo Fisher Scientific Waltham, Nemecko). Systém je vybavený autosamplérom, inteligentnou pumpou, detektorom diódového poľa (DAD) a fluorescenčným detektorom (FLD). Na kvantitatívnu analýzu bola použitá chromatografická kolóna Thermo Scientific Acclaim™ 120 C18 (Thermo Fisher Scientific, Nemecko) s dĺžkou 150 mm, vnútorným priemerom 3 mm, veľkosťou častíc 3 μm a veľkosťou pórov 120Å. Teplota kolóny bola regulovaná termostatom s presnosťou ± 0,5 °C. Získané dáta boli spracované softvérom Chromeleon 7.2 Chromatography Data System.

Biologický materiál

Na tejto štúdii sa zúčastnilo 52 pacientov (n = 52) oboch pohlaví, ktorých priemerný vek bol 67,1 ± 11,6. Skupinu dobrovoľníkov s diagnostikovanou dnou tvorilo 19 žien a 33 mužov, ktorí boli liečení ambulantne v reumatologickej ambulancii nemocnice Agel Košice-Šaca. Naša štúdia bola schválená etickou komisiou nemocnice Agel Košice-Šaca. Moč (stredný prúd) bol pacientom odoberaný počas kontrolného vyšetrenia, aby nedošlo ku bakteriálnej kontaminácii vzoriek. K dispozícii boli aj výsledky krvných testov s vyšetrovanými parametrami: kreatinín, kyselina močová, CRP a GFR. Kontrolnú skupinu predstavoval súbor 16 dobrovoľníkov (n = 16), ktorých priemerný vek bol 43,9 ± 10,2. Všetci dobrovoľníci boli oboznámení s cieľom biomedicínskeho výskumu a svojím podpisom potvrdili využitie biologického materiálu v tejto štúdii. Pred samotnou analýzou bol moč semikvantitatívne vyšetrený pomocou indikátorových prúžkov Heptaphan Leuco (Erba Lachema, ČR). Semikvantitatívne boli stanovené parametre: hustota, pH, prítomnosť leukocytov, bielkoviny, glukóza, ketolátky, urobilinogén a krv.

Podmienky UHPLC analýzy

Pripravené vzorky moču boli detegované pomocou detekcie DAD a FLD. DAD detekcia prebiehala v spektrálnom rozsahu vlnových dĺžok 220, 230, 240 a 280 nm. FLD detekcia bola uskutočnená pri excitačnej vlnovej dĺžke λ_{ex} = 280 nm a emisnej vlnovej dĺžke λ_{em} = 350 nm. Objem injektovaných vzoriek bol 10 μl. Všetky kvapalné zložky boli degasované pomocou ultrazvukového sonikátora. Mobilná fáza pozostávajúca z deionizovanej vody s prídavkom 0,1 % kyseliny mravčej (A) a metanolu (B) bola aplikovaná za gradientových podmienok: 0 – 50 % B (0 – 20 min), 100 % A (20 – 25 min). Analýza s celkovou dĺžkou 25 minút prebiehala pri teplote kolóny 37 °C a s prietokovou rýchlosťou 0,6 ml.min⁻¹.

Validácia metódy

Realizácia a prevedenie metódy boli hodnotené z hľadiska presnosti, linearity, limitu detekcie (LOD) a limitu kvantifikácie (LOQ). Pomer signál/šum

pre najnižší LOD bol 3 a najnižší LOQ bol 10. Kalibračné krivky boli získané sériou roztokov študovaných analytov s koncentráciou v rozsahu 0,01 – 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ s výnimkou kyseliny močovej, ktorej rozsah bol 25 – 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Počet kalibračných bodov bol $n = 5$ a každý analyt bol injektovaný dvakrát.

Spracovanie výsledkov a štatistická analýza

Analyzované dáta boli štatisticky vyhodnotené pomocou softvéru GraphPad PRISM pre Windows, verzia 5.0 (GraphPad, Inc., La Jolla, CA). Distribúcia rozdelenia hodnôt vykazovala vo všetkých prípadoch študovaných metabolitov v moči pacientov s diagnostikovanou dnou ($n = 52$) log-normálnu distribúciu, ktorá bola potvrdená D'Agostinovým testom normality. Štatistický test bol použitý z dôvodu rozsahu nášho súboru pacientov ($30 \leq n \leq 100$). Log-normálna distribúcia rozdelenia hodnôt v kontrolnej skupine ($n = 16$) bola potvrdená Shapiro-Wilkov testom normality z dôvodu nižšieho rozsahu probandov ($7 \leq n < 30$).

Na porovnanie koncentrácií metabolitov v rámci študovaných skupín bol použitý neparametrický Mann-Whitney U test. Štatistická významnosť bola stanovená na hladine významnosti $p < 0,05$. Na porovnanie vybraných pomerov koncentrácií metabolitov v moči pacientov a kontrolnej skupiny bol použitý Studentov t-test.

VÝSLEDKY

Cieľom štúdie bolo vyvinúť UHPLC metódu na simultánne kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie kreatinínu, kyseliny močovej a vybraných aminokyselín fenylalanínu, tyrozínu, tryptofánu a jeho metabolitov serotonínu, kyseliny 5-hydroxyindolactoovej, kyseliny kynurenínovej a kynurenínu. Všetky tieto študované metabolity sa prirodzene nachádzajú v moči za fyziologických, resp. patologických podmienok. Následne, ďalším cieľom bola metabolická profilácia vyššie spomenutých metabolitov v moči pacientov s diagnostikovaným ochorením dna a kontrolnej skupiny.

Kvantitatívne stanovenie študovaných metabolitov v moči pacientov s diagnostikovanou dnou artritídou je graficky znázornené na obrázku 1. Z grafickej vizualizácie vyplýva, že dochádza k dysbalancii vylučovaných metabolitov u pacientov s dnou v porovnaní s kontrolnou skupinou. Namerané koncentrácie metabolitov boli vyššie v moči pacientov v porovnaní s kontrolnou skupinou. Táto skutočnosť platí pre všetky študované metabolity s výnimkou kreatinínu, ktorého koncentrácie v moči pacientov s dnou a zdravých dobrovoľníkov boli relatívne porovnateľné.

Koncentrácia KM v moči bola vyhodnotená samostatne, keďže hodnoty koncentrácie KM sú rádovo vyššie (viď obr. 2) v porovnaní s ostatnými študovanými metabolitmi.

Výstupné dáta deskriptívnej analýzy predstavovali hodnoty mediánu koncentrácií všetkých študovaných metabolitov v moči pacientov s diagnostikovanou dnou a kontrolnej skupiny. Minimálne, maximálne hodnoty a hodnoty mediánu pre každý metabolit v moči oboch študovaných skupín sú uvedené v tabuľke 1 a 2.

Dôležitý parameter, ktorý je potrebné kontrolovať u pacientov s chronickou dnou, je C-reaktívny proteín (CRP). Fyziologická hodnota CRP u zdravých jedincov je $< 5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Hodnota CRP bola stanovená u 18 pacientov z celkového počtu $n = 52$ (34,6 %). Priemerná hodnota CRP v skupine pacientov s dnou bola $6,79 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Z toho vyplýva, že aj v chronickom štádiu ochorenia môžu byť zvýšené zápalové parametre.

Častou komorbiditou dny je vznik nefropatie, a preto u pacientov bol vyhodnotený aj parameter GFR (rýchlosť glomerulárnej filtrácie), ktorý je dôležitým parametrom pri hodnotení správnej funkcie obličiek. V skupine pacientov s chronickou dnou boli deskriptívne vyhodnotené aj hodnoty GFR. Priemerná hodnota GFR bola $0,997 \text{ ml/s/1,73 m}^2$; čo je hodnota nižšia ako fyziologická hodnota $>1,5 \text{ ml/s/1,73 m}^2$. Hodnota GFR bola sledovaná u 23 pacientov s diagnostikovanou chronickou formou dny z celého súboru pacientov $n = 52$ (44,2 %). Z toho vyplýva, že pacienti s dnou mali mierne alebo až stredne zníženú funkciu obličiek, keďže dochádza k zníženiu rýchlos-

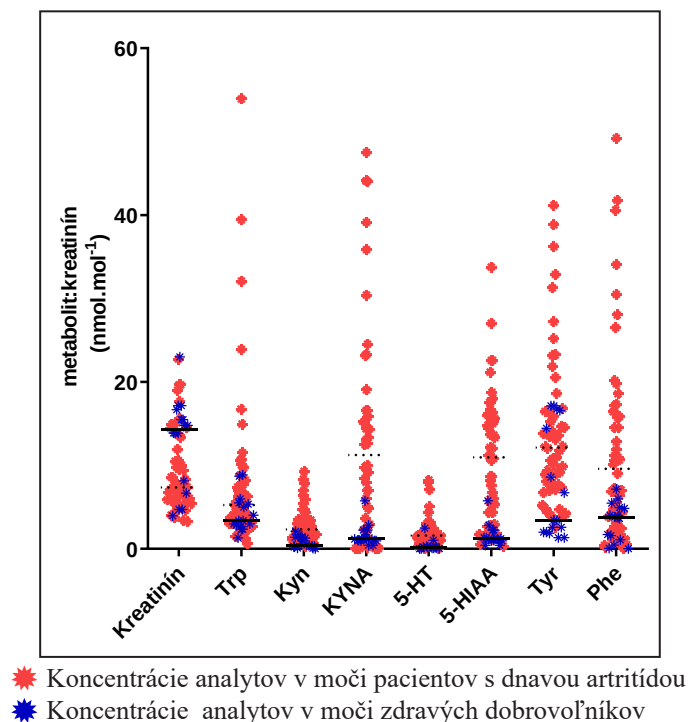
Tab. 1: Vyhodnotenie študovaných metabolitov (nmol.mol⁻¹ kreatinínu) v moči pacientov s diagnostikovanou dnou

n = 52	Kreatinín (μM)	Trp	Kyn	KYNA	Ser	5-HIAA	Tyr	Phe	KM
Minimum	3,27	0,65	0,26	0,00	0,00	0,31	2,60	0,06	57,54
25 % percentil	5,75	3,40	1,41	2,48	0,77	3,29	7,73	2,48	136,60
Medián	7,35	5,26	2,34	11,25	1,59	10,96	12,14	9,58	222,90
75 % percentil	11,58	8,16	3,64	22,13	2,54	16,14	16,73	16,97	342,40
Maximum	22,74	53,91	9,28	81,30	8,25	33,76	41,18	72,73	564,90

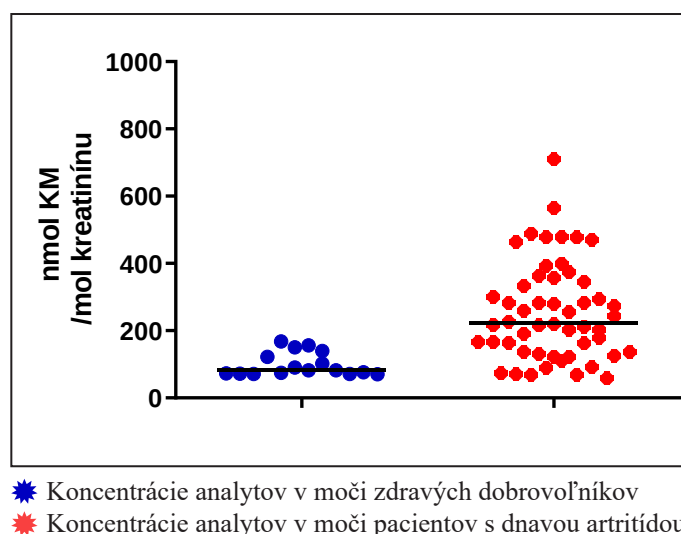
Tab. 2: Vyhodnotenie študovaných metabolitov (nmol.mol⁻¹ kreatinínu) v moči kontrolnej skupiny

n = 16	Kreatinín (μM)	Trp	Kyn	KYNA	Ser	5-HIAA	Tyr	Phe	KM
Minimum	3,95	1,32	0,023	0,41	0,01	0,41	1,33	0,02	70,06
25 % percentil	7,03	2,70	0,23	0,97	0,03	0,97	1,99	1,21	72,31
Medián	14,33	3,37	0,45	1,18	0,11	1,18	3,45	3,78	82,16
75 % percentil	16,39	5,47	1,34	2,01	0,27	2,01	16,05	4,93	135,40
Maximum	22,99	8,85	2,11	5,75	2,48	5,75	17,14	7,15	167,90

Obr. 1: Grafické znázornenie nameraných koncentrácií (nmol.mol⁻¹ kreatinínu) študovaných metabolitov v moči pacientov s diagnostikovanou dnou artritídou vs. zdravých dobrovoľníkov



Obr. 2: Grafické znázornenie nameranej koncentrácie kyseliny močovej (nmol.mol⁻¹ kreatinínu) v moči kontrolnej skupiny zdravých dobrovoľníkov vs. pacientov s diagnostikovanou dnovou artritídou



Tab. 3: Štatistické vyhodnotenie Mann-Whitney U testu metabolitov v moči pacientov s diagnostikovanou dnou oproti kontrolnej skupine

Metabolity	Mann-Whitney U test p – hodnoty
Kreatinín	0,0354*
KM	< 0,01**
Trp	0,0632
KYNA	0,0007***
Kyn	< 0,0001***
Ser	< 0,0001***
Tyr	0,0041**
Phe	0,0026**
5-HIAA	< 0,0001***

KM – Kyselina močová, Trp – Tryptofán, KYNA – Kyselina kynurenová, Kyn – Kynurenín, Ser – Serotonín, Tyr – Tyrozín, Phe – Fenylalanín, 5-HIAA – Kyselina 5-hydroxyindolactová, p – hodnota významnosti, $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$

ti glomerulárnej filtrácie.

Studentov t-test pre dva nezávislé výbery s rovnosťou rozptylu bol zvolený pre štatistickú analýzu vybraných pomerov metabolitov u pacientov a kontrolnej skupiny. Štatistická významnosť bola definovaná hladinou významnosti $p < 0,05$. Vyhodnotené pomery metabolitov Kyn/Trp ($p = 0,0265^*$); 5-HIAA/Trp ($p = 0,0048^{**}$); Ser/Trp ($p = 0,0092^{**}$); KYNA/Trp

($p = 0,0121^*$) vykazovali signifikantne významné parametre v diagnostike samotnej dny a vo veľkej miere aj jej komorbidít. Ochorením, pri ktorom má veľké opodstatnenie sledovať pomery metabolitov, je chronické ochorenie obličiek – CKD (chronic kidney disease).

Neparametrický Mann-Whitney U test bol použitý na štatistické vyhodnotenie dát získaných z oboch študovaných skupín (viď tab. 3) Kyselina kynurenová, kynurenín, serotonín a kyselina 5-hydroxyindolactová boli vyhodnotené ako signifikantne významné ($p < 0,001$) v diagnostike dnavej artritídy. V prípade vyhodnotenia kyseliny močovej ($p < 0,01$) môžeme potvrdiť, že sledovanie koncentrácie KM v sére a moči má opodstatnený význam v diagnostike a následnej terapii dnavej artritídy. Ďalšími štatisticky významnými metabolitmi boli Tyr ($p < 0,01$); Phe ($p < 0,01$) a kreatinín ($p < 0,05$).

DISKUSIA

Hlavným zameraním práce bolo využitie neinvazívnej diagnostiky štúdiom metabolomického profilu moču pacientov s diagnostikovanou dnou. V dôsledku nízkej psychickej záťaže pacienta sa očakáva vyššia compliance pacientov k samotnému vyšetreniu a aj následnej liečbe (Scuiller a kol., 2020).

Metabolická profilácia bola uskutočnená pomocou UHPLC metódy, ktorá predstavovala simultánne kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie vybraných metabolitov (serotonín, kyselina 5-hydroxyindolová, kyselina kynurenínová, kynurenín) v moči pacientov s diagnostikovaným ochorením dna ($n = 52$) a zdravej kontrolnej skupiny ($n = 16$). V štúdiu Liu a kol. (2011) poukázali na spojitosť ochorenia dny s metabolitmi ako kreatinín, Trp, 5-HIAA a kyselina hippurová (Liu a kol., 2011). Vedecká práca Luo a kol. (2018) bola tiež zameraná na kvantitatívne stanovenie aminokyselín v krvnom sére a moči a poukázali na možnosť odlíšenia akútneho dnaveho záchvatu a chronickej dny (Luo a kol., 2018).

Predpokladáme, že študované metabolity úzko súvisia s dnou a z toho dôvodu boli vyhodnotené rozdiely v pozorovaných intenzitách biomarkerov získaných zo skupiny pacientov s dnou a zdravej kontrolnej skupiny. Na štatistické vyhodnotenie dát bol použitý neparametrický Mann-Whitney U test. Výsledky tejto štúdie poukázali na zvýšené vylučovanie kyseliny močovej ($p < 0,01^{**}$); kyseliny 5-hydroxyindolovej ($p < 0,0001^{***}$); kyseliny kynurenovej ($p = 0,0007^{***}$); kynurenínu ($p < 0,0001^{***}$) a serotonínu ($p < 0,0001^{***}$) v moči pacientov s dnou v porovnaní so zdravou kontrolnou skupinou. Za signifikantne významné metabolity v diagnostike dny boli vyhodnotené aj tyrozín ($p = 0,0041^{**}$) a fenylalanín ($p = 0,0026^{**}$). Štatistická významnosť stanovenia kreatinínu bola tiež štatisticky potvrdená ($p = 0,0354^{*}$).

Koncentrácie aminokyseliny tyrozínu u pacientov s dnou (medián $12,14 \text{ nmol.mol}^{-1}$ kreatinínu) boli zvýšené v porovnaní s kontrolnou skupinou (medián $3,45 \text{ nmol.mol}^{-1}$ kreatinínu). Referenčné hodnoty Tyr v moči dospelých jedincov oboch pohlaví sú v rozmedzí $4,10 - 23,50 \text{ nmol.mol}^{-1}$ kreatinínu (Bouatra a kol., 2013). V štúdiu Kopple (2007) poukázali na znížené hodnoty Tyr a jeho metabolitov, pretože nedochádza k hydroxylácii fenylalanínu u pacientov s diagnostikovanou dnou s pridruženou komplikáciou CKD. Strata renálnej aktivity fenylalanínhydroxylázy je zodpovedná za zníženú konverziu fenylalanínu na

tyrozín pri zlyhavaní obličiek. Moč pacientov v našej štúdiu vykazoval zvýšené koncentrácie tyrozínu, preto predpokladáme prítomnosť aktivity fenylalanínhydroxylázy; a taktiež nameraná koncentrácia kreatinínu v sére, moči a hodnoty GFR v sére nesvedčia o vzniku prítomnej CKD.

V skupine pacientov s dnou sme detegovali zvýšenú koncentráciu tryptofánu v moči (medián $5,26 \text{ nmol.mol}^{-1}$ kreatinínu) v porovnaní s kontrolnou skupinou (medián $3,37 \text{ nmol.mol}^{-1}$ kreatinínu), avšak štatistická významnosť tryptofánu v diagnostike dny a jej komorbidít nebola potvrdená. Predpokladáme, že zvýšené koncentrácie Trp v moči môžu súvisieť s vysokým príjmom antioxidantov v strave pacientov, keďže pacienti dodržiavajú nízkopurínovú diétu, ktorá vylučuje málo výživné potraviny a potraviny s vysokým obsahom tukov a sacharidov (Strasser a kol., 2016).

Koncentrácie KYNA v moči dospelých jedincov oboch pohlaví sú v rozmedzí $0,08 - 4,20 \text{ nmol.mol}^{-1}$ kreatinínu (Bouatra a kol., 2013). Hodnoty koncentrácie v našej skupine pacientov s dnou boli rádovo vyššie ako v kontrolnej skupine, a to v rozmedzí $0 - 81,30 \text{ nmol.mol}^{-1}$ kreatinínu. Koncentrácia metabolitu KYNA úzko súvisí so zápalovými reakciami organizmu.

V našej skupine pacientov ($n = 52$) bola u 18 pacientov stanovená aj vyššia koncentrácia CRP ako fyziologická hodnota ($\text{CRP} < 5 \text{ mg.l}^{-1}$), ktorá predstavuje priamy indikátor zápalu v organizme. Semikvantitatívnym vyšetrením moču sme detegovali u 29 pacientov (z celkového $n = 52$) aj prítomnosť bielkovín, čo môže tiež svedčiť o prítomnosti zápalového procesu.

Rozmedzie koncentrácií kreatinínu v skupine pacientov s dnou bolo $3,95 - 22,99 \text{ }\mu\text{M}$ a v skupine zdravej kontroly bolo $3,27 - 22,74 \text{ }\mu\text{M}$, ktoré korelovali s referenčnými hodnotami $4,515 - 20,423 \text{ }\mu\text{M}$ podľa štúdie Bouatra a kol. (2013). Na základe získaných koncentrácií kreatinínu môžeme skonštatovať, že naša skupina pacientov nevykazuje známky chronického poškodenia funkcie obličiek. Zároveň však treba podotknúť, že koncentrácia kreatinínu ako

jediný parameter nie je postačujúci.

Fyziologická koncentrácia serotonínu v moči u dospelých jedincov oboch pohlaví organizmu je v rozmedzí 0,04 – 0,12 nmol.mol⁻¹ kreatinínu (Bouatra a kol., 2013). V našej kontrolnej skupine dobrovoľníkov bolo rozmedzie 0,01 – 2,48 nmol.mol⁻¹ kreatinínu a v skupine pacientov 0 – 8,25 nmol.mol⁻¹ kreatinínu. Predpokladáme, že zvýšené koncentrácie serotonínu môžu vyplývať aj zo zvýšenej koncentrácie tryptofánu, ktorý je prekursorom pri biosyntéze serotonínu.

Rozmedzie koncentrácií 5-HIAA a Phe v moči sú pre 5-HIAA dospelých jedincov bez ohľadu na pohlavie 0,40 – 5,80 nmol.mol⁻¹ kreatinínu a pre Phe za rovnakých podmienok 5,00 – 11,30 nmol.mol⁻¹ kreatinínu (Bouatra a kol., 2013). Koncentrácie oboch metabolitov mnohonásobne prevyšovali maximálne fyziologické hodnoty. Kopple vo svojej štúdii (2007) poukázal na súvislosť medzi zvýšenou koncentráciou Phe u pacientov s dnou a následnou komorbiditou CKD. Koncentrácie fenylalanínu môžu byť zvýšené v dôsledku nízkej aktivity enzýmu fenylalanínhydroxylázy, ktorý katalyzuje premenu fenylalanínu na tyrozín. V našej štúdii sme detegovali zvýšené koncentrácie Tyr, preto predpokladáme, že aktivita fenylalanínhydroxylázy bola prítomná, čo nesvedčí o vzniku chronického poškodenia obličiek.

Fyziologické rozmedzie kynurenínu je 1,10 – 2,50 nmol.mol⁻¹ kreatinínu (Bouatra a kol., 2013). Vyhodnotené koncentrácie Kyn v skupine dobrovoľníkov boli v rozmedzí 0,02 – 2,11 nmol.mol⁻¹ kreatinínu a v skupine pacientov s dnou 0,26 – 9,28 nmol.mol⁻¹ kreatinínu. Štatistická významnosť pre stanovenie Kyn bola vyhodnotená ako signifikantne veľmi významná ($p < 0,0001^{***}$). Prítomnosť chronického zápalového procesu môže mať za následok zvýšené koncentrácie Kyn (Davis a Liu, 2015).

V našej štúdii sme sa zamerali aj na asociácie dny s jej pridruženými komplikáciami. Predpokladáme, že pomer Tyr/Phe úzko súvisí s možným vznikom nefropatií u pacientov s chronickou dnou (Kopple, 2007). V štúdii Wang a kol. (2019) poukázali na znížený pomer Tyr/Phe v krvnej plazme a iných telesných tekutinách, a tiež v erytrocytoch a myocytoch v spo-

jitosti s pridruženým chronickým ochorením obličiek (Wang a kol., 2019). V našej štúdii pomer Tyr/Phe ($p = 0,1430$) bol mierne znížený, avšak nevykazoval štatistickú signifikanciu medzi pacientmi a kontrolnou skupinou. Taktiež boli vyhodnotené aj pomery Kyn/Trp ($p = 0,0265^*$); 5-HIAA/Trp ($p = 0,0048^{**}$); Ser/Trp ($p = 0,0092^{**}$); KYNA/Trp ($p = 0,0121^*$); ktoré vykazovali výrazné rozdiely medzi skupinou pacientov v porovnaní s kontrolnou skupinou. Zakrocka a Załuska (2022) vo svojej štúdii poukázali na signifikanciu pomeru Kyn/Trp v moči pacientov s dnou voči zdravej kontrole a zároveň poukázali aj na asociáciu s komorbiditami dny (Zakrocka a kol., 2022).

V skupine našich pacientov ($n = 23$) s chronickou dnou sme tiež vyhodnotili GFR. Priemerná hodnota GFR u pacientov s dnou bola 0,997 ml/s/1,73 m²; čo je nižšia hodnota ako fyziologická hodnota >1,5 ml/s/1,73 m² (Levey a kol., 2014). Nameraná priemerná hodnota GFR je klasifikovaná ako mierne znížená funkcia obličiek.

Vyhodnotený koncentračný rozptyl hodnôt KM v moči pacientov s dnou bol v rozmedzí 57,54 – 564,90 nmol.mol⁻¹ kreatinínu. Referenčná hodnota KM v moči je 93 – 329 nmol.mol⁻¹ kreatinínu (Bouatra a kol., 2013). Rozmedzie koncentrácií v našej kontrolnej skupine bolo 70,06 – 167,90 nmol.mol⁻¹ kreatinínu. Signifikantná významnosť stanovenia KM v moči bola vyhodnotená na hladine významnosti $p < 0,01^{**}$.

Referenčná hodnota KM v sére u mužského pohlavia je 180 – 420 mmol.l⁻¹ a u žien 180 – 360 mmol.l⁻¹ (Marks a kol., 2003). Priemerná hodnota koncentrácie KM v sére našich pacientov ($n = 41$) s diagnostikovanou dnou bola 377,80 mmol.l⁻¹. Priemer koncentrácie KM v skupine žien ($n = 15$) bol 358,60 mmol.l⁻¹. Vyššia koncentrácia KM v sére bola nameraná u 6 žien. V skupine mužov ($n = 26$) bola priemerná hodnota koncentrácie 392,15 mmol.l⁻¹, čo je nižšia ako najvyššia fyziologická hodnota 420 mmol.l⁻¹ (Marks a kol., 2003). Vyššie koncentrácie KM v sére boli u 11 mužov v rozmedzí 420 – 540 mmol.l⁻¹. Pacienti s diagnostikovanou dnou boli liečení alopurinolom s koncentráciou účinnej látky v rozmedzí 100 – 600 mg.

Farmakoterapia dny úzko súvisí s koncentráciou KM v moči a sére. V súčasnosti sú registrované na Slovensku dve liečivá na liečbu dny, a to alopurinol a febuxostat (Gavorník a kol., 2007). Pacienti v našej štúdii s diagnostikovanou chronickou dnou prijímali alopurinol v dennej dávke v rozmedzí 100 – 600 mg alebo febuxostat v dávke 80 mg. Napriek prebiehajúcej medikamentóznej liečbe a zníženiu incidence akútnych dnových záchvatov, koncentrácia KM v sére u niektorých pacientov prevyšovala referenčnú hodnotu, o čom svedčí aj vyššia nameraná koncentrácia KM v moči. Aj napriek zvýšeným koncentráciám KM v sére a moči u niektorých pacientov môžeme považovať urikostatickú liečbu za postačujúcu.

Dôležitou súčasťou správnej liečby dny je aj správna životospráva s dodržiavaním nízkopurínovej diéty. V prípade vzniku nefropatií má veľký prínos pre pacienta aj diéta s nižším obsahom bielkovín, ktorá nezaťažuje obličky.

ZÁVER

V súčasnosti má výskyt dnavej artritídy stúpajúcu tendenciu, čo podmieňuje aj vznik jej pridružených komorbidít. V klinickej praxi sa metabolomika čoraz viac dostáva do popredia z dôvodu možnosti neinvazívneho vyšetrenia. Veľkou výhodou metabolomickej profilácie je komplexnosť samotnej analýzy za účelom získať užitočné informácie o fyziologickom/patologickom stave živého organizmu. Výsledky tejto metabolomickej štúdie môžu prispieť v rámci ich možnej aplikácie v diagnostike samotnej dny, a tak predísť možným vznikom jej pridružených komorbidít.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla za podpory projektu KEGA 015UVLF-4/2022.

ZOZNAM LITERATÚRY

Bouatra, S., Aziat, F., Mandal, R., Guo, A. C.,

Wilson, M. R., Knox, C., Bjorndahl, T. C., Krishnamurthy, R., Saleem, F., Liu, P., Dame, Z. T., Poelzer, J., Huynh, J., Yallou, F. S., Psychogios, N., Dong, E., Bogumil, R., Roehring, C., Wishart, D. S.: The Human urine metabolome. *PLoS One*, 2013, 8 (9), e73076.

Davis, I., Liu, A.: What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it important to neurotherapeutics? *Expert Rev. Neurother.*, 2015, 15 (7), 719 – 721.

Gavorník, P., Dukát, A., Gašpar, Ľ., Uhrinová, A., Pišková, T., Krížová, L., Mihoková, V.: Metabolický syndróm X ako cievna porucha [Metabolic syndrome X as a vascular disorder]. *Súčasná Klin. prax*, 2007, 1, 52 – 55.

Kopple, J. D.: Phenylalanine and tyrosine metabolism in chronic kidney failure. *J. Nutr.*, 2007, 137 (6), 3 – 7.

Levey, A. S., Inker, L. A., Coresh, J.: GFR estimation: from physiology to public health. *Am. J. Kidney Dis.*, 2014, 63 (5), 820 – 834.

Liu, Y., Sun, X., Di, D., Quan, J., Zhang, J., Yang, X.: Clinica Chimica Acta A metabolic profiling analysis of symptomatic gout in human serum and urine using high performance liquid chromatography-diode array detector technique. *Clin. Chim. Acta*, 2011, 412 (23 – 24), 2132 – 2140.

Luo, Y., Wang, L., Liu, X. Y., Chen, X., Song, Y. X., Li, X. H., Jiang, C., Peng, A., Liu, J. Y.: Plasma profiling of amino acids distinguishes acute gout from asymptomatic hyperuricemia. *Amino Acids*, 2018, 50 (11), 1539 – 1548.

Marks, V., Cantor, T., Pullmann, R., Nosalo-va, G.: Differential diagnosis by laboratory medicine. *EJIFCC*, 2003, 14 (3), 152.

McCracken, E., Monaghan, M., Sreenivasan, S.: Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin. Dermatol.*, 2018, 36 (1), 14 – 20.

Scuiller, A., Pascart, T., Bernard, A., Oehler, E.: Gout. *Rev. Med. Interne*, 2020, 41 (6), 396 – 403.

Strasser, B., Gostner, J. M., Fuchs, D.: Mood, food, and cognition: role of tryptophan and serotonin. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2016, 19 (1), 55

– 61.

Tausche, A. K., Aringer, M.: Gouty arthritis. *Z. Rheumatol.*, 2016, 75, 885 – 898.

Wang, Y. N., Ma, S. X., Chen, Y. Y., Chen, L., Liu, B. L., Liu, Q. Q., Zhao, Y. Y.: Chronic kidney disease: biomarker diagnosis to therapeutic targets. *Clin. Chim. Acta*, 2019, 499, 54 – 63.

Zakrocka, I., Załuska, W.: Kynurenine pathway in kidney diseases. *Pharmacol. Reports*, 2022, 74 (1), 27 – 39.



STRAVOVACIE PREFERENCIE U ŠTUDENTOV A ZAMESTANCOV NA UVLF

DIETARY PREFERENCES OF STUDENTS AND STAFF AT UVLF

Megyesy Eftimová, Zuzana¹; Eftimová, Jarmila²

¹Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice

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

zuzana.megyesy.eftimova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Cieľom predloženej štúdie bolo pomocou dotazníka vykonať prieskum stravovacích návykov respondentov s ohľadom na ich pracovné zaradenie (študent vysokej školy – domáci, zo zahraničia, zamestnanec vysokej školy) na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie (UVLF) v Košiciach. Na základe výskumných dát (odpovedí) sme poukázali na pozitívne a negatívne stravovacie návyky u pozorovanej vzorky. Prieskum sme realizovali dotazníkovou formou, osobným zberom na vzorke 150 respondentov vo veku 20 až 67 rokov. Z celkového počtu respondentov 50 (33,3 %) respondentov tvorili domáci študenti, 50 (33,3 %) zahraniční študenti a 50 (33,3 %) boli zamestnanci. Z prieskumu vyplynulo, že najhoršie stravovacie návyky majú domáci študenti, pretože vo viacerých otázkach odpovedali, že uprednostňujú nezdravé potraviny pred zdravými. Až 43,5 % stu-

dentov preferuje sladké raňajky. Zarážajúce bolo zistenie, že (52,7 %) domácich študentov obedeje až po príchode domov, častokrát až v neskorých poobedňajších hodinách. Zistili sme, že 50,9 % domácich študentov jedáva večeru po 19 hodine; 45,5 % domácich študentov si dopraje pochutiny pri TV/PC. Nelichotivé je tiež zistenie, že až 47,4 % domácich študentov navštevuje fast-foody a reštaurácie jedenkrát do týždňa. Nemôžeme však povedať, že zahraniční študenti a zamestnanci sa stravujú ukážkovo podľa zásad správnej výživy a konzumujú len zdraviu prospešné potraviny. Na otázku, čo najčastejšie konzumujú na desiatu sme zistili, že zahraniční študenti (48,5 %) konzumujú sladkosti a zamestnanci (50 %) sladké pečivo. Alarmujúce je zistenie, že 70,6 % zamestnancov uprednostňuje na obed tučné mäso a 44,7 % zamestnancov má denný príjem tekutín iba 1000 ml. Tieto zistenia sú dosť znepokojúce, pretože v areáli školy sa nachádza školská jedáleň, ktorá ponú-

ka na výber z niekoľkých druhov jedál denne. V závere konštatujeme, že je potrebné vykonať pre študentov a zamestnancov UVLF v Košiciach viac osvetu vo forme prednášok, letákov o zdravej výžive, zdravom životnom štýle s ohľadom na denný energetický príjem a potrebu organizmu. Dietetické poradenstvo, ktoré je založené na dôkazoch, podporuje zmeny v stravovaní, ktoré zabezpečia optimálne zdravie človeka.

Kľúčové slová: fast-foody; mäso; tekutiny; stravovacie návyky; výživa; životný štýl

ABSTRACT

The aim of the present study was to use a questionnaire to investigate the dietary habits of the respondents with regard to their occupational status (university student – domestic, foreign, university employee) at the University of Veterinary Medicine and Pharmacy (UVMP) in Košice. Based on the research data (responses), we pointed out the positive and negative eating habits of the observed sample. We conducted the survey in the form of a questionnaire, by personal collection on a sample of 150 respondents aged 20 to 67 years. Of the total respondents, 50 (33.3 %) were domestic students, 50 (33.3 %) were international students and 50 (33.3 %) were employees. The survey revealed that domestic students had the worst eating habits as they responded that they preferred unhealthy foods to healthy foods in several questions. As many as 43.5 % of the students preferred sweet breakfast. What is striking is the finding that (52.7 %) of home students have lunch only after they get home, which is often in the late afternoon. We found that 50.9 % of home students eat dinner after 7 pm, 45.5 % of home students indulge in snacks with TV/PC. It is also an unflattering finding that as many as 47.4 % of home students visit fast-food joints and restaurants once a week. However, it cannot be said that international students and staff are eating exemplarily according

to the principles of good nutrition and eating only healthy foods. When asked what they eat most often for snacks, we found that international students (48.5 %) eat sweets and staff (50 %) eat sweet pastries. Alarming, 70.6 % of employees prefer fatty meats for lunch and 44.7 % of employees have a daily fluid intake of only 1,000 ml. These findings are quite disturbing as there is a school canteen in the campus which offers several types of meals to choose daily. In conclusion, it is necessary to conduct more education for students and employees of UVMP in Košice in the form of lectures, leaflets on healthy nutrition, healthy lifestyle with regard to daily energy intake and the need of the body. Evidence-based dietetic counseling promotes dietary changes to ensure optimal human health.

Key words: eating habits; fast food; meat; lifestyle; liquids; nutrition

ÚVOD

Z pohľadu národného verejného zdravia je výživa životne dôležitá pre zdravie, rast, ekonomický rozvoj a produktivitu počas celého života populácie (Mozafarian a kol., 2024). Výživa je komplex procesov, ktorými ľudský organizmus prijíma a zužitkováva látky nevyhnutné na úhradu nepretržitého energetického výdaja, na stavbu a stálu obnovu tkanív a zabezpečovanie fyziologických funkcií (Fratrcová-Šramková, Kajaba, Mrázová, 2011). Živiny (nutrienty) sú zložky potravín, látky so známym chemickým zložením, sú prijímané stravou, zabezpečujú vývoj všetkých štruktúr, funkcií organizmu a ich rovnovážny stav (Keresteš a kol., 2011).

Výživovú a energetickú hodnotu potravín zabezpečujú hlavné živiny, prídavné alebo doplnkové živiny majú iba biologickú hodnotu (Šulcová a kol., 2012). Vo výžive človeka plnia živiny spolu s vodou a vzduchom uspokojovanie základných potrieb človeka (Keresteš a kol., 2011). Zároveň sa výživa spája aj s emóciami, pretože ide často o určitý druh uspokojenia

nia. Výživa je najvýznamnejší faktor, ktorý ovplyvňuje ľudské zdravie pozitívnym alebo negatívnym spôsobom (Tuček, 2013). Zlá výživa môže prispieť k zlému zdravotnému stavu, hlavne v súvislosti s chronickými ochoreniami, ktoré vedú k zníženiu kvality života jedinca (Mozaffarian a kol., 2024).

Hlavnou príčinou úmrtnosti na celom svete sú kardiovaskulárne ochorenia (CVD) (Roth a kol., 2020; Tsao a kol., 2023). Medzi modifikovateľnými metabolickými a behaviorálnymi rizikami pre KVO sa objavila zlá strava ako hlavný faktor, ktorý spôsobuje 36 % globálnych koronárnych úmrtí, 70 % nových prípadov cukrovky na celom svete a veľkú záťaž v dôsledku invalidity a predčasnej úmrtnosti. Kardio-metabolické riziko možno pripísať nízkemu príjmu ochranných diétnych zložiek (napr. ovocie, zelenina, celozrnné výrobky, strukoviny, nenasýtené mastné kyseliny, ryby) a vysokému príjmu škodlivých zložiek (napr. rafinované obilniny, spracované mäso, nasýtené tuky, sodík, pridané cukry) (Micha a kol., 2017; Miller a kol., 2022).

Súčasná politika Európskeho úradu pre bezpečnosť potravín (EFSA) však zdôrazňuje, že bezpečnosť potravín sa musí chápať zo širokej perspektívy v súlade s prístupom „jedno zdravie“, čím sa zabezpečí, aby sa zohľadňovali tak nutričné aspekty, ako aj aspekty (environmentálnej) udržateľnosti (Devos a kol., 2022). Z kvalitatívneho hľadiska by strava mala byť vyvážená, rozmanitá, bohatá na dostatočné množstvo živín, minerálov a vitamínov. Veľmi dôležitý je príjem vody. Pri nesprávnych stravovacích návykoch môže nevyvážená výživa spôsobiť nedostatok niektorých živín. Výživa by mala zaisťovať príjem energie, ktorá zodpovedá jeho výdaju. Ľudia so sedavým spôsobom zamestnania by mali mať nižší energetický príjem výživy ako ľudia s fyzicky náročnejšou prácou. Nadmerný príjem stravy, ktorá má vysokú energetickú hodnotu vedie k vzniku obezity, *diabetes mellitus*, srdcovo-cievnych ochoreniam, ochoreniam pohybového aparátu, rakovine a k mnohým ďalším ochoreniam neinfekčného pôvodu (Machová a kol., 2009).

Cieľom výskumu bolo pomocou dotazníka vy-

konať prieskum stravovacích návykov u študentov a zamestnancov UVLF v Košiciach. Na základe výskumných dát (odpovedí) na výskumné otázky poukážeme na to, či existujú rozdiely v stravovacích návykoch medzi respondentami, s ohľadom na pracovné zaradenie (študenti domáci, zahraniční, zamestnanci). Komparáciou výskumných dát zistíme, či bola naša hypotéza potvrdená alebo zamietnutá. V prípade, že prieskumná vzorka respondentov má nevhodné, nezdravé stravovacie návyky, poukážeme na zdravotné dôsledky a navrhujeme dietetické zmeny.

MATERIÁL A METÓDY

Prieskumný problém: Stravovacie návyky respondentov s ohľadom na ich pracovné zaradenie.

Hlavný cieľ prieskumu: Zistiť stravovacie návyky respondentov s ohľadom na ich pracovné zaradenie (študent vysokej školy – domáci, zo zahraničia, zamestnanec vysokej školy) na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie (UVLF) v Košiciach.

Parciálne ciele prieskumu:

- zistiť, čo najčastejšie raňajkujú, desiatujú, obedujú, olovrantujú a večerajú študenti a zamestnanci vysokej školy
- zistiť, či si doprajú druhú večeru a aj pochutiny
- zistiť, koľko študentov a zamestnancov sa stravuje päťkrát denne
- zistiť pitný režim a preferovanie tekutín
- zistiť aký druh stravy preferujú
- zistiť návštevnosť fast-foodov a reštaurácií
- na základe výsledkov prieskumu navrhnúť odporúčania pre prax.

METODOLÓGIA PRIESKUMU

Na dosiahnutie cieľa výskumu sme používali dotazník, ktorý patrí medzi jednu z najčastejšie používaných metód vo výskume na rýchle zisťovanie faktov, názorov a pod. Prieskum sme realizovali dotazníkovou formou, osobným zberom v roku 2015 na vzorke 150 respondentov vo veku 20 až 67 rokov. Z celkového počtu respondentov 50 (33,3 %) tvorili domáci

študenti, 50 (33,3 %) zahraniční študenti a 50 (33,3 %) boli zamestnanci. V prieskumnej vzorke dominovalo ženské pohlavie (n – 128; 85,3 %) v porovnaní s mužským pohlavím (n – 22; 14,7 %). Z celkového počtu opýtaných až 126 (84,0 %) bývalo v meste a 24 (16,0 %) na dedine.

V uvedenej inštitúcii sme mali povolenie vykonávať prieskum na základe podania písomnej žiadosti (príloha u autorov). Respondenti, ktorí sa zúčastnili prieskumu, boli informovaní o anonymite dotazníkov. Návratnosť dotazníkov bola 100 %.

Dotazník pozostával z 18 položiek uzatvoreného charakteru. Jeho súčasťou boli:

- identifikačné položky týkajúce sa respondentov (pohlavie, vek, miesto bydliska, zamestnanie vo vzťahu k vysokej škole)
- položky, ktorými sme posudzovali preferenciu potravín, ktoré konzumujú respondenti na raňajky, deň, obed, olovrant a večeru
- položky, ktorými sa respondenti vyjadrili, či si doprajú druhú večeru a pochutiny
- položku, v ktorej sa respondenti vyjadrili, koľkokrát za deň sa stravujú
- položky, ktorými sa respondenti vyjadrili ohľadom pitného režimu a preferencie druhu tekutín
- položku, v ktorej sa respondenti vyjadrili aký druh stravy preferujú, či si prisľujú stravu, a či navštevujú fast-foody a reštaurácie.

HYPOTÉZA (H1): „Predpokladáme, že domáci študenti a zamestnanci budú mať oproti zahraničným študentom UVLF osvojené zdravšie stravovacie návyky“.

HYPOTÉZA (H2): „Predpokladáme, že respondenti prieskumu budú využívať na obed teplú stravu poskytovanú UVLF“.

HYPOTÉZA (H3): „Predpokladáme, že domáci študenti a zamestnanci budú oproti zahraničným preferovať domácu kuchyňu pred reštauračnými zariadeniami a fast-foodmi“.

Hypotézy sme vyslovili ako náš určitý odborný odhad, ako sa budú správať výskumné dáta, a aké vý-

sledky budeme môcť z nich vyvodit'. Na základe odborných a vedeckých článkov ohľadom stravovania sme predpokladali, že domáci študenti a zamestnanci sa budú stravovať zdravšie ako zahraniční študenti, pretože majú viac výhod a príležitostí. Žijú na Slovensku, mnohí v spoločnej domácnosti s rodinou, uprednostňujú domácu kuchyňu a nepoužívajú polotovary. Domáci respondenti majú možnosť získať viac odborných a vedeckých informácií o zdravom stravovaní ako zahraniční študenti, ktorí sú v inej krajine, sú odkázaní na stravovacie zariadenia, fast-foody a využívanie polotovarov. Keďže UVLF má možnosť poskytovať zamestnancom v čase obeda teplú stravu, ktorú finančne dotuje, predpokladali sme, že všetci respondenti budú túto príležitosť využívať.

Pre potreby štatistického spracovania zistených údajov sme využili funkcie programu Microsoft Office Excel 2007. Deskriptívna štatistika skupín nám poskytla informácie o mierach centrality (početnosť – n, percentuálne zastúpenie – %, priemer/priemerné hodnoty – M, smerodajná odchýlka – SD). Výsledky prieskumu sú spracované v tabuľkách s uvedením celkového počtu (n), percentuálneho zastúpenia (%) a priemernej hodnoty (M).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na dosiahnutie cieľa výskumu zameraného na prieskum stravovacích návykov študentov a zamestnancov UVLF v Košiciach sme použili dotazník s otázkami uzatvoreného charakteru formulované tak, aby sme získali čo najcharakteristickejší obraz o respondentoch. Výskumné dáta (odpovede) na 18 položiek dotazníka uvádzame v tabuľkách 1 – 18 (viď tab. 1 – 18).

Kvantitatívna analýza prieskumných údajov

Charakteristika prieskumnej vzorky

Prieskumu sa celkovo zúčastnilo 150 respondentov UVLF, ktorých priemerný vek bol 29 rokov (M – 29,38; SD – 11,10). Vekové rozmedzie v skúmanej

Tab. 1: Vekové kategórie respondentov

vekové kategórie	n	%
do 30 rokov	109	72,7
31 – 40 rokov	17	11,3
41 – 50 rokov	13	8,7
51 – 60 rokov	6	4,0
≥ 61 rokov	5	3,3
spolu	150	100,0

Tab. 2: Porovnanie preferencie druhu raňajok s ohľadom na kategórie respondentov

druh raňajok	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
sladké	10	5	8
% v rámci raňajok	43,5 %	21,7 %	34,8 %
% v rámci zamestnania	20,0 %	10,0 %	16,0 %
mäsové	25	9	23
% v rámci raňajok	43,9 %	15,8 %	40,4 %
% v rámci zamestnania	50,0 %	18,0 %	46,0 %
mliečne	15	33	14
% v rámci raňajok	24,2 %	53,2 %	22,6 %
% v rámci zamestnania	30,0 %	66,0 %	28,0 %
neraňajujú	0	3	5
% v rámci raňajok	0,0 %	37,5 %	62,5 %
% v rámci zamestnania	0,0 %	6,0 %	10,0 %

vzorke bolo 20 až 67 rokov. Až 72,7 % (n – 109) respondentov bolo vo veku do 30 rokov (viď tab. 1).

Respondenti najčastejšie raňajujú mliečne raňajky (41,3 %) a mäsové raňajky (38,0 %) a 5,3 % respondentov neraňajkuje vôbec. Pri posudzovaní preferencie druhu raňajok s ohľadom na kategórie respondentov sme zistili, že 43,5 % domácich študentov preferuje sladké; 43,9 % mäsové a 24,2 % mliečne raňajky. Mliečne raňajky taktiež preferovalo až 53,2 % zahraničných študentov. Zamestnanci (40,4 %) uprednostňovali mäsové raňajky (viď tab. 2).

Pri porovnávaní preferencie jednotlivých druhov desiaty s ohľadom na kategórie respondentov sme zistili, že až 54,5 % domácich študentov uprednostňovalo chlieb/pečivo. Zahraniční študenti (48,5 %)

najčastejšie konzumovali sladkosti na desiatu a 50 % zamestnancov najčastejšie uprednostňovalo sladké pečivo na desiatu (viď tab. 3).

Z tabuľky 4 vyplýva, že až 52,7 % domácich študentov; 32,7 % zahraničných študentov a 14,5 % zamestnancov obeduje až po príchode domov. Obedy si nosí z domu do školy/práce až 48,3 % zahraničných študentov. V školskej jedálni obeduje 62,2 % zamestnancov, ale len 10,8 % zahraničných a 27 % domácich študentov (viď tab. 4).

Z odpovedí respondentov sme zistili, že 46,4 % domácich študentov a 50,0 % zamestnancov si dopraje polievku ako predkrm k hlavnému jedlu dňa. Naopak, až 66,7 % zahraničných študentov; 26,5 % zamestnancov a 13,3 % domácich študentov nekonzumuje

Tab. 3: Porovnanie preferencie druhov desiaty s ohľadom na kategórie respondentov

druh desiaty	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
sladké pečivo	3	4	7
% v rámci desiaty	21,4 %	28,6 %	50,0 %
% v rámci zamestnania	6,0 %	8,0 %	14,0 %
ovocie	15	23	26
% v rámci desiaty	23,4 %	35,9 %	40,6 %
% v rámci zamestnania	30,0 %	46,0 %	52,0 %
sladkosti	11	16	6
% v rámci desiaty	33,3 %	48,5 %	18,2 %
% v rámci zamestnania	22,0 %	32,0 %	12,0 %
chlib/pečivo	18	4	11
% v rámci desiaty	54,5 %	12,1 %	33,3 %
% v rámci zamestnania	36,0 %	8,0 %	22,0 %
proteínový drink	3	3	0
% v rámci zamestnania	50,0 %	50,0 %	0,0 %
% v rámci zamestnania	6,0 %	6,0 %	0,0 %

Tab. 4: Porovnanie druhu preferencie konzumácie obedov s ohľadom na kategórie respondentov

druh preferencie konzumácie obedov	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
nosím si obedy z domu do školy/práce	11	28	19
% v rámci preferencie	19,0 %	48,3 %	32,8 %
% v rámci zamestnania	22,0 %	56,0 %	38,0 %
obedujem v školskej jedálni	10	4	23
% v rámci preferencie	27,0 %	10,8 %	62,2 %
% v rámci zamestnania	20,0 %	8,0 %	46,0 %
obedujem až po príchode domov	29	18	8
% v rámci preferencie	52,7 %	32,7 %	14,5 %
% v rámci zamestnania	58,0 %	36,0 %	16,0 %

Tab. 5: Porovnanie preferencie polievok k hlavnému jedlu s ohľadom na kategórie respondentov

preferencia polievky	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
áno	26	2	28
% v rámci polievky	46,5 %	3,6 %	50,0 %
% v rámci zamestnania	52,0 %	4,0 %	56,0 %
nie	6	30	13
% v rámci polievky	13,3 %	66,7 %	26,5 %
% v rámci zamestnania	12,0 %	60,0 %	26,0 %
niekedy	18	18	13
% v rámci polievky	36,7 %	36,7 %	26,5 %
% v rámci zamestnania	36,0 %	36,0 %	26,0 %

Tab. 6: Porovnanie preferencie druhu obeda s ohľadom na kategórie respondentov

druh obedov	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
chudé mäso	33	7	22
% v rámci obeda	53,2 %	11,3 %	35,5 %
% v rámci zamestnania	66,0 %	14,0 %	44,0 %
divina	3	0	0
% v rámci obeda	100,0 %	0,0 %	0,0 %
% v rámci zamestnania	6,0 %	0,0 %	0,0 %
tučné mäso	4	1	12
% v rámci obeda	23,5 %	5,9 %	70,6 %
% v rámci zamestnania	8,0 %	2,0 %	24,0 %
ryby	2	2	3
% v rámci obeda	28,6 %	28,6 %	42,9 %
% v rámci zamestnania	4,0 %	4,0 %	6,0 %
cestovinové jedlá	4	12	3
% v rámci obeda	21,1 %	63,2 %	15,8 %
% v rámci zamestnania	8,0 %	24,0 %	6,0 %
bezmäsité jedlá	3	11	6
% v rámci obeda	15,0 %	55,0 %	30,0 %
% v rámci zamestnania	6,0 %	22,0 %	12,0 %
šaláty	1	17	4
% v rámci obeda	4,5 %	77,3 %	18,2 %
% v rámci zamestnania	2,0 %	34,0 %	8,0 %

polievku ako predkrm k hlavnému jedlu dňa (viď tab. 5).

V rámci porovnávania preferencie konzumovaného druhu jedál v čase hlavného jedla – obeda, s ohľadom na kategórie respondentov sme zistili, že 53,2 % domácich študentov preferovalo chudé mäso, až 70,6 % zamestnancov skôr tučné mäso. Na obed preferovali zahraniční študenti šaláty (77,3 %); 63,2 % cestoviny a 55,0 % bezmäsité jedlá (viď tab. 6).

Z celkového počtu respondentov s ohľadom na kategórie konzumovalo na olovrant sladké pečivo 41,7 % domácich študentov a 33,3 % zamestnancov. Zahraniční študenti (45,2 %) konzumovali na olovrant najčastejšie sladkosti a 33,3 % šaláty. V rámci olovrantu 42,3 % zamestnancov konzumovalo chlieb/pečivo so šunkou/salámou/paštétou/syrom a 38,6 %

konzumovalo ovocie. Iba 4 % domácich študentov si doprialo na olovrant zdravý proteínový drink, tyčinku alebo müsli tyčinku (viď tab. 7).

V rámci preferencií druhu večere s ohľadom na kategórie respondentov sme zaznamenali, že na večeru preferovalo šaláty 20,0 % domácich študentov; 14,0 % zahraničných študentov a 12,0 % zamestnancov. Suchú mäsovú večeru uprednostnilo 26,0 % zamestnancov, 20,0 % domácich študentov. Zahraniční študenti (28,0 %) uprednostnili na večeru chudé mäso (viď tab. 8).

Pri porovnávaní preferencie času konzumácie večere s ohľadom na kategórie respondentov sme zistili, že 37,7 % zamestnancov; 34,8 % domácich študentov a 27,5 % zahraničných študentov konzumovalo večeru okolo 18 hodiny. Večeru okolo 19 hodiny upred-

Tab. 7: Porovnanie preferencie konzumácie druhu olovrantu s ohľadom na kategórie respondentov

druh olovrantu	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
sladké pečivo	5	3	4
% v rámci olovrantu	41,7 %	25,0 %	33,3 %
% v rámci zamestnania	10,0 %	6,0 %	8,0 %
ovocie	21	22	27
% v rámci olovrantu	30,0 %	31,4 %	38,6 %
% v rámci zamestnania	42,0 %	44,0 %	54,0 %
sladkosti	11	14	6
% v rámci olovrantu	35,5 %	45,2 %	19,4 %
% v rámci zamestnania	22,0 %	28,0 %	12,0 %
chlieb/pečivo so šunkou/salámou/ paštétou/syrom	7	8	11
% v rámci olovrantu	26,9 %	30,8 %	42,3 %
% v rámci zamestnania	14,0 %	16,0 %	22,0 %
šaláty	4	3	2
% v rámci olovrantu	44,4 %	33,3 %	22,2 %
% v rámci zamestnania	8,0 %	6,0 %	4,0 %
proteínový drink/proteínovú tyčinku/ müsli tyčinku	2	0	0
% v rámci olovrantu	100,0 %	0,0 %	0,0 %
% v rámci zamestnania	4,0 %	0,0 %	0,0 %

nostnilo 40,5 % zahraničných študentov. V neskorších hodinách si najčastejšie večeru dopraje 50,0 % domácich študentov (viď tab. 9).

Z odpovedí respondentov sme zistili, že druhú večeru si niekedy dopraje až 50,9 % domácich študentov, hlavne ak nespia v noci. Druhú večeru si pravidelne dopraje zhodné percento (35,7 %) zamestnancov a domácich študentov. Druhú večeru si nikdy nedopraje 46,8 % zahraničných študentov a 32,9 % zamestnancov (viď tab. 10).

Pri porovnávaní frekvencie jedál konzumovaných počas dňa sme zistili, že najčastejšie 4-krát do dňa konzumovalo 32,1 % domácich študentov; 37,5 % zahraničných študentov a 30,4 % zamestnancov. Stravu 5-krát do dňa konzumovalo 37,8 % zamestnancov; 33,3 % domácich študentov a 28,9 % zahraničných študentov (viď tab. 11).

Pri porovnávaní ako často respondenti konzumujú sladkú alebo slanú pochutinu s ohľadom na kategórie respondentov sme zistili, že každý deň si pochutinu dopraje 38,3 % domácich študentov; 33,3 % zamestnancov a 28,3 % zahraničných študentov. Každý druhý deň si pochutinu dopraje 50,0 % zahraničných študentov; 28,6 % zamestnancov a 21,4 % domácich študentov (viď tab. 12).

Z tabuľky 13 vyplýva, že pri sledovaní TV/PC si dopraje pochutiny 45,5 % domácich študentov; 57,9 % zamestnancov si dopraje niekedy. Avšak 61,9 % zahraničných študentov si dopraje pochutiny len zriedkakedy (viď tab. 14).

Pri porovnaní najpreferovanejšej tekutiny dňa s ohľadom na kategórie respondentov sme zistili, že najpreferovanejším nápojom je voda pre 37,6 % zahraničných študentov; 36,5 % domácich študentov a

Tab. 8: Porovnanie preferencie konzumácie druhu večere s ohľadom na kategórie respondentov

druh večere	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
chudé mäso	3	14	3
% v rámci večere	15,0 %	70,0 %	15,0 %
% v rámci zamestnania	6,0 %	28,0 %	6,0 %
divina	0	3	0
% v rámci večere	0,0 %	100,0 %	0,0 %
% v rámci zamestnania	0,0 %	6,0 %	0,0 %
tučné mäso	2	4	1
% v rámci večere	28,6 %	57,1 %	14,3 %
% v rámci zamestnania	4,0 %	8,0 %	2,0 %
ryby	2	5	3
% v rámci večere	20, %	50,0 %	30,0 %
% v rámci zamestnania	4,0 %	10, %	6,0 %
cestovinové jedlá	8	7	7
% v rámci večere	36,4 %	31,8 %	31,8 %
% v rámci zamestnania	16,0 %	14,0 %	14,0 %
bezmäsité jedlá	6	10	5
% v rámci večere	28,6 %	47,6 %	23,8 %
% v rámci zamestnania	12,0 %	20,0 %	10,0 %
múčnikové jedlá	0	0	5
% v rámci večere	0,0 %	0,0 %	100,0 %
% v rámci zamestnania	0,0 %	0,0 %	10,0 %
šaláty	10	7	6
% v rámci večere	43,5 %	30,4 %	26,1 %
% v rámci zamestnania	20,0 %	14,0 %	12,0 %
ovocný šalát	2	0	3
% v rámci večere	40,0 %	0,0 %	60,0 %
% v rámci zamestnania	4,0 %	0,0 %	6,0 %
sladká suchá večera	5	0	0
% v rámci večere	100,0 %	0,0 %	0,0 %
% v rámci zamestnania	10,0 %	0,0 %	0,0 %
suchá mäsová cečera	10	0	13
% v rámci večere	43,5 %	0,0 %	56,5 %
% v rámci zamestnania	20,0 %	0,0 %	26,0 %
mliečna večera	2	0	4
% v rámci večere	33,3 %	0,0 %	66,7 %
% v rámci zamestnania	4,0 %	0,0 %	8,0 %

Tab. 9: Porovnanie preferencie času konzumácie večere s ohľadom na kategórie respondentov

hodina večere	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
okolo 17 hod	2	5	8
% v rámci hodiny	13,3 %	33,3 %	53,3 %
% v rámci zamestnania	4,0 %	10,0 %	16,0 %
okolo 18 hod	24	19	26
% v rámci hodiny	34,8 %	27,5 %	37,7 %
% v rámci zamestnania	48,0 %	38,0 %	52,0 %
okolo 19 hod	12	17	13
% v rámci hodiny	28,6 %	40,5 %	31,0 %
% v rámci zamestnania	24,0 %	34,0 %	26,0 %
ešte neskôr	12	9	3
% v rámci hodiny	50,0 %	37,5 %	12,5 %
% v rámci zamestnania	24,0 %	18,0 %	60, %

Tab. 10: Porovnanie preferencie druhej večere s ohľadom na kategórie respondentov

hodina večere	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
nie, nikdy nejem druhú večeru	16	5	8
% v rámci druhej večere	20,3 %	46,8 %	32,9 %
% v rámci zamestnania	32,0 %	74,0 %	52,0 %
áno, niekedy si dám aj druhú večeru, keď som dlho hore	29	9	19
% v rámci druhej večere	50,9 %	15,8 %	33,3 %
% v rámci zamestnania	58,0 %	18,0 %	38,0 %
áno, pravidelne jedávam aj druhú večeru	5	4	5
% v rámci druhej večere	35,7 %	28,6 %	35,7 %
% v rámci zamestnania	10,0 %	8,0 %	10,0 %

25,9 % zamestnancov. Preferenciu kombinácie nápojov udávalo 43,2 % zahraničných študentov; 32,4 % domácich študentov a 24,3 % zamestnancov (viď tab. 14).

Pri porovnaní prijatého množstva tekutín počas dňa s ohľadom na kategórie respondentov sme konštatovali, že 44,7 % zamestnancov prijme sa deň 1000 ml tekutín; 41,2 % zahraničných študentov prijme za

deň 1500 ml tekutín. Zhodný počet zahraničných a domácich študentov (36,0 %) prijme za deň 2000 ml tekutín (viď tab. 15).

Pri porovnaní odpovedí respondentov ohľadom frekvencie návštevnosti fast-foodov a reštaurácií s ohľadom na kategórie respondentov sme zistili, že 57,4 % zamestnancov navštevuje fast-foody a reštaurácie iba pri rodinných oslavách. Raz za mesiac na-

Tab. 11: Porovnanie frekvencie počtu denných jedál s ohľadom na kategórie respondentov

Frekvencia počtu jedál	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
2x denne	1	2	1
% v rámci frekvencie	25,0 %	50,0 %	25,0 %
% v rámci zamestnania	2,0 %	4,0 %	2,0 %
3x denne	8	10	12
% v rámci frekvencie	26,7 %	33,3 %	40,0 %
% v rámci zamestnania	16,3 %	20,0 %	24,0 %
4x denne	18	21	17
% v rámci frekvencie	32,1 %	37,5 %	30,4 %
% v rámci zamestnania	36,7 %	42,0 %	34,0 %
5x denne	15	13	17
% v rámci frekvencie	33,3 %	28,9 %	37,8 %
% v rámci zamestnania	30,6 %	26,0 %	34,0 %
6x denne	7	4	3
% v rámci frekvencie	50,0 %	28,6 %	21,4 %
% v rámci zamestnania	14,3 %	8,0 %	6,0 %

Tab. 12: Porovnanie frekvencie konzumácie pochutiny s ohľadom na kategórie respondentov

častosť konzumácie pochutín	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
každý deň	23	17	20
% v rámci častosti pochutiny	38,3 %	28,3 %	33,3 %
% v rámci zamestnania	46,0 %	34,0 %	40,0 %
niekoľko krát do dňa	4	2	2
% v rámci častosti pochutiny	50,0 %	25,0 %	25,0 %
% v rámci zamestnania	8,0 %	4,0 %	4,0 %
každý druhý deň	6	14	8
% v rámci častosti pochutiny	21,4 %	50,0 %	28,6 %
% v rámci zamestnania	12,0 %	28,0 %	16,0 %
dvakrát do týždňa	8	8	6
% v rámci častosti pochutiny	36,4 %	36,4 %	27,3 %
% v rámci zamestnania	16, %	16,0 %	12,0 %
raz do týždňa	7	4	5
% v rámci častosti pochutiny	43,8 %	25,0 %	31,3 %
% v rámci zamestnania	14,0 %	8,0 %	10,0 %
iba pri nejakej príležitosti	2	5	9
% v rámci častosti pochutiny	12,5 %	31,3 %	56,3 %
% v rámci zamestnania	4,0 %	10,0 %	18,0 %

Tab. 13: Porovnanie konzumácie pochutín pri sledovaní TV/PC s ohľadom na kategórie respondentov

konzumácia pochutín pri sledovaní TV/PC	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
áno	20	13	11
% v rámci sledovania	45,5 %	29,5 %	25,0 %
% v rámci zamestnania	40,0 %	26,0 %	22,0 %
nie	6	11	9
% v rámci sledovania	23,1 %	42,3 %	34,6 %
% v rámci zamestnania	12,0 %	22,0 %	18,0 %
zriedkakedy	8	26	8
% v rámci sledovania	19,0 %	61,9 %	19,0 %
% v rámci zamestnania	16,0 %	52,0 %	16,0 %
niekedy	16	0	22
% v rámci sledovania	42,1 %	0,0 %	57,9 %
% v rámci zamestnania	32,0 %	0,0 %	44,0 %

Tab. 14: Porovnanie najpreferovanejšej tekutiny dňa s ohľadom na kategórie respondentov

referencia nápoja	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
voda	31	32	11
% v rámci nápoja	36,5 %	37,6 %	25,9 %
% v rámci zamestnania	62,0 %	64,0 %	44,0 %
sladené nápoje	0	0	2
% v rámci nápoja	0,0 %	0,0 %	100,0 %
% v rámci zamestnania	0,0 %	0,0 %	4,0 %
džúsy	0	1	1
% v rámci nápoja	0,0 %	50,0 %	50,0 %
% v rámci zamestnania	0,0 %	2,0 %	2,0 %
sladený čaj	0	0	3
% v rámci nápoja	0,0 %	0,0 %	100,0 %
% v rámci zamestnania	0,0 %	0,0 %	6,0 %
nesladený čaj	7	1	13
% v rámci nápoja	33,3 %	4,8 %	61,9 %
% v rámci zamestnania	14,0 %	2,0 %	26,0 %
kombinácia nápojov	12	16	9
% v rámci nápoja	32,4 %	43,2 %	24,3 %
% v rámci zamestnania	24,0 %	32,0 %	18,0 %

vštevuje fast-foody a reštaurácie 48,1 % zahraničných študentov a jedenkrát za dva týždne 54,2 % domácich študentov (viď tab. 16).

Z tabuľky 17 vyplýva, že varenú domácu stravu uprednostňuje 35,2 % domácich študentov; 34,4 % zamestnancov a 30,5 % zahraničných študentov. Su-

Tab. 15: Porovnanie prijatého množstva tekutín počas dňa s ohľadom na kategórie respondentov

množstvo tekutín počas dňa	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
500 ml denne	3	5	7
% v rámci množstva tekutín	20,0 %	33,3 %	46,7 %
% v rámci zamestnania	6,0 %	10,0 %	14,0 %
1000 ml denne	16	10	21
% v rámci množstva tekutín	34,0 %	21,3 %	44,7 %
% v rámci zamestnania	32,0 %	20,0 %	42,0 %
1500 ml denne	18	21	12
% v rámci množstva tekutín	35,3 %	41,2 %	23,5 %
% v rámci zamestnania	36,0 %	42,0 %	24,0 %
2000 ml denne	9	9	7
% v rámci množstva tekutín	36,0 %	36,0 %	28,0 %
% v rámci zamestnania	18,0 %	18,0 %	14,0 %
viac ako 2000 ml denne	4	5	3
% v rámci množstva tekutín	33,3 %	41,7 %	25,0 %
% v rámci zamestnania	8,0 %	10,0 %	6,0 %

Tab. 16: Porovnanie frekvencie návštevnosti fast-foodov a reštaurácií s ohľadom na kategórie respondentov

návštevnosť fast-foodov a reštaurácií	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
každý deň	0	0	2
% v rámci návštevnosti	0,0 %	0,0 %	100, %
% v rámci zamestnania	0,0 %	0,0 %	4,0 %
3x do týždňa	2	2	2
% v rámci návštevnosti	33,3 %	33,3 %	33,3 %
% v rámci zamestnania	4,0 %	4,0 %	4,0 %
1x do týždňa	9	7	3
% v rámci návštevnosti	47,4 %	36,8 %	15,8 %
% v rámci zamestnania	18,0 %	14,0 %	6,0 %
1x za dva týždne	13	7	4
% v rámci návštevnosti	54,2 %	29,2 %	16,7 %
% v rámci zamestnania	26,0 %	14,0 %	8,0 %
1x za mesiac	15	25	12
% v rámci návštevnosti	28,8 %	48,1 %	23,1 %
% v rámci zamestnania	30,0 %	50,0 %	24,0 %
iba pri rodinách oslavách	11	9	27
% v rámci návštevnosti	23,4 %	19,1 %	57,4 %
% v rámci zamestnania	22,0 %	18,0 %	54,0 %

Tab. 17: Porovnanie preferencie druhu stravy s ohľadom na kategórie respondentov

preferencia druhu stravy	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
varená domáca strava	45	39	44
% v rámci stravy	35,2 %	30,5 %	34,4 %
% v rámci zamestnania	90,0 %	78,0 %	88,0 %
strava z fast-foodov	1	0	1
% v rámci stravy	50,0 %	0,0 %	50,0 %
% v rámci zamestnania	2,0 %	0,0 %	2,0 %
strava z reštaurácií	2	9	2
% v rámci stravy	15,4 %	69,2 %	15,4 %
% v rámci zamestnania	4,0 %	18,0 %	4,0 %
suchá strava	2	2	3
% v rámci stravy	28,6 %	28,6 %	42,9 %
% v rámci zamestnania	4,0 %	4,0 %	6,0 %

Tab. 18: Porovnanie prisoľovania si stravy s ohľadom na kategórie respondentov

prisoľovanie stravy	kategórie respondentov		
	domáci študenti	zahraniční študenti	zamestnanci
áno, ak je málo slané	33	27	31
% v rámci prisoľovania	36,3 %	29,7 %	34,1 %
% v rámci zamestnania	66,0 %	54,0 %	62,0 %
áno, bez ohľadu na to akú má chuť	0	2	1
% v rámci prisoľovania	0,0 %	66,7 %	33,3 %
% v rámci zamestnania	0,0 %	4,0 %	2,0 %
nie	17	21	18
% v rámci prisoľovania	30,4 %	37,5 %	32,1 %
% v rámci zamestnania	34,0 %	42,0 %	36,0 %

chú stravu preferuje 42,9 % zamestnancov; 28,6 % zahraničných a 28,6 % domácich študentov (viď tab. 17).

Z tabuľky 18 sme zistili, že ak je jedlo málo slané, potom 36,3 % domácich študentov, 34,1 % zamestnancov a 29,7 % zahraničných študentov si ho prisoľuje. Jedlo si neprisoľuje 37,5 % zahraničných študentov; 32,1 % zamestnancov a 30,4 % domácich študentov (viď tab. 18).

Hypotézu (H1) sme vyslovili na základe presvedčenia, že prieskumná vzorka respondentov UVLF bude

reprezentovať generáciu, ktorá žije v súčasnej modernej dobe, keď sú dostupné publikácie o zdravom stravovaní, rôzne iné informačné zdroje, poradenské služby v oblasti stravovania a zdravia a respondenti majú možnosť sa vzdelávať. Zároveň si tieto vedomosti osvojili a praktizujú zdravé stravovacie návyky, ktoré zohľadňujú kvalitu a zloženie stravy. Predpokladali sme, že mnohí domáci študenti a zamestnanci majú osvojené stravovacie návyky už z detstva. Mnohí respondenti (domáci študenti, zamestnanci) sú zvyknutí na domácu stravu alebo budú využívať tep-

lú stravu poskytovanú UVLF. Naopak, študenti zahraniční ako aj domáci, ktorí bývajú na internátoch, budú viac odkázaní na reštauračné zariadenia, fast foody, polotovary a stravu, ktorú im poskytuje UVLF.

Na základe porovnávania odpovedí na preferenciu druhu raňajok s ohľadom na kategórie respondentov sme zistili pozitívnu skutočnosť, že všetci domáci študenti raňajujú a iba 6 % zahraničných a 10 % zamestnancov neraňajkuje. Z celkového množstva respondentov v rámci kategórie raňajky neraňajkuje 62,5 % zamestnancov a 37,5 % zahraničných študentov (viď tab. 2). Macek (2013) na základe prieskumu na Brnenskej univerzite zistil, že 50,67 % respondentov (študentov) raňajkovalo každý deň, vôbec neraňajkovalo 25,56 % a 23,77 % nepravidelne raňajkuje. Zároveň autor zistil, že 41,3 % respondentov najčastejšie raňajkovalo mliečne raňajky a 38,0 % mäsové raňajky. Naše výsledky v kategórii mliečne raňajky nie sú v zhode s autorom. V našom prieskume až 53,2 % zahraničných študentov uprednostňovalo mliečne raňajky a iba 24,2 % domácich študentov a 22,6 % zamestnancov. Miler a kol. (2023) uvádzajú, že mliečne potraviny, ako napr. mlieko, syr a jogurt sú bohatým zdrojom živín, ale sú nedostatočne konzumované. Často sú pre obsah kalórií, nasýtených tukov a sodíka kriticky hodnotené najmä pri redukčných výživových programoch.

Z výsledkov prieskumu sme zistili, že 43,5 % domácich študentov na raňajky dávalo prednosť sladkým a 43,9 % mäsových výrobkom. Podobne zamestnanci (40,4 %) uprednostňovali mäsové raňajky (viď tab. 2). Marinov (2011) odporúča na raňajky uprednostňovať jedlá s vyšším obsahom polysacharidov, alebo v kombinácii s jednoduchými sacharidmi, pretože sú ľahko stráviteľné a nezaťažujú tráviaci trakt. V zhode s týmto odporúčaním majú zahraniční študenti zdravšie a ľahšie stráviteľné raňajky.

Desiata by mala tvoriť asi 10 – 15 % denného energetického príjmu, mala by obsahovať vždy čerstvé ovocie alebo zeleninu, tekutiny, ďalej napríklad celozrnné pečivo s kvalitným syrom alebo šunkou. Správnu voľbou sú i mliečne výrobky, vyhýbať by sme sa mali tzv. sladkým desiata (URL 2, 2023).

V rámci hodnotenia preferencie desiaty sme zaznamenali, že všetci respondenti (150) zahrnutí do prieskumu počas dňa desiatujú. Predpokladáme, že časť respondentov v skúmanom súbore, ktorí neraňajkovali (5,3 %), namiesto raňajok desiatovali. Naše výsledky nie sú v zhode s výsledkami Macek (2013), ktorý vo svojej štúdií zistil, že iba 50,67 % respondentov študentov Brnenskej univerzity pravidelne každý deň desiatuje; 20,56 % nedesiatuje vôbec a príležitostne si desiatu dopraje 23,77 % respondentov.

Veľmi pozitívne hodnotíme prístup 42,7 % respondentov v k výberu ovocnej desiaty. Ovocie si najčastejšie zvolilo 40,6 % zamestnancov a 35,9 % zahraničných študentov a iba 23,4 % domácich študentov (viď tab. 3). Keresteš a kol. (2011) uvádzajú, že dostatočným prísunom ovocia, zeleniny, ktoré sú zdrojom polyfenolov, flavonoidov a ich vhodnou kombináciou v strave si môžeme zabezpečiť v organizme rovnováhu medzi reduktantmi a antioxidantmi. Kadřabová a kol. (2005) uvádza, že ich konzumáciou môžeme zamedziť vzniku voľnoradikálových ochorení ako kardiovaskulárne, onkologické, neurologické a iné degeneratívne ochorenia. Napr. jablká sú zdrojom vody (až 84 %), vlákniny, pektínu, flavonoidov, kyseliny chlórgénovej, fruktózy, nenasýtených tukov, vitamínu C, K, Ca, Mg, Br. Plody zástupcov rodu citrónovník obsahujú polyfenoly, flavonoidy, hesperidín, ktorý zvyšujú a vitamín C a podobne ako rutín znižuje permeabilitu, zvyšuje pružnosť ciev (Efťimová a kol., 2023).

Z celkového množstva respondentov 22,0 % respondentov preferovalo na desiatu sladkosti a rovnako 22 % chlieb/pečivo so šunkou/salámou/paštétou/syrom. S ohľadom na kategórie respondentov sme zaznamenali, že 54,5 % domácich študentov uprednostňovalo na desiatu chlieb/pečivo so šunkou/salámou/paštétou/syrom. Naopak, sladkú desiatu si zvolilo 48,5 % zahraničných študentov (sladkosti) a 50 % zamestnancov (sladké pečivo) (viď tab. 3). S ohľadom na preferencie druhu desiaty môžeme povedať, že domáci študenti majú zdravšiu desiatu ako zamestnanci a zahraniční študenti.

Obed by mal tvoriť 30 % denného energetického

příjmu (Klimešová a Stelzer, 2013). Obed by mal organizmus poskytnúť všetky potrebné druhy živín (bielkoviny, sacharidy s dostatočným množstvom vlákniny, tuky, vitamíny a minerálne latky (URL 3, 2023).

Predpokladali sme, že ak vysoká škola poskytuje respondentom počas obeda teplé jedlo, budú mať respondenti záujem o obedy (hypotéza H2). Na základe odpovedí v rámci kategórie respondentov sme zistili, že v školskej jedálni obeduje 62,2 % zamestnancov, 27 % domácich a 10,8 % zahraničných študentov, čím sme hypotézu potvrdili. Zároveň sme zistili, že obedy si nosí do školy/práce 19,0 % domácich študentov; 48,3 % zahraničných študentov a 32,8 % zamestnancov. Zarážajúce bolo, že až 52,7 % domácich študentov, 32,7 % zahraničných a 14,5 % zamestnancov obeduje až po príchode domov. Na základe týchto odpovedí môžeme povedať, že zahraniční študenti a zamestnanci majú vhodnejšiu preferenciu obeda ako domáci študenti (viď tab. 4).

S ohľadom na preferencie konzumácie polievok sa z celkového súboru respondentov 37,3 % vyjadrilo, že jedávajú polievky ako predkrm k hlavnému jedlu; 32,7 % jedáva len niekedy a 30,0 % respondentov vôbec nekonzumuje polievky. Až 50,0 % zamestnancov a 46,4 % domácich študentov jedáva polievky k hlavnému jedlu. Naopak, až 66,7 % zahraničných študentov nekonzumuje polievky vôbec (viď tab. 5). Vývary sú v strave dôležité a ich nutričné zloženie je variabilné a závisí od technológie prípravy, druhu zvierat, typu kosti či mäsa, použitia ďalších ingrediencií, dĺžky varu či následnej úpravy pripraveného vývaru (Hsu a kol., 2018). Podľa USDA databázy je vývar potravina s pomerne nízkou energetickou hodnotou od 13 – 36 kcal. Obsah sacharidov sa pohybuje do 3,5 %; v závislosti od druhu zeleniny, kosti a mäsa sú zdrojom bielkovín a tukov (URL 1, 2023). Vývary z kosti obsahujú kľúčové aminokyseliny pre tvorbu kolagénu (Alcock, Shaw, Burke, 2019).

Pri preferencii druhu obedov sa 41,3 % respondentov vyjadrilo, že na obed dáva prednosť chudému mäsu; 14,7 % respondentov šalátom a 13,3 % bezmäsitým jedlám. Veľmi nízke percento, iba 4,7 % respondentov preferuje na obed ryby, čo z výživového

hľadiska nie je pre organizmus prospešné. V rámci kategórie respondentov 53,2 % domácich študentov preferovalo na obed chudé mäso, až 70,6 % zamestnancov uprednostňovalo tučné mäso (viď tab. 6).

Strava by mala byť zložená z rozmanitých zdrojov bielkovín, a to s obmedzením príjmu (najmä) živočíšnych zdrojov bielkovín a zvýšením príjmu (najmä) rastlinných zdrojov bielkovín (Devos a kol., 2022). U bežného jedinca by mal byť optimálny pomer živočíšnych a rastlinných bielkovín zhruba 1 : 1 a pri fyzicky aktívnych osobách alebo s fyzicky náročným zamestnaním by mal byť 2 : 1 (Caha, 2022).

Zahraniční študenti v rámci obeda preferovali 63,2 % cestoviny; 55,0 % bezmäsité jedlá a 77,3 % šaláty (viď tab. 6). Môžeme teda povedať, že zahraniční a domáci študenti preferovali počas obeda zdravšie jedlá ako zamestnanci.

Marinov (2011) uvádza, že olovrant by mal pokryť 10 % s celkového energetického príjmu. Olovrant má dodať energiu v popoludňajších hodinách, hlavne pred alebo po aktívnej športovej aktivite. Preto je najvhodnejšie konzumovať ako olovrant mliečne výrobky alebo sladké ovocie, resp. zeleninu.

V prieskume sme zistili, že na olovrant 46,7 % respondentov konzumuje ovocie; 20,7 % sladkosti a 17,3 % chlieb/pečivo so šunkou/salámou/paštétou/syrom. Iba 6 % respondentov odpovedalo, že konzumuje na olovrant šaláty. Domáci študenti v rámci desiaty takmer rovnako konzumovali sladké pečivo (41,7 %) a (šaláty 44,4 %). Zahraniční študenti preferovali sladkosti (45,2 %) a šaláty (33,3 %). Zamestnanci dávali prednosť konzumácii chlieb/pečivo so šunkou/salámou/paštétou/syrom (42,3 %) a ovociu (38,6 %) (viď tab. 7). Na základe týchto výsledkov môžeme pozitívne hodnotiť skutočnosť, že respondenti v priebehu dňa konzumujú olovrant. Na druhej strane musíme ale povedať, že zloženie olovranu bolo u polovice respondentov z každej skupiny v súlade s výživovými zásadami a v druhej polovici nesprávne. Na rozdiel od výsledkov Macek (2013), ktorý vo svojej štúdií zistil, že 51,12 % respondentov pravidelne konzumuje olovrant, 12,56 % neolovrantuje a 36,32 % respondentov olovrantuje nepravidelne. Naši res-

pondenti všetci olovrantovali.

Večera by mala byť posledným jedlom dňa, mala by poskytnúť asi 15 – 20 % energie, nemusí byť teplá, ale dôležité je, aby obsahovala kvalitné bielkoviny (mäso, ryby, strukoviny, vajcia, mliečne výrobky), vhodné je pečivo (najlepšie celozrnné) alebo iná príloha, nemala by chýbať zelenina (URL 2, 2023).

Z celkového množstva respondentov 15,3 % uviedlo, že uprednostňuje na večeru šaláty a suchú mäsovú večeru; 14,7 % cestoviny a 14,0 % bezmäsitú večeru. Konzumáciu šalátov uprednostnilo 20,0 % domácich študentov, 14,0 % zahraničných študentov a 12,0 % zamestnancov. Suchú mäsovú večeru konzumovalo 26,0 % zamestnancov a 20,0 % domácich študentov. Zahraniční študenti (28,0 %) uprednostňovali na večeru chudé mäso (viď tab. 8). Podľa odpovedí na danú otázku môžeme povedať, že respondenti preferujú na večeru vhodný druh večere.

Na otázku, o koľkej hodine respondenti konzumujú večeru, uviedlo 46,0 % respondentov čas okolo 18 hodiny; 28,0 % okolo 19 hodiny a 16,0 % až v neskorších hodinách. Okolo 18 hodiny večeru konzumovalo 37,7 % zamestnancov; 34,8 % domácich študentov a 27,5 % zahraničných študentov. Zahraniční študenti v 40,5 % jedávali večeru okolo 19 hodiny. Prekvapivé je zistenie, že až 50,0 % domácich študentov jedáva večeru v neskorších hodinách. Na základe toho by sa dalo skonštatovať, že veľké percento respondentov jedáva večeru v optimálnom čase, znepokojujúce je to, že polovica domácich študentov ju jedáva v neskorších hodinách (viď tab. 9).

Macek (2013) zistil že 80,27 % študentov Brnenskej Univerzity denne konzumovalo večeru; 18,38 % príležitostne a 1,34 % nevečeralo.

Druhá večera by mala tvoriť len asi 5 až 10 % z celkového denného príjmu, mala by byť ľahká v podobe zeleniny alebo jogurtu (URL 3, 2023).

My sme zistili, že viac ako polovica respondentov (52,7 %) druhú večeru nikdy nekonzumovalo; 38,0 % respondentov si však druhú večeru niekedy doprialo, najmä keď sú dlho hore. Zahraniční študenti v 46,8 % a 32,9 % zamestnancov si druhú večeru nikdy nedopraje. Niekedy si doprajú druhú večeru, keď sú

dlho hore domáci študenti v 50,9 %. Prekvapivé je, že zhodné percento (35,7 %) domácich študentov a zamestnancov si pravidelne dopraje druhú večeru (viď tab. 10).

V nutričnej praxi je zaužívané dodržiavať správnu konzumáciu a frekvenciu jedál, jeť pravidelne a v menších množstvách, stravovať sa 4 až 5-krát denne, približne každé 2 až 3 hodiny (Zeleňáková, Čapla, Zajác, 2018). Z hľadiska nutričnej praxe je frekvencia počtu jedál u respondentov uspokojivá. V prieskume sme zaznamenali, že respondenti najčastejšie jedia stravu 4-krát do dňa (32,1 % domáci študenti; 37,5 % zahraniční študenti a 30,4 % zamestnanci). Druhá najčastejšia odpoveď bola, že respondenti konzumujú stravu 5-krát do dňa (37,8 % zamestnanci; 33,3 % domáci študenti a 28,9 % zahraniční študenti (viď tab. 11).

Pochutinu, či už sladkého alebo slaného charakteru si doprialo každý deň 38,3 % domácich študentov; 33,3 % zamestnancov a 28,3 % zahraničných študentov. Až 50,0 % zahraničných študentov; 28,6 % zamestnancov a 21,4 % domácich študentov si dopraje pochutinu každý druhý deň. Zistili sme, že až 45,5 % domácich študentov si dopraje pochutiny pri TV/PC, 61,9 % zahraničných študentov si dopraje zriedkakeď pochutinu. Pochutinu pri TV/PC si dopraje niekedy 57,9 % zamestnancov (viď tab. 12 – 13). Môžeme skonštatovať, že veľké percento respondentov prijíma nadmerné množstvo pochutín.

Ďalšie naše parciálne ciele boli zistiť pitný režim a preferovanie tekutín, zistiť aký druh stravy respondenti preferujú a zistiť návštevnosť fast-foodov a reštaurácií. Kleinerová (2015) vo svojej literatúre uvádza, že pre pitný režim je najlepšie prijať vodu; zelené a ovocné čaje a džúsy riedené vodou. V malom množstve sa doporučujú aj nesladené minerálne vody, z dôvodu vyššieho obsahu minerálov. V prieskume sme zistili, že najpreferovanejším nápojom u respondentov je voda, v zastúpení 37,6 % zahraniční študenti; 36,5 % domáci študenti a 25,9 % zamestnanci. 43,2 % zahraničných študentov; 32,4 % domácich študentov a 24,3 % zamestnancov odpovedalo, že kombinujú nápoje (viď tab. 14). Môžeme teda po-

vedieť, že naši respondenti pijú vhodné nápoje. Optimálne množstvo tekutín, ktoré by sme v priebehu dňa mali prijať, závisí hlavne od jeho výdaja (Klimešová a Stelzer, 2013). Clark (2010) uvádza, že by človek by mal za deň vypíť aspoň 2 litre vody. Zistili sme, že 44,7 % zamestnancov prijme za deň len 1000 ml tekutín; 41,2 % zahraničných študentov vypije 1500 ml tekutín. Za deň 2000 ml tekutín prijme zhodný počet domácich a zahraničných študentov, a to 36,0 %. (viď tab. 15). Naše výsledky nie sú v zhode s výsledkami Macek (2013), ktorý zistil, že 68,53 % študentov vypilo za deň 2000 ml tekutín a 31,47 % vypilo aj viac ako 2000 ml tekutín.

V rámci návštevnosti fast-foodov a reštaurácie vo vzťahu na kategóriu respondentov 47,4 % domácich študentov a 36,8 % zahraničných študentov ich navštevuje jedenkrát do týždňa. Iba pri rodinných oslavách ich navštevuje 57,4 % zamestnancov a 48,1 % zahraničných študentov a 54,2 % domácich študentov ich navštevuje raz za dva týždne (viď tab. 16). Môžeme teda zhodnotiť, že najčastejšie navštevujú fast-foody a reštaurácie domáci študenti, čo môže mať veľmi negatívny dopad na ich zdravie, pretože takéto jedlo obsahuje veľa tukov a soli. Strava, ktorá je uvarená doma býva výživnejšia ako strava, ktorá je pripravená mimo domova; ľudia, ktorí pravidelne varia z čerstvých ingrediencií, si tak môžu pripraviť pestrejšiu, chutnejšiu a zdravšiu stravu (www.eufic.sk). Celkovo 85,3 % respondentov preferuje domácu stravu; 8,7 % reštauračnú stravu a 4,7 % suchú stravu. Suchú stravu uprednostňuje 42,9 % zamestnancov a totožné percento (28,6 %) domácich a zahraničných študentov (viď tab. 17).

Zo získaných odpovedí vyplynulo, že hypotézu H3 sme potvrdili iba čiastočne. Zaznamenali sme, že varenú domácu stravu uprednostňovalo 35,2 % domácich študentov a 34,4 % zamestnancov a len 30,5 % zahraničných študentov. Avšak jedenkrát týždenne navštevovalo reštauračné zariadenia a fast-foody viac domácich študentov (47,4 %) ako zahraničných študentov (36,8 %).

Sol' je nevyhnutná pre život, označuje sa ako chloRID sodný (NaCl); priemerný príjem sa pohybuje od 2

do 6 g/deň. Postačujúci príjem pre zdravého dospelého jedinca je 0,5 g (www.eufic.sk). Zistili sme, že 60,7 % respondentov si jedlo prisoluje v prípade, že je málo slané, na druhej strane neprisoluje si jedlo 37,7 % opýtaných. Jedlo si prisolujú, ak je málo slané domáci študenti (36,3 %), zamestnanci (34,1 %) a zahraniční študenti (29,7 %). Neprisoluje si ho 37,5 % zahraničných študentov; 32,1 % zamestnancov a 30,4 % domácich študentov (viď tab. 18).

V závere nemôžeme potvrdiť ani hypotézu H1, že domáci študenti a zamestnanci budú mať oproti zahraničným študentom UVLF osvojené zdravšie stravovacie návyky. Naopak, domáci študenti vo viacerých odpovediach preukázali, že preferujú nezdravý spôsob stravovania. Až 52,7 % domácich študentov obeduje až po príchode domov; 50,9 % jedáva večeru po 19 hodine a 45,5 % si dopraje pochutiny pri TV/PC. Podobne aj zahraniční študenti a zamestnanci sa nestravujú podľa zásad správnej výživy, pretože na desiati 48,5 % zahraničných študentov konzumuje sladkosti a 50 % zamestnancov sladké pečivo. Tak tiež 70,6 % zamestnancov uprednostňuje tučné mäso na obed.

Všeobecne vysoké percento respondentov s obľubou konzumuje sladkosti, sladké pečivo, pochutiny, prijíma málo tekutín počas dňa, navštevuje reštaurácie a fast-foody a ak je jedlo málo slané, tak si ho prisoluje; tieto položky však poukazujú na nesprávne stravovanie, čo sa v neskoršom čase môže preukázať na ich zdraví. Preto je veľmi potrebné vykonať u študentov a zamestnancov UVLF v Košiciach viac osvetu a prednášok o zdravej výžive s ohľadom na denný energetický príjem a potrebu organizmu. Celkové zlepšenie kvality stravy by mohlo viesť k výraznému zníženiu počtu predčasných úmrtí (Wang a kol., 2019).

ZÁVER

Nielen na Slovensku, ale aj v celosvetovom merítku nie je vypracovaná dostatočná dôkazová základňa odporúčaní týkajúcich sa stravovania v oblasti verejného zdravia na zlepšenie kvality stravy a spomale-

nie nástupu chronických ochorení. Stravovacie návyky u vysokoškolských študentov a zamestnancov sa navzájom líšia a súvisia so sociálnou a finančnou situáciou jednotlivca, od ich charakterových vlastností a národnostnej príslušnosti. Cieľom predloženej štúdie bolo pomocou dotazníka vykonať prieskum stravovacích návykov 150 respondentov s ohľadom na ich pracovné zaradenie (študent vysokej školy – domáci, zo zahraničia, zamestnanec vysokej školy) na UVLF v Košiciach. Na základe dosiahnutých výsledkov sme poukázali na pozitívne alebo negatívne stravovacie návyky respondentov. Podľa odpovedí na jednotlivé položky v dotazníku sme zistili, že prekvapivo vysoké percento domácich študentov vo viacerých otázkach preferuje nezdravý spôsob stravovania. Zarážajúce je zistenie, že 52,7 % domácich študentov obeduje až po príchode domov, čo je z hľadiska zdravého stravovania nevyhovujúce. Znepokojujúce je aj to, že 50,9 % domácich študentov jedáva večeru až po 19 hodine a 45,5 % domácich študentov si dopraje pochutiny pri TV/PC. Nemôžeme však povedať, že zahraniční študenti a zamestnanci sa stravujú podľa zásad správnej výživy, pretože aj tam sme v niektorých položkách našli prekvapivé vysoké percento konzumácie nezdravej stravy. Zistili sme, že na desiatu najčastejšie zahraniční študenti (48,5 %) konzumujú sladkosti a zamestnanci (50 %) sladké pečivo, čo je z hľadiska zdravej výživy veľmi nesprávne. Alarmujúce zistenie je, že na obed 70,6 % zamestnancov uprednostňovalo tučné mäso. Znepokojujúci je aj nízky príjem tekutín (1000 ml za deň) u 44,7 % zamestnancov. Celkovo však môžeme zhodnotiť, že vysoké percento respondentov s obľubou konzumuje sladkosti, sladké pečivo, pochutiny, prijíma malo tekutín počas dňa, navštevuje reštaurácie a fast-foody a ak je jedlo málo slané tak si ho prisoluje; tieto položky však poukazujú, na nezdravé stravovanie, čo sa v neskoršom čase môže preukázať na ich zdraví. Preto je veľmi potrebné vykonať u študentov a zamestnancov UVLF v Košiciach viac osvetu a prednášok o zdravej výžive s ohľadom na denný energetický príjem a potrebu organizmu.

ZOZNAM LITERATÚRY

Alcock, R. D., Shaw, G. C., Burke, L. M.: Bone broth unlikely to provide reliable concentrations of collagen precursors compared with supplemental sources of collagen used in collagen research. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.*, 2019, 29 (3), 265 – 272. Doi:10.1123/ijsnem.2018-0139.

Caha, J.: *Sám sobě výživovým poradcem* [He's his own nutritionist]. Nakladatelství CPress, 2022. s. 248.

Clark, N.: *Sportovní výživa. (Sports nutrition)*. 1. vyd. Praha: Grada publishing, a. s., 2009. 352 s.

Devos, Y., Bray, E., Bronzwaer, S., Gallani, B., Url, B.: Advancing food safety: strategic recommendations from the „ONE–Health, Environment & Society-Conference 2022“. *EFSA Journal*, 2022, 20 (11), e201101. DOI: 10.2903/j.efsa.2022.e201101.

EUFIK. Sol', draslík a krvný tlak [Salt, potassium and blood pressure]. *Food Today*, 2006, 12. <<http://www.eufic.org/article/sk/4/35/artid/salt-potassium-blood-control/>>. Accessed March 15, 2024.

EUFIK. Význam sledovania odporúčaného denného príjmu [The importance of monitoring the recommended daily intake]. *Food Today*, 2007, 03. <http://www.eufic.org/article/sk/4/14/artid/Making_Sense_of_Guideline_Daily_Amounts/>. Accesed January 15, 2024.

EUFIK. Pravidelné raňajky – zdravý návyk v detstve aj v dospelosti [Regular breakfast – a healthy habit in childhood and adulthood]. *Food Today*, 2010, 5. <<http://www.eufic.org/article/sk/5/18/artid/Regular-breakfast-healthy-habit-in-childhood-slovak/>>. Accessed March 15, 2024.

EUFIK. Môžu byť kuchárske schopnosti kľúčom ku zdraviu? [Can cooking skills be the key to health?]. *Food Today*, 2011, 11. <http://www.eufic.org/article/sk/5/18/artid/Cooking_skills_key_health/>. Accesed January 15, 2022.

Eftimová, J., Megyesy-Eftimová, Z., Balážová, L., Faixová, D.: *Farmaceutická botanika*. [Pharmaceutical Botany] 1. vyd. Košice: UVLF,

2023. 271 s.

Fatrcová-Šramková, K., Kajaba, I., Mrázová, J.: kapitola 7 – *Zásady správné výživy. Zdravie a výživa ľudí 1* [Human health and nutrition 1]. Bratislava: CAD Press, 2011. 269 – 289 s.

Hsu, D., Lee, C., Tsai, W., Chien, Y.: Essential and toxic metals in animal bone broths. *Food Nutr. Res.*, 2023. <https://foodandnutritionresearch.net/index.php/fnr/article/view/1245>. Accessed April 9, 2023.

Kadřabová, J., Maďarič, A., Németh, K.: Přírodní zdroje polyfenolů a iných bioaktivních látek [Natural sources of polyphenols and other bioactive substances]. *Farmaceut. obzor*, 2005, 74 (8), 171 – 180. DOI: 10.1007/s10341-020-00488-9.

Keresteš, J., Bíreš, J., Ebringer, L., Ďuračková, Z., Čársky, J., Horáková, K., Graifová, M., Sektretár, S., Staruch, L., Válsíková, M., Hričovský, I., Golian, J., Lagin, L., Trakovická, A., Chlebo, P., Zálešáková, J., Fatrcová-Šramková, K., Daniška, J., Maček, J., Hamadová, Z., Toth, Z., Herian, K., Kováč, M., Dlouhý, P., Málá, P., Gažárová, M., Kajaba, I.: *Zdravie a výživa ľudí 1* [Human health and nutrition 1]. Bratislava: NIKA spol. s r. o., 2011. 1037 s.

Kleinerová, S.: *Fitness výživa [Fitness nutrition]*. 1. vyd. Praha: Grada publishing, a. s., 2015. 352 s.

Klimešová, I., Stelzer, J.: *Fyziologie výživy [Physiology of Nutrition]*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. 177 s.

Macek, P.: *Stravovací zvyklosti studentů a některé odlišnosti u závislosti na kouření cigaret* [Dietary habits of students and some differences in cigarette smoking addiction]. Diplomová práce. Brno: Masarykova Univerzita. Fakulta sportovních studií, 2013. 87 s.

Machová, J., Kubátová, D., Svoboda, Z., Wedlichová, I., Mrázová, E., Hamanová, J., Kubátová, D.: *Výchova ke zdraví* [Health Education]. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a. s. 2016. 312 s.

Marinov, Z., Pastucha, D., Barčáková, U., Čepová, J., Divoká, J., Kalvachová, B., Kuželová, H., Málková, I., Nesrstová, M., Ptáček, R., Seeman, T.,

Vašíčková, L., Vignerová, J., Zemková, D.: *Praktická dětská obezitologie* [Practical Paediatric Obesity]. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a. s., 2012. 224 s.

Micha, R., Peñalvo, J. L., Cudhea, F., Imamura, F., Rehm, C. D., Mozaffarian, D.: Association between dietary factors and mortality from heart disease, stroke, and type 2 diabetes in the United States. *JAMA*, 2017, 317 (9), 912 – 924. Doi:10.1001/jama.2017.0947.

Miller, V., Micha, R., Choi, E., Karageorgou, D., Webb, P., Mozaffarian, D.: Evaluation of the quality of evidence of the association of foods and nutrients with cardiovascular disease and diabetes: a systematic review. *AMA Netw. Open*, 2022, 5 (2), e2146705. Doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.46705.

Miller, G. D., Ragalie-Carr, J., Torres-Gonzalez, M.: Perspective: seeing the forest through the trees: the importance of food matrix in diet quality and human health, advances. *Nutrition*, 2023, 14 (3), 363 – 365. Doi: 10.1016/j.advnut.2023.03.005.

Mozaffarian, D., Aspry, K. E., Garfield, K., Kris-Etherton, P., Seligman, H., Velarde, G. P., Williams, K., Yang, E.: “Food Is Medicine” Strategies for Nutrition Security and Cardiometabolic Health Equity: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology*, 2024, 83 (8), 843 – 864. Doi: 10.1016/j.jacc.2023.12.023.

Navas-Carretero, S., Pérez-Granados, A., Sarriá, B., Carbajal, A., Pedrosa, M., Roe, M., Fairweather-Trait, S., Vaquero M. P.: Oily fish increases iron bioavailability of a phytate rich meal in young iron deficient women *J. Am. Coll. Nutr.*, 2008, 27 (1), 96 – 101. Doi: 10.1080/07315724.2008.10719680.

Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M. et al.: Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990 – 2019: update from the GBD 2019 study. *Journal of the American College of Cardiology*, 2020, 76 (25), 2982 – 3021. Doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.

Šulcová, M., Čížnár, I., Fabiánová, E., Adamčáková, Z., Auxtová, E., Avdičová, M., Bar-

- tošovič, I., Dostálová, K., Egnerová, A., Glasa, J., Glasová, H., Gvozdjaková, M., Hurbánková, M., Klement, C., Kollárová, J., Koppová, K., Kováč, A., Kováč, R., Krištúfek, P., Krišťuková, Z., Máderová, E., Mészáros, J., Moricová, Š., Nikodémová, D., Oleár, V., Procházková, M., Rusnáková, V., Slotová, K., Schwarz, M., Šimko, G., Šovčíková, E., Wsóllová, L.: 2012. *Verejné zdravotníctvo* [Public Health]. 1. vyd. Bratislava: VEDA, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, 2012. 654 s.
- Tsao, C. W., Aday, A. W., Almaraz, Z. I., Anderson, Ch. A. M., Arora, P., Avery, Ch. L., Baker-Smith, C. M., Beaton, A. Z., Boehme, A. K., Buxton, A. E., Commodore-Mensah, Y., Elkind, M. S. V., Evenson, K. R., Eze-Nliam, Ch., Fugar, S., Generoso, G., Heard, D. G., Hiremath, S., Ho, J. E., Kalani, R., Kazi, D. S., Ko, D., Levine, D. A., Liu, J., Ma, J., Magnani, J. W., Michos, E. D., Mussolino, M. E., Navaneethan, S. D., Parikh, N. I., Poudel, R., Rezak-Hanna, M., Roth, G. A., Shah, N. S., St-Onge, M. P., Thacker, E. L., Virani, S. S., Voeks, J. H., Wang, N., Y., Wong, N., D., Wong, S. S., Yaffe, K., Martin, S.: Heart disease and stroke statistics-2023 update: a report from the American Heart Association *Circulation*, 2023, 147 (8), e93 – e621. Doi: 10.1161/CIR.0000000000001123.
- Tuček, M., Bencko, V., Holcátová, I., Kmeťová, A., Kožíšek, F., Králíková, E., Kudlová, E., Pekárek, L., Rameš, J., Rössner, P., Schejbalová, M., Slamová, A., Šmerhovsky, Z.: *Hygiena a epidemiologie*. [Hygiene and Epidemiology] 1. vyd. Praha: Karolinum, 2013. 358 s.
- Wang, D. D., Li, Y., Afshin, A., Springmann, M., Mozaffarian, D., Stampfer, M. J., Hu, F. B., Murray, Ch. J. L., Willett, W. C.: Global improvement in dietary quality could lead to substantial reduction in premature death. *J. Nutr.*, 2019, 149 (6), 1065 – 1074; 1065 – 1074. Doi: 10.1093/jn/nxz010.
- Zachar, D.: *Živiny človeka* [Human Nutrients]. 2. vyd. Zvolen: TU Zvolen, 2011. 252 s.
- Zeleňáková, L., Čapla, J., Zajác, P.: *Hygiena výživy a stravovania* [Nutritional and Dietary Hygiene]. 2. vyd. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2018. 204 s.
- URL 1. *Food Data Central*. U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2019. <https://fdc.nal.usda.gov/>. Accessed March 15, 2024.
- URL 2. *Ako správne rozdeliť jedlo počas dňa* [How to properly divide food during the day]. Centrum rozvoja znalosti o potravinách n. o. 2016. www.opotravinach.sk.
- URL 3. *Správny stravovací režim a jak chytře zdolat hlad* [The right eating regime and how to conquer hunger smartly]. Víšcojís.cz/Teens, 2016.
- <http://www.viscojis.cz/teens/index.php?option=com_content&view=article&id=99:90&catid=59:principy-spravne-vyivy&Itemid=109>. Accessed March 15, 2024.

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 prehľadse-nie, že ich článok je pôvodný, nebol publikovaný ani zaslaný na publikáciu inde.

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

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

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

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

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

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

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

Latinské termíny sa 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Kniha (editovaná, needitovaná):

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

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

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

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

Canganella, F., Balsamo, R.: Isolation and selection of probiotic microorganisms with antagonistic activity against *Paenibacillus larvae* and *Paenibacillus alvei*. In *Proceedings of the International Probiotic Conference: Probiotics for the 3rd Millennium*, 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 rozboru 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