

FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

Vedecký časopis

UNIVERZITY VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA
A FARMÁCIE V KOŠICIACH

ISSN 2585-9609

ISSN 2729-790X



2
V • 2023

FOLIA

PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA

VYDÁVA
UNIVERZITA VETERINÁRSKEHO LEKÁRSTVA A FARMÁCIE V KOŠICIACH
SLOVAKIA



FOLIA
PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA
V., 2, 2023

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

FOLIA PHARMACEUTICA CASSOVIENSIA, V., 2, 2023

O B S A H

Faixová, Zita; Čabaiová, Andrea; Faixová, Dominika; Gažová, Andrea; Kyselovič, Ján:	
HYPURURICEMIA, THE RISK FACTORS AND PHARMACOTHERAPY	5
Halušková, Jana:	
EPIGENETICS OF ALLERGIC RHINITIS: POTENTIAL FOR THERAPEUTIC APPLICATIONS	14
Kolesárová, Mária; Olejníková, Anna:	
POROVNANIE PRESKRIPTIE LIEČIV V TERAPII PSORIÁZY	
COMPARISON OF DRUG PRESCRIPTION IN PSORIASIS THERAPY.....	23
Marcinčáková, Dana; Badovská, Dominika; Legáth, Jaroslav; Petrilla, Vladimír:	
HODNOTENIE ANTIPIROLIFERAČNÝCH ÚČINKOV HADIEHO JEDU ZA POMOCI	
MODELOVÉHO ORGANIZMU	
EVALUATION OF ANTIPIROLIFERATIVE EFFECTS OF SNAKE VENOM USING	
A MODEL ORGANISM.....	34
Jurošová, Kristína; Holécyová, Monika:	
INTERACTIONS OF CARDIOVASCULAR DRUGS WITH FRUITS OF THE GENUS CITRUS	41
Palovčáková, Monika; Takáč, Peter:	
FARMAKOTERAPEUTICKÉ MOŽNOSTI U PACIENTOV S HYPERPROLAKTINÉMIOU	
PHARMACOTHERAPEUTIC OPTIONS IN PATIENTS WITH HYPERPROLACTINEMIA	47
Solárová, Zuzana:	
METRONIDAZOLE – DRUG OF MANY INDICATIONS.....	55
Hudáková, Nikola; Maloveská, Marcela; Petroušková, Patrícia; Humeník, Filip; Čížková, Daša:	
NOVÁ GENERÁCIA LIEČIV NA BÁZE KMEŇOVÝCH BUNIEK	
A NEW GENERATION OF DRUGS BASED ON STEM CELLS.....	71
Megyesy Eftimová, Zuzana; Eftimová, Jarmila:	
VPLYV KONZUMÁCIE TOKAJSKÉHO VÍNA NA METABOLIZMUS	
A BIOCHEMICKÝ PROFIL KRVI	
THE EFFECT OF TOKAJ WINE CONSUMPTION ON METABOLISM AND BLOOD	
BIOCHEMICAL PROFILE	84
Podolská, Kristína; Mazánková, Dana; Göböövá, Mária; Vaňo, Ivan:	
THE ROLE OF MATERNAL NUTRITION DURING PREGNANCY – OVERVIEW	
OF DAILY DOSAGES RECOMMENDATIONS (REVIEW ARTICLE)	100
Pokyny pre autorov	109



HYPURICEMIA, THE RISK FACTORS AND PHARMACOTHERAPY

Faixová, Zita¹; Čabaiová, Andrea¹; Faixová, Dominika²;
Gažová, Andrea³; Kyselovič, Ján^{4,5}

¹Department of Biology and Physiology

University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice

²Department of Pharmaceutical Technology, Pharmacognosy and Botany

University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice

³Institute of Pharmacology and Clinical Pharmacology

Comenius University Faculty of Medicine, Špitálska 24, 813 72 Bratislava

⁴Department of Pharmacology and Toxicology

University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice

⁵5th Department of Internal Medicine

Comenius University Faculty of Medicine and University Hospital in Bratislava, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava

The Slovak Republic

zita.faixova@uvlf.sk

ABSTRACT

Hyperuricemia is a pathologically increased concentration of uric acid in the blood and is a risk factor for gout and the development of other diseases. The prevalence of hyperuricemia has increased due to the increasing average age of the population, more frequent kidney diseases, increasing prevalence of obesity, changes in dietary habits, excessive use of diuretics or the influence of genetic factors. The study aims to analyse the therapy of hyperuricemia and gouty arthritis (*arthritis uratica*), joint involvement, and comorbidities in the patients. Of the patients with hyperuricemia (n = 14), most were male (79 %) and over 41 years old (64 %). Up to 50 % of patients reported involvement of the ankle joints and knee joints,

35 % involvement of the metatarsophalangeal joints and elbow joints, and 28 % of patients involvement of the metacarpophalangeal joints. Eight patients (57 %) reported a blood family history of rheumatological diseases. Seven patients (50 %) suffered from a gout attack once a year, three patients (21 %) had two episodes, one patient (7 %) had pain attacks three times, one patient (7 %) had more than three gout attacks, and two patients (14 %) did not report a single gout attack. Twenty-eight percent of patients suffered from arterial hypertension, 21 % had hypercholesterolemia, 14 % were treated for DM type II, and one patient (7 %) suffered from venous thrombosis. All patients were treated with allopurinol, and uricemia targets were achieved in 43 % of patients.

Key words: allopurinol; *arthritis uratica*; comorbidities; gout; gout flares; hyperuricemia

INTRODUCTION

Hyperuricemia is a pathologically increased concentration of uric acid in the blood. It can lead to the formation and deposition of sodium urate microcrystals in tissues, mainly in cartilage and ligaments, where they may not cause any clinical symptoms for some time (George and Minter, 2022).

A serum uric acid concentration greater than $420 \mu\text{mol.L}^{-1}$ in men and greater than $360 \mu\text{mol.L}^{-1}$ in women is defined as hyperuricemia. In more than one-quarter of persons with hyperuricemia, gout will be developed over a more extended period depending on the presence of local tissue factors that support crystal growth (Nian and You, 2022). A characteristic feature of gout is an acute recurrent attack of mono-articular arthritis (gout attack, gout flare), which most often affects the first metatarsophalangeal joint (Taylor et al., 2015). A critical role in the crystal-induced inflammatory response plays the cytoplasmic nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3 (NLRP3) inflammasome with released IL-1 β , promoting neutrophil influx into the synovial membrane and joint fluid, a pathological hallmark of acute inflammatory attacks (So and Martinon, 2017). The period between gouty flares is called the inter-critical period. The deposition of urate salts in the structures of the musculoskeletal system causes destructive changes in the joint, which we refer to as chronic tophaceous gout.

The prevalence of gout is 3 – 6 % in men and 1 – 2 % in women (Xia et al., 2020). The latest data show a significant increase in the prevalence of gout (Dehlin et al., 2020).

Among the most frequent causes for the rising prevalence of hyperuricemia is the increasing average age of the population, more frequent kidney diseases, increasing prevalence of obesity, changes in eating habits, excessive use of diuretics or the influence of genetic factors (Rai et al., 2017; Němec, 2020).

Uric acid is the end product of purine metabolism and is formed by the oxidation of xanthine and hypoxanthine, which is catalysed by xanthine oxidase. It is composed mainly in the liver and in the small intestine, and its concentration in the serum is the result of a balance between the intake of purines by food, their *de novo* synthesis and degradation in the body, and the rate of excretion of uric acid from the body, mainly by the kidneys (Němec, 2020).

Diet is a source of exogenous purines. Food with a high content of nucleic acids, such as the liver or kidneys, significantly affects uricemia.

Purine biosynthesis *de novo* takes place in the liver. A congenital disorder of enzyme catalysing purine synthesis leads to increased purine synthesis, such as increased phosphoribosyl diphosphate (PRPP)-synthase activity or X-linked hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency.

Other enzyme disorders associated with hyperuricemia and gout are a regulatory mutation of hepatic AMP deaminase and the overproduction of ribose-5-phosphate (Nian and You, 2022).

Pathological conditions such as cytostatic drug treatment, extensive hemolysis or rhabdomyolysis, which are accompanied by rapid cell turnover, proliferation or cell death, lead to accelerated metabolism of endogenous nucleotides and thus to overproduction of uric acid and gout.

It has been shown that two-thirds of uric acid in the human body is excreted from the kidneys, and one-third from the intestines, where bacteria break it down into ammonia and carbon dioxide (Jackuliak and Payer, 2019). In the kidney, uric acid is completely filtered by the glomerulus, and 98 % is reabsorbed in the proximal renal tubule. It is then secreted in the distal parts into the lumen of the tubules and finally only partially reabsorbed. Disruption of these four processes can reduce uric acid elimination and hyperuricemia.

The cause of hyperuricemia is either increased uric acid production, reduced excretion by urine, or a combination of both processes.

Up to 75 – 90 % of gout cases are associated with

reduced excretion of uric acid from the kidneys as a result of a decrease in kidney function due to their chronic damage or as a result of congenital disorders of urate transporters in the kidneys (Němec, 2020; Nian and You, 2022).

Almost all diuretics, low doses of acetylsalicylic acid, pyrazinamide, cyclosporine, ethambutol, niacin, ketone bodies, lactate, and chronic lead-induced nephropathy decrease uric acid clearance.

A combination of both mechanisms can also cause hyperuricemia in glucose-6-phosphatase deficiency, hereditary fructose intolerance, or excessive alcohol intake (Nian and You, 2022).

Urate-lowering therapy (ULT) involves a variety of strategies to reduce urate levels, typically pharmaceutical agents that reduce purine breakdown (e. g. xanthine oxidase inhibitors – XOIs, allopurinol and febuxostat) or increase urinary excretion of uric acid due to a decrease in its tubular reabsorption in the proximal tubule by inhibiting the transport proteins URAT1, URATv1/Glut9, OAT10 (e. g. uricosuric agents, lesinurad, benzbromarone, probenecid) (Otnani et al., 2020). Uricosurics are recommended, alone or in combination with xanthine oxidase inhibitors. Uricosurics are suitable for treating patients with reduced excretion of uric acid from the kidneys. Their use is not recommended for patients with urolithiasis and severe kidney function disorders.

In patients with severe debilitating chronic tophaceous gout in whom the serum uric acid target cannot be reached with any other available drug at the maximal dosage (including combinations), pegylated uricase (pegloticase) is indicated. Uricase is an enzyme that catalyses the oxidation of uric acid into allantoin, a more soluble end product (Rybár, 2014; Němec, 2020).

Recommended first-line options for acute gout attacks are colchicine, and/or NSAIDs, and biological drugs if necessary (Richette et al., 2017). However, despite the knowledge of the pathogenesis and clinical picture of the disease and effective treatments, gout is often misdiagnosed, and its management still needs to be improved (Roman, 2022; Spragg et al.,

2023).

This study deals with the therapy of hyperuricemia and gouty arthritis, clinical symptoms (joint involvement) and occurrence of comorbidities in outpatients treated.

MATERIAL AND METHODS

We performed a retrospective analysis of the medical records of 14 patients diagnosed with hyperuricemia and gouty arthritis (*arthritis uratica*) at the general practitioner's clinic for adults in 2021 in Slovakia.

From the medical records, the following data were collected: age and gender, pharmacotherapy, frequency of acute gout attack per year and joint involved, comorbidities of the patients and rheumatic diseases in blood family members.

The Personal Data Protection Act depersonalised all data obtained. The obtained data were processed using MS Excel (2016).

RESULTS AND DISCUSSION

Our study showed that out of 14 patients with hyperuricemia, 11 (79 %) were male, and three (21 %) were female. According to Nováková Tkadlečková and Gajdošová (2020), hyperuricemia affects men three times more frequently than women. Grassi et al. (2013) compared data from the United States National Health Surveys (NHANES) and found that hyperuricemia currently occurs in 21 % of men and almost 5 % of women.

Our studied sample were patients with gout aged between 20 and 80 years (see Tab. 1). Nine patients (64 %) were between the ages of 41 and 70 years old. The results of other studies indicate that hyperuricemia can occur in all age groups (Olejárová, 2011; Dukát et al., 2016); but the prevalence increases with increasing age of the population, which is observed throughout life in men and especially after menopause in women probably due to the uricosuric effect of estrogen. In Canada, the prevalence of gout in men

Tab. 1: The distribution of patients by age

Age group	Number of patients N %
20 – 30	1 (7.1 %)
31 – 40	2 (14.3 %)
41 – 50	3 (21.4 %)
51 – 60	3 (21.4 %)
61 – 70	3 (21.4 %)
71 – 80	2 (14.3 %)

and women aged 70 – 79 in 2012 was 11.8 %, compared with 5.1 % in men and women aged 50 – 59 years and < 1 % in < 30 years (Rai et al., 2017).

The basic principle of successful treatment of hyperuricemia is educating the patient about the pathophysiology of the disease, the existence of effective therapies, associated comorbidities and the principles of managing acute attacks and eliminating urate crystals through the lifelong lowering of serum uric acid below a target level (Richette et al., 2017). Moreover, an observational study showed that complete patient education increased adherence to urate-lowering therapy, leading to a high rate (92 %) of effectively treated patients at 12 months (Rees et al., 2013).

According to European League Against Rheumatism (EULAR) recommendations for the management of gout for patients on urate-lowering therapy, serum uric acid should be monitored and maintained to less than 360 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, which is below the saturation point for monosodium urate to dissolve all crystal deposits. A lower serum uric acid target (less than 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) to facilitate faster dissolution of crystals is recommended for patients with severe gout (tophi, chronic arthropathy, frequent attacks) until total crystal dissolution and resolution of gout. A serum uric acid level of less than 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ is not recommended in the long term (Richette et al., 2017).

Allopurinol is the longest-used and most widespread hypouricemic drug (Chen-Xu et al., 2019). It is a hypoxanthine analogue that reduces uric acid synthesis by inhibiting xanthine oxidase. The drug

is first converted by xanthine oxidase to alloxanthin, which is stored in tissues for a long time and is an effective non-competitive xanthine oxidase inhibitor. Allopurinol reduces the concentrations of relatively insoluble urates and uric acid in tissues, plasma and urine. The drug is given to patients for long-term treatment but worsens inflammation and pain during acute attacks.

Allopurinol is recommended for first-line urate-lowering therapy in patients with normal renal function, starting at a low dose (100 mg/day) and increasing by 100 mg increments every 2 – 4 weeks, if required, to reach the uricaemia target. A lower allopurinol dose is recommended in patients with chronic kidney disease (Richette et al., 2017). The most commonly used allopurinol dose of 300 mg/day does not achieve the serum uric acid target (360 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) in about 30 – 50 % of patients with normal kidney function. Treatment with allopurinol up to 600 – 800 mg/day had a 75 – 80 % success rate of achieving serum uric acid levels of less than 360 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Rees et al., 2013).

The maximum dose of allopurinol in patients with normal renal function is 800 mg/day. Doses over 300 mg/day should be divided into 2 – 4 administrations.

The maximum allopurinol dosage should be adjusted to creatinine clearance in patients with renal impairment. This limitation complicates the effective treatment of hyperuricemia with allopurinol in patients with renal diseases.

To the patients in our study, the serum uric acid (SUA) had been monitored three times in a row every two months from the first visit to the doctor due to proven complications.

All patients with hyperuricemia and gouty arthritis were treated with allopurinol. Seven patients with initial hyperuricemia (from 436 to 493 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) were treated with allopurinol at 100 mg/day, and six patients reached the serum uric acid target (lower than 360 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Allopurinol at a dose of 150 mg/day was prescribed to three patients with an initial serum uric acid from 538 to 565 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, and another three patients with

an initial serum uric acid from 589 to 618 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ were prescribed allopurinol at a dose of 300 mg/day. One patient with serum uric acid of 502 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ was prescribed allopurinol at a dose of 200 mg/day. Our results showed that 43 % of the patients have managed to reach the uricaemia target. In patients with serum uric acid (SUA) higher than 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, SUA measured at two-month intervals gradually decreased, but the SUA target has not been reached in the monitored period. In the other patients, it would be necessary to adjust the drug doses and focus on dietary (low-purine diet) and general lifestyle advice.

Allopurinol therapy can also have adverse effects. There are skin and gastrointestinal disorders, increased liver tests or headaches. Exceptionally, skin hypersensitivity reactions may also occur. Patients with the HLA-B*58:01 allele have a high risk of life-threatening skin reactions (FitzGerald et al., 2020).

There are drug interactions of allopurinol with oral anticoagulants theophylline and drugs that are metabolised by xanthine oxidase, azathioprine and mercaptopurine (Němec, 2020). Allopurinol increases the effect of the cytostatic mercaptopurine, which is inactivated by xanthine oxidase, and also of azathioprine, which is metabolised to mercaptopurine. Allopurinol increases the effect of some anticancer drugs, e. g. cyclophosphamide. It increases the effect of warfarin as its degradation is inhibited (Ritter et al., 2019).

Another xanthine oxidase inhibitor is febuxostat. Febuxostat has a similar mechanism of action as allopurinol. It is metabolised in the liver, and renal excretion is not a major route of elimination. Febuxostat is recommended in case of ineffective treatment with allopurinol or in cases where allopurinol is contraindicated. Febuxostat is effective in patients with a very high initial serum uric acid and patients with reduced renal functions (Gao et al., 2021). Treatment with febuxostat should be avoided in patients with severe cardiovascular disease.

Allopurinol is prescribed for prophylaxis (it should not be started while the patient is asymptomatic), and uricosuric drugs (probencid, sulfapyrazone) are given to patients who are allergic to allopurinol. Ras-

buricase is administered intravenously to prevent and treat acute hyperuricemia (Ritter et al., 2019).

Among the uricosuric drugs that increase uric acid excretion by directly affecting the renal tubules, benzboromarone is included, but it is not categorised in Slovakia. The combination of uricosuric medications (probencid, sulfapyrazone, benzboromarone) with aspirin and salicylates decreased the effect of uricosuric drugs (Ritter et al., 2019).

In most cases, the first manifestation of gout is acute monoarthritis, which affects the first metatarsophalangeal joint in 60 – 80 % of cases. Other affected joints can be the fingers, wrists, knees, heels, ankles and small joints of the feet.

In our group of patients, up to 50 % reported involvement of the ankle and knee joints, 35 % reported involvement of the metatarsophalangeal joints and elbow joints, and 28 % of patients reported involvement of the metacarpophalangeal joints. A twin study demonstrated that serum uric acid concentration is 40 % genetically determined and hyperuricemia 60 % (Yang et al., 2005). While high serum uric acid concentration significantly predicts gout development, hyperuricemia does not always cause gout, suggesting that gout is influenced more by environmental than genetic factors (Krishan et al., 2012). Eight (57 %) patients reported a blood family history of rheumatological diseases.

Among therapeutics for acute gout, we include non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), e. g. ibuprofen and naproxen. Colchicine is administered in cases where NSAIDs are contraindicated. Glucocorticoids, e. g. hydrocortisone (oral, intramuscular, intra-articular administration), can be given as an alternative to NSAIDs. In 2013, the European Medicines Agency (EMA) registered the biological drug canakinumab – a monoclonal antibody against IL-1 β . In patients with frequent, poorly controlled flares, in whom hypouricemic treatment with commonly available drugs is ineffective, it represents an alternative treatment for this disease. Canakinumab is administered in a single dose of 150 mg s. c. at the beginning of an acute gout attack in patients who have had at least

Tab. 2: Number of gout attacks in patients with hyperuricemia per year

Number of gout attacks/year	Number of patients N %
0	2 (14.3 %)
1	7 (50 %)
2	3 (21.4 %)
3	1 (7.1 %)
More than 3 attacks	1 (7.1 %)

three recurrences of gout episodes in the last 12 weeks. Among the side effects, a higher risk of allergic and infectious complications is reported (Lingling et al., 2016).

Acute attacks occur mainly in the early stages of therapy (probably as a result of physicochemical changes on the surface of urate crystals, leading to their dissolution). Thus, allopurinol treatment is not recommended during acute attacks and is usually combined with NSAIDs (Ritter et al., 2019).

Since the last EULAR recommendation, pegloticase has emerged as a powerful urate-lowering therapy for refractory gout. It catalyses the oxidation of uric acid into allantoin, a more soluble end product, and thus excreted faster. It is registered in Slovakia in an injectable form (Richette et al., 2017).

In the evaluated group of 14 patients during one year, only two patients with hyperuricemia did not report a single gout attack (14 %), up to 7 patients (50 %) suffered from a gout attack once a year, three patients had two episodes (21 %). One patient (7 %) reported suffering from pain attacks three times during the year, and also one patient (7 %) had more than three gout attacks during the year (see Tab. 2).

In the monitored group of patients, every patient with pain was prescribed NSAIDs or colchicine, and the doctor's indications were correct. Hyperuricemia and gout can lead to the development of comorbidities, such as arterial hypertension, cardiovascular events, chronic renal failure, erectile dysfunction, venous thromboembolic disease and manifestations of

metabolic syndrome (Dehlin et al., 2020; Borghi et al., 2022).

According to EULAR, every person with gout should be systematically screened for associated comorbidities and cardiovascular risk factors, including renal impairment, coronary heart disease, heart failure, stroke, peripheral arterial disease, obesity, hyperlipidemia, hypertension, diabetes and smoking, which should be addressed as an integral part of the management of gout (Richette et al., 2017).

In our study, out of 14 patients who have taken urate-lowering therapy, ten patients (70 %) also had associated diseases, e. g. arterial hypertension, hypercholesterolemia, hypothyroidism, diabetic nephropathy, venous thrombosis, *diabetes mellitus* type II and open-angle glaucoma. The choice of drugs that polymorbid patients have taken was correct regarding the interaction of their mutual effects.

The treatment of both asymptomatic and symptomatic hyperuricemia must also include dietary measures, regular physical exercise and the use of the uricosuric effect of medicinal preparations indicated for the treatment of comorbidities recommended. A suitable diet for hyperuricemia consists of low-fat dairy products, vegetable fats and oils, fresh vegetables and fruits. It is advised to adjust body weight in overweight or obese patients and limit smoking and alcohol consumption (especially beer and spirits), sugar-sweetened drinks, heavy meals and excessive meat and seafood intake (Szabóová et al., 2020).

CONCLUSIONS

The study results showed that it is very important to spread available information and current knowledge about hyperuricemia and its possible complications to the public so they can be prevented effectively and in time. In the case of complications in the patient with gout, the medical staff must diagnose the disease correctly and set up adequate treatment, which the patient must support by changing the lifestyle, following the recommended dietary measures and regular physical exercise.

In the case of undiagnosed hyperuricemia or gout, a doctor's consultation is always necessary if warning symptoms such as sudden pain in the joints that are swollen and reddened appear. The pain typically begins at night, and its intensity decreases even without treatment the next day after the onset. In patients with gout, it is advisable to notify the doctor if the frequency of gout attacks is higher, if other joints are affected or if the intensity of the attacks worsens.

Our results confirm a higher prevalence of hyperuricemia and gout in men (79 %) over 41 years. Nine patients (64 %) were over 41 years and were classified into three age groups: 41 – 50, 51 – 60, and 61 – 70.

It is always necessary to individually assess the risks and benefits of long-term urate-lowering therapy. With proper treatment, it is possible to successfully reduce the progression of the disease and the number of acute gout attacks. The pharmacist should recognise the symptoms of gout and recommend the patient to see a specialist in a timely manner and explain to patients with the diagnosed disease the necessity of observing the regimen measures and the correct use of the prescribed medicines.

REFERENCES

- Borg, C., Agnoletti, D., Cicero, A. F. G., Lurbe, E., Virdis, A.: Uric acid and hypertension: A review of evidence and future perspectives for the management of cardiovascular risk. *Hypertension*, 2022, 79, 1927 – 1936.
- Dehlin, M., Jacobsson, L., Roddy, E.: Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors. *Nature reviews/Reumatology*, 2020, 16, 380 – 390.
- Dukát, A., Sabaka, P., Gajdosík, J., Vrbnjak, J., Tlčimuka, O., Gavorník, P., Gašpar, L., Šimko, F.: Epidemiologické údaje o výskytu hyperurikémie u mužov a u žien v podmienkach primárnej liečebnej starostlivosti na Slovensku [Epidemiologic data of hyperuricaemia prevalence in the conditions of primary care in Slovakia]. *Vnitřní lékarství*, 2015, 61 (12), 5S7 – 5S11. <https://www.casopisvnitrilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2015/92/02>. [cit.12-05-2021].
- FitzGerald, J. D., Dalbeth, N., Mikuls, T., Brignardello-Petersen, R., Guzatt, G., Abeles, A. M., Gelber, A. C., Harrold, L. R., Khanna, D., King, C., Levy, G., Libbey, C., Mount, D., Pillinger, M. H., Rosenthal, A., Singh, J. A., Sims, J. E., Smith, B. J., Wenger, N. S., Bae, S. S., Danve, A., Khanna, P. P., Kim, S. C., Lenert, A., Poon, S., Qasim, A., Sehra, S. T., Sharma, T. S. K., Topover, M., Turgunbaev, M., Zeng, L., Zhang, M. A., Turner, A. S., Neogi, T.: American College of Rheumatology Guideline for the Management of Gout. *Arthritis Care Res.*, 2020, 72, 744 – 760.
- Gao, L., Wang, B., Pan, Y., Lu, Y., Rui, Ch.: Cardiovascular safety of febuxostat compared to allopurinol for gout treatment: A systemic and meta-analysis. *Clinic Cardiol.*, 2021, 44 (7), 907 – 916.
- George, Ch., Minter, D. A.: *Hyperuricemia*. Pubmed, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459218/>. Accessed February 11, 2023.
- Grassi, D., Ferri, L., Desideri, G., Di Gioia, P., Cheli, P., Del Pinto, R., Properzi, G., Ferri, C.: Chronic hypouricemia, uric acid deposit and cardiovascular risk. *Curr. Pharm. Des.*, 2013, 19 (13), 2432 – 2438.
- Jackuliak, P., Payer, J.: *proLékaře.cz. Hyperurikémia a diabetes mellitus. Přehledová práce* [Hyperuricaemia and *diabetes mellitus*. A Review]. *proLékaře.cz.*, 2019, 8 (1), 15 – 20. <https://www.prolekare.cz/casopisy/forum-diabetologicum/2019-1-16/hyperurikemia-a-diabetes-mellitus-112418>. [cit. 20-03-2022].
- Chen-Xu, M., Yokose, C., Rai, S. K., Pillinger, M. H., Choi, H. K.: Contemporary prevalence of gout and hyperuricemia in the United States and decadal trends: the National Health and Nutrition Examination Survey, 2007 – 2016. *Arthritis Rheumatol.*, 2019, 71, 991 – 999.
- Krishnan, E., Lessov-Schlaggar, C. N., Krasnow, R. E., Swan, G. E.: Nature versus nurture in gout: A twin study. *Am. J. Med.*, 2012, 125, 499 – 504.

- Lingling, X., Shiqun, L., Meiping, G., Yaoming, X.: PubMed – National Institutes of Health (NIH). *Comparison of prednisolone, etoricoxib, and indomethacin in treatment of acute gouty arthritis: An open-label, randomized, controlled trial*, 2016, 22, 810 – 817. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4791088/>. Accessed April 15, 2022.
- Němec, P.: Dnava artritida – současné možnosti farmakoterapie [Gout arthritis – current options of pharmacotherapy]. *Remedia*, 2015, 17 (2), 80 – 87. <http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2015/3-2015/Dnava-artritida-soucasne-moznosti-farmakoterapie/e-1Nn-1Rj-1T0.magarticle.aspx>.
- Němec, P.: Hyperurikemie v ambulanci praktického lékaře [Hyperuricaemia in primary care]. *Medicina pro praxi*, 2020, 17 (2), 80 – 87. [cit. 25-02-2022].
- Nian, Y. L., You, Ch. G.: Susceptibility genes of hyperuricemia. *Hereditas*, 2022, 159:30[http://doi.org/10.1186/s41065-022-00243-y](https://doi.org/10.1186/s41065-022-00243-y) open access 04 August 2022. Accessed September 23, 2022.
- Nováková Tkadlečková, V., Gajdošová, M.: *Academiq Dr.Max: Poruchy metabolismu purinů v běžné lékárenské praxi* [Disorders of purine metabolism in pharmacy practice], 2020. https://academiq.drmax.cz/lesson_run.php?lr=3272429&size=small. [cit. 21-1-2022].
- Olejárová, M.: Dnava artritida [Gouty arthritis]. *Medicina pro praxi*, 2011, 8 (11), 452 – 454.
- Otani, N., Ouchi, M., Kudo, H., Tsuruoka, S., Hisatome, I., Anzai, N.: Recent approaches to gout drug discovery: an update. *Expert. Opin. Drug Discov.*, 2020, 15 (8), 943 – 954. Doi:10.1080/17460441.2020.1755251.
- Rai, S. K., Aviña-Zubieta, J. A., McCormick, N., De Vera, M. A., Shojaniak, K., Saye, E. C., Choi, H. K.: The rising prevalence and incidence of gout in British Columbia: population-based trends from 2000 to 2012. *Semin. Arthritis Rheum.*, 2017, 46, 451 – 456.
- Rees, F., Jenkins, W., Doherty, M.: Patients with gout adhere to curative treatment if informed appropriately: proof-of-concept observational study. *Ann. Rheum. Dis.*, 2013, 72, 826 – 830.
- Richette, P., Doherty, M., Pascual, E., Barskova, V., Becce, F., Castañeda-Sanabria, J., Coyfish, M., Guilló, S., Jansen, T. L., Janssens, H., Lioté, F., Mallen, C., Nuki, G., Perez-Ruiz, F., Pimentao, J., Punzi, L., Pywell, T., So, A., Tausche, A. K., Uhlig, T., Zavada, J., Zhang, W., Tubach, F., Bardin, T.: 2016 Updated EULAR evidence-based recommendations for the management of gout. *Ann. Rheum. Dis.*, 2017, 76, 29 – 42.
- Ritter, J. M., Flower, R., Henderson, G., Loke, Y. K., Mackewan, D., Rang, H. P.: *Rang and Dale's Pharmacology*. 9th edn. Elsevier Science, 2019. 808 p.
- Roman, Y. M.: Moving the needle in gout management: The role of culture, diet, genetics, and personalised patient care practices. *Nutrients*, 2022, 14, 390. [http://doi.org/10.3390/nu14173590](https://doi.org/10.3390/nu14173590). 2022 Aug 31. Accessed February 23, 2023.
- Rybár, I.: Dna – diagnostika a liečba [Gout – diagnosis and the therapy]. *Via Practica*, 2014, 11 (5), 154 – 158.
- So, A. K., Martinon, F.: Inflammation in gout: Mechanisms and therapeutic targets. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2017, 13, 639 – 647.
- Spragg, J. C., Michael, T. J. F., Aslani, P., Coleshill, M. J., Chan, J. S., Day, R. O., Stocker, S. L.: Optimizing adherence to allopurinol for gout: Patients' perspectives. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2023, 1 – 14.
- Szabóová, R., Herich, R. Gajdošová, M.: The therapeutic effect of allopurinol on uric acid serum levels in patients with arthritis uratica. *Folia Pharma.*, 2020, 2 (4), 71 – 78.
- Taylor, W. J., Fransen, J., Jensen, T. L., Dalbeth, N., Schumacher, H. R., Brown, M., Louthrenoo, W., Vazquez-Mellado, J., Eliseev, M., McCarthy, G., Stamp, L. K., Perez-Ruiz, F., Sivera, F., Ea, H.-K., Gerritsen, M., Scire, C., Cavagna, L., Lin, Ch., Chou, Y.-Y., Tausche, A. K., Vargas-Santos, A. B., Janssen, M., Chen, J.-H., Slot, O., Cimmino, M. A., Uhlig, T., Neogi, T.: Study for updated gout classification criteria: Identification of features to classify

gout. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*, 2015, 67, 1304 – 1315. Doi:10.1002/acr.2285.

Yang, Q., Guo, Ch.-Y., Cupples, L. A., Levy, D., Wilson, P. W., Fox, C. S.: Genome-wide, search for genes affecting serum uric acid levels: the Framingham Heart Study. *Metabolism*, 2005, 54 (11),

1435 – 1441.

Xia, Z., Wu, Q., Wang, H., Zhang, S., Jiang, Y., Gong, T., Xu, X., Chang, Q., Niu, K., Zhao, Y.: Global, regional and national burden of gout, 1990 – 2017: A systemic analysis of the global burden of disease study. *Rheumatology*, 2020, 59, 1529 – 1538.



EPIGENETICS OF ALLERGIC RHINITIS: POTENTIAL FOR THERAPEUTIC APPLICATIONS

Halušková, Jana

Department of Biology and Physiology
University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Komenského 73, 041 81 Košice
The Slovak Republic

jana.haluskova@uvlf.sk

ABSTRACT

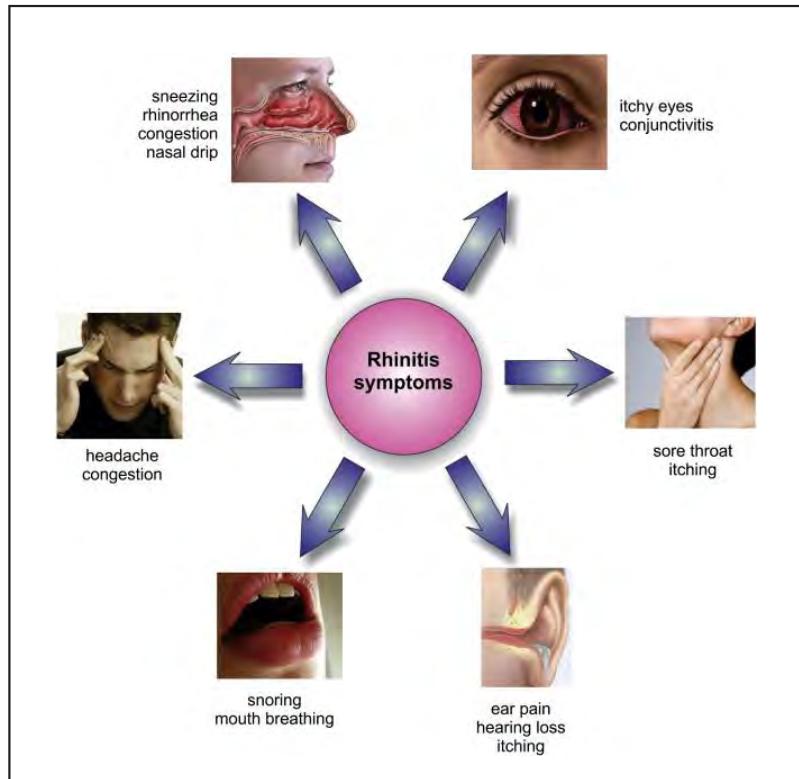
The incidence of allergic rhinitis (AR) is increasing worldwide. AR is defined as an IgE antibody-mediated inflammatory disease and is closely related to other inflammatory disorders such as asthma or conjunctivitis. External environmental factors such as exposition to allergens, air pollution, climate change, ozone, or the presence of toxicants in combination with genetic factors play a role in the induction of AR. More recently, epigenetic mechanisms have also been found to be involved in the pathogenesis of AR, thought to mediate the link between genetic and environmental factors. In the present work, studies analysing basic epigenetic mechanisms in AR, such as DNA methylation, histone modification, and miRNA expression are presented. The potential of epigenetics for the therapy of AR is also included.

Key words: allergic rhinitis; DNA methylation; epigenetics; histone acetylation; miRNA

INTRODUCTION

The incidence of allergic rhinitis (AR) is increasing worldwide. The symptoms of this disease – sneezing, watery rhinorrhea, nasal itching, and airflow obstruction are a consequence of the response to inhaled allergens mediated by IgE antibodies and mucosal inflammation realized by type-2 helper T (Th2) cells. Thus, AR is clinically defined as an IgE antibody-mediated, inflammatory disease (Gao et al., 2019). AR is closely related to other inflammatory diseases which affect respiratory mucous membranes, such as asthma and conjunctivitis (Choi et al., 2021). When the organism first encounters an antigen, specific, so-called antigen-presenting cells in the mucosa take up the antigen, thereby activating antigen-specific T cells in the lymph nodes. At the same time, the activation of epithelial cells leads to the release of epithelial cytokines, such as IL-25 and IL-33, and thymic stromal lymphopoietin (TSLP). This process subsequently stimulates Th2 lymphoid cells and basophils to release the cytokines IL-13 and IL-4, resulting in the

Fig. 1: The schematic illustration of AR symptoms



Source: <https://e-revapharma.com/blog/61>

production of Th2 cells capable of activating B cells to produce IgE antibodies against the antigen. When allergens re-encounter the body, they bind to IgE antibodies on the surface of mast cells and circulating basophils, thereby activating these cells and releasing histamine and leukotrienes. These mediators can cause the above-mentioned symptoms of AR. Pathogenesis of AR and other allergic diseases is fairly complicated whereby a combination of genetic and environmental factors play a role in their induction. The external environmental influences include e. g. exposure to allergens, air pollution, climate change, ozone, presence of toxic substances, etc. In addition to hereditary and environmental effects, AR can be influenced also by epigenetics which, according to Gao et al. (2019), is hypothesized to mediate a relationship between heredity and environment. On the epidemiological as well as molecular levels, allergies represent a kind of prototypic example of gene-environment interactions-related disorders, the underly-

ing mechanisms of which involve a variety of epigenetic mechanisms (Harb et al., 2016; Turner, 2017).

In the following parts, studies that deal with the analysis of epigenetic mechanisms associated with AR and related allergic diseases, as well as the possibilities of epigenetic approaches to their treatment, will be presented.

Epigenetics of AR

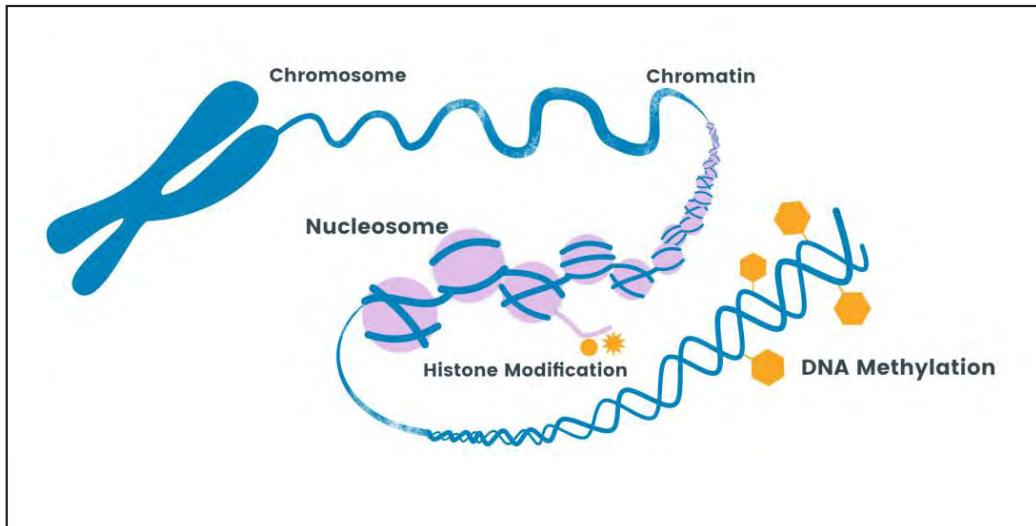
Epigenetic regulation involves changes in gene expression that are not due to alterations in the DNA sequences themselves (Pechalrieu et al., 2017). The mechanisms such as DNA methylation, histone acetylation, and the action of non-coding RNAs (e. g. micro RNAs – miRNAs) are instead involved in the regulation of gene expression. Many studies have focused on the analysis of epigenetic modifications of relevant genes that are associated with AR. North and Ellis (2011) reviewed current literature studying

the role of epigenetics in the development of AR. The authors concluded that a growing body of papers supports the theory that environmental pressures may have permanent effects on gene regulation and expression through epigenetic mechanisms. Moreover, the researchers showed that histone modifications were associated with bronchial hyper-responsiveness and corticosteroid resistance in asthma. Furthermore, they pointed on the role of epigenetics in the differentiation of human T cells and murine studies which revealed that a maternal diet rich in methyl donors may enhance susceptibility to allergic inflammation in the offspring, mediated through increased DNA methylation. In the following text, several further studies analysing DNA methylation changes, histone modifications and altered miRNA expression in AR will be presented, starting with a brief characterization of each epigenetic modification.

Biochemically, DNA methylation represents the covalent attachment of a methyl group to the fifth carbon of the cytosine in the dinucleotide sequences of CpG. This reaction is catalysed by the specific enzymes, DNA methyltransferases (DNMTs). Several CpG sites sometimes form so-called CpG islands which represent sites of condensed occurrence of CpG dinucleotides. CpG islands are mostly located in regulatory regions of genes such as promoters and enhancers. DNA methylation plays an important role in the regulation of gene expression. Increased methylation of regulatory sequences of some genes inhibits their expression, and conversely, hypomethylation of regulatory regions promotes the expression of the corresponding genes. DNA methylation is not stable and the methylation status of the genome is the result of the interaction of genetic, epigenetic, and environmental factors (Dhar et al., 2021). Undesirable changes in the genome methylation patterning can have pathological consequences and result in the induction of various diseases. Stefanowicz et al. (2012) characterized DNA methylation patterns of AEC (airway epithelial cells) and PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) in children from four groups: atopic, atopic asthmatic, non-atopic asthmatic, and

healthy. They identified a set of differentially methylated CpG sites in AECs when compared to PBMCs, from which 13 were specific to healthy controls, 8 sites were only found in atopics and 6 sites were unique to asthmatics. No differences in the methylation status of PBMCs among disease phenotypes were detected. Li et al. (2015) studied methylation of the *IL-13* gene in 60 patients with HDM (house dust mite)-sensitized AR in comparison with 65 control healthy individuals and they revealed hypomethylation and increased expression of the gene which may be associated with increased risk of AR from HDM sensitization. Sarnowski et al. (2016) aimed to identify novel risk loci for AR and asthma taking into account parent-of-origin effect. The researchers identified a differentially methylated CpG site within the *MTNR1A* (melatonin receptor 1A) gene which mediates the effect of a paternally transmitted genetic variant on the comorbidity of asthma and AR. North et al. (2017) analysed DNA methylation in PBMCs of a group of 38 AR patients and a healthy group (8 individuals) exposed to grass pollen for 3 hours on two consecutive days. They revealed 42 methylation sites in samples of AR patients which undergone significant DNA methylation changes. Moreover, the *SLFN12* (schlafen 12) gene methylation significantly correlated with symptoms, and baseline DNA methylation pattern was identified as predictive of symptoms severity upon grass allergen exposure. The authors studied also DNA methylation and expression of *MUC4* (mucrin 4) gene in nasal brushing of the further group of patients exposed to birch pollen and they revealed a decrease in methylation and an increase in *MUC4* gene expression. Gao et al. (2019) provide new insights into the molecular mechanism of DNA methylation in AR by identification of one multiple differential module, and seventeen significant pathways mapped by the module, which were found as important factors in AR. There was shown that DNA methylation at only three nasal CpG sites enabled classification of allergic diseases in Dutch children aged sixteen years and also detected allergic multi-morbidity and symptomatic IgE sensitization

Fig. 2: The schematic illustration of DNA methylation and histone modification



Source: abclinics.com/2018/11/08/role-dna-methylation-disease/?lang=en

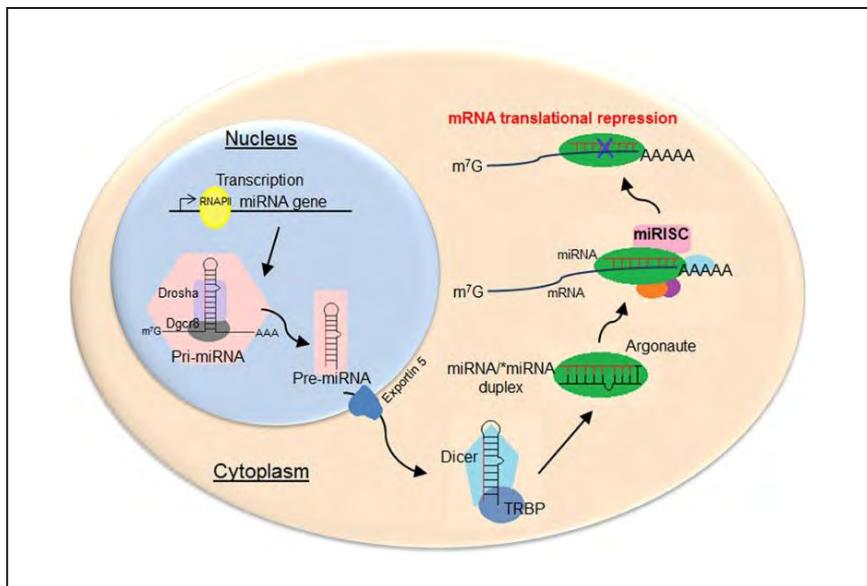
(van Breugel, 2022).

The most known histone modifications which contribute to epigenetic modulation of gene expression include acetylation, methylation, phosphorylation, and ubiquitination. The acetylation status of histones is controlled by two groups of enzymes with opposing functions: histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). HATs catalyse the transfer of an acetyl group from the molecule of acetyl-CoA to the terminal amino group of lysine in the histone tails. Since acetyl groups are negatively charged, their addition to the amino groups of histone proteins neutralizes a positive charge of histones. This weakens the interaction between histones and negatively charged phosphate groups of the DNA making the chromatin less condensed and more accessible to the transcription machinery. By contrast, the removal of acetyl groups from lysine residues of histones catalysed by HDACs restores a positive charge on histones thereby increasing the strength of the interaction between histones and DNA. The consequence is higher chromatin condensation, which is associated with the inhibition of gene expression (Potaczek et al., 2021). There was shown that expression of HDAC1

was increased in the nasal epithelia of AR patients compared to healthy persons (Wang et al., 2015). Jiang et al. (2015) revealed that the level of the *TREK1* (TWIK-related potassium channel 1) gene, which has an important role in the epithelial barrier regulation in the nasal mucosa, was significantly lower in patients and rats with AR than in healthy individuals. Moreover, IL-4 (interleukin 4) suppressed the expression of *TREK1* in the nasal mucosa via up-regulation of HDAC1. Seumois et al. (2014) identified increased methylation of histone H3 at lysine 4 (H3K4me2) in around 200 gene regions in naïve Th1 and Th2 cells of asthmatic compared to non-asthmatic patients.

The miRNAs represent the post-transcriptional control elements which contribute to the epigenetic regulation of gene expression. They cleave and silence the target transcripts and inhibit the post-transcriptional process (Choi et al., 2021). The miRNAs are around 20 – 25 nucleotides long non-coding RNA molecules of high abundance, e. g. in humans; 2,500 miRNAs were identified. The miRNAs are transcribed from double-stranded DNA by the enzyme RNA polymerase II and then the immature primary transcript undergoes processing by the action of two RNase

Fig. 3: The biogenesis of miRNA



Source: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK373371/figure/fig13_1/

III-type enzymes called Drosha and Dicer. Subsequently, only one strand of mature miRNA is incorporated into the so-called RNA-induced silencing complex, and the role of the miRNA in this complex is to recognize and interact with the corresponding mRNA whose degradation is controlled by this complex (Potaczek et al., 2021). Decreased expression of miR-21 and miR-126 was shown to be associated with AR by Chen et al. (2010). Liu et al. (2016) found that in childhood, miR-181a levels may be a predictor of AR severity. Panganiban et al. (2016) identified 30 differentially expressed miRNAs among healthy, allergic, and asthmatic individuals, from which circulating miR-125b, miR-16, miR-299-5p, miR-126, miR-206, and miR-133b levels were confirmed as the most predictive for allergy and asthma. The inflammatory cells, cytokines, and miRNAs were analysed during the non-pollen season in nasal biopsies of 117 middle-aged men suffering from allergic asthma around 20 years, and also in a group of 33 healthy individuals by Suojalehto et al. (2014). They observed down-regulation of miR-18a, miR-126, let-7e, miR-155, and miR-224 and upregulation of miR-498, miR187, miR-874, miR-143, and miR-886-3p in asth-

matic patients compared to controls. The differences in miRNA expression were similar in asthmatics with and without AR and asthma severity had only minor impact on miRNA expression. There was found that miR-29a is highly expressed in the nasal mucosa of AR patients, and that it can suppress apoptosis of the nasal epithelial cells (NECs) and support AR by inhibition of *FOS* expression (proto-oncogene; regulator of cell proliferation and differentiation; acting in cell apoptosis) (Fan et al., 2021). Specjalski et al. (2022) revealed that in the AR group, miR-136, miR-208, and miR-190 were upregulated and after 6 months of the subcutaneous immunotherapy (SCIT) some of the pro-inflammatory miRNAs were down-regulated, and some miRNAs which regulate the balance between Th1 and Th2 immune cells were up-regulated. The authors concluded that miRNAs probably play a regulatory role in SCIT which may lead to the induction of tolerance. Tunçer et al. (2022) showed that levels of miRNA expressions were different in a group of 20 healthy children, 20 patients with seasonal AR (SAR), 20 non-atopic asthmatics (NA-A), and 12 patients with perennial allergic rhinitis (PAR). Moreover, the authors pointed out that miR-181a and

miR-125b can be candidate biomarkers for SAR and miR-206 for NA-A, and PAR.

Treatment of AR: a potential of epigenetics

Currently, nasal antihistamines, nasal corticosteroids, anti-cholinergics, leukotriene antagonists, anti-IgE monoclonal antibodies, and mast cells stabilizers are mainly used for the treatment of AR (Choi et al., 2021). However, these drugs only suppress the symptoms of AR, their effect is short-lived and the symptoms reappear when the patient stops taking the medication. Another method of current treatment, which is characterised by a relatively long therapeutic effect, is the repeated subcutaneous or sublingual administration of a specific antigen; however, with this therapy, the first results do not appear until after two years. Currently, it is necessary to look for other effective ways of treating AR with a long-lasting effect. Epigenetic mechanisms have been proven to contribute significantly to the development, clinical manifestation, and heterogeneity of AR by mediating the environmental influences and by taking part in the physiology and pathophysiology of cells which play an important role in AR. Those cells include T cells involved in the adaptive immune response and cells of the affected organs as AEC or smooth muscle cells (SMC). Based on the above, influencing cytokines produced by epithelial cells that regulate T cell activity in allergic reactions, as well as acting on T cells themselves, appear to be potentially useful in AR therapy today. In this regard, epigenetic studies analysing the processes that control cytokine production and T cell proliferation have been performed (Potazcek et al., 2017). Also, the antigen-specific regulatory T cells (the FOXP3+ CD4+ CD25+ T cells – Tregs) should be produced which would induce and maintain tolerance to specific antigens. In this regard, demethylation of the Treg-specific demethylated region (TSDR) in the *FOXP3* (forkhead box P3; transcription factor) gene is essential to keep the inhibitory properties of Tregs (Toker et al., 2013). According to Choi et al. (2021), the demethylation of

FOXP3 may be a promising marker for the induction of tolerance and also for predicting the response to immunotherapy. Drugs that target histone modifications, such as inhibitors of HDACs (HDACis), also have the potential for the treatment of AR. For example, the broad-spectrum HDACis JNJ-26481585 restored the integrity of *ex vivo* cultured nasal epithelial cells (NECs) isolated from AR patients (Steelant et al., 2019). Wang et al. (2016) investigated the therapeutic effect of the further HDACis – NaB (sodium butyrate) on mice with AR. They revealed that the intranasal application of NaB inhibited the expression of HDAC1, HDAC3, and TSLP while H3 acetylation at lysine 9 (H3K9Ac) was increased. Moreover, NaB decreased an increased level of ovalbumin-specific IgE and improved clinical symptoms and nasal mucosa epithelial morphology in the AR mouse model. These findings indicate that NaB has the potential for the treatment of AR. In further work, Wang et al. (2020) studied the preventive effect of NaB on AR when added to the diet of newly weaned mice and also its effect on the lncRNA (long noncoding RNA) and mRNA expression profiles in the nasal mucosa. They revealed that NaB, along with other impacts, showed a preventive effect in the murine AR model by inhibition of HDAC1 and HDAC8 expression and an increase of ovalbumin-induced H3K9Ac. Cho et al. (2015) revealed that TSA (trichostatin A) has an anti-allergic effect by reducing the infiltration of eosinophils and cytokines produced by Th2 cells in a murine model of AR via regulation of Tregs. There was found that miR-146a is able to induce production of Tregs enforcing the ovalbumin-specific immunotherapy. This indicates that miR-146a has the potential for therapy of AR (Liu et al., 2016). Treatment of the airway smooth muscle cells with BET (bromo and extra-terminal inhibitors) resulted in the decrease of inflammatory cytokines (Clifford et al., 2015). Also, prenatal treatment with fish oil induced histone acetylation changes in the promoter region of the *PKC ζ* (protein kinase C zeta) of the CB (cord blood) CD4+ T cells, indicating the anti-allergic effect of this diet supplement (Harb et al., 2017). There was revealed

that histone acetylation changes occur in promoters of the allergy-related immune genes in the placentas of women from a prospective birth cohort study that ingested fish or olive oil during pregnancy (Acevedo et al., 2019). The anti-allergic effect of the cowshed bacterium *A. lwoffii* and unprocessed cow's milk was also presented, which was related to the ability to modify histone acetylation (Brand et al., 2011; Abbring et al., 2019). The effect of the DNA methylation inhibitor 5-azacytidine on the increased methylation of the *IFNG* (interferon gamma) gene promoter in the CD4+ T cells, resulting in the beneficial mouse asthma phenotypes was reported by Brand et al. (2012).

CONCLUSION

Epigenetic mechanisms represent promising targets for new diagnostic methods and therapies not only for AR but also for all other allergic diseases. In the future, further studies of epigenetic regulation of allergy-related genes will be necessary to identify new possible targets for the action of potential epigenetic drugs based on DNMT, HDAC, HAT, and other epigenetic-related enzyme inhibitors as well as miRNA.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Scientific Grant Agency of the Slovak Republic under grants No. 1/0166/21.

REFERENCES

Abbring, S., Wolf, J., Ayechu-Muruzabal, V., Diks, M. A. P., Alhamwe, B. A., Alhamdan, F., Harb, H., Renz, H., Garn, H., Garssen, J., Potaczek, D. P., van Esch, B. C. A. M.: Raw cow's milk reduces allergic symptoms in a murine model for food allergy – a potential role for epigenetic modifications. *Nutrients*, 2019, 11 (8), 1721. Doi: 10.3390/nu11081721.

Acevedo, N., Frumento, P., Harb, H., Alashkar Alhamwe, B., Johansson, C., Eick, L., Alm, J., Renz, H., Scheynius, A., Potaczek, D. P.: Histone

acetylation of immune regulatory genes in human placenta in association with maternal intake of olive oil and fish consumption. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20 (5), 1060. Doi:10.3390/ijms20051060.

Brand, S., Teich, R., Dicke, T., Harb, H., Yildirim, A. Ö., Tost, J., Schneider-Stock, R., Waterland, R. A., Bauer, U.-M., von Mutius, E., Garn, H., Pfefferle, P. I., Renz, H.: Epigenetic regulation in murine offspring as a novel mechanism for transmaternal asthma protection induced by microbes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011, 128 (3), 618 –25. e1-7. Doi: 10.1016/j.jaci.2011.04. 035.

Brand, S., Kesper, D. A., Teich, R., Kilic-Niebergall, E., Pinkenburg, O., Bothur, E., Lohoff, M., Garn, H., Pfefferle, P. I., Renz, H.: DNA methylation of TH1/TH2 cytokine genes affects sensitization and progress of experimental asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, 129 (6), 1602 – 1610.e6. Doi: 10.1016/j.jaci.2011.12.963.

Chen, R. F., Huang, H. C., Ou, C. Y., Hsu, T. Y., Chuang, H., Chang, J. C., Wang, L., Kuo, H. C., Yang, K. D.: MicroRNA-21 expression in neonatal blood associated with antenatal immunoglobulin E production and development of allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy*, 2010, 40, 1482 – 1490.

Cho, J. S., Kang, J. H., Han, I. H., Um, J. Y., Park, I. H., Lee, S. H., Lee, H. M.: Antiallergic effects of trichostatin A in a murine model of allergic rhinitis. *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.*, 2015, 8, 243 – 249.

Choi, B. Y., Han, M., Kwak, J. W., Kim, T. H.: Genetics and epigenetics in allergic rhinitis. *Genes*, 2021, 12, 2004. Doi: 10.3390/genes12122004.

Clifford, R. L., Patel, J. K., John, A. E., Tatler, A. L., Mazengarb, L., Brightling, C. E., Knox, A. J.: CXCL8 histone H3 acetylation is dysfunctional in airway smooth muscle in asthma: regulation by BET. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2015, 308 (9), L962 – L972. Doi: 10.1152/ajplung.00021.2015.

Dhar, G. A., Saha, S., Mitra, P., Nag Chaudhuri, R.: DNA methylation and regulation of gene expression: Guardian of our health. *Nucleus (India)*, 2021, 64 (3), 259 – 270.

- Fan, Y., Tang, Z., Sun, J., Zhao, X., Li, Z., Zheng, Y., Zeng, X., Feng, J.: MicroRNA-29a promotes the proliferation of human nasal epithelial cells and inhibits their apoptosis and promotes the development of allergic rhinitis by down-regulating FOS expression. *PLoS ONE*, 2021, 16, e0255480.
- Gao Z., Huang, M., Qu, Z., Wang, J., Cai, X.: Identification of DNA methylation module in seasonal allergic rhinitis. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 2019, 117, 163 – 166.
- Harb, H., Alashkar Alhamwe, B., Garn, H., Renz, H., Potaczek, D. P.: Recent developments in epigenetics of pediatric asthma. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2016, 28 (6), 754 – 763. Doi: 10.1097/MOP.0000000000000424.
- Harb, H., Irvine, J., Amarasekera, M., Hii, C. S., Kesper, D. A., Ma, Y., D'Vaz, N., Renz, H., Potaczek, D. P., Prescott, S. L., Ferantte, A.: The role of PKC ζ in cord blood T-cell maturation towards Th1 cytokine profile and its epigenetic regulation by fish oil. *Biosci. Rep.*, 2017, 37 (2), BSR20160485. Doi: 10.1042/BSR20160485.
- Jiang, J., Liu, J. Q., Li, J., Li, M., Chen, H. B., Yan, H., Mo, L. H., Qiu, S. Q., Liu, Z. G., Yang, P. C.: Trek1 contributes to maintaining nasal epithelial barrier integrity. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 9191.
- Li, J. Y., Zhang, Y., Lin, X. P., Ruan, Y., Wang, Y., Wang, C. S., Zhang, L.: Association between DNA hypomethylation at IL13 gene and allergic rhinitis in house dust mite-sensitized subjects. *Clin. Exp. Allergy*, 2015, 46, 298 – 307.
- Liu, H.-J., Zhang, A.-F., Zhao, N., Li, X.-Z.: Role of miR-146a in enforcing effect of specific immunotherapy on allergic rhinitis. *Immunol. Invest.*, 2016, 45 (1), 1 – 10.
- Liu, W., Zeng, Q., Luo, R.: Correlation between serum osteopontin and miR-181a levels in allergic rhinitis children. *Mediat. Inflamm.*, 2016, 9 471–215.
- North, M. L., Ellis, A. K.: The role of epigenetics in the developmental origins of allergic disease. *Annals Allerg. Asthma Immunol.*, 2011, 106 (5), 355 – 361.
- North, M. L., Jones, M. J., MacIsaac, J. L., Morin, A. M., Steacy, L. M., Gregor, A., Kobor, M. S., Ellis, A. K.: Blood and nasal epigenetics correlate with allergic rhinitis symptom development in the environmental exposure unit. *Allergy*, 2018, 73, 196 – 205.
- Panganiban, R. P., Wang, Y., Howrylak, J., Chinchilli, V. M., Craig, T. J., August, A., Ishmael, F. T.: Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, 137, 1423 – 1432.
- Pechalrieu, D., Etievant, C., Arimondo, P. B.: DNA methyltransferase inhibitors in cancer: From pharmacology to translational studies. *Biochem. Pharmacol.*, 2017, 129, 1 – 13.
- Potaczek, D. P., Harb, H., Michel, S., Alhamwe, B. A., Renz, H., Tost, J.: Epigenetics and allergy: from basic mechanisms to clinical applications. *Epigenomics*, 2017, 9 (4), 539 – 571. Doi: 10.2217/epi-2016-0162.
- Potaczek, D. P., Alashkar Alhamwe, B., Miethe, S., Garn, H.: Epigenetic mechanisms in allergy development and prevention. In Traidl-Hoffmann, C. et al. (Eds.). *Allergic Diseases – From Basic Mechanisms to Comprehensive Management and Prevention, Handbook of Experimental Pharmacology* 268, Springer Nature Switzerland AG, 2021, 331 – 357. Doi: 10.1007/164_2021_475.
- Sarnowski, C., Laprise, C., Malerba, G., Moffatt, M. F., Dizier, M.-H., Morin, A., Vincent, Q. B., Rohde, K., Esparza-Gordillo, J., Margaritte-Jeanin, P., Liang, L., Lee, Y.-A., Bousquet, J., Siroux, V., Pignatti, P. F., Cookson, W. O., Lathrop, M., Pastinen, T., Demenais, F., Bouzigon, E.: DNA methylation within melatonin receptor 1A (MTNR1A) mediates paternally transmitted genetic variant effect on asthma plus rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, 138 (3), 748 – 753. Doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1341.
- Seumois, G., Chavez, L., Gerasimova, A., Lienhard, M., Omran, N., Kalinke, L., Vedanayagam, M., Ganesan, A. P. V., Chawla, A., Djukanović, R., Ansel, K. M., Peters, B., Rao, A., Vijayanand, P.: Epigenomic analysis of primary human T cells reveals

enhancers associated with TH2 memory cell differentiation and asthma susceptibility. *Nat. Immunol.*, 2014, 15 (8), 777 – 788. Doi: 10.1038/ni. 2937.

Specjalski, K., Maciejewska, A., Romanowski, J., Pawłowski, R., Jassem, E., Niedoszytko, M.: miRNA profiles change during grass pollen immunotherapy irrespective of clinical outcome. *Immunother.*, 2022, 14 (6). Doi: 10.2217/imt-2021-0217.

Steelant, B., Wawrzyniak, P., Martens, K., Jonckheere, A.-C., Pugin, B., Schrijvers, R., Bullens, D. M., Vanoirbeek, J. A., Krawczyk, K., Dreher, A., Akdis, C. A., Hellings, P. W.: Blocking histone deacetylase activity as a novel target for epithelial barrier defects in patients with allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2019, 144 (5), 1242 – 1253. Doi: 10.1016/j.jaci. 2019.04.027.

Stefanowicz, D., Hackett, T.-L., Garmaroudi, F. S., Günther, O. P., Neumann, S., Sutanto, E. N., Ling, K.-M., Kobor, M. S., Kicic, A., Stick, S. M., Paré, P. D., Knight, D. A.: DNA methylation profiles of airway epithelial cells and PBMCs from healthy, atopic and asthmatic children. *PLoS ONE*, 2012, 7 (9), e44213. Doi:10.1371/journal.pone.0044213.

Suojaehto, H., Lindström, I., Majuri, M.-L., Mitts, C., Karjalainen, J., Wolff, H., Alenius, H.: Altered microRNA expression of nasal mucosa in long-term asthma and allergic rhinitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2014, 163, 168 – 178.

Toker, A., Engelbert, D., Garg, G., Polansky, J. K., Floess, S., Miyao, T., Baron, U., Duber, S., Geffers, R., Giehr, P., Schallenberg, S., Kretschmer, K., Olek, S., Walter, J., Weiss, S., Hori, S., Hamann, A., Huehn, J.: Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus. *J. Immunol.*, 2013, 190, 3180 – 3188.

Tunçer, F., Şahiner, Ü. M., Ocak, M., Ünsal, H., Soyer, Ö., Şekerel, B. E., Birben, E.: Comparison of miRNA expression in patients with seasonal and perennial allergic rhinitis and non-atopic asthma. *Turkish J. Pediatr.*, 2022, 64, 859 – 868.

Turner, S.: Gene-environment interactions- what can these tell us about the relationship between asthma and allergy? *Front. Pediatr.*, 2017, 5, 118. Doi: 10.3389/fped.2017.00118.

Van Breugel, M., Qi, C., Xu, Z., Pedersen, C.-E. T., Petoukhov, I., Vonk, J. M., Gehring, U., Berg, M., Bügel, M., Carpaïj, O. A., Forno, E., Morin, A., Eliasen, A. U., Jiang, Y., van der Berge, M., Nawijn, M. C., Li, Y., Chen, W., Bont, L. J., Bønne-lykke, K., Celedón, J. C., Koppelman, G. H., Xu, C.-J.: Nasal DNA methylation at three CpG sites predicts childhood allergic disease. *Nat. Commun.*, 2022, 13, 7415. Doi: 10.1038/s41467-022-35088-6.

Wang, Y., Lv, L., Zang, H., Gao, Z., Zhang, F., Wang, X., Zhou, X.: Regulation of Trek1 expression in nasal mucosa with allergic rhinitis by specific immunotherapy. *Cell. Biochem. Funct.*, 2015, 33 (1), 23 – 28.

Wang, J., Wen, L., Wang, Y., Chen, F.: Therapeutic effect of histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, on allergic rhinitis *in vivo*. *DNA Cell Biol.*, 2016, 35, 203 – 208.

Wang, J., Cui, M., Sun, F., Zhou, K., Fan, B., Qiu, J.-H., Chen, F.-Q.: HDAC inhibitor sodium butyrate prevents allergic rhinitis and alters lncRNA and mRNA expression profiles in the nasal mucosa of mice. *Int. J. Mol. Med.*, 2020, 45, 1150 – 1162.



POROVNANIE PRESKRIPTIE LIEČIV V TERAPII PSORIÁZY

COMPARISON OF DRUG PRESCRIPTION IN PSORIASIS THERAPY

Kolesárová, Mária; Olejníková, Anna

Katedra farmakológie a toxikológie

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Komenského 73, 041 81 Košice

Slovenská republika

maria.kolesarova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Psoriáza je dedične podmienené, chronické, recidivujúce ochorenie na imunitnom podklade, pre ktoré je charakteristické neúplné dozrievanie a differenciácia buniek pokožky. Psoriáza sa môže objavíť v ktoromkoľvek vekovom období. Vyskytuje sa v rovnakom percente u žien ako aj u mužov. V terapii ochorenia sa využíva predovšetkým lokálna terapia pomocou glukokortikoidov, keratolytik, emoliencií a antipsoriatík ako cignolín, deriváty vitamínu D a retinoidy. V terapii psoriázy má opodstatnenie aj fototerapia a systémová terapia.

Cieľom štúdie bolo vyhodnotiť a porovnať na základe preskripcie receptov farmakoterapiu pacientov s diagnózou L40.0 *Psoriasis vulgaris* v dvoch verejných lekárňach. Výsledky boli získané z preskripčných záznamov (PZ) počas 1. polroka roku 2021. V prvej lekárni s názvom Galenos bolo za dané obdobie predpísaných 473 PZ pre 111 pa-

cientov. V druhej verejnej lekárni Taj bolo zaznamenaných 108 receptov pre 45 pacientov. V rámci charakteristiky pacientov zo sledovaných PZ vyplýva, že psoriáza sa častejšie vyskytovala u žien, v priemere 60 % v obidvoch lekárňach. Pacienti sa najčastejšie vyskytovali vo vekovej skupine 41 – 50 rokov a 61 – 70 rokov. Výsledky analýzy preskripcie PZ poukazujú na to, že farmakoterapia psoriázy v obidvoch lekárňach sa výrazne nelíšila. Z vyhodnotených výsledkov vyplýva, že v obidvoch lekárňach prevládala preskripcia lokálnej terapie psoriázy, ktorá bola v lekárni Galenos na úrovni 95,14 % a v lekárni Taj 88,88 %. Z lokálnej terapie boli v obidvoch lekárňach najčastejšie predpisované hlavne lokálne kortikoidy, emoliencie a individuálne pripravované lieky.

Kľúčové slová: farmakoterapia; lokálne kortikoidy; psoriáza

ABSTRACT

Psoriasis is a hereditary, chronic, relapsing immune-based disease characterized by incomplete maturation and differentiation of skin cells. Psoriasis can appear at any age. It occurs in the same percentage in women and in men. In the treatment of the disease, local therapy using glucocorticoids, keratolytics, emollients and antipsoriatics such as cignolin, vitamin D derivatives and retinoids is used. In the therapy of psoriasis, phototherapy and systemic therapy are also justified.

The aim of the study was to evaluate and compare the pharmacotherapy of patients diagnosed with L40.0 *Psoriasis vulgaris* in two public pharmacies based on prescriptions. The results were obtained from prescription records (PZ) during the first half of 2021. In the first pharmacy called Galenos, 473 PZs were prescribed for 111 patients during the given period. In the second TaJ public pharmacy, 108 prescriptions for 45 patients were recorded. Within the characteristics of the patients, it follows from the observed PZs that psoriasis occurred more often in women, in an average of 60 % in both pharmacies. Patients were most often found in the age group of 41 – 50 years and 61 – 70 years. The results of the analysis of the PZ prescription showed that the pharmacotherapy of psoriasis in both pharmacies did not differ significantly. The evaluated results showed that local psoriasis therapy prevailed in both pharmacies, which was at the level of 95.14 % in the Galenos pharmacy and 88.88 % in the TaJ pharmacy. Local corticoids, emollients and individually prepared medicines were the most frequently prescribed local therapy in both pharmacies.

Key words: local corticoids; pharmacotherapy; psoriasis

ÚVOD

Psoriáza je definovaná ako chronické zápalové kožné ochorenie s epidermálnou proliferáciou, čo sa prejavuje v podobe zápalových ložísk pokrytých striebornými šupinami (Vaškú, 2020). Klinická manifestácia je výsledkom zložitej súhry imunologických pochodov u jedincov s genetickou predispozíciou (Tichý, 2011). Celosvetovo toto ochorenie postihuje 2 % populácie. Morbidita sa však líši podľa geografických a etnografických podmienok (Rendon a Schäkel, 2019). Psoriáza sa môže prejavovať v ktoromkoľvek veku. V detskom období sa objavuje skôr u dievčat (Gkalpakiotis a kol., 2020). V dospelosti sa výskyt medzi pohlaviami nelíši (Drozenová, 2008). Zvyčajne sa objavuje v dvoch maximách, prvé medzi 15. – 20. rokom a druhé medzi 57. – 60. rokom (Jusko, 2016). U väčšiny pacientov má chronický priebeh s častými recidívami. Až u 30 % chorých sa môže vyvinúť psoriatická artropatia rôzneho stupňa (Obstová, 2016). Existujú tri stupne závažnosti psoriázy: mierna, stredne ľažká a ľažká forma. Stupeň závažnosti sa určuje podľa intenzity tvorby šupín, začervenania, infiltrácie kože a tiež podľa percenta postihnutia povrchu tela (Drozenová, 2008). Psoriáza môže byť spojená s celým radom komorbidít ako metabolický syndróm, obezita, diabetes, dyslipidémia, nealkoholická steatóza pečene, kardiovaskulárne ochorenia, ulcerózna kolitída a Crohnova choroba, chronická obstrukčná choroba plúc a psychiatrické ochorenia (Gkalpakiotis a kol., 2020).

Na liečbu psoriázy je k dispozícii lokálna terapia, fototerapia a systémová terapia (Benáková, 2005). Spektrum lokálnej terapie psoriázy je veľmi rozmanité. Počas posledných rokov sa lokálna liečba posunula od dechtu a ditranolu k účinnejším a priateľnejším možnostiam ako sú lokálne kortikosteroidy, či analógy vitamínu D3 (Baranová, 2018). Dôležitou súčasťou terapie psoriázy sú aj emolienciá a keratolytiká. Pre úspech liečby nestačí iba správna volba lieku lekárom a jeho pravidelná aplikácia pacientom, ale aj preskripcia dostatočného množstva vzhladom k rozsahu postihnutia a spotrebe (Vachatová, 2019).

O fototerapii zvyčajne uvažujeme v prípadoch psoriázy nedostatočne reagujúcich na zvolenú lokálnu liečbu (Benáková, 2012). Bolo dokázané, že ultrafialové žiarenie (UV) má na kožu imunomodulačné, antiproliferatívne a protizápalové účinky. V prípade psoriázy je najúčinnejšie úzkopásmové UVB žiarenie o vlnovej dĺžke 311 nm (Rácz, 2011; Obstová, 2016). Fotochemoterapia PUVA [kombinácia UVA žiarenia (315 – 400 nm) so psoralénmi] sa v dnešnej dobe pre liečbu psoriázy vzhľadom k vedľajším účinkom využíva minimálne (Obstová, 2016).

Pri nedostatočnom efekte intenzívnej lokálnej terapie či fototerapie sa v ďalšom kroku odporúča podávanie systémovej liečby. Každá systémová liečba so sebou nesie určité riziká v zmysle obmedzení, ktorými sú nežiaduce účinky, kontraindikácie, či primárna (maximálna dávka lieku je neúčinná) alebo sekundárna (maximálna dávka lieku je účinná, ale nie je možná kvôli nežiaducim účinkom) neúčinnosť lieku (Imlejová, 2020). Podáva sa vo forme tablet alebo injekcií (Navrátilová a Miklíková, 2011). Pri výbere konkrétneho lieku je potrebné zohľadniť fenotyp (forma, klinický obraz a lokalizácia psoriázy) a závažnosť ochorenia, vek a pohlavie pacienta, komorbidity a spôsob ich liečby, prípadne plánovanie tehotenstva. Vzhľadom k možnej toxicite systémovo podávaných antipsoriatík, sú v priebehu liečby nutné pravidelné laboratórne aj klinické kontroly (Gkalpakiotis a kol., 2020).

V posledných rokoch je systémová liečba psoriázy a psoriatickej artritídy obohatená o biologickú liečbu, tzv. biologiká (Šimaljaková, 2008). Z pohľadu mechanizmu účinku ich môžeme zaradiť do skupiny selektívnych imunosupresív (Švihovec a kol., 2018). Vychádzajú z nových poznatkov patogenézy psoriázy a preto pôsobia selektívne na kľúčové body rozvoja zápalových zmien (Szép, 2005). Z tohto dôvodu sú oveľa efektívnejšie ako štandardné antipsoriatické systémové lieky. Ide o preparáty pôsobiace selektívne proti interleukínom (IL) 12/23 (ustekinumab), resp. IL 17 (sekukinumab), alebo s účinkom proti tumor-nekrotizujúcemu faktoru α (TNF α) (etarnecept, infliximab, adalimumab) (Drlík, 2016; Jusko, 2016).

Ďalšou skupinou sú liečivá blokujúce aktiváciu T-lymfocytov (efalizumab, alefacept). Počas biologickej liečby je najčastejším nežiaducim účinkom a zároveň najväčším rizikom častejší výskyt vírusových, bakteriálnych, či mykotických infekcií (aj oportúnnych). Preto pred začatím liečby a aj počas liečby sa realizujú vyšetrenia na vylúčenie prítomnosti infekcií ako tuberkulóza a hepatitída B. Okrem infekcií môže byť pri biologickej liečbe vyššie riziko rozvoja nádorových ochorení, vyvolania iného autoimunitného ochorenia, či hypersenzitívnych reakcií (Brázdilová a kol., 2017).

Cieľom štúdie bolo vyhodnotenie a porovnanie farmakoterapie pacientov s diagnózou L40.0 *Psoriasis vulgaris* počas 1. polroka roku 2021 v dvoch verejných lekárňach v Prešove.

METODIKA PRÁCE

Výsledky z preskripcie liečiv indikovaných u pacientov s diagnózou L40.0 *Psoriasis vulgaris* boli získané z preskripčných záznamov (PZ) z dvoch verejných lekární v Prešove počas 1. polroka 2021 (1. 1. 2021 – 30. 6. 2021). Prvá verejná lekáreň s názvom Galenos je situovaná pri dermatovenerologickej ambulancii, kde bolo za dané obdobie zaznamenaných 473 PZ pre 111 pacientov. Druhá verejná lekáreň TaJ sa nachádza na sídlisku Sekčov v Prešove, kde bolo za dané obdobie predpísaných 108 receptov pre 45 pacientov. Obidve lekárne pripravujú široké spektrum individuálne pripravovaných liekov (IPL).

Výsledky boli spracované pomocou programu Microsoft Excel 2016. Pri získavaní a spracovaní výsledkov bol dodržaný zákon 18/2018 Z. z. o ochrane osobných údajov.

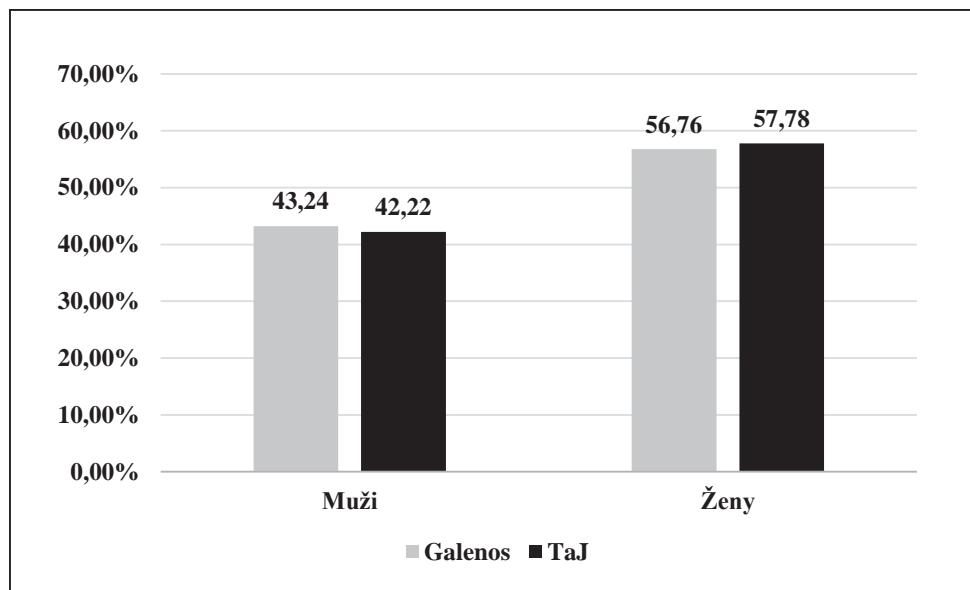
VÝSLEDKY

Charakteristika pacientov

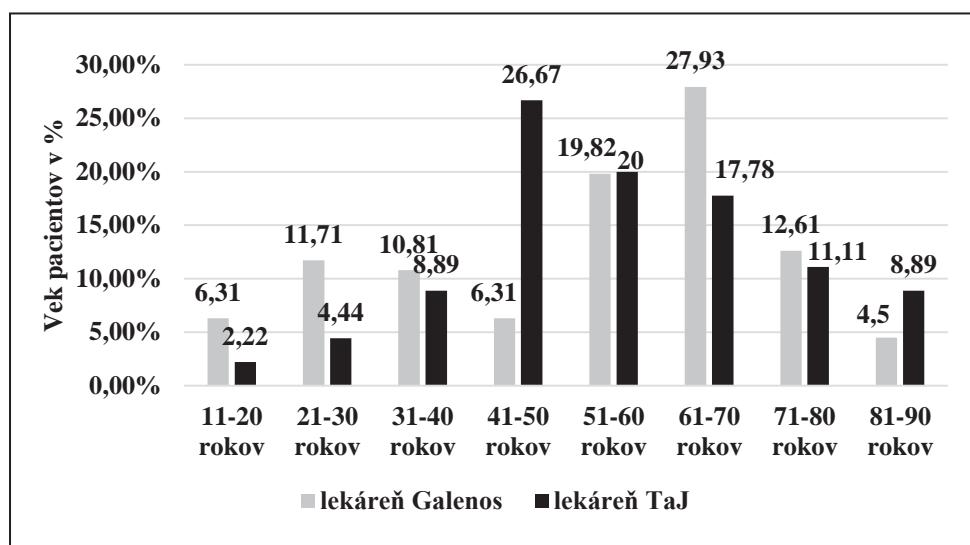
Pohlavie pacientov

V lekárni Galenos bolo zaznamenaných 111 pacientov s diagnózou L40.0 *Psoriasis vulgaris*, z ktorých 43,24 % (48) boli muži a 56,76 % (63) boli ženy.

Graf 1: Porovnanie zastúpenia mužov a žien v lekárni Galenos (n = 111) a v lekárni TaJ (n = 45)



Graf 2: Vek pacientov



V lekárni TaJ bol pomer mužov a žien podobný. Zo 45 pacientov bolo 42,22 % (19) mužov a 57,78 % (26) žien (viď graf 1).

Vek pacientov

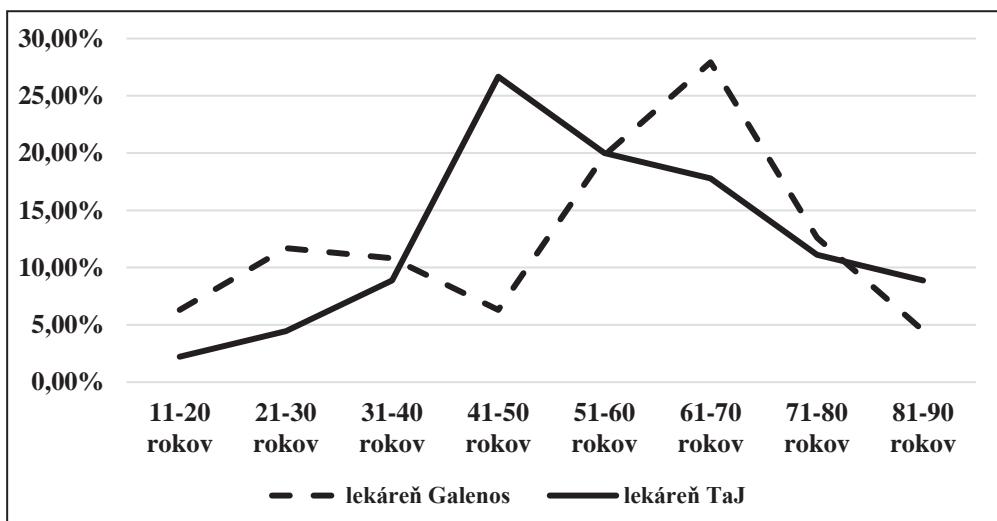
Pacienti boli rozdelení do 8 vekových skupín. Najvyššie percentuálne zastúpenie mala veková skupina

61 – 70 rokov v lekárni Galenos (27,93 %); kým v lekárni TaJ to bola veková skupina 41 – 50 rokov (26,67 %) (viď graf 2). Celkovo najmladší pacient mal 15 rokov a najstarší 88 rokov.

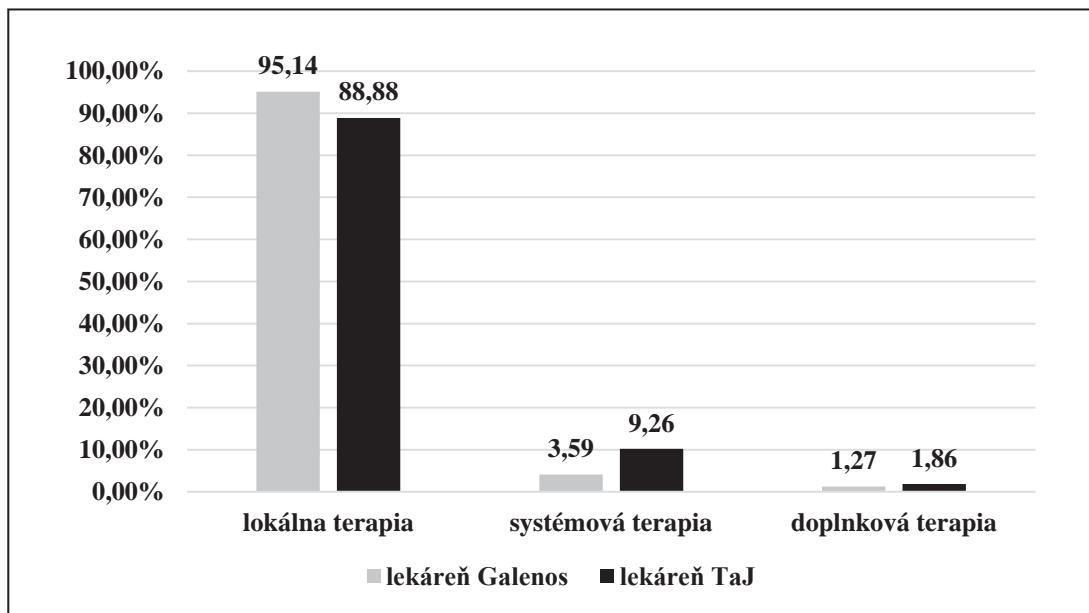
Veková krivka pacientov

Taktiež bola vyhodnotená veková krivka pacientov,

Graf 3: Veková krivka pacientov



Graf 4: Porovnanie lokálnej, systémovej a doplnkovej terapie

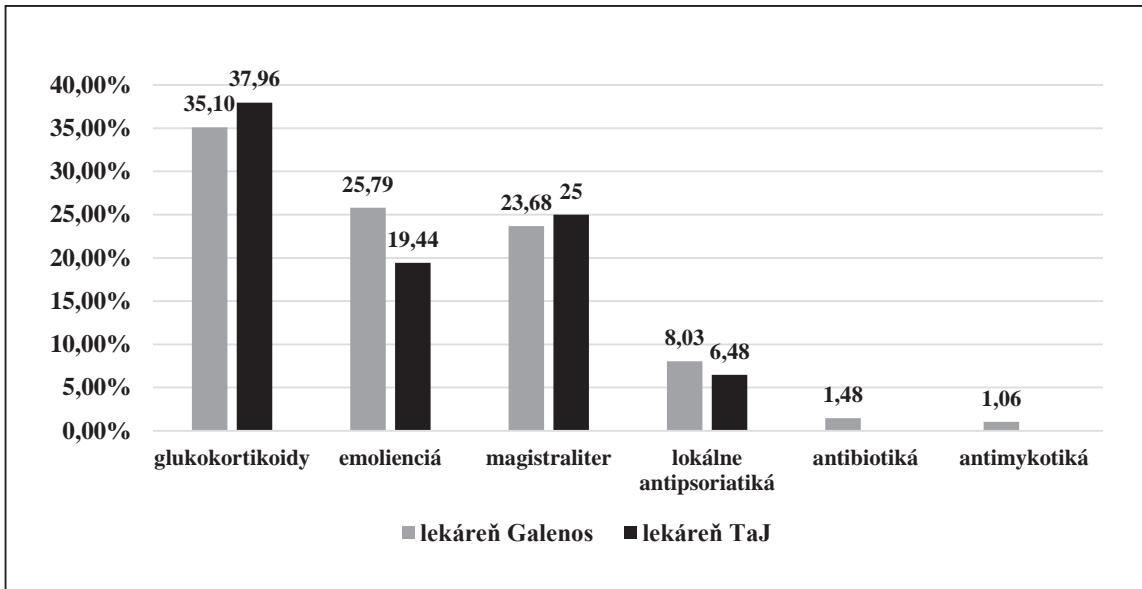


ktorú znázorňuje graf 3. V lekárni Galenos boli pozorované dva vrcholy, kde boli zaznamenaní pacienti so psoriázou hlavne vo veku 20 – 30 rokov a vo veku cca 50 – 70 rokov, kým v lekárni TaJ bol zaznamenaný jeden vrchol s najväčším výskytom pacientov vo vekovej skupine v priemere 40 – 50 rokov.

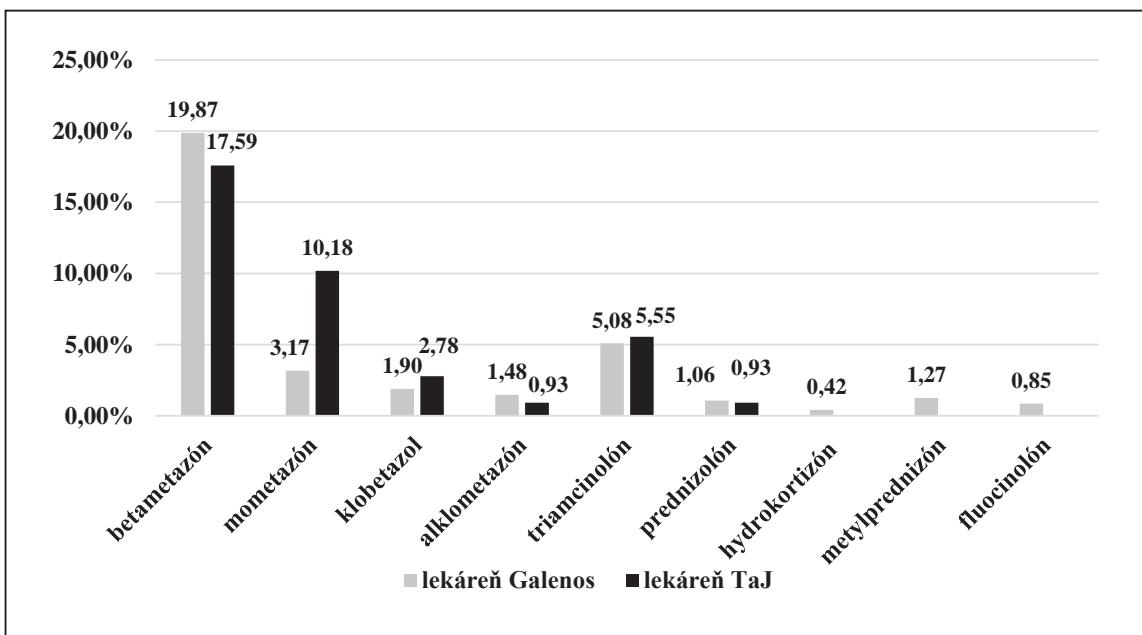
Porovnanie lokálnej, systémovej a doplnkovej terapie

V rámci farmakoterapie psoriázy prevažoval výdaj lokálnych liekov v obidvoch lekárňach, ktorá v lekárni Galenos bola predpisovaná na úrovni 95,14 % a v lekárni TaJ na úrovni 88,88 % (viď graf 4).

Graf 5: Analýza lokálnej farmakoterapie



Graf 6: Preskripcia lokálnych glukokortikoidov



Analýza lokálnej farmakoterapie

V rámci lokálnej terapie boli v obidvoch lekárňach najviac predpisované lokálne glukokortikoidy, emolienciá a individuálne pripravené lieky (IPL prípravky). Glukokortikoidy tvorili v lekárni Galenos 35,1 % a v lekárni TaJ 37,96 %; emolienciá v lekárni Galenos 25,79 % a v lekárni TaJ 19,44 %; a IPL v lekárni Galenos 23,68 % a v lekárni TaJ 25 % (27) (viď graf 5).

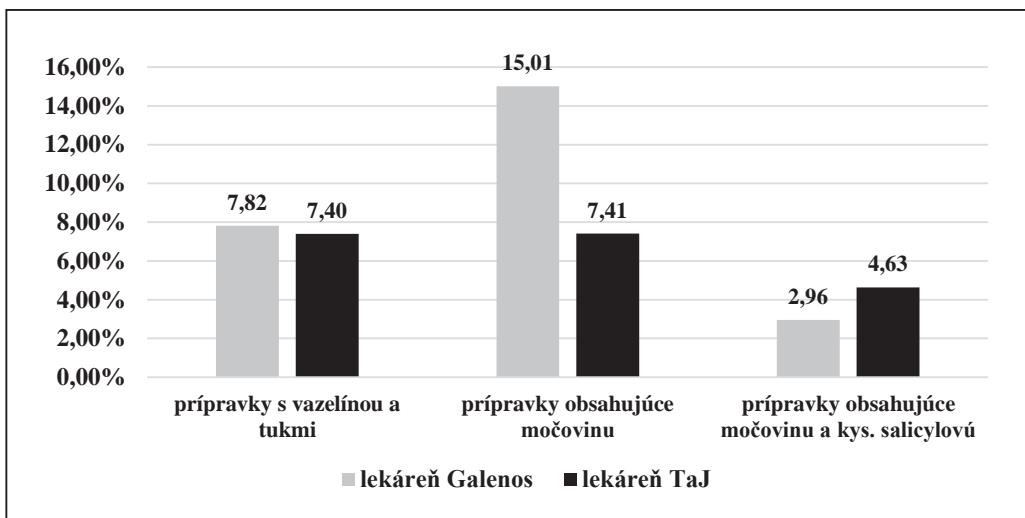
Preskripcia lokálnych glukokortikoidov

Z lokálnych glukokortikoidov bol v obidvoch lekárňach najčastejšie predpisovaný silne účinný betametazón, a to v 19,87 % v lekárni Galenos a v 17,59 % v lekárni TaJ. Ostatné kortikoidy boli predpisované menej často, ako znázorňuje graf 6.

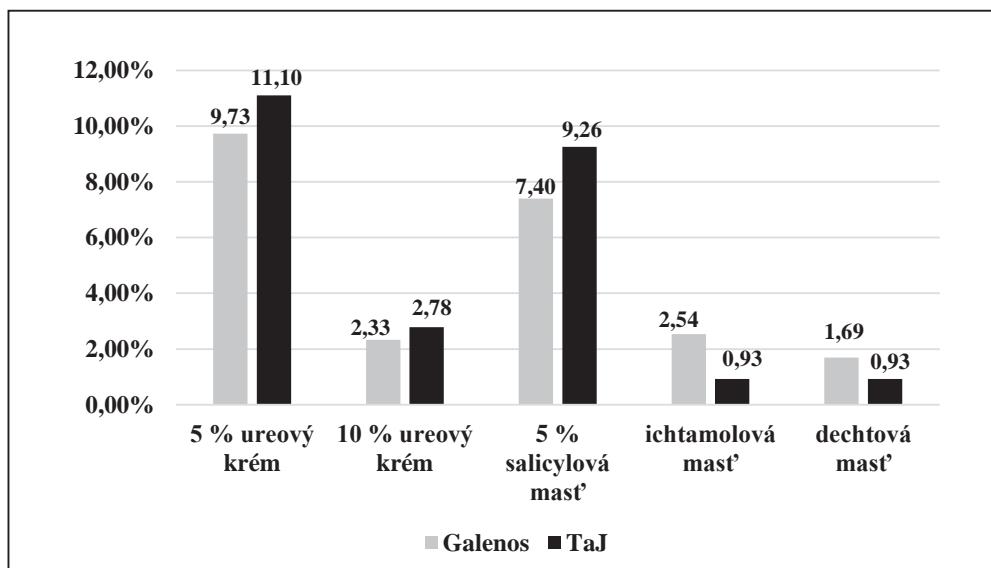
Preskripcia emoliencií

Z emoliencií boli najčastejšie predpisované prí-

Graf 7: Analýza preskripcie emoliencií



Graf 8: Percentuálne zastúpenie IPL v terapii psoriázy



pravky obsahujúce močovinu, ktoré v lekárni Galenos tvorili 15,01 % a tiež prípravky s vazelinou a tukmi v obidvoch lekárňach (viď graf 7).

Preskripcia individuálne pripravovaných liekov

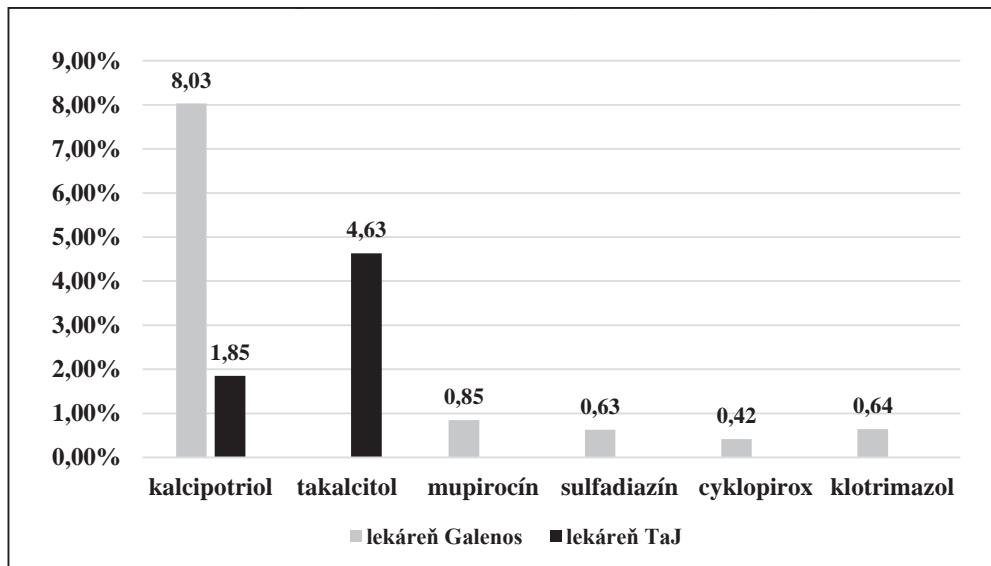
Zo všetkých predpísaných receptov tvorili IPL 23,68 % v lekárni Galenos a 25 % v lekárni TaJ. Najčastejšie predpisovaným IPL liekom v obidvoch lekárňach bol 5 % ureový krém (Galenos – 9,73 %; TaJ – 11,1 %). Druhým najčastejšie predpisovaným

IPL bola 5 % salicylová mast' (Galenos – 7,40 %; TaJ – 9,26 %). Ostatné IPL boli predpisované menej často (viď graf 8).

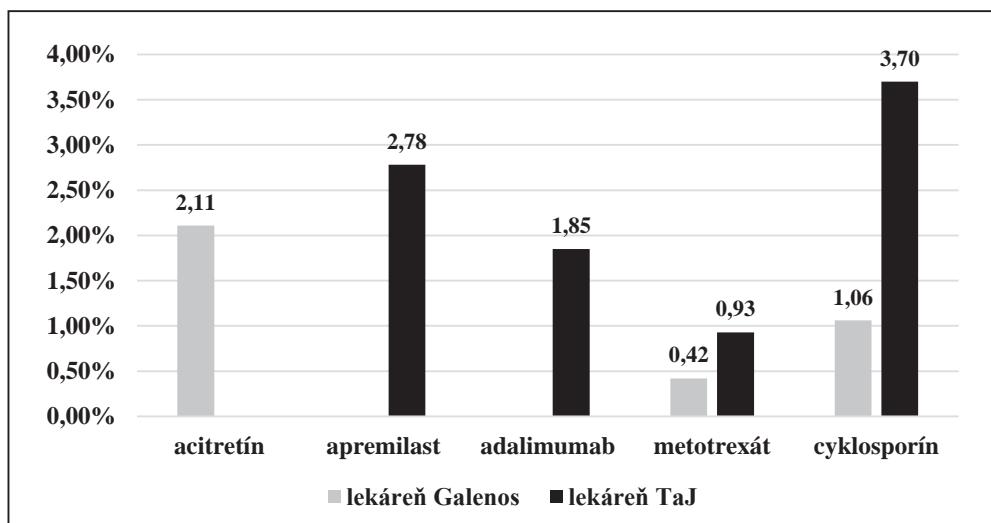
Preskripcia ostatných lokálnych liečív

V prípade ostatných lokálnych liečív sa najčastejšie predpisovali lokálne antipsoriatiká kacipotriol v obidvoch lekárňach a takalcitol v lekárni TaJ (viď graf 9).

Graf 9: Preskripcia ostatných lokálnych liečiv v terapii psoriázy



Graf 10: Preskripcia systémovej terapie



Analýza systémovej terapie

Systémová terapia psoriázy bola predpisovaná menej často. V lekárni Galenos tvorila 3,59 % a v lekárni TaJ 9,26 %. Z toho boli najčastejšie predpisované liečivá apremilast (2,78 %) a cyklosporín (3,7 %), hlavne v lekárni TaJ (viď graf 10).

Analýza doplnkovej terapie

V rámci doplnkovej terapie, ktorá bola na nízkej úrovni, bol predpisovaný desloratadín v 0,85 % v lekárni Galenos a v 0,93 % v lekárni TaJ, a kyselina listová v 0,42 % v lekárni Galenos a 0,93 % v lekárni TaJ.

DISKUSIA

Výsledky štúdie, ktorá porovnávala preskripciu antipsortiatík v dvoch verejných lekárňach v meste Prešov poukázali na to, že zaznamenaná preskripcia liečiv v terapii psoriázy bola veľmi podobná. Výrazný rozdiel bol však zaznamenaný v počte pacientov so psoriázou za sledované obdobie v daných dvoch lekárňach. V lekárni Galenos bolo zaznamenaných počas sledovaného obdobia 111 pacientov a v lekárni TaJ 48 pacientov so psoriázou. Vyšší počet pacientov v lekárni Galenos môže byť spôsobený tým, že sa nachádza v blízkosti dermatovenerologickej ambulancie. Lekáreň TaJ je situovaná uprostred sídliska, kde sa sice nenachádzajú žiadne ambulancie, avšak pacienti si vyberajú predpísané recepty prostredníctvom elektronickej preskripcie.

Percentuálny podiel mužov a žien bol v obidvoch lekárňach veľmi podobný, v priemere cca 40 % mužov a 60 % žien. Podľa Drozenovej (2008) toto ochorenie postihuje rovnako mužov aj ženy. Avšak vyšše percento zastúpenia žien v našom prípade môže byť zapríčinené aj vyššou senzitívnosťou žien na kožné problémy aj z estetického hľadiska. Vekové rozpätie pacientov môže byť ovplyvnené lokalizáciou lekárni. Kým v TaJ lekárni uprostred sídliska prevládali mladší pacienti, ktorí tam bývajú, s najčastejším vekovým rozpäťím 41 – 50 rokov, v lekárni Galenos bola najčastejšie zastúpenou veková skupina 61 – 70 rokov. V lekárni Galenos bolo zaznamenané širšie spektrum pacientov z jednej dermatovenerologickej ambulancie, a tak v tejto lekárni vzniká ucelenejší pohľad na pacientov trpiacich psoriázou. Graf prezentujúci vekovú krivku pacientov v lekárni Galenos potvrdzuje skutočnosť, že psoriáza prichádza v dvoch vlnách, a to medzi 15. – 20. rokom a druhá medzi 57. – 60. rokom života (Jusko, 2016).

V rámci farmakoterapie prevládala preskripcia lokálnej terapie, ktorá sa pohybovala v priemere na úrovni 92 % v obidvoch lekárňach. Mohlo to byť spôsobené tým, že pacienti mali diagnostikované ľahšie, prípadne stredne ľažké formy psoriázy. Až 80 % psoriatikov má ľahké, poprípade stredné postihnutie,

ktoré je zvládnuteľné lokálnou terapiou (Urbanček, 2014). Lokálne aplikované prípravky v spojení so správnou životosprávou môžu byť v prípade vonkajšej terapie postačujúce. Nevýhodou lokálnej terapie je časová a aplikačná náročnosť a výhodou sú minimálne vedľajšie účinky v porovnaní so systémovou terapiou (Obstová, 2016).

Z lokálnej terapie boli v obidvoch lekárňach najčastejšie predpisované lokálne glukokortikoidy (Galenos 35,1 % a TaJ 37,96 %); z ktorých bol najčastejšie predpisovaný silne a dlhodobo účinný betametazón. Glukokortikoidy majú nezastupiteľné miesto v terapii inverznej psoriázy (prejavy v slabinách a podpaží), a tiež pri postihnutí kože štice a nechtok. Predpisujú sa kvôli imunosupresívnomu, antiproliferatívnomu a protizápalovému účinku. Indikujú sa vždy v počiatocnej terapii, pretože majú rýchly nástup účinku a tak prispievajú aj k psychickému upokojeniu pacienta, ktorý je potom ochotný dodržiavať terapiu. Avšak remisie sú krátke a psoriatické lézie sa môžu pri monoterapii glukokortikoidmi skoro objaviť. Preto sa postupne prechádza na kombináciu, napr. s analógmi vitamínu D3 (kalcipotriol, kalcitriol, takalcitol). Glukokortikoidy sa maximálne používajú v monoterapii 2 – 4 týždne. Navyše dlhodobé používanie glukokortikoidov môže mať nežiaduce účinky ako atrofia kože, strie, angiectázie alebo hypopigmentácia (Obstová, 2016). Preskripcia emoliencií v lekárni Galenos bola o viac ako 6 % vyššia, čo mohlo byť spôsobené vyšším vekovým priemerom pacientov v lekárni Galenos, ktorí majú výraznejšiu spotrebú emoliencií. Emolienciá a zvláčňujúce prípravky sú dôležitou súčasťou starostlivosti o psoriatickú kožu. Emolienciá vytvorením okluzívnej vrstvy obmedzujú transepidermálne odparovanie vody a prispievajú tak k obnovi ochrannej funkcie kožnej bariéry (Jusko, 2016). Zároveň zmierňujú svrbenie a znižujú nutnosť častejšej aplikácie rôznych lokálnych liečiv vrátane glukokortikoidov (Obstová, 2016). V prípade emoliencií bol najčastejšie predpisovaný prípravok s obsahom močoviny, hlavne v lekárni Galenos (15,01 %); alebo prípravky s vazelinou a tukmi s podobnou preskripciou v obidvoch lekárňach v priemere na úrovni 7,6

%. Treťou najčastejšie predpisovanou skupinou liečiv v obidvoch lekárňach boli IPL liečivá (v priemere 24,3 %); z ktorých boli najčastejšie pripravované 5 % ureový krém a 5 % salicylová mast' v obidvoch lekárňach. Tieto účinné látky patria medzi keratolytiká, ktoré pomáhajú na začiatku liečby odstraňovať šupiny, aby mohli účinné látky indikované v rámci terapie psoriázy lepšie penetrovať do kože. Keratolytiká sa najčastejšie používajú v kombinácii s analógmi vitamínu D3, glukokortikoidmi alebo antimikrobiálnymi látkami (Obstová, 2016). V menšom množstve boli v obidvoch lekárňach pripravované ichtamolová a dechtová mast', ktoré majú svoje miesto v liečbe psoriázy pre svoje antipurigozne, antiflogistické a antiproliferatívne účinky (Šimaljaková, 2008). Výhoda IPL je v možnosti predpísat' rôzne koncentrácie látok a celkové množstvo prípravku podľa individuálnych potrieb pacienta (Obstová, 2016). Ďalšou nezanedbateľnou zložkou v liečbe psoriázy sú antipsoriatiká, a to analógy vitamínu D. V lekárni Galenos bol najviac vydávaný kalcipotriol (80,03 %) a v lekárni TaJ takalcitol (4,63 %). Tieto analógy vitamínu D majú antiproliferatívny a imunomodulačný účinok a upravujú differenciáciu buniek. Väčšinou sa kombinujú s glukokortikoidmi alebo ich aplikácia nadväzuje na úvodnú terapiu rýchlo pôsobiacimi glukokortikoidmi (Obstová, 2016). Ich výhodou oproti lokálnym glukokortikoidom je, že sa môžu používať dlhodobo bez závažných vedľajších účinkov (Baranová, 2018). Ostatné účinné látky ako mupirocín (Galenos 0,85 %); sulfadiazín (Galenos 0,63 %); ciklopirox (Galenos 0,42 %) a klotrimazol (Galenos 0,64 %) boli predpisované zvyčajne len jednorazovo, a to pri bakteriálnej či plesňovej komplikácii psoriázy.

Systémová terapia nebola často indikovaná u pacientov so psoriázou. Systémová terapia sa zvažuje pri nedostatočnom účinku lokálnych prípravkov alebo fototerapie. Indikuje sa v prípade veľkého psoriatického postihnutia kože, psoriatickej erytrodermie, pustulóznej a artropatickej psoriázy (Obstová, 2016). Častokrát sú tito pacienti s ľažšou formou psoriázy hospitalizovaní. Medzi najčastejšie používané liečivá systémovej terapie patrí cyklosporín, metotrexát

a acitretín. V rámci biologickej liečby psoriázy sa v súčasnosti môžu používať aj liečivá blokujúce tumor nekrotizujúci faktor – TNF α (etarnecept, infliximab, adalimumab) (Jusko, 2016). Podobná preskripcia liečiv bola zaznamenaná aj v lekárni Galenos, kde bol najčastejšie predpisovaný acitretín (2,11 %); potom cyklosporín (1,06 %) a metotrexát (0,42 %). V lekárni TaJ bol práve najvýraznejší cyklosporín (3,70 %); potom apremilast (2,78 %); adalimumab (1,85 %) a metotrexát (0,93 %). Aj keď táto systémová terapia je pre pacienta pohodlnejšia, nevýhodou sú jej vedľajšie účinky.

Ako doplnková terapia sa v lekárňach najčastejšie vyskytovala kyselina listová pri liečbe metotrexátom a v prípade nadmerného svrbenia antihistaminičkom desloratadín.

ZÁVER

Z vyhodnotených výsledkov preskripcie receptov u pacientov s diagnózou L40.0 *Psoriasis vulgaris* v dvoch verejných lekárňach v Prešove vyplýva, že percentuálny podiel mužov a žien bol v obidvoch lekárňach podobný, a to na úrovni v priemere 40 % mužov a 60 % žien. Najčastejší výskyt ochorenia bol zaznamenaný u pacientov vo vekovej skupine 41 – 50 rokov v lekárni TaJ a u pacientov vo vekovej skupine 61 – 70 rokov v lekárni Galenos. Vyhodnotená veková krivka pacientov navštievujúcich lekáreň Galenos potvrdila, že psoriáza prichádza v dvoch vlnách, a to medzi 15. – 20. rokom a druhá medzi 57. – 60. rokom života. Výsledky analýzy preskripcie receptov ukazujú, že farmakoterapia psoriázy v obidvoch lekárňach sa výrazne nelíšila. V obidvoch lekárňach prevládala lokálna terapia, a to najmä lokálne kortikoidy, emolienciá a IPL. Systémová terapia je v liečbe psoriázy veľmi dôležitá, no v našom prípade nebola často predpisovaná, čo mohlo byť spôsobené prevažne pacientmi trpiacimi ľahkou, či stredne ľažkou formou psoriázy, keďže psoriáza patrí medzi recidivujúce ochorenia, vyvoláva pocity menej cennosti a ovplyvňuje kvalitu života. Preto jej terapia vyžaduje úzku spoluprácu a trpezlivosť zo strany pacienta aj lekára.

ZOZNAM LITERATÚRY

Baranová, Z.: Lokálna liečba psoriázy [Topical treatment of psoriasis]. *Dermatologie pro praxi*, 2018, 12 (4), 167 – 170.

Benáková, N.: Postavení fototerapie v ambulantní léčbě psoriázy [The position of phototherapy in the outpatient treatment of psoriasis]. *Dermatologie pro praxi*, 2012, 6 (2) 64 – 66.

Benáková, N.: Psoriáza a současné léčebné možnosti [Psoriasis and contemporary treatment modalities]. *Interní medicína pro praxi*, 2005, 7 (2), 88 – 91.

Brázdilová, K., Čierny, D., Killinger, Z., Payer, J.: Súčasné poznatky o psoriatickej artritíde [Actual knowledges of psoriatic arthritis]. *Via practica*, 2017, 14 (2), 76 – 78.

Drlík, L.: Možnosti terapie těžkých forem psoriázy [Severe psoriasis – possibility of therapy]. *Dermatológia pre prax*, 2016, 10 (2), 58 – 62.

Drozenová, H.: Lupénka [Psoriasis]. *Dermatológia pro praxi*, 2008, 2 (3), 121 – 125.

Gkalpakiotis, S., Cetkovská, P., Kojanová, M., Arenberger, P. a kol.: *Psoriáza od teorie k praxi* [Psoriasis: From theory to practice]. 1.vyd. Praha: Mladá fronta, 2020. 207 s.

Imlejová, P.: Konvenčná systémová liečba psoriázy včera, dnes a zajtra [Conventional systemic treatment of psoriasis yesterday, today and tomorrow]. *Dermatológia pre prax*, 2020, 14 (4), 154 – 156.

Jusko, M.: Riziká a nežiaduce účinky pri liečbe psoriázy u vybraných skupín pacientov [Risks and side effects of treatment of psoriasis in selected groups of patients]. *Praktické lekárničstvo*, 2016, 6 (3), 96 – 98.

Navrátilová, M., Miklíková, J.: Psoriáza – možnosti léčby, edukace pacienta [Psoriasis – treatment options, patient education]. *Dermatológia pre prax*, 2011, 5 (4), 230 – 231.

Obstová, I.: Terapie psoriázy [Therapy of psoriasis]. *Praktické lékárenství*, 2016, 12 (1), 12 – 15.

Prusíková, D.: Apremilast v dermatológií [Apremilast in dermatology]. *Dermatológia pre prax*, 2019, 13 (1), 87 – 91.

Rácz, E., Prens, E. P., Kurek, D., Kant, M., de Ridder, D., Mourits, S., Baerveldt, E. M., Ozgur, Z., van Ijcken, W. F. J., Laman, J. D., Staal, F. J., van der Fits, L.: Effective treatment of psoriasis with Narrow- band UVB phototherapy is linked to suppression of the IFN and TH17 pathways. *Journal of Investigative Dermatology*, 2011, 131 (7), 1547 – 1558.

Randon, A., Schäkel, K.: Psoriasis pathogenesis and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (6), 1475.

Szép, Z.: Psoriáza – novinky v patogenéze a terapii [Psoriasis – news in pathogenesis and therapy]. *Via practica*, 2005, 2 (3) 126 – 128.

Šimaljaková, M.: Psoriáza – etiopatogenéza, klinický obraz a súčasné možnosti terapie [Psoriasis – ethiopathogenesis, clinical picture and current treatment options]. *Dermatológia pre prax*, 2008, 2 (2), 50 – 55.

Švihovec, J. a kol.: *Farmakologie* [Pharmacology]. 1.vyd. Praha: Grada, 2018. 962 s.

Tichý, M.: Psoriáza – základní charakteristika častého onemocnění [Psoriasis – basic characteristics of frequent illness]. *Dermatologie pro praxi*, 2011, 5 (4), 227 – 229.

Urbanček, S.: Lokálna liečba psoriázy [Topical psoriasis therapy]. *Dermatológia pre prax*, 2014, 8 (1), 6 – 8.

Vachatová, S.: Pacient s psoriázou a metabolickým syndrómom [A patient with psoriasis and metabolic syndrome]. *Dermatológia pre prax*, 2019, 13 (2), 108 – 110.

Vašků, V.: *Psoriáza* [Psoriasis]. 2. vyd. Praha: Maxdorf, 2020. 135 s.



HODNOTENIE ANTIPIROLIFERAČNÝCH ÚČINKOV HADIEHO JEDU ZA POMOCI MODELOVÉHO ORGANIZMU

EVALUATION OF ANTIPIROLIFERATIVE EFFECTS OF SNAKE VENOM USING A MODEL ORGANISM

Marcinčáková, Dana¹; Badovská, Dominika¹; Legáth, Jaroslav¹; Petrilla, Vladimír²

¹Katedra farmakológie a toxikológie

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

²Katedra biológie a fyziológie

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

Slovenská republika

dana.marcincakova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo testovanie cytotoxického a antiproliferatívneho účinku jedu hada druhu *Crotalus adamanteus* v koncentráciách 0,0114 – 1,14 µg·µl⁻¹ na zdravej epitelovej bunkovej línii obličiek opice (VERO) a bunkovej línii plúcneho karcinómu (A549) pomocou 2 *in vitro* testov. Schopnosť proliferácie buniek bola hodnotená po 48-hodinovom pôsobení jedu BrdU testom, kde sme pri vyšších koncentráciách zaznamenali pokles schopnosti buniek novosyntetizovať DNA v porovnaní s kontrolnými bunkami bez ošetrovania ($P < 0,05$). Naopak, pri nižších koncentráciách bola proliferácia vyššia alebo porovnatelná s kontrolou u obidvoch bunkových línií ($P < 0,05$). Cytotoxicita jedu bola hodnotená LDH testom, kde sme pozorovali nárast uvoľňovania laktátdehydrogenázy

so stúpajúcou koncentráciou jedu. Vyššia koncentrácia jedu spôsobila cytotoxicitu u buniek VERO, zatiaľ čo nižšia koncentrácia jedu bola toxickejšia pre nádorové bunky A549. Odlišná reakcia buniek môže byť spôsobená špecifítou mechanizmov zodpovedných za cytotoxicitu u odlišných typov buniek. Táto skutočnosť dáva predpoklad k selektívному využívaniu cytotoxických zložiek hadieho jedu v protinádorovej terapii.

Kľúčové slová: bunková kultúra; cytotoxicita; jed; metabolická aktivita

ABSTRACT

The aim of the study was evaluation of cytotoxic and antiproliferative effect of *Crotalus adamanteus* snake venom in concentrations of 0,0114

– 1,14 µg·µl⁻¹ on renal epithelial cell line from monkey (VERO) and human lung carcinoma cell line (A549) using 2 *in vitro* assays. Cell proliferation was evaluated after 48 hours of cell treatment. In higher concentrations, decline in cell proliferation was recorded ($P < 0,05$). On the other side, in lower concentrations the proliferation was higher or comparable with control cells without treatment. Cytotoxicity was evaluated using LDH test; leakage of lactatedehydrogenase rose with the rising concentration of venom. The higher concetration of venom caused higher cytotoxicity in VERO cells, whereas the lower concentration was more toxic for carcinoma A549 cells. The different cell response may be due to the specificity of the mechanisms responsible for cytotoxicity in different cell types. This fact provides a prerequisite for the selective use of cytotoxic component of snake venoms in antitumor therapy.

Key words: cytotoxicity; cell culture; metabolic activity; venom

ÚVOD

Vo svete je identifikovaných viac ako 100 000 druhov jedovatých zvierat. Na základe tvorby toxínov rozdeľujeme jedovaté živočíchy na primárne jedovaté (toxín v živočíšnom orgáne vzniká primárnymi fyziológickými procesmi) a sekundárne jedovaté (toxicité látka získavajú živočíchy z okolitého prostredia najmä potravou). Nie každý živočích, ktorého telo obsahuje jed dokáže tento jed produkovať, niekedy sa jed v organizme nachádza v dôsledku prijímanej potravy. Napríklad toxicita žiab rodu *Dendrobates* je ovplyvnená prijímanou potravou, tieto žaby toxicité látky nesyntetizujú a jedince chované v zajatí jedovaté nie sú. Každý z týchto druhov je schopný produkovať jedy, ktoré často obsahujú až 100 rôznych molekúl. Živočíšne jedy sa efektívne využívajú na obranu a predáciu. Hadí jed sa syntetizuje v jedových žľazách jedovatých hadov. Hadí jed sa lísi sa medzi rôznymi druhami aj v rámci tohto istého druhu v závislosti od

veku hada, biotopu a klímy. Asi 90 – 95 % suchej hmotnosti hadieho jedu tvoria bielkoviny, ktoré sú zodpovedné za hlavné biologické účinky. Jed má dve hlavné funkcie: spôsobuje paralýzu a spúšťa tráviaci proces. Jed je klasifikovaný podľa spôsobu jeho účinku do 4 skupín: cytotoxín, neurotoxín, kardiotoxín a hemotoxín. Obsahuje niekoľko bioaktívnych zložiek, ktoré majú rôzne farmakologické aktivity (Moga a kol., 2018; Nassar a kol., 2021). Existujú štyri druhy jedu podľa jeho účinkov. Hemotoxické jedy poškodzujú kardiovaskulárny systém a spôsobujú zrážanie krvi, cytotoxické jedy primárne ničia bunky a svaly a toxicke jedy blokujú a poškodzujú všetky životne dôležité systémy (Yang a kol., 1996).

Hadie jedy sa používajú už tisíce rokov, najmä v tradičnej čínskej medicíne. Okrem schválených liekov je teraz mnoho ďalších zložiek hadieho jedu zapojených do predklinických alebo klinických testov na rôzne terapeutické aplikácie. Výskum hadích jedov priniesol výsledky v podobe látok ovplyvňujúcich kardiovaskulárny systém a hemoreguláciu. Cytotoxické hadie jedy sa zameriavajú na špecifické bunkové miesta. Cytotoxíny môžu interagovať s lipo-proteínmi prítomnými v plazmatickej membráne buniek a môžu spôsobiť zmrštenie. Cytotoxické účinky zložiek hadieho jedu majú teda potenciál degradovať nádorové bunky. Vzhľadom na cytotoxický charakter jedov niektorých druhov hadov sa vedecká pozornosť upriamuje na možnosti využitia zložiek hadích jedov v terapii nádorových ochorení. Niekoľko štúdií zistilo, že hadie jedy obsahujú potenciálne terapeutické látky, ktoré možno použiť ako protirakovinové látky (Ullah a kol., 2018). Hlavným problémom, ktorému čelia lekári v boji proti nádorovým ochoreniam sú rôzne lieky a chemoterapeutiká, ktoré nedokážu rozlíšiť nádorové bunky od zdravých buniek, čo spôsobuje nežiaduce vedľajšie účinky, ktoré niekedy vedú k smrti. Toxíny pochádzajúce z jedu pôsobia iba na určité typy buniek a vykazujú rozdielnú lytickú aktivitu proti rôznym bunkovým líniám a subcelulárny organelám (Leon a kol., 2011, Calderon a kol., 2014).

Štrkáče rodu *Crotalus* patria do čeľade *Viperidae* a pochádzajú z rozličných oblastí Severnej a Južnej

Ameriky. Na účely nášho experimentu sme zvolili jed hada druhu *Crotalus adamanteus*. Na testovanie cytotoxických a antiproliferatívnych účinkov jedu boli využité *in vitro* testy. Nenádorová bunková línia epitelových buniek obličiek opice (VERO) a nádorová bunková línia plúcneho karcinómu ľudí (A549) boli vystavené účinkom hadieho jedu vo vybraných koncentráciách. Následne bola po 48 h pôsobení hodnotená zmena v proliferácii buniek pomocou merania schopnosti novosyntetizovať DNA (BrdU test), a pomocou merania množstva uvoľnenej laktátdehydrogenázy z poškodených buniek bola vyjadrená miera poškodenia buniek (LDH test).

MATERIÁL A METÓDY

Pre účely tejto experimentálnej štúdie bol použitý jed štrkáča rodu *Crotalus* (*Crotalus adamanteus*) získaný z chovného zariadenia VIPERAFARM, spol. s. r. o. (Ltd.). Pri odbere bolo vypudenie hadieho jedu z jedových zubov iniciované zahryznutím hada do celofánového krytu odbernej nádoby. Po odbere bol hadí jed zmrazený a skladovaný pri teplote – 80 °C, aby sa zabránilo degradácii zložiek a strate biologickej aktivity. Pred použitím bol jed rozmrazený a následne sa odvážila hmotnosť 170 µl jedu (194 mg) a ďalej sa jed riedil fosfátovým pufrom na zásobné koncentrácie E-2 až E-5 (11,4; 1,14; 0,114 a 0,0114 µg·µl⁻¹). Ďalšie použité materiály a extrakty boli: zdravá línia epitelových buniek obličiek opice VERO (ATCC-CRL 1586) a nádorová línia z ľudského karcinómu plúc A549 (ATCC® CCL-185™), kultivované v inkubátore pri konštantnej teplote 37 °C, atmosfére 5 % s obsahom CO₂ v kompletnom kultivačnom médiu Minimum Essential Medium Eagle (MEM) s obsahom 10 % fetálneho bovinného séra (FBS), glukózy, antimykotík a antibiotík (Sigma Aldrich, Nemecko).

In vitro testy

Na hodnotenie cytotoxických účinkov jedu u zdravej a nádorovej bunkovej línie boli použité 2 testy. Pri obidvoch testoch boli bunky nasadené do dvoch 96-jamkových platničiek (Greiner Bio One, Neme-

ko) s hustotou 16 500 buniek A549 na jamku a pri bunkách VERO 20 000 buniek na jamku. Po 24-hodinovej kultivácii boli k bunkám pridané zásobné koncentrácie hadieho jedu (1 : 10 s médium), aby výsledná koncentrácia jedu v jamke bola E-3 až E-6 (1,14 – 0,0114 µg·µl⁻¹). Testy boli vykonávané po 48 hodinách pôsobenia jedu. Absorbancia bola meraná pomocou Apollo 11 LB 913 ELISA Reader (Berthold Technologies, Nemecko) pri vlnovej dĺžke 450 nm.

BrdU test

BrdU proliferačný test (BrDU Cell proliferation ELISA kit, Abcam, Cambridge, UK) je elisa kit využívaný na detekciu inkorporácie BrdU do novosyntetizovanej DNA v aktívne proliferujúcich bunkách. Test bol vykonaný po 48 hodinách od ošetroenia buniek podľa protokolu poskytovaného výrobcom. Ako kontrola slúžili bunky bez vystavenia účinkom jedu a ich proliferácia bola považovaná za 100 %. Hodnoty optickej denzity (OD) boli následne vyjadrené ako % proliferačnej aktivity (% PA) pomocou vzorca % PA = (OD vzorka / OD kontrola) × 100.

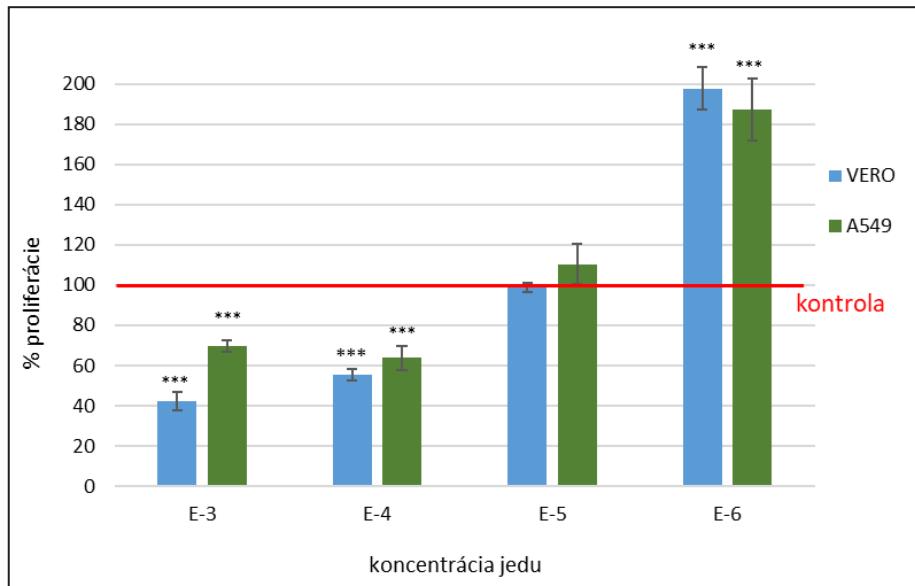
LDH test

LDH je enzym prítomný v cytozole buniek širokého spektra organizmov a po poškodení plazmatickej membrány dochádza k jeho masívному uvoľňovaniu. Pretože LDH je pomerne stabilný enzym, široko sa používa na hodnotenie prítomnosti poškodenia a toxicity tkaniva a buniek. Kvantifikácia LDH má široké spektrum aplikácií. Test bol rovnako ako pri BrdU teste vykonaný podľa inštrukcií výrobcu a výsledky boli prepočítané na % cytotoxicity (C) podľa vzorca: % C = Abs. vzorky – Abs. LC / Abs. HC – Abs. LC) × 100, kde LC (low control) znamená OD buniek v médiu, HC (high control) vyjadruje maximálnu mieru poškodenia buniek s prídomkom 1 % tritonu do média.

Štatistické spracovanie výsledkov

Experimenty boli vykonané v triplikátoch pomocou programu Excel, kde boli stanovené štandardné odchýlky (± sd) a následne boli výsledky spracované

Graf 1: Porovnanie proliferačnej aktivity buniek VERO a A549 ošetrených hadím jedom



Konzentrácie jedu: E-3 – $1,14 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$; E-4 – $0,114 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$; E-5 – $0,0114 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$; E-6 – $0,00114 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$. Štatisticky významný rozdiel * – $P < 0,05$ a *** – $P < 0,001$

statistickým programom Graph Pad Prism 8.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) jednocestou Anovou, Dunettovým porovnávacím testom. Za signifikantný rozdiel bola považovaná hodnota $P < 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

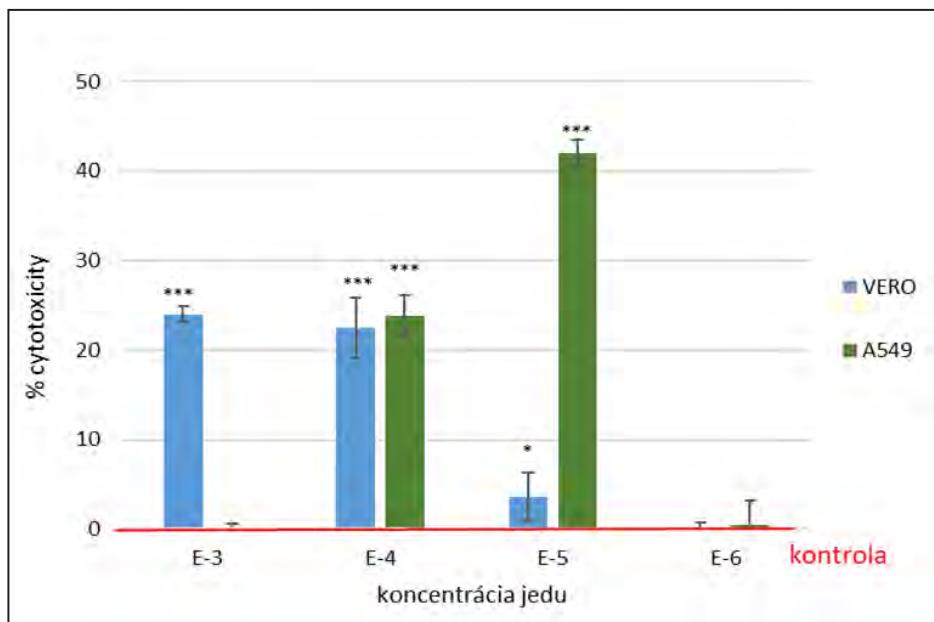
Cytotoxicické účinky, ktoré jedy vykazujú, sú sľubným spôsobom využitia jedu alebo aspoň jeho jednotlivých zložiek v protinádorovej terapii. V predbežných testoch klinických štúdií boli zistené protinádorové účinky jedu a z neho izolovaných enzymov. Cytotoxicita toxínov hadieho jedu je spojená s ich špecifickosťou a afinitou k bunkám a tkanivám. Určité proteíny alebo peptidy odvodené z hadích jedov sú schopné viazať sa na membrány nádorových buniek a táto schopnosť ovplyvňuje aj migráciu a proliferáciu týchto buniek. Niekol'ko štúdií jedov získaných z druhov kobry zistilo, že existujú izolované cytotoxíny, ktoré ľahko prenikajú do buniek ľudského aden-

karcinómu plíúc (A549) a hromadia sa v lizozómoch (El-Aziz a kol., 2019).

V priebehu posledných desaťročí sa pozornosť upriamuje na disintegríny prítomné v hadích jedoch vzhľadom na ich potenciálne využitie v terapii nádorových ochorení. Tieto molekuly sú schopné interagovať s niektorými rakovinovými integrínmi a môžu tak zasahovať do dôležitých procesov karcinogenézy. Non-RGD disintegrín izolovaný z jedu hada druhu *Crotalus durissus collilineatus* indukuje nízku cytotoxicitu a inhibuje migráciu ľudských buniek rakoviny prsníka (MDA-MB-231) (Vyas a kol., 2013).

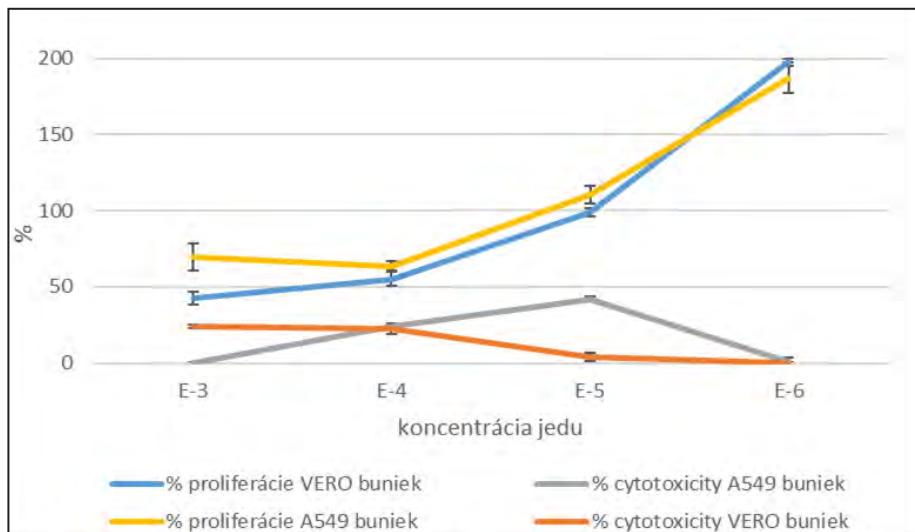
V našej štúdii sa sledovali bunkové zmeny, ktoré nastali po ošetrení, vplyvom účinku jedu hada druhu *Crotalus adamanteus* na modelových zdravých a národových bunkových liniách. Pre porovnanie sme si zvolili 2 *in vitro* testy s odlišnými princípmi. Pri porovnaní zdravej VERO a nádorovej A549 bunkovej línie sme zistili, že s klesajúcou koncentráciou jedu rastla schopnosť buniek proliferovať, pričom koncentrácie E-5 a E-6 preukázali hodnoty vyššie (P

Graf 2: Porovnanie cytotoxicity buniek VERO a A549 ošetrených hadím jedom



Koncentrácie jedu: E-3 – $1,14 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$; E-4 – $0,114 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$; E-5 – $0,0114 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$; E-6 – $0,00114 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$. Štatisticky významný rozdiel *** – $P < 0,001$

Graf 3: Porovnanie antiproliferatívneho a cytotoxického účinku jedu hada druhu *Crotalus adamanteus*



Koncentrácie jedu: E-3 – $1,14 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$; E-4 – $0,114 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$; E-5 – $0,0114 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$; E-6 – $0,00114 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$.

$< 0,001$) alebo porovnatelné ($P > 0,05$) s kontrolou bez ošetrenia. Vyššie koncentrácie E-3 a E-4 spôsobili signifikantný pokles proliferácie ($P < 0,001$). Z našich zistení vyplýva, že účinok jedu bol sice výrazný, ale porovnatelný medzi zdravou a nádorovou

bunkovou líniou, okrem koncentrácie E-3, ktorá spôsobila signifikantne vyšší pokles proliferácie u buniek VERO (viď graf 1).

Ako druhý z testov na hodnotenie účinkov jedu bol zvolený cytotoxický LDH test. Výsledky sú zazna-

menané v grafe 2. K výraznejšiemu poškodeniu došlo u buniek pri pôsobení koncentrácií E-3, E-4 a E-5. Významný rozdiel medzi účinkami jedu na bunky zdravé a nádorové bol zaznamenaný pri koncentráciách E-3 a E-5. Koncentrácia E-3 spôsobila vyššie poškodenie buniek VERO a naopak nižšia koncentrácia E-5 vyššie poškodenie nádorových buniek A549. Najnižšia testovaná koncentrácia E-6 nespôsobila signifikantný nárast uvoľňovania LDH v porovnaní s kontrolou ($P > 0,05$).

Porovnanie účinkov jedu na obidvoch bunkových liniach je znázornené v grafe 3. Zatiaľ čo proliferácia buniek rastla so znižujúcou sa koncentráciou, cytotoxicita naopak klesala. Z tohto javu je zrejmé, že toxicita jedu je závislá na jeho koncentrácii.

Prakticky všetky hadie jedy sú schopné vyvolať cytotoxicitu, ktorá spôsobuje bunkovú nekrózu alebo apoptózu v rôznych stupňoch. Cytotoxicita hadieho jedu sa klinicky prejavuje ako lokálna nekróza, hemolýza, kardiotoxicita, myonekróza, poškodenie obličiek, bud' priamym mechanizmom alebo v kombinácii s inými patogénnymi aktivitami jedu. Cytotoxicité látky hadích jedov sú pre hada rovnako užitočné ako pre modernú medicínu. Špecifickosť pôsobenia týchto toxínov môže byť využitá na liečbu mnohých život ohrozujúcich chorôb. Protirakovinový potenciál hadieho jedu bol popísaný mnohými štúdiami. Rakovina je stále veľkou výzvou pre našu spoločnosť, ako aj protinádorová terapia. Preto je skúmanie použitia proteínov, peptidov a enzymov pochádzajúcich zo zvierat rôznych druhov na terapeutické účely v poslednom čase významným predmetom vedeckého zájmu (Moga a kol., 2018; Ullah a kol., 2018).

ZÁVER

V posledných rokoch sa čoraz väčšia pozornosť upriamuje na pochopenie mechanizmu účinku komplexného hadieho jedu v súvislosti s vývojom nových liečív na terapiu najmä kardiovaskulárnych a nádorových ochorení. Cieľom našej štúdie bolo porovnanie cytotoxického a antiproliferatívneho účinku jedu hada druhu *Crotalus adamanteus* na zdravej epite-

lovej bunkovej línii obličiek opice a bunkovej línii plúcneho karcinómu. Z našich zistení vyplýva, že so zvyšujúcou sa koncentráciou jedu klesala proliferácia buniek a naopak stúpala miera poškodenia buniek a množstvo uvoľneného LDH. Účinok jedu bol súčasťou výrazný, ale porovnatelný medzi zdravou a nádorovou bunkovou líniou, pričom účinky jedu boli závislé od jeho koncentrácie.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola vykonaná s podporou Národného referenčného laboratória pre pesticídy Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

ZOZNAM LITERATÚRY

Calderon, L. A., Sobrinho, J. C., Zaqueo, K. D., de Moura, A. A., Grabner, A. N., Mazzi, M. V., Marcussi, S., Nomizo, A., Fernandes, F. C., Zuliani, J. P., Carvalho, B. M. A., Silva, S. L., Stábeli, R. G., Soares, A. M.: Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. *BioMed. research international*, 2014, 19. Article ID 203639. DOI: 10.1155/2014/203639.

El-Aziz, T. M. A., Soares, A. G., Stockand, J. D.: Snake venoms in drug discovery: Valuable therapeutic tools for life saving. *Toxins*, 2019, 11 (9), 564. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6832721/>>. Accessed October 13, 2021.

Leon, G., Sánchez, L., Hernández, A., Vilalta, M., Herrera, M., Segura, A., Estrada, R., Gutiérrez, J., M.: Immune response towards snake venoms. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 2011, 10 (15). <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21824081/99>>. Accessed May 2, 2022.

Moga, M., Dimienescu, O. G., Arvătescu, C. A., Ifteni, P., Pleš, L.: Anticancer activity of toxins from bee and snake venom – an overview on ovarian cancer. *Molecules*, 2018, 23 (3), 692.

Nassar, M. I.: Snake venom and therapeutic potential. *Snake Venom and Ecology*, 2021, 84 (3), 622 – 625.

Ullah, A.: Structure-function studies and mechanism of action of snake venom L-amino acid oxidases. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11, 110.

Vyas, V. K., Brahmbhatt, K., Bhatt, H., Parmar, U.: Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2013, 3, 156 – 162.

Yang, C. C.: Structure and Function of Cobra Neurotoxin. In: Singh, B.R., Tu, A.T. (eds) *Natural Toxins 2. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA: Springer, 1996, 391. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0361-9_5. Accessed May 2, 2022.



INTERACTIONS OF CARDIOVASCULAR DRUGS WITH FRUITS OF THE GENUS CITRUS

Jurošová, Kristína; Holécyová, Monika

Department of Pharmacy and Social Pharmacy
University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice
Komenského 73, 041 81 Košice
The Slovak Republic

monika.holecyova@uvlf.sk

ABSTRACT

Level of attention being paid to the importance of drug interactions is constantly increasing, from both healthcare professionals and general public point of view. Drug interactions can be considered significant complications of pharmacotherapy, yet they are very difficult to recognize and unsufficiently recorded, especially when it comes to drug-food interactions. In practice, drug interactions are often mistaken for complications resulting from the process of pathophysiological condition treatment.

Aim of the study was to create an overview of interactions between cardiovascular drugs, which are ranked among the most prescribed drugs in Slovakia every year, and selected types of citrus fruits – grapefruit, sweet orange, and bitter orange. We have recorded 21 interacting drugs, one third of which were calcium channel blockers. Another goal was to evaluate the occurrence of these interactions through drug counseling con-

sultations with patients. Up to 89 % of participating patients regularly used at least 1 cardiovascular drug with the potential to interact with citrus fruits. The most common interaction was between the hypolipidemic drug atorvastatin and grapefruit.

Data on drug interactions from available sources often diverge, so it is challenging for a pharmacist to analyze these sources and constantly obtain up-to-date knowledge. Nevertheless, contribution of the pharmacist in the process of educating the patient on drug interactions is irreplaceable in clinical practice.

Key words: cardiovascular drugs; *Citrus L.*; interactions

INTRODUCTION

Important complications in pharmacotherapy currently include drug interactions. Interactions rank among the adverse effects of drugs and great caution

is needed to interpret them. The clinical significance of drug interactions can vary widely, and therefore they are on the one hand underestimated or on the other hand generally considered as a contraindication for a given drug – or food – in general (Lékové interakce, 2022; Solutio, 2022).

The pharmacy is the last and easily accessible link in health care, and the pharmacist often has insight not only into the patient's pharmacotherapy from various physicians, but also into the patient's self-medication. Therefore, the pharmacy can catch and eliminate these problems, which can prevent health complications of the patient and thus reduce the overall cost of treatment in the society (Vlček et al., 2010).

MATERIAL AND METHODS

Information on interactions between citrus fruits and cardiovascular drugs were collected from the following information sources: the "Check drug interactions" module of the Drug Interactions Database from DrugAgency, Inc. (Lékové interakce, 2022); the "Drug Interaction Checker" module on the Medscape portal (Medscape, 2022); the Drugs interactions checker on the www.drugs.com (Drugs.com, 2022); the publication Fytofarmaká a potraviny – klinicky významné interakcie (Czígle and Tóth, 2016); the publications Stockley's Herbal Medicines Interactions (Baxter, Driver, Williamson, 2013); Stockley's Drug Interactions – 8th edition (Baxter et al., 2008) and SPCs (Summaries of Product Characteristics) of medicines containing the relevant drugs (ŠÚKL, 2022).

Examples of drug interactions within this study were obtained via the Medicines Consultation Form. A total of 28 patients participated in the drug counseling, 10 females and 18 males. All drug counseling consultations were conducted face-to-face with patients for one hour, in the consultation room of a public pharmacy. The consultations took place between September 2021 and March 2022. The selection of consultations was not filtered and was not targeted to patients with cardiovascular medications. The main

focus of the study was the analysis of the cardiovascular drugs that were listed in the sources of this work for the risk of interaction with selected species of fruits of the genus *Citrus* L.

RESULTS

The potential occurrence of interaction with selected types of fruits of plants of the genus *Citrus* L. was recorded for a total of 21 cardiovascular drugs that are found among the drugs registered in the Slovak Republic. These are drugs included in 6 out of 9 subgroups in the main ATC group C – drugs of the cardiovascular system. The most represented were Calcium channel blockers (C08) in the number of 7 (33 %) and Cardiac (C01) in the number of 5 (24 %). The list of drugs that have the potential to interact with citrus fruits – grapefruit, sweet orange and bitter orange can be found in the Table 1.

Other citrus fruits interacting with cardiovascular drugs were **sweet orange** (*Citrus sinensis* L.) and **bitter orange** (*Citrus aurantium* L.). In the case of sweet orange, 4 drugs – atenolol, felodipine, aliskiren and pravastatin – had the potential for interaction. Only 1 drug (aliskiren) also had this information listed in the SPC (SPC, 2022). **Bitter orange** represents a food at risk for possible interaction for 3 drugs – amiodarone, felodipine and diltiazem. None of these drugs has information on the possible occurrence of an interaction listed in the relevant SPC. The only drug that had DI with all 3 citrus species was felodipine, with the SPC listing only grapefruit.

In one of the sources (Drug Interactions, 2022); we noted possible interactions with 2 cardiovascular drugs with two other types of citrus fruits (Drug Interactions not listed in SPC):

- 1) with **pomelo** (*Citrus maxima*) – with the drugs felodipine and verapamil
- 2) with **lemon** (*Citrus limon*) – with the drug felodipine.

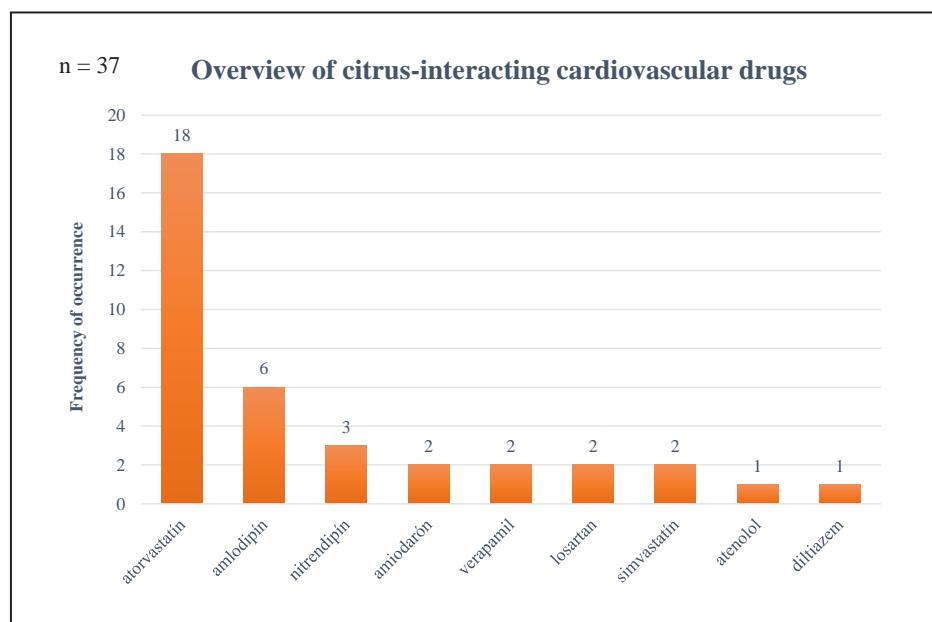
In the case of pomelo, "severe" clinical severity is indicated for both drugs, and it is recommended to avoid consumption of these fruits and juices made

Table 1: Interactions of cardiovascular drugs with selected citrus fruits

GRAPEFRUIT <i>Citrus paradisi</i> Macf.				ORANGE, bitter <i>Citrus aurantium</i> L.	
ATC	DRUG	ATC	DRUG	ATC	DRUG
C01B	<i>amiodarone</i> ¹⁻⁶	C08C	<i>nitrendipine</i> ^{1,2,4,6}	C01B	<i>amiodarone</i> ⁴
	<i>dronedarone</i> ^{2,3,6}		<i>lacidipine</i> ^{1,2,6}	C08C	<i>felodipine</i> ^{1,4,5}
	<i>propafenone</i> ^{2,6}	C08D	<i>diltiazem</i> ^{2,3,4,6}	C08D	<i>diltiazem</i> ⁴
C01E	<i>ranolazine</i> ^{2,3,6}		<i>verapamil</i> ¹⁻⁶	ORANGE, sweet <i>Citrus sinensis</i> L.	
	<i>ivabradine</i> ^{1,2,3,5,6}	C09C	<i>losartan</i> ^{1,3,4}		
C02K	<i>riociguat</i> ²	C09X	<i>aliskiren</i> ^{1,3,6}	ATC	DRUG
C07A	<i>carvedilol</i> ⁴	C10A	<i>atorvastatin</i> ¹⁻⁶	C07A	<i>atenolol</i> ^{1,3}
C08C	<i>amlodipine</i> ^{1,2,3,4,6}		<i>lovastatin</i> ¹⁻⁵	C08C	<i>felodipine</i> ¹
	<i>felodipine</i> ¹⁻⁶		<i>pravastatin</i> ^{1,6}	C09X	<i>aliskiren</i> ^{1,3,6}
	<i>nimodipine</i> ¹⁻⁶		<i>simvastatin</i> ¹⁻⁶	C10A	<i>pravastatin</i> ^{1,4}

1 – Lékové interakce, 2022; 2 – Medscape, 2022; 3 – Drugs.com, 2022; 4 – Czígle and Tóth, 2016;
5 – Baxter, Driver, Williamson, 2013/Baxter et al., 2008; 6 – ŠÚKL, 2022

Graph 1: Overview of recorded cardiovascular drugs interacting with citrus fruits



from them during the entire therapy. The consequence of this interaction may be an increase in the area under the curve (AUC) and the maximum drug concentration (Cmax) of felodipine and verapamil, which may lead to an increased risk of adverse drug reactions. With lemon, the interaction is reported as

“minor”, but it is recommended to avoid direct ingestion of the drug containing felodipine with lemon juice (Guo et al., 2007; Aqel et al., 2011).

Out of the total number of 28 patients, up to 26 (93 %) patients regularly used at least 1 drug that contained a drug from ATC group C – Drugs of the

cardiovascular system. Of these 26 patients, whose total therapy included at least one medicinal product with a cardiovascular effect, 25 patients used at least 1 medicinal product that had the potential to cause an interaction in combination with one of the selected species of fruits of the genus *Citrus* L. It follows that in the medicinal record of **89 %** of all patients, there was a potential risk of at least one interaction between the medicinal product of the cardiovascular system and the citrus fruit.

The most common potential interaction (18 x) reported among patients was between the hypolipidemic drug **atorvastatin** and grapefruit, accounting for nearly half (49 %) of all interactions. The second most common interaction (6 x) was that of grapefruit with the selective calcium channel blocker, amlodipine. An overview of the prevalence of cardiovascular drugs interacting with citrus fruits is given in Graph 1. Up to **88 %** of the recorded drugs interacting with grapefruit also had information about the interaction mentioned in the SPC of the respective drug – except for the drug losartan.

DISCUSSION

Drug interactions, as an important aspect of pharmacotherapy, can undoubtedly lead to clinically significant risks, especially with insufficient patient management. In clinical practice, in most cases, it is a combination of two or more drugs, while the number of described drug interactions of cardiovascular drugs currently exceeds 10.000 (Rudolf and Malý, 2010).

Based on the officially available information from the National Health Information Centre (NCZI), **the most prescribed drugs in 2021** were those containing drugs intended **for the treatment of cardiovascular diseases**, and the consumption of these drugs tends to grow year-on-year. The most frequently prescribed drug in this group was Agen (Zentiva, Czech Republic) containing the drug amlodipine (NCZI, 2022); which we noted for a possible interaction with grapefruit. This interaction was mentioned in up to

5 of the 6 sources of this work (Lékové interakce, 2022; Drugs.com, 2022; Medscape, 2022; Czígle and Tóth, 2016; ŠÚKL, 2022); as well as in the SPC of the respective drug. However, the sources disagree on whether the interaction causes an increase or decrease in plasma levels of the drug. In practice, pharmacists currently do not have sufficient auxiliary dispensing materials that address the topic of cardiovascular drug interactions. The results of this study may serve as one aid to the pharmacist to ensure optimal pharmacotherapy for the patient. However, it is always necessary to think comprehensively and to consider other risk factors that may influence a given interaction.

The majority (64 %) of **drug consultations** were attended by men. The most common age group was the 70 – 79 year old group (39 %). One male aged 35 years who was taking a higher number of medications (12) also participated in the consultation, including a drug containing atorvastatin, which has the potential to interact with grapefruit. The potential for at least one interaction between a cardiovascular drug and a *Citrus* L. fruit was observed in up to 25 patients out of a total of 28 consultations (89 %).

Grapefruit was clearly the most frequent fruit of the *Citrus* L. genus interacting with drugs intended for the therapy of cardiovascular diseases, which was recorded for 95 % of the drugs. The latter appears to be the citrus with the greatest potential for interaction, based on both general awareness and the number of publications focusing on grapefruit specifically and exclusively. The results of the study showed that the most numerous potential interactions among the drug counseling consultations performed was the interaction of grapefruit with the hypolipidemic drug atorvastatin. This was also a serious interaction with a very good documentation rate, with rhabdomyolysis to acute kidney failure cited as the most serious risk (Lékové interakce, 2022). Although the manufacturer does not recommend the simultaneous ingestion of large amounts of grapefruit juice and atorvastatin in the SPC of the drug in question (SPC, 2022); research suggests that CYP3A4 inhibition also occurs

when consuming normal amounts (2 dcl per day) of grapefruit juice, and given the cumulative inhibition of intestinal CYP3A4, we are inclined to just exclude it altogether (Ainslie et al., 2014).

CONCLUSIONS

Drug interactions represent one of the most significant complications of pharmacotherapy with a relatively frequent occurrence. Fruits and fruit juices contain a large number of phytochemicals that, when combined with certain drugs, can also cause clinically significant interactions and lead to adverse effects.

We recorded 21 potential interactions between cardiovascular drugs registered in Slovakia and selected species of *Citrus* L. Drug interactions with grapefruit and grapefruit juice are among the most clinically documented drug-food interactions. This may also be the reason that the most interactions described in the literature have been with grapefruit. Information on the interaction with grapefruit was provided in the SPCs of the respective medicines for 16 (80 %) of the cardiovascular medicines registered in Slovakia. Aliskiren was the only drug that also had information on interaction with a citrus fruit other than grapefruit in the SPC. This was an interaction with sweet orange.

Pharmacists should clearly know the significant interactions not only of drugs with each other, but also of drugs with food. The suitability and unsuitability of different foods and beverages when taking medicines simultaneously is an area in which the pharmacist has an important role, especially in patient education. It is practically impossible to control all drug interactions. However, cardiovascular drugs were the most frequently prescribed group of drugs in 2021, and therefore it would be appropriate to place considerable emphasis on interactions with them.

REFERENCES

- Ainslie, G. R., Wolf, K. K., Li, Y., Connolly, E. A., Scarlett, Y. V., Hull, J. H., Paine, M. F.: Assessment of a candidate marker constituent predictive of a dietary substance-drug interaction: case study with grapefruit juice and CYP3A4 drug substrates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2014, 351 (3), 576 – 584. <http://jpet.aspetjournals.org/content/351/3/576>. Accessed April 9, 2022.
- Aqel, S. M., Yacoub, M. I., Munir, N. G., Tawfiq, A. A.: The effect of ethyl acetate extract of pomelo mix on systemic exposure of verapamil in rabbits. *Drug Metabolism Letters*, 2011, 5 (2), 92 – 98. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/dml/2011/00000005/00000002/art00003>. Accessed June 7, 2022.
- Baxter, K., Driver, S., Williamson, E.: *Stockley's herbal medicines interactions*. 2nd edn. Pharmaceutical Press, London, UK, 2013. 423 p.
- Baxter, K. et al.: *Stockley's drug interactions*. 8th edn. Pharmaceutical Press, London, UK, 2008. 555 p.
- Czigle, S., Tóth, J.: *Fytofarmaká a potraviny – klinicky významné interakcie* [Phytopharmaceuticals and food – clinically significant interactions]. 1st edn., RAABE, Bratislava, Slovensko, 2016. 148 p.
- Drugs.com. *Drug Interactions Checker*. https://www.drugs.com/drug_interactions.html. Accessed June 07, 2022.
- Guo, L. Q., Chen, Q. Y., Wang, X., Liu, Y. X., Chu, X. M., Cao, X. M., Li, J. H., Yamazoe, Y.: Different roles of pummelo furanocoumarin and cytochrome P450 3A5*3 polymorphism in the fate and action of felodipine. *Current drug metabolism*, 2007, 8 (6), 623 – 630. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdm/2007/00000008/00000006/art00006>. Accessed June 7, 2022.
- Lékové interakce [Drug interactions]. Zkontrolovat interakce léků. <https://lekoveinterakce.cz/Interaction>. Accessed July 16, 2022.
- Medscape. *Drugs interaction checker*. <https://reference.medscape.com/drug-interaction-checker>. Accessed June 7, 2022.
- NCZI [National Health Information Centre]. *Spotreba humánnych liekov, zdravotníckych*

pomôcok a dietetických potravín v SR, 2021. https://data.nczisk.sk/statisticke_vystupy/top_100_liekov/spotreba_liekov/Spotreba_liekov_a_zdravotnickych_pomocok_v_SR_2021_Sprava_k_publikovanym_vystupom.pdf. [cit.3-6-2022].

Rudolf, K., Malý, J.: Co by měl lékárník vědět o lékových interakcích a nežádoucích účincích kardiovaskulární terapie [What a pharmacist should know about drug interactions and adverse effects of cardiovascular therapy]. *Praktické lékárenství*, 2010, 6 (5), 240 – 243. <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2010/05/06.pdf>. [cit.11-9-2022].

Solutio. Řešení interakcí metodou SAZE. <https://lekovinterakce.cz/Interaction>. [cit.16-6-2022].

ŠÚKL [State Institute for Drug Control]. Súhrn charakteristických vlastností lieku. <https://www.sukl.sk/>. [cit.7-6-2022].

Vlček, J. et al.: *Klinická farmacie I* [Clinical Pharmacy I]. 1st edn., Grada, Praha, 2010. 368 s.



FARMAKOTERAPEUTICKÉ MOŽNOSTI U PACIENTOV S HYPERPROLAKTINÉMIOU

PHARMACOTHERAPEUTIC OPTIONS IN PATIENTS WITH HYPERPROLACTINEMIA

Palovčáková, Monika; 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

Tento článok opisuje problematiku ochorenia a farmakoterapie hyperprolaktinémie. Hyperprolaktinémia je charakterizovaná zvýšenou hladinou hormónu prolaktínu v krvi. V organizme vyvoláva rôzne klinické príznaky. Príčiny jej vzniku sú fyziologické, patologické a farmakologické. Článok je zameraný na vedecké a odborné poznatky o prolaktíne a o samotnej charakteristike ochorenia. V rámci rôznych línií jej liečby je najdôležitejšou farmakoterapia dopaminergickými agonistami, a to bromokriptínom, karbegolínom a chinagolidom. Z farmaceutického pohľadu je veľmi zaujímavý manažment terapie farmakami navodenej hyperprolaktinémie. Súčasťou štúdie sú kazuistiky z praxe endokrinologickej ambulancie, ktoré sú praktickým príkladom teoretických poznatkov. Všetky kazuistiky potvrdzujú dobrú účinnosť dopaminergických agonistov pri liečbe.

Liekom voľby ostáva karbegolín. V každej kazuistike došlo k zámene liečiva najmä kvôli výskytu nežiaducích účinkov. Stratégia liečby pri hyperprolaktinémii vyvolanej liekmi je odlišná a vyžaduje si dobrú spoluprácu endokrinológa a iného odborného lekára. V kazuistikách ide najmä o spoluprácu s psychiatrom, nakoľko hyperprolaktinémia u týchto pacientov vznikla ako nežiaduci účinok pri terapii psychofarmakami. Priložené prípady z praxe pomáhajú vytvoriť si obraz o príčinách, priebehu a farmakoterapii hyperprolaktinémie.

Kľúčové slová: bromokriptín; dopamín; hyperprolaktinémia; chinagolid; karbegolín; neuroleptiká

ABSTRACT

This article describes the issue of the disease and pharmacotherapy of hyperprolactinemia. Hy-

perprolactinemia is characterized by an increased level of hormon prolactin in the blood. It causes various clinical symptoms in the body. The causes of its occurrence are physiological, pathological and pharmacological. The article is focused on scientific and professional knowledge about prolactin and the characteristics of the disease itself. Within the various lines of its treatment, the most important is pharmacotherapy with dopaminergic agonists, namely bromocriptine, cabergoline and quinagolide. From a pharmaceutical point of view, the management of drug-induced hyperprolactinemia therapy is very interesting. Part of the article are case studies from the endocrinology outpatient clinic, which are a practical example of theoretical knowledge. All case studies confirm good effectiveness of dopaminergic agonists in the treatment. Cabergoline remains the drug of choice. In each case report, the medicine was changed, mainly due to the occurrence of undesirable effects. The treatment strategy for drug-induced hyperprolactinemia is different and requires good cooperation between the endocrinologist and other medical specialists. In the case report, it is mainly a collaboration with a psychiatrist, as hyperprolactinemia in these patients arose as a side effects of psychotropic drug therapy. The attached cases from practice help to create pictures of the causes, course and pharmacotherapy of hyperprolactinemia.

Key words: bromocriptine; cabergoline; dopamine; hyperprolactinemia; neuroleptics; quinagolide

ÚVOD

Prolaktín je hypofyzárny hormón. Regulácia sekrecie prolaktínu je zložitý proces a ovplyvňuje ho viačero faktorov. Klúčové postavenie má dopamín, ktorý je hlavným inhibičným faktorom sekrecie prolaktínu. V organizme má prolaktín veľa rôznych funkcií s ohľadom na pohlavie. Zohráva dôležitú úlohu pri

laktácii, v reprodukčnom systéme, v tukovom tkanive, v imunitnom systéme, v metabolizme kostí a pri iných procesoch.

Hyperprolaktinémia je charakterizovaná zvýšenou hladinou hormónu prolaktínu v krvi. Príčiny vzniku hyperprolaktinémie rozdeľujeme na fyziologické, patologické a farmakologické. Medzi fyziologické príčiny patrí napr. tehotenstvo, laktácia, pohlavný styk, stres, jedlo. Z patologických vyvolávajúcich príčin sú v popredí poruchy hypofýzy, hypotalamu, poranenia a niektoré systémové ochorenia (Allahbadia a kol., 2020). Medzi liečivá, ktoré majú potenciál zvyšovať koncentráciu prolaktínu, patria predovšetkým látky zasahujúce do metabolizmu dopamínu v nervovom systéme. Najčastejšie ide o neuroleptiká, z ktorých majú najvyšší potenciál tieto liečivá: haloperidol, amisulprid, risperidón a olanzapín. Naopak, medzi PRL-šetriace neuroleptiká patria: aripirazol, klozapín, kvetiapín a ziprasidón. Hyperprolaktinému môžu vyvolať aj iné skupiny liečiv ako napr. niektoré antidepresíva, opiáty, estrogény, prokinetiká či niektoré staršie antihypertenzíva (Gonzalez-Rodriguez a kol., 2020).

Hyperprolaktinémia sa prejavuje rôznymi klinickými príznakmi u mužov a žien. Bezprostredné účinky sa prejavujú na pohlavných a sexuálnych funkciách a na prsiach. Hyperprolaktinémia u žien spôsobuje predovšetkým galaktoreu, poruchy menštruačného cyklu s výslednou poruchou fertility. Podobne sa u mužov vyskytuje galaktorea, gynekomastia, erektilná dysfunkcia a infertilita. Z dlhodobého hľadiska má ochorenie aj iné prejavy, napríklad na kostiach, v rámci metabolizmu, v imunitnom systéme, v nervovom systéme a v kardio-vaskulárnom systéme (Casanueva a kol., 2018).

Manažment terapie je zaujímavý a ovplyvňuje ho vyvolávajúca príčina. Hlavnou líniou liečby je farmakoterapia. Predstavujú ju dopaminergickí agonisti, z ktorých sa využívajú predovšetkým bromokriptín, karbegolín a chinagolid. Terapia je medzinárodne odporúčaná a dlhodobá (Auriemma a kol., 2019). Ich cieľom je zníženie hladiny prolaktínu a ústup klinických príznakov. Aj napriek tomu, že mechanizmus

ich účinku je takmer rovnaký, existujú medzi nimi rozdiely v znášanlivosti, vo frekvencii nežiaducích účinkov, v dávkovacích schémach, a teda aj vo výslednej compliance pacientov.

Bromokriptín sa v praxi používa najdlhšie. Nežia-duce účinky, najmä gastrointestinálne, vyvoláva veľmi často. Obvyklá denná dávka je 2,5 mg. Karbegolín je všeobecne lepšie tolerovaný a užíva sa väčšinou raz týždenne 0,5 mg. Chinagolid je určený na denné používanie v dávke 0,075 mg (Akter a kol., 2018). V prípade prolaktinómov je ďalšou línou liečby chirurgický zákrok, rádioterapia a chemoterapia (Maiter, 2019).

Táto štúdia sa zameriava na vytvorenie súhrnu odborných údajov o problematike hyperprolaktinémie s komplexným opisom farmakoterapie. V spracovaných kazuistikách z endokrinologickej ambulancie sú zachytené rôznorodé príčiny vzniku ochorenia, vrátane liekmi vyvolanej hyperprolaktinémie. Kazuistiky sú zamerané na priebeh farmakoterapie u vybraných pacientov. Praktická časť nielen verifikuje poznatky z odborných publikácií, ale zároveň otvára aj nové témy.

METODIKA PRÁCE A METÓDY SKÚMANIA

Metodika tejto práce spočívala v zbere a spracovávaní odborných poznatkov o hyperprolaktinémii a jej farmakoterapii. Pri ich vyhľadávaní boli využité prevažne zahraničné vedecké články dostupné v online databázach. Všetky zdroje, ktoré boli použité, sú uvedené v zozname literatúry.

Kazuistiky boli vypracované na základe poskytnutej dokumentácie od MUDr. Danuši Maškulíkovej, ktorá je lekárkou v endokrinologickej ambulancii. Dokumentácia bola úplne anonymizovaná, bez akýchkoľvek osobných údajov a v súlade so zákonom č. 18/2018 Z. z. o ochrane osobných údajov a o zmenе a doplnení niektorých zákonov. Bolo vybratých celkovo 5 pacientov, z ktorých bol jeden muž a štyria ženy. Všetci pacienti mali stanovenú diagnózu E22.1 – Hyperprolaktinémia.

Predmetom záujmu bolo pohlavie a vek, rodinná a osobná anamnéza, lieková anamnéza, priebeh ochorenia a farmakoterapie. Získané informácie sme spracovali a vyhodnocovali pomocou poznatkov z odborných publikácií.

VÝSLEDKY

Kazuistika 1: Muž so zhoršenou hyperprolaktinémiou pri terapii risperidónom

V kazuistike išlo o 47-ročného muža s hyperprolaktinémiou s prejavom gynecomastie. V začiatku liečby mu bola indikovaná terapia bromokriptínom, počas ktorej sa u neho prejavili typické dyspeptické nežia-duce účinky. Terapia bola zmenená na chinagolid. K výraznému vzostupu hladiny PRL v krvi došlo pri liečbe risperidónom. Na odporúčanie endokrinológa mu psychiater zmenil farmakoterapiu z risperidónu na aripiprazol, čo prinieslo želaný efekt z pohľadu PRL. Muž ostáva pravidelne kontrolovaný v endokrinologickej ambulancii.

Kazuistika 2: Žena s hyperprolaktinémiou vyvolanou cystickým prolaktinómom

Patientkou v tejto kazuistike bola mladá 24-ročná žena, ktorá mala vážnejšie poruchy menštruačného cyklu so začiatkom po autohavárii. Bola jej diagnostikovaná hyperprolaktinémia, ktorej príčinu odhalilo MRI mozgu, a to cystický prolaktinóm. Kvôli rôznym nežiaducim účinkom vystriedala viaceré DA. Patientka bola poučená o nutnosti pravidelných kontrolných endokrinologických vyšetrení aj kontrolných MRI mozgu.

Kazuistika 3: Žena s hyperprolaktinémiou, mikroprolaktinómom a nežiaducimi účinkami pri terapii DA

V tretej kazuistike išlo o ženu s hyperprolaktinémiou, u ktorej MRI mozgu odhalilo mikroprolaktinóm. Bola jej indikovaná terapia bromokriptínom, neskôr prešla na chinagolid a kvôli nedostatočnému efektu liečby bola terapia zmenená na karbegolín s vyššiou dávkovacou schémou. Pacientka ochorela

na depresiu, u ktorej je vysoký predpoklad, že ju vyvolala práve liečba DA. Žena ostáva pod dohľadom endokrinológa.

Kazuistika 4: Žena s poliekovou hyperprolaktinémiou

Žena vo veku 36 rokov mala detskú mozgovú obrnu a psychické poruchy, preto sa dlhodobo liečila u psychiatra a užívala rôzne psychofarmaká. Boli jej zaznamenané zvýšené hladiny PRL ako výsledok poliekovej hyperprolaktinémie. Keďže sa u nej vyskytli aj prejavy HPRL, bola jej indikovaná terapia bromokriptínom. Po hospitalizácii na psychiatrickom oddelení a po zaradení olanzapínu do liečby sa jej HPRL výrazne zhoršila. Pomohla jej až úprava dávkowania olanzapínu psychiatrom. Pacientka bola poučená o dôležitosti spolupráce medzi endokrinológom a psychiatrom.

Kazuistika 5: Žena s fyziologickými, patologickými a farmakologickými príčinami hyperprolaktinémie

V kazuistike tejto 48-ročnej ženy s hyperprolaktinémiou sa vyskytli viaceré možné príčiny vzniku tohto ochorenia, a to fyziologické (stres), patologické (chronická nefritída, hypotyreóza) a farmakologické (hlavne psychofarmaká). Terapiu HPRL začala bromokriptínom a kvôli nedostatočnému efektu jej bola neskôr zmenená na karbegolín. Prejavilo sa u nej aj všeobecné riziko vzniku osteoporózy pri tejto diagnoze. Žena ostáva naďalej pravidelne kontrolovaná a liečená v endokrinologickej ambulancii.

DISKUSIA

Kazuistika 1

Štandardný princíp liečby hyperprolaktinémie je medikamentózna terapia dopamínovými agonistami, z ktorých sa v praxi najdlhšie používa bromokriptín. Nežiaduce účinky bromokriptínu sa objavujú až u 50 – 70 % pacientov. Ide najčastejšie o GIT potiaže, slabosť, mdloby, cerebrálne bolesti (Ozery, Wadha, 2021). U pacienta sa zmenila terapia z bromokriptínu

na chinagolid práve kvôli nežiaducim účinkom. Terapia dosahovala želaný efekt, ale po svojvoľnom vysadení liečby sa u pacienta opäť objavili ťažkosti. Non-compliance je známy a často podceňovaný problém farmakoterapie. Pacient bol poučený o nutnosti dodržiavania predpisanej terapie. Zlom v priebehu jeho liečby nastal, keď sa začal liečiť v psychiatrickej ambulancii a začal užívať okrem iného aj risperidón 1mg 1-0-1. Ten spôsobil výrazné zvýšenie hladiny PRL s klinickými dôsledkami. Endokrinológ mu odporučil poradiť sa s psychiatrom o úprave dávkowania, resp. liečby. Ak je hyperprolaktinémia vyvolaná liekom a stav pacienta to dovoľuje, liečba sa má zastaviť. To zvyčajne možné nie je. V opačnom prípade by sa malo znížiť dávkowanie, prípadne zvážiť prechod na iné liečivo s menším účinkom na hladinu prolaktínu (Aldahmani a kol., 2020). Psychiater pacientovi zmenil liečbu z risperidónu na aripiprazol 15 mg 1-0-0, čo sa prejavilo v znížení hladiny PRL. Aripiprazol predstavuje terapeutickú možnosť na zníženie hladiny PRL pri liekmi indukovanej hyperprolaktinémii. Možno ho použiť ako doplnok k už prebiehajúcej liečbe, alebo ním nahradíť doterajšiu liečbu (Gonzalez-Rodrigez a kol., 2020).

Kazuistika 2

V čase prvého endokrinologického vyšetrenia pacientka už pol roka nemala spontánnu menštruáciu. Viacerí autori uvádzajú úrazy hlavy ako možnú príčinu hyperprolaktinémie (Akter a kol., 2018). Laboratórne vyšetrenie krvi ukázalo veľmi zvýšenú hladinu PRL, a to 200 ng.l^{-1} (norma do 26). Hodnoty prolaktínu od $100 - 200 \text{ ng.l}^{-1}$ zvyčajne zodpovedajú mikroprolaktinómu a je potrebné urobiť ďalšie vyšetrenia. Pacientka bola odoslaná na MRI mozgu, kde bolo popísané balónovito rozšírené turecké sedlo s cystickou expanziou intraselárne. Cystické prolaktinómy sú prolaktinómy, ktoré obsahujú cystické oblasti. Chirurgický zákrok treba zvážiť v prípade rezistencie na terapiu dopaminergickými agonistami, resp. intolerancie na dlhodobú terapiu (Nakhleh a kol., 2018). Terapia hyperprolaktinémie začala bromokriptínom v sile 2,5 mg s dávkovaním prvé štyri dni 0-0-1/2 a následne

sledne 0-0-1. Po troch mesiacoch liečby sa pacientke ustálila menštruácia a hodnoty prolaktínu klesli ($33,7 \text{ ng.l}^{-1}$; $30,1 \mu\text{g.l}^{-1}$). Menštruačný cyklus sa spravidla upraví po troch až šiestich mesiacoch liečby DA (Naz a kol., 2020). Kontrolné MRI po pol roku potvrdilo stacionárny nález cystoidnej lézie bez patologického sýtenia vnútorných štruktúr a bez porušenia optickej chiazmy. Kvôli gastrointestinálnym ťažkostiam bola terapia zmenená na chinagolid s titračným balením, prvé tri dni $25 \mu\text{g}$ denne, ďalšie tri dni $50 \mu\text{g}$ denne a následne $75 \mu\text{g}$ denne. Pacientka kvôli dočasným výpadkom liekov na trhu prešla časom na karbegolín $0,5 \text{ mg}$ dva dni v týždni. Výpadky liekov na trhu sú relatívne bežné a majú celosvetový rozmer. V prípade nedostupnosti adekvátnej náhrady lekár musí zvoliť iný, dostupný liek. Keďže ide o mladú, bezdetnú ženu, je nutné pravidelne kontrolovať nález na MRI a hladiny prolaktínu aj z hľadiska plánovania tehotenstva, nakoľko neliečená hyperprolaktinémia môže byť príčinou infertility.

Kazuistika 3

Pacientkou bola 42-ročná žena, ktorá mala dve deti. Na endokrinologickej ambulancii bola dlhodobo pozorovaná kvôli cystickej degenerácii štítnej žľazy. Začala mať problémy s menštruáciou, potením a nadmerným vypadávaním vlasov. Na pokožke hlavy bol detekovaný aj prolaktín a prolaktínový receptor. Mechanizmus PRL regulácie rastu vlasov je spojený s jeho inhibičným vplyvom na predĺžovanie vlasových svolov a predčasnovou indukciami katagénnej fázy. Pravdepodobne PRL inhibuje aktivitu $5\text{-}\alpha$ -reduktažy (Grymovicz a kol., 2020). Štúdia však ukázala, že iba vysoké hodnoty PRL majú inhibičný vplyv na folikuly, zatiaľ čo len mierne zvýšené hladiny možno zanechať (Bhat a kol., 2020). Príčinou vypadávania vlasov môže byť okrem hormónov aj zápal v tele, genetika a aj vplyv prostredia. Pri kontrolách mala opakovane zvýšené hladiny PRL ($823,42 \text{ mIU.l}^{-1}$; norma do $628,53$); preto bola začatá terapia bromokriptínom so začiatocným dávkovaním $1,25 \text{ mg}$ večer. Už v úvode liečby sa u nej prejavili nežiaduce účinky, a to bolesti hlavy a nevoľnosť. Bromokriptín bol nahradený

chinagolidom s obvyklou dávkovacou schémou. Hladina PRL bola na viacerých kontrolách zvýšená (29 ng.ml^{-1} ; $26,2 \text{ ng.ml}^{-1}$ – norma do $13,4$). Pacientka bola odoslaná na MRI mozgu, ktoré odhalilo ložisko v hypofýze charakteru mikroadenómu $5 \times 5 \text{ mm}$. Pri mikroprolaktinómoch sú odporúčané kontroly MRI každý rok (Vestník MZ, 2020). Nález z kontrolných MRI bol viackrát stacionárny, no napriek tomu, že sa mikroprolaktinóm nemenil, boli hodnoty PRL pri liečbe opakovane vysoké. Pre nedostatočný efekt bol chinagolid zamenený za karbegolín s dávkovaním $0,5 \text{ mg}$ dvakrát týždenne. Ani táto zmena neprinesla žiadaný efekt, preto bolo dávkovanie karbegolínu zvýšené na $0,5 \text{ mg}$ trikrát do týždňa. Toto dávkovanie sa zdalo efektívne, pretože sa hodnoty PRL sa konečne znížili ($10,1 \text{ ng.ml}^{-1}$). Pacientka sa začala liečiť u psychiatra a možno predpokladať, že zhoršenie psychického stavu vyvolali vyššie dávky DA. Hromadné dôkazy však naznačujú, že výskyt týchto nežiaducích účinkov je častý aj u pacientov s HPRL a prolaktinom (Davies, 2022). V každom prípade musí byť aj psychiater upovedomený o tom, že pacient má hyperprolaktinému, resp. prolaktinóm a tomu prispôsobiť medikáciu. Na druhej strane je potrebná aj zvýšená informovanosť medzi endokrinológmi o možných psychických nežiaducích účinkoch tejto liečby.

Kazuistika 4

Na endokrinologickej vyšetrenie pacientku odosla gynekológ kvôli zväčšovaniu a bolestivosti jedného prsníka pri menštruácii. Hodnota PRL bola zvýšená [$30,5 \text{ ng.l}^{-1}$ (do $29,2$)]. U pacientov so zvýšenou hladinou PRL je dôležité poznať ich liekovú anamnézu. Keďže užíva aj psychofarmaká, možno predpokladať, že ide o liekmi indukovanú hyperprolaktinému. Hlavne klomipramín, ktorý pacientka užívala v dávke 25 mg denne, môže zvýšiť hodnotu PRL. Aj keď tričlické antidepresíva nezvyšujú hodnotu PRL výrazne, HPRL spôsobená klomipramínom sa pokladá za bežnú (Wattegama a kol., 2017). Pokial' ide o liekmi indukovanú HPRL s asymptomatickým priebehom, farmakoterapia nie je nutná (Gonzalez-Rodrigues a kol., 2020). Keďže sa u pacientky vyskytovala bolest'

a zväčšovanie prsníka počas menštruačie, začala sa u nej terapia bromokriptínom s nižším dávkovaním, a to 1,25 mg denne. Pacientka bola hospitalizovaná na psychiatrickom oddelení s diagnózou psychózy a bola jej zmenená farmakoterapia na citalopram 20 mg ráno, klozapín 25 mg dvakrát denne a olanzapín s dávkovaním 5 mg ráno a 10 mg večer. Hodnota PRL bola výrazne zvýšená na 105 ng.ml^{-1} (do 13,4); preto jej bola zmenená aj dávka bromokriptínu na 2,5 mg večer. Pri liekmi vyvolanej HPRL je hladina PRL od 25 do 100 ng.ml^{-1} (Casanueva a kol., 2018). Olanzapín patrí medzi atypické antipsychotiká a väčšina autorov potvrdila, že zvyšuje hladinu PRL v závislosti od dávky (Yang a kol., 2018). Bolo nutné poučiť pacientku o možnom vplyve jej psychiatrickej liečby na hladinu PRL. Liečba liekmi indukowanej HPRL spočíva vo vysadení lieku, ktorý ju vyvolal, čo vo väčšine prípadov nie je možné. Následné možnosti sú: úprava dávky antipsychotika, výmena antipsychotika, pridanie aripiprazolu a pridanie DA (Gonzalez- Rodriguez a kol., 2020). Pacientkin psychiater sa rozhodol upraviť dávkovanie olanzapínu na 10 mg večer a u pacientky sa znova obnovil menštruačný cyklus. Kvôli jeho nepravidelnosti bolo nutné dávku ešte znížiť, a to na 5 mg večer, čo prinieslo celkom uspokojivý výsledok na jej cyklus. Hodnoty PRL boli dlhodobo zvýšené z dôvodu liekmi navodenej hyperprolaktinémie (49, 33, 40 ng.ml^{-1}), ale už bez prejavov.

Kazuistika 5

Pacientka bola evidovaná v kardiologickej, angio-logickej, neurologickej, alergologickej ambulancii a dlhodobo vedená na endokrinológii a psychiatrickej ambulancii. Užíva viaceré lieky vrátane rôznych psychofarmák, ktoré sa pomerne často obmieňajú, keďže pacientka bola viackrát hospitalizovaná na psychiatrickom oddelení. Prejavili sa u nej typické príznaky pre hyperprolaktinému, a to poruchy menštruačného cyklu a galaktorea. Aj laboratórne sa potvrdila zvýšená hladina PRL ($15,6 \text{ ng.ml}^{-1}$) a začala sa liečba bromokriptínom 1,25 mg denne. Po štyroch mesiacoch liečby sa upravil cyklus a galaktorea sa zlepšila. Vysoké hodnoty PRL boli zaznamenané po jej hospitali-

zácií na psychiatrickom oddelení (700 uIU.ml^{-1}). Ide o typický príklad poliekovej HPRL. Na druhej strane sa pacientka stáže na dlhodobú záťaž a stres v súkromnom živote. Medzi potenciálne patologickú príčinu pacientkinej HPRL môžeme označiť jej chronickú tubulointersticiálnu nefritídu aj hypotyreózu. HPRL sa môže vyskytnúť až u 30 % pacientov s chronickým ochorením obličiek. S najväčšou pravdepodobnosťou je to spôsobené zníženým klírensom PRL alebo zhoršením regulačného účinku dopamínu (Sharif a kol., 2021). Pacientka užívala viaceré lieky, ktoré majú vplyv na PRL. Ide predovšetkým o psychofarmáka zo skupiny antidepressív, a to: venlafaxín zo skupiny SNRI, paroxetín zo skupiny SSRI, trazodón zo skupiny SARI. Neskôr bol venlafaxín nahradený escitalopramom. Okrem týchto liekov užívala denne verapamil 40 mg 1-0-1, ktorý pôsobuje zníženie produkcie dopamínu v hypotalame. HPRL pri užívaní verapamisu sa vyskytuje približne u 8,5 % pacientov. Vo väčšine prípadov sa hladina PRL po vysadení vráti do normálu (Tritos a kol., 2019). Pacientka bola kvôli pretrvávajúcim bolestiam chrbtice a kĺbov odoslaná na denzitometrické vyšetrenie, ktoré odhalilo osteoporózu. Riziko vzniku osteoporózy je problémom u všetkých pacientov s hyperprolaktinémiou. Vysoké hladiny PRL prostredníctvom ich účinku na gonadotropíny znižujú hodnoty estrogénov, čím sa hustota kosti znižuje a riziko osteoporózy narastá. Toto riziko sa pri medikamentóznej liečbe dopamínovými agonistami znižuje (Kalsi a kol., 2020). Pacientka mala aj iné predispozície na vznik osteoporózy, a to vek, výpadky menštruačného cyklu a narušenie funkcie štítnej žľazy. Po ďalšej hospitalizácii na psychiatriu výrazne stúpli hladiny PRL, ktoré boli aj pri následných viacerých kontrolách zvýšené. Pre nedostatočnú odpoved' organizmu na liečbu bromokriptínom bola terapia zmenená na karbegolín 0,5 mg dvakrát týždenne.

ZÁVER

V našej štúdii sme vypracovali zhrnutie doterajších odborných poznatkov o hyperprolaktinémii. Detailne

sme opísali farmakoterapiu tohto ochorenia. Predmetom nášho záujmu bolo spracovanie piatich kazuistík pacientov, ktorí boli liečení v endokrinologickej ambulancii.

V štúdii sme dospeli k týmto záverom:

- Hyperprolaktinémia je častou endokrinopatiou. Pacienti sú pod dohľadom endokrinológov. Ochorenie má široké spektrum klinických prejavov, čo sme zachytili aj v našich kazuistikách. Užien išlo o poruchy menštruačného cyklu, galaktoreu, vypadávanie vlasov, osteoporózu. U muža bola zistená gynekomastia a bolestivosť prsných žliaz.
- Pri zachytení vyšších plazmatických koncentrácií prolaktínu je nevyhnutné pacienta dôkladne vyšetriť. Cieľom je zistiť vyvolávajúcu príčinu, aby sa mohla indikovať čo najvhodnejšia terapia. V rámci toho nemožno zabúdať na zistenie liekovej anamnézy. Existujú skupiny liečív, ktoré nežiaduco ovplyvňujú hladinu prolaktínu. Najčastejšie poliekovú hyperprolaktinémiu vyvolávajú neuroleptiká. V našich kazuistikách sme opísali terapiu muža s hyperprolaktinémiou pri užívaní risperidónu a ženy pri užívaní olanzapínu. V prípade muža pomohla zámena za aripiprazol a u ženy úprava dávkovania olanzapínu. Aj iné skupiny liečív majú potenciál zvýšiť prolaktinémiu, čoho príkladom bola žena s hyperprolaktinémiou liečená venlafaxínom a verapamilom.
- Terapia závisí od vyvolávajúcej príčiny a klinických príznakov. Liečba nie je potrebná pri fyziologických príčinách, pri asymptomatických mikroprolaktinómoch a pri asymptomatickej poliekovej hyperprolaktinémii. Hlavnú líniu liečby tohto ochorenia predstavuje farmakoterapia dopaminergickými agonistami. Používa sa bromokriptín, karbegolín a chinagolid. Ani jeden z našich pacientov sa neliečil len jedným liečivom počas celej doby jeho terapie. K zámenám došlo hlavne kvôli nežiaducim účinkom a nedostatočnému efektu liečby. V tejto indikácii je k dispozícii relatívne malý počet liekov, preto aj

výpadky lieku na trhu spôsobujú nutnosť výmeny liečiva.

- Vo farmakoterapii hyperprolaktinémie je liekom voľby karbegolín. Takmer u všetkých pacientov z našich kazuistik sa prejavili dyspepsické ťažkosti po liečbe bromokriptínom. Nežiaduce účinky dopaminergických agonistov ovplyvňujúce psychiku sa vyskytli v prípade jednej ženy. Pri dlhšie trvajúcej liečbe sa u nej rozvinuli príznaky depresie a úzkosti.
- Na základe kazuistik sme skonštatovali, že pre efektívnu terapiu tejto diagnózy je potrebná súčinnosť endokrinológa s ostatnými ošetrovúcimi lekármi. Predovšetkým s psychiatrom pri farmakami navodenej hyperprolaktinémii, gynäkológom pri poruchách cyklu a plodnosti a pri prolaktinómoch aj s neurológom, príp. oftalmológom.
- Kazuistiky nám potvrdili dobrú účinnosť farmakoterapie dopaminergickými agonistami pri liečbe hyperprolaktinémie. Úpravou hladiny prolaktínu v krvi sa výraznou mierou znížili alebo odstránili klinické prejavy tohto ochorenia.

ZOZNAM LITERATÚRY

Al Dahmani, K., Almalki, M. H., Beshyah, S. A.: A rational approach to the evaluation and management of patients with hyperprolactinemia. *Ibnosina Journal Of Medicine And Biomedical Sciences*, 2020, 12 (2). <https://www.ijmbs.org/article.asp?issn=1947-489X;year=2020;volume=12;issue=2;spage=90;epage=97;aulast=Aldahmani>. Accessed October 26, 2021.

Allahbadia, G.N. et al.: *Textbook of Assisted Reproduction*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2020. 844 p.

Akter, N., Qureshi, N. K., Akter, T.: Hyperprolactinemia: a systematic review of diagnosis and management. *Delta Medica lCollage Journal*, 2018, 6 (2), 90.https://www.researchgate.net/publication/327659259_Hyperprolactinemia_A_Systematic_Review_of_Diagnosis_and_Management. Accessed March 4,

2021.

Auriemma, R., Pirchio, R., De Alcubierre, D., Pivonello, R., Colao, A.: Dopamine agonists: from the 1970s to today. *Neuroendocrinology*, 2019, 109 (1), 34 – 41. <https://www.karger.com/Article/Abstract/499470#>. Accessed February 26, 2021.

Casanueva, F. F. et al.: *Hypothalamic-Pituitary Diseases*. New York: Springer International Publishing, 2018. 535 p.

Gonzales-Rodriguez, A., Labad, J., Seeman, M.: Antipsychotic-induced hyperprolactinemia in aging populations: prevalence, implication, prevention and management. *Progress in Neuropsychopharmacology&Biological Psychiatry*, 2020, 101. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278584620302578?via%3Dihub>. Accessed February 15, 2021.

Grymowicz, M., Rudnicka, E., Podfigurna, A., Napierala, P., Smolarczyk, R., Smolarczyk, K., Meczekalsk, B.: Hormonal effects on hair follicles. *International Journal Of Molecular Sciences*, 2020, 21 (15). <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5342/htm>. Accessed January 20, 2022.

Kalsi, A., Jain, M., Halder, A.: An investigation on bone mineral density in hyperprolactinemia. *Journal of Endocrinology and Reproduction*, 2020, 24 (2). https://www.researchgate.net/profile/Ashutosh-Halder/publication/352189479_An_Investigation_on_Bone_Mineral_Density_in_Hyperprolactinemia/links/60bf55f6458515218f9fe20c/An-Investigation-on-Bone-Mineral-Density-in-Hyperprolactinemia.pdf ISSN 0976-5131. Accessed February 2, 2022.

Maiter, D.: Management of dopamine agonist-resistant prolactinoma. *Neuroendocrinology*, 2019, 109 (1). <https://www.karger.com/Article/Pdf/495775>. Accessed March 16, 2021.

Nakhleh, A., Shehadeh, N., Hochberg, I., Zloczower, M., Zolotov, S., Taher, R., Naccache, D. D.: Management of cysticprolactinomas: a review. *Pituitary*, 2018, 21 (4), 425 – 430.<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29654440/>. Accessed March 24, 2021.

Naz, M., Dovom, M. R., Tehrani, F. R.: The menstrual disturbances in endocrine disorders. A narrative review. *International Journal Of Endocrinology And Metabolism*, 2020, 18 (4), e106694.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7887462/>. Accessed January 20, 2022.

Ozery, M., Wadhwa, R.: Bromocriptine. *StatPearls*, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555948/>. Accessed October 24, 2021.

Sharif, K. et al.: *Assisted Reproduction Techniques: Challenges and Management Options, Second Edition*. 2nd edn. New York: John Wiley and Sons Ltd., 2021.

Tritos, A. et al.: *Prolactin Disorders – From Basic Science to Clinical Management*. Switzerland: Humana Press, 2019. 237 s.

Vestnik MZ SR. file:///C:/Users/USER/Downloads/vestnik-2020-osobitne-vydanie1%20(1).pdf. [cit.13-12-2021].



METRONIDAZOLE – DRUG OF MANY INDICATIONS

Solárová, Zuzana

Ústav farmakológie
Lekárska fakulta UPJŠ, Trieda SNP 1, 040 11 Košice

zuzana.solarova@upjs.sk

ABSTRACT

Metronidazole (MTZ) is one of the basic medications used in the therapy of anaerobic and microaerophilic bacterial infections and a mainstay drug in protozoal infections. MTZ was initially used only against parasites. Later was found excellent benefit against anaerobic bacteria. Nowadays, MTZ is a generally accepted and widely used as an antimicrobial in the therapy of a wide range of infections extending from amoebiasis to bacterial septicaemia. Nitroimidazoles, one of which is metronidazole, have been known for their large spectrum of activity as well as their low incidence of resistance for already more than 55 years. However, as with nearly all antibacterial drugs, resistances are on the rise and susceptibility testing is of special interest. MTZ is a bactericidal drug that works via a four-step process that finally leads to the death of the microorganism by damaging the host cell's DNA. Furthermore, there are common resistant strains depicted in this paper and the mechanism behind the resistance is then discussed. Clinical indications are illustrated, using

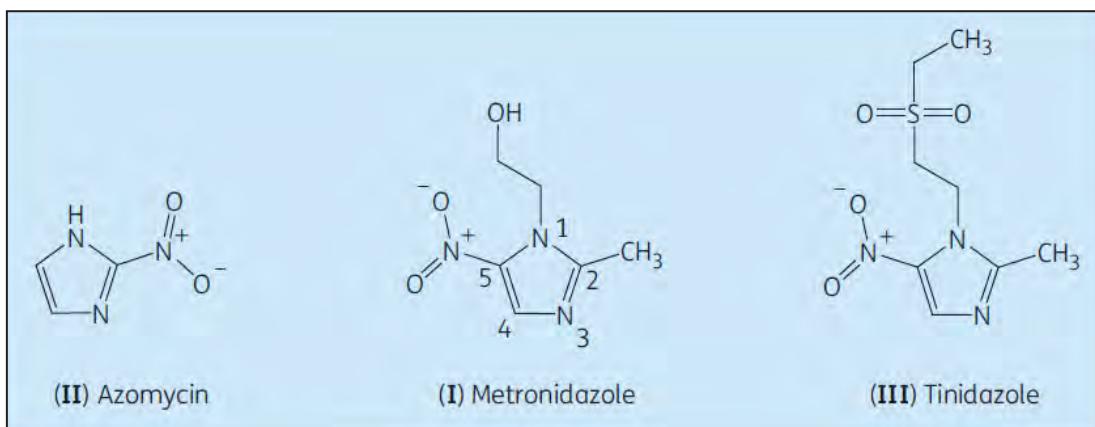
dosing regimens and examples, to give clear advice on when and how to use metronidazole. MTZs use in *Helicobacter pylori* eradication and *Clostridium difficile* infections is nowadays still considered essential even though other possibilities do exist. Besides the bacterial indications, MTZ is also used in protozoal infections by *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*.

Key words: clinical indications; metronidazole; mechanism of action; resistance; side effects

INTRODUCTION

This review describes the basic information about metronidazole. It discusses the highly specific pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of this antimicrobial. Furthermore, the mechanism of action, the side effect profile, the main drug-drug interactions between metronidazole and concomitantly administered drugs are depicted. Despite MTZ's effective use for many decades, resistances against the drug are generally low but often underestimated. Yet the general incidence of resistance is low, even though

Fig. 1: Chemical structure of metronidazole and related compounds azomycin and tinidazole



Source: adapted from Dingsdag and Hunter, 2018

some organisms such as aerobic bacteria are naturally resistant to the nitroimidazole. Here we also describe specific mechanisms resulting in resistance against metronidazole. Moreover, the main indications for metronidazole will be portrayed and different treatment options reviewed.

HISTORY AND CHARACTERISTICS OF METRONIDAZOLE

Metronidazole is a synthetic derivate of the antiparasite nitroimidazole called azomycin, which was primarily isolated in 1955 from a *Streptomyces* species in Rhône-Poulenc laboratories in France. Metronidazole was introduced to medicine in 1959 and used initially for the treatment of protozoal infections due to its powerful trichomonicidal activity. Due to its widespread utilization against parasitic infections, many resistances against metronidazole have developed, especially in areas where parasitic infections are a major problem (Kumar, 2017).

The treatment of anaerobic bacterial infections was approved in 1981 after discovering that a patient treated for vaginal trichomoniasis also improved her concomitant symptoms of an acute necrotizing ulcerative gingivitis in 1962. Metronidazole's microbiological

spectrum against microaerophilic and strict anaerobic microorganisms was soon after that described, but not regularly used until the 1970s (Kumar, 2017).

Metronidazole's molecular formula is C₆H₉N₃O₃ (see Fig. 1) (Kumar, 2017) and is also known under the IUPAC name 2-(2-methyl-5-nitroimidazole-1-yl) ethanol. Tinidazole and ornidazole belong to the same chemical class as metronidazole. As shown in Figure 1, the imidazole derivate was substituted at C1, C2, and C5 with a 2-hydroxyethyl, a methyl, and a nitro group respectively (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metronidazol>).

Metronidazole is a prodrug that gets activated by enzymatic reduction of its nitro subgroup allowing its bactericidal action as the active form in susceptible organisms (Kumar, 2017).

PHARMACOKINETICS

Metronidazole is available as oral (*p. o.*; capsule/tablet), topical or intravenous (*i. v.*) formulation (Dingsdag and Hunter, 2018). Oral formulations, except for the extended-release forms, may be combined with food to reduce some of the gastrointestinal side effects such as stomach discomfort. According to Weir and Le (2018, 2020), the extended-release forms

Tab. 1: A four-step manner metronidazole's mechanism of action

step 1	Step one includes the passive diffusion of metronidazole through the cell membrane of aerobic and anaerobic microorganisms, but its effects are limited to anaerobic and facultative anaerobic pathogens (Weir and Le, 2020).
step 2	The second step is characterised by the reductive activation of metronidazole's nitro group via the intracellular transport protein pyruvate: ferredoxin oxidoreductase, altering its chemical structure. This reductive step creates a concentration gradient of metronidazole which increases the cell's uptake of the drug and leads to a cytotoxic build-up of free radicals (Weir and Le, 2020).
step 3	Step three is DNA damage by the cytotoxic particles. Protonated one electron nitro radical anion (named nitroso free-radical) oxidize the DNA of the host cell leading to DNA strand breakage and therefore to the final damage of the DNA helix (Kumar, 2017; Weir and Le, 2020).
step 4	Breakdown of the cytotoxic compounds occurs during the fourth and last step of the bactericidal process of metronidazole (Weir and Le, 2020).

should always be administered on an empty stomach either 1 hour prior to or 2 hours after the food. Additionally, the destruction of the extended-release forms, by splitting or crushing has to be avoided, as the coating that is responsible for the prolonged release then gets destroyed.

For intravenous forms, a standard preparation of 5 mg.ml⁻¹ in 100 ml is routinely available. It is necessary to avoid the contact of metronidazole-hydrochloride with aluminium (e. g. in needles) as one study suggested that this leads to the precipitation in the solution and change in colour and pH to more alkaline. MTZ infusion bags should be administered over 30 to 60 minutes reasonably to avoid side effects such as nausea, vomiting, and neurotoxicity by fast accumulation (Weir and Le, 2020).

The topical application occurs mostly vaginally and a gel with 0,75 % and 37,5 mg per applicator is also available (Weir and Le, 2020).

After its rapid absorption, metronidazole distributes well into fluids and tissues and shows a good cellular penetration. Organs and tissues that possessed larger amount of metronidazole after oral or intravenous administration in mice and rats were the liver, bladder, kidneys, vagina and gastrointestinal tract (Dingsdag and Hunter, 2018).

It is a lipid-soluble drug that significantly pene-

trates into the CNS. Metabolism of the drug depends on hepatic oxidation of the metronidazole side chain by mixed-function oxidase, followed by glucuronidation. Therefore, concomitant treatment with inducers of the cytochrome P450, such as phenobarbital, enhances the rate of metabolism, and inhibitors, such as cimetidine, prolong the plasma half-life of metronidazole. The drug accumulates in patients with severe hepatic disease. The parent drug and its metabolites are excreted in the urine (Martin, 2015).

PHARMACODYNAMICS

Mechanism of action and indications

Metronidazole's mechanism of action occurs in a four-step manner (see Tab. 1). After diffusing into the organism and reduction of the nitro-group, it interacts with the DNA, causing a strand breakage and loss of its helical structure. This leads to inhibition of the protein biosynthesis and results in the death of susceptible cells (Kumar, 2017; Weir, 2020). Metronidazole belongs to the concentration-dependent rather than to the time-dependent antimicrobials (Kumar, 2017).

The above mentioned four-step process is valid only for purely anaerobic organisms. Cytotoxic effects of metronidazole do also occur in facultative anaerobes such as *Gardnerella vaginalis* and *Helico-*

bacter pylori but the exact mechanism, how metronidazole works there, is not completely understood (Weir, 2020).

Metronidazole has an excellent CNS penetration. Therefore, it is mainly indicated in CNS and abdominal infections by obligate anaerobic bacteria. Additionally, it is used against bacterial vaginosis as well as *H. pylori* and *C. difficile* infections, but also obligate anaerobic pathogens often seen in association with dental problems such as periodontitis and acute gingivitis (e. g. *Bacteroides* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp. and *Clostridium* spp.) (Kumar, 2017).

Metronidazole also exhibits action against human parasites such as *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Blastocystis hominis* and *Giardia intestinalis* (Miljkovic, 2014).

Some of the anaerobic bacteria (*A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *Actinomyces* and *Propionibacterium*) have already gained resistance to metronidazole (Miljkovic, 2014).

Antibacterial use

Clostridioides (Clostridium) difficile infection (CDI)

Clostridioides difficile infection (CDI), is according to Ma and Dubberke (2019), the most common cause of health-care-associated infectious diarrhea in the developed world (Ma, 2017). Infections with *C. difficile*, mostly preceded by antibiotic therapy, such as lincosamides, are leading to acute diarrhea with colitis in its mild form up to the life-threatening pseudomembranous colitis, in severe cases with leucocytosis and fever (Herold, 2017). CDI is a nosocomial infection and its transmission occurs often due to poor hand hygiene of the health care workers. Its spore-forming ability in the aerobic environment makes it difficult for common disinfection processes to destroy the pathogen. Special care is needed to remove the spores after contact with an infected individual (Herold, 2017; Gerding, 2018). From an epidemiologic point of view, *C. difficile* is responsible for nearly 10 – 35 % of all antibiotic-associated diarrheas

and is one of the most common ethiologic factors of nosocomial-acquired diarrhea (Ma, 2017). Paediatric patients show shorter duration and faster onset of CDI. However, regarding surgical interventions and hospitalisations, they are not as frequently affected by complications as adults. Children are more frequently involved in a community-acquired type of CDI (McFarland, 2016).

The two toxins of *C. difficile* induce an inflammatory response in the colon leading to diarrhea, mucosal erosion and the development of pseudomembranes (Gerding, 2018). Perforations of the colon, toxic megacolon and ileus belong to severe complications of CDI (Herold, 2017).

Risk factors for developing a *C. difficile* infection are:

- recent admissions to hospital or other health care centres
- high age or severe underlying diseases
- immunosuppression
- abdominal surgeries
- inhibition of gastric acid provided by PPIs (Herold, 2017).

Diagnosis of CDI is criteria-based and either one or more of the following criteria must be fulfilled to successfully diagnose CDI:

- clinical features of diarrhea or toxic megacolon
- serologic evidence of toxin presence in stool
- endoscopic evidence of pseudomembranous colitis
- histopathologic evidence of CDI (Herold, 2017).

Treatment of *Clostridium difficile* infections mostly starts with withdrawal of antibiotic causing the infection; strict isolation of patient must occur to stop transmission of the infection to other patients. Antibiotic therapy should be initiated with orally administered metronidazole (500 mg, 3 x/d) for 10 days (Herold, 2017). For severe cases, such as toxic megacolon, in patients with leucocytosis or increased creatinine concentration, oral vancomycin (125 mg) may be used and can be combined with intravenous metronidazole. A drug of reserve is fidaxomicin. An-

Tab. 2: Treatment recommendations and classification of *C. difficile* infection

Classification	Criteria	Treatment recommendations
1 st episode, non-severe	leucocytosis (< 15 000 cells/mL) serum creatinine	oral vancomycin (125 mg, 4 x/d for 10 days) or oral fidaxomicin (200 mg, 2 x/d for 10 days); if neither available: metronidazole (500 mg, 3 x/d for 10 days)
1 st episode, severe	leucocytosis (> 15 000 cells/mL) serum creatinine (> 1,5 mg.dL ⁻¹)	oral vancomycin (125 mg, 4 x/d for 10 days) or oral fidaxomicin (200 mg, 2 x/d for 10 days)
fulminant episode	hypotension or signs of shock ileus, megacolon	early surgical consultation and vancomycin (500 mg, 4 x/d) If gut motility ↓, then administer vancomycin <i>per rectum</i> (retention enema with 500 mg in 100 mL saline every 6 hours) and metronidazole <i>i. v.</i> (500 mg every 8 hours)
1 st recurrence	symptoms within 8 weeks after finishing the initial treatment period	if initial treatment with metronidazole, then use oral vancomycin (125 mg, 4 x/d for 10 days) if initial treatment with vancomycin, then use prolonged pulse-tapered vancomycin or fidaxomicin (200 mg, 2 x/d, for 10 days)
2 nd or subsequent recurrence	—	pulse-tapered vancomycin or fidaxomicin (200 mg, 2 x/d, for 10 days) or oral vancomycin (125 mg, 4 x/d, for 10 days) and then oral rifaximin (400 mg, 3 x/d, for 20 days) or faecal microbiota transplant

Source: adapted and modified from Ma and Dubberke, 2017

other treatment option for recurrent infection is a faecal microbiota transplant (Herold, 2017; Gerding, 2018). Table 2 provides pharmaceutical treatment options according to the severity of the CDI, laboratory values and clinical picture. According to McFarland et al. (2016), paediatric patients with CDI respond to metronidazole marginally better, whereas adults show slightly higher response rate to the treatment with vancomycin (McFarland, 2016).

Prevention of CDI is one of the key responsibilities and may be achieved by restricted use of antibiotics. Probiotics may show a prophylactic effect if used directly after initiation of the antibiotic therapy, however according to the newest guidelines, there is a lack of sufficient data and therefore the administration of probiotics as a primary prevention is not recommended (McDonald, 2018). Screening of all patients presenting with diarrhea should be performed directly on

admission to the hospital to achieve adequate and immediate isolation (Herold, 2017). There are a few new preventive approaches currently undergoing clinical review such as vaccinations to stimulate antibodies to the toxins of *C. difficile* or the use of monoclonal antibodies for passive immunisation. Living bacterial organisms (biotherapeutics), for instance nontoxigenic *C. difficile* spores or faecal microbiota transplantation may be helpful as well (Gerding, 2017). Toxoid vaccines used for *C. difficile* prophylaxis have shown to be relatively safe and well-tolerated, inducing a substantial immune response after administering a series of vaccinations to healthy adults. Immunisation neutralizes the exotoxins but is unable to prevent the colonisation of the GI tract, nor prevent the cytotoxicity of *C. difficile*. Toxoid vaccination seems to be very promising, but needs further research and clinical trials to compare this type of immunisation with

the use of monoclonal antibodies, that have shown longer half-life *in vivo* or vaccines directed against cell wall components (Henderson, 2017).

Helicobacter pylori eradication

Helicobacter pylori is a gram-negative spirally-shaped rod with some distinct features such as the inability to oxidize or ferment carbohydrates and microaerophilic growth requirements.

Faecal-oral, oral-oral, gastro-oral transmission or their combination may be conceivable due to the cultivation of *H. pylori* in faeces, saliva and vomited stomach content (Fischbach, 2016). The infection is thought to persist life-long if no specific treatment is used. Over the past several decades, a decline in *H. pylori* infection was seen in developed countries (Cover, 2017). Fischbach et al. (2016) account that even though there has been a decline in *H. pylori* prevalence, *HHj*, more than 50 % of the world population in the adult age (> 40 years) are still affected (Fischbach, 2016).

Infection with *H. pylori* remains asymptomatic in most colonised persons. The pathogen is furthermore known as a carcinogen for gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) B-cell lymphomas and for gastric adenocarcinomas. On the other hand, it is thought to protect from gastroesophageal reflux disease and adenocarcinomas of the lower oesophagus and gastric cardia (Cover and Blaser, 2017).

The treatment of infections with *H. pylori* is not recommended as long as the patient remains asymptomatic and preventive measures are not commonly utilized in practice (Cover, 2017). Therefore, treatment is initiated after a clear indication and the evidence of the infection. Metronidazole has a unique role in the *H. pylori* eradication in symptomatic patients. It is a part of different types of treatment options, but options that do not contain metronidazole in their treatment regimen are not further discussed here.

Standard triple therapy is the first-line choice in areas with a low-clarithromycin resistance. This pattern is administered for 10 – 14 days and thereby

achieves an eradication rate of 81,9 % (Fischbach, 2016; Buensalido, 2018). It consists of the following components – proton pump inhibitor, clarithromycin or metronidazole and, amoxicillin or metronidazole (if not already used as the second component) (Fischbach, 2016; see also Tab. 3; Buensalido, 2018).

Another first-line option is the non-bismuth quadruple concomitant therapy, where a combination of drugs is used for 10 – 14 days. The eradication rate in non-bismuth quadruple concomitant therapy is more than 90 % and therefore is considered superior to the triple therapy. Following medications are used in this regimen – proton pump inhibitors, amoxicillin, clarithromycin and metronidazole (Buensalido, 2018).

In areas with high MTZ and high clarithromycin resistance, bismuth-based therapy is another first-line choice for eradication. It is administered for 10 – 14 days with an eradication rate up to 97,1% in 14 days duration. Other first-line therapy options exist (proton pump inhibitor or H₂ receptor antagonist, bismuth subsalicylate, metronidazole and, tetracycline), but as they do not contain metronidazole in their treatment regimen, they are not further discussed here (Buensalido, 2018).

Levofloxacin-containing triple therapy or bismuth-based therapy is a non-metronidazole containing pattern that can be used as a second-line treatment if not used previously (Buensalido, 2018).

Third-line therapies or “rescue” therapies exist and should always start with a microbiologic culture and antibiotic susceptibility testing of a sample obtained by biopsy. Choosing a treatment regimen not previously used is essential and may contain a bismuth-based quadruple therapy with a slightly changed antibiotic pattern. As an example, the combination of a proton pump inhibitor, bismuth potassium citrate, metronidazole, furazolidone or tetracycline (if not previously used) and tetracycline or amoxicillin may provide a third-line strategy for *H. pylori* eradication (Buensalido, 2018).

If the patient has already received the bismuth-based quadruple therapy as a first-line treatment

Tab. 3: Treatment recommendations for *H. pylori* eradication according to Fischbach et al.

Name	Line	Scheme	Dosage	Duration
Standard-triple therapy (Italian)	1 st line	PPI Clarithromycin (250 – 500 mg) Metronidazole (400 – 500 mg)	1-0-1 1-0-1 1-0-1	7 – 14 d
Standard-triple therapy (French)	1 st line	PPI Clarithromycin (250 – 500 mg) Amoxicillin (1000 mg)	1-0-1 1-0-1 1-0-1	7 – 14 d
Bismuth-based quadruple therapy	1 st line or 2 nd line after standard therapy	PPI Bismuth-potassium-salt (140 mg) Tetracycline (125 mg) Metronidazole (125 mg)	1-0-1 1-1-1-1 1-1-1-1 1-1-1-1	10 d
Non-bismuth containing quadruple therapy	1 st line therapy	PPI Clarithromycin (500 mg) Amoxicillin (1000 mg) Metronidazole (400 – 500 mg)	1-0-1 1-0-1 1-0-1 1-0-1	7 d
Fluoroquinolone-triple therapy	2 nd line therapy	PPI Levofloxacin (500 mg) or Moxifloxacin (400 mg) Amoxicillin (1000 mg)	1-0-1 1x1 1-0-1	10 d

This table provides a slightly different drug combination and therefore represents another option to the previous described treatment regimens.

Source: translated and modified from Fischbach et al., 2016

regimen, then a levofloxacin or clarithromycin-containing “rescue” regimen is favoured. Levofloxacin therapy may be used sequentially with this therapeutic scheme:

- (1) proton pump inhibitor coupled with (2) amoxicillin for 7 days followed by the pattern of a
- (1) proton pump inhibitor with (2) metronidazole and (3) levofloxacin for additional 7 days.

Antiprotozoal use

Trichomonas vaginalis

Trichomoniasis, caused by the parasite *Trichomonas vaginalis*, is the most widespread non-viral sexual transmitted infection (STI) seen in women worldwide. Usually, metronidazole is used to treat trichomoniasis, however, as already discussed, resistant strains are present and therefore the number of refractory cases is increasing (Schwebke, 2016).

Kissinger et al. (2018) compared the efficacy of a 2 g single dose with a 7-day regimen (500 mg *b. i. d.* – bis in die/two times a day) of metronidazole in a randomised, controlled, open-label trial for HIV negative, nonpregnant women with trichomoniasis. The 7-day administration of MTZ showed better results as it leads to 45 % fewer TOC (test of curve, patients cured of disease proven by a test) positive results when compared to the single oral dose. However, the rate of repeated infections in the 7-day MTZ group was still of concern (rate of repeated infections 10,9 %) (Kissinger, 2018).

Systemic treatment, which may be carried out in an outpatient setting, is essential as multiple sites may be affected by *T. vaginalis* (Schwebke, 2016; Smith, 2020). There are four different treatment options currently available (Smith, 2020): a single, oral dose of metronidazole (2 g), a single, oral dose of tinidazole (2 g), 7-day regimen of metronidazole, 500 mg *b. i. d.*

d., or 7-day regimen of metronidazole, 400 mg *t. i. d.* (tres in die-three times a day).

Entamoeba histolytica (intestinal amoebiasis, liver amoebiasis)

Amoebiasis is an infectious disease caused by the protozoan *Entamoeba histolytica*. About 90 % of cases are asymptomatic, whereas the other 10 % show either intestinal (amoebic dysentery), or extraintestinal symptoms. Despite the high number of asymptomatic cases, it is still a common factor for mortality and morbidity in many countries. One of the more common extraintestinal manifestations is the amoebic liver abscess (ALA) due to *E. histolytica*'s ability to invade the tissue and form the liver amoebiasis (Schmiedel, 2018).

Due to MTZ's excellent tissue penetration and therefore great success, with clinical response as high as 90 % in patients with mild-moderate amoebic colitis, it is considered as the gold standard. Amoebic liver abscesses with a size of less than 5 cm may be treated only with metronidazole. Abscesses that do not respond to pharmacologic treatment, larger than 5 cm or located in the left liver lobe should be drained additionally by surgery (Dhawan, 2019). Luminal agents such as paromomycin or diloxanide furoate, which are poorly absorbed by the human gastrointestinal tract, should be added to stop the intestinal invasion and spreading by the faecal-oral route as the nitroimidazoles do not affect the intraluminal parasites which are present in the cyst form. Additional antibacterial therapy should be initiated as the clinical and radiologic signs of a bacterial liver abscess and *E. histolytica* liver abscess is not always clearly defined and bacterial superinfection of the liver abscess may occur (Schmiedel, 2018; Dhawan, 2019).

Giardia lamblia (giardiasis)

Giardia lamblia is a protozoan parasite that causes the common human disease giardiasis. This parasite is transmitted by the faecal-oral route via the ingestion of cysts causing diarrhea and abdominal discomfort which may turn into a chronic form leading to the

malabsorption syndrome and significant weight loss (Hill and Nash, 2017).

The drug of choice for giardiasis is metronidazole, but the patient's noncompliance, side effects and resistant strains of *Giardia lamblia* may limit its application. 250 mg *t. i. d.* of MTZ is administered for 5 – 7 days but its application is not FDA approved. Alternatively, albendazole 400 mg *q. d.* for 5 days has shown to have similar effectiveness and has simultaneously less side effects when compared to metronidazole. MTZ-resistant giardiasis may make up to 20 % of cases, and therefore needs proper treatment with other compounds. Tinidazole (2 g, single dose) a long-acting nitroimidazole derivative, nitazoxanide (500 mb *b. i. d.* for 3 days) or furazolidone (100 mg *q. i. d.* for 7 – 10 days) are possible alternatives among others.

Situational indication

Crohn's disease

Nitroimidazoles do diminish the postoperative disease recurrence after an ileocolonic resection but their application is restricted due to their side effect profile which worsens with an increased, continuous dose (Wehkampo, 2016).

CNS infections (meningitis, brain abscess)

Metronidazole has an excellent penetration to the cerebrospinal fluid (CSF) and therefore is used in the treatment of anaerobic bacterial meningitis and brain abscesses. Anaerobic bacterial meningitis is a rare condition in adults and additionally is often underdiagnosed, because anaerobic examinations of the CSF are sometimes not routinely ordered. Most of the anaerobic bacteria (*Fusobacterium*, *Prevotella* spp.) that were found to be responsible, were susceptible to penicillin, however, the *Bacteroides fragilis* strain was just susceptible to MTZ. In general, treating a suspected meningitis case should not be delayed by waiting for imaging or laboratory results. Nowadays, the empiric therapy does not often include metronidazole, as other antibiotics have shown to be more effective, however, after susceptibility testing, met-

ronidazole may possess benefits (Lee, 2018). A case report by de A. Silva et al. (2019) describes a rare neonatal anaerobic meningitis caused by *B. fragilis*. The child was successfully treated with a combination of metronidazole and carbapenems for 14 days which is also the recommended choice of antibiotic therapy in this diagnosis (case) (de A. Silva, 2020).

Surgical prophylaxis in colorectal surgeries

Utilization of antibiotics before a colorectal surgery is performed for more than three decades to prevent surgical site and wound infections. Giske et al. (2017) described the possibility of using an oral dose of doxycycline (400 mg) with metronidazole (1200 mg), 2 hours before an elective gastrointestinal surgery. By measuring the serum concentrations of MTZ before surgery initiation (time of incision) and at the point of wound closure, they found out that epidemiologic cut-off values (ECOFF) were achieved in 103 out of 104 patients for relevant anaerobic species (*Bacteroides fragilis*, *Clostridium* spp.) treated with metronidazole (2 mg.l⁻¹). Nonetheless, doxycycline just achieved the ECOFF of 4 mg.l⁻¹ in 58/104 patients for *Enterobacteriaceae* spp. A single, oral dose of 1200 mg MTZ leads to a serum concentration of 18,88 mg.l⁻¹ at the time of incision and 15,56 mg.l⁻¹ at the time of closure and therefore is sufficient as a prophylactic agent (Giske, 2017).

According to Dellinger and Wu et al. (2020) the combination of cefazolin (2 g), or another cephalosporin in addition to MTZ (500 mg or 1 g) is one of the most effective and inexpensive choices in preventing infections at surgical site (Dellinger, 2018; Dellinger, 2020). This combination (cephalosporin + metronidazole) is commonly used and also recommended by the multi-society guidelines from 2013 (cephalosporin + metronidazole) (Dellinger, 2020).

Another important indication for metronidazole as a prophylactic agent is in case of hysterectomies, as many of the isolated organisms are anaerobic. Till et al. (2017) compared cefazolin + metronidazole with the existing standard of cefazolin alone or 2nd generation cephalosporins alone. Here the combination

of cefazolin along with metronidazole ensue in a reduced rate of surgical site infections after hysterectomy compared to the existing recommendation (Till, 2017).

CONTRAINDICATIONS OF METRONIDAZOLE

Concomitant intake of alcohol or propylene glycol-containing products is not recommended for the next three days after cessation of the drug due to metronidazole's known disulfiram-like effect. Additionally, a recent disulfiram use during the past two weeks also contraindicates its use (Weir, 2020).

MTZ should be avoided during the first trimester of pregnancy, due to its potential risk of causing birth defects, by its mechanism of action, inhibiting DNA synthesis in anaerobic bacteria. However, there is no evidence that it may be linked to preterm deliveries, abnormal fetal weight, or congenital anomalies. MTZ is therefore classified as pregnancy category B by the FDA (Kumar, 2017; Weir, 2020).

Patients with pre-existing neurological disorders should highly consider the intake of metronidazole as the symptoms might become increased due to the side effect profile of metronidazole, which contains peripheral neuropathy.

Infections that are caused solely by aerobic bacteria cannot be treated with metronidazole. Moreover, MTZ is contraindicated in patients suffering from viral or fungal infections as it is just not active against these pathogens (Kumar, 2017). In suspected mixed infections of aerobic and anaerobic bacteria, MTZ must be combined with an antibacterial agent active against aerobic bacteria. Yet, it might be more sophisticated to use a drug active against aerobic or anaerobic infections rather than initiating double antibacterial therapy. However, every case must be assessed individually.

ADVERSE DRUG EFFECTS

Adverse drug reactions vary from simple gastro-

intestinal to more severe neurotoxic effects (Alonzo, 2019).

Minor adverse reactions

Metronidazole's gastrointestinal side effects are comprised of nausea, vomiting, xerostomia, abdominal cramping, diarrhea and epigastric distress (Kumar, 2017; Agarwal, 2016). The compound may also create an unpleasant, metallic taste. Additionally, oral moniliasis (yeast infections) were reported. A red-brown to dark discolouration of the urine as well as a skin rash, gynecomastia and vaginal or urethral burning sensation may be observed in some patients (Kumar, 2017).

It is recommended to perform a differential leukocyte count before initiating and after completing the treatment with metronidazole as it may lead to reversible neutropenia (Kumar, 2017).

More severe neurotoxic effects

The neurotoxic side effects of metronidazole include dizziness, numbness, paraesthesia, visual impairment, damage to the cochlear and vestibular apparatus, dysarthria, ataxic gait, encephalopathies and seizures (Agarwal, 2016; Roy, 2016). Peripheral neuropathies are rarely reported and are classified as major adverse reactions, but are mostly of concern when high doses are used for a long period of time. More severe signs of CNS toxicity include seizures, cerebellar dysfunction, mental confusion, depression, and subacute progressive encephalopathy. These are rarely reported and mostly in association with prolonged use of high MTZ doses (Kumar, 2017).

Among the very serious but rare adverse drug reaction is the metronidazole-induced encephalopathy – MIE (see also Fig. 2). Most patients with MIE present with cerebellar dysfunction (75 %), whereas an altered mental status accounts for 33 % and seizures for 13 % of symptoms among patients with MIE. Cerebellar toxicity presents with nystagmus, dysarthria, dysmetria and ataxia (Roy, 2016).

The pathologic mechanisms of MIE are still not known but a few proposals state that metronidazole

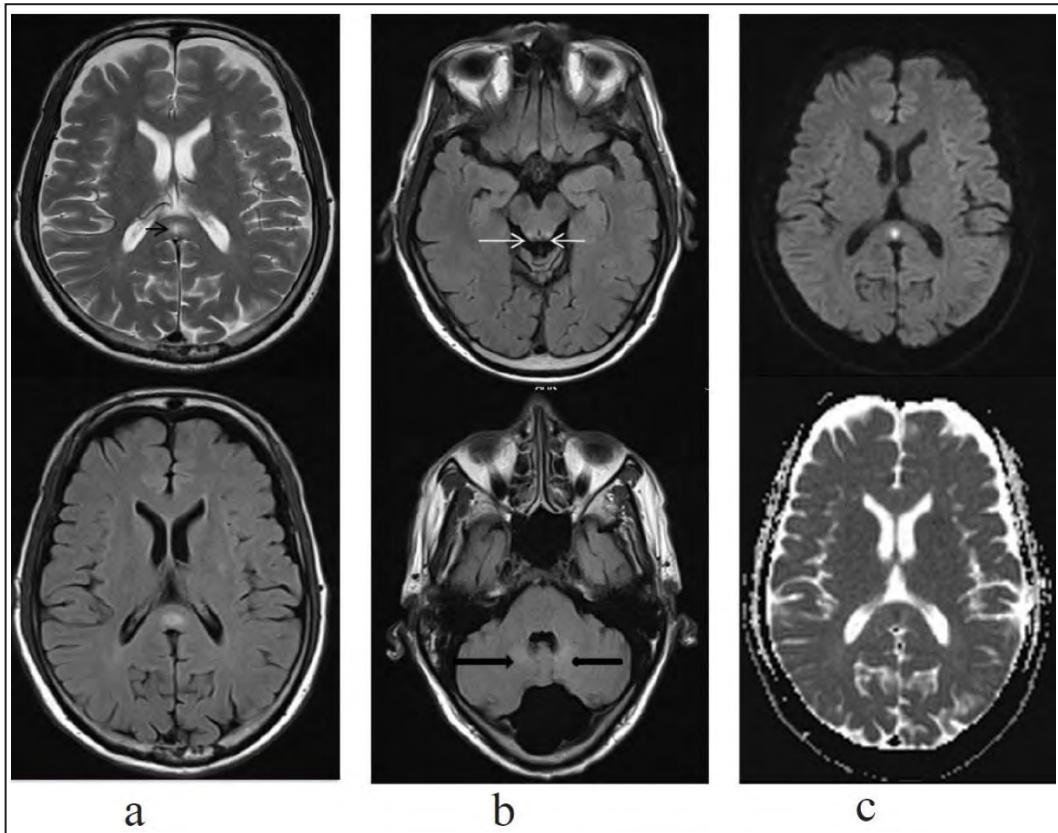
might interact with RNA and DNA of neuronal cells. Moreover, oxidation of catecholamine derivatives (norepinephrine, dopamine) results in semiquinone and nitro anion radicals. These are known for their reduction of tissue oxygen and generation of the superoxide radical that causes axonal swelling (Roy, 2016). MIE may involve the dentate nucleus, brain-stem (midbrain with the periaqueductal region, dorsal pons and medulla), inferior colliculus, basal ganglia, thalamus, subcortical white matter and splenium of the corpus callosum. At these locations, FLAIR and T2W hyperintensities with minimal T1W hypointense areas appear and do not show any mass effect or contrast enhancement (Agarwal, 2016; Roy, 2016).

A frequent observation was the diffusion restriction to the above-mentioned brain areas but the apparent diffusion coefficient (ADC) was varying from low to high values. ADC is commonly calculated using the MRI DWI (diffusion-weighted imaging) and describes the diffusion of water molecules within tissues. Normal or high ADC values tend to be seen in axonal swelling (vasogenic oedema) whereas low ADC values describe a cytotoxic (true) oedema seen in ischaemic processes (Roy, 2016). In the corpus callosum lesions, diffusion restrictions and a low ADC are sometimes seen which indicate a poor outcome due to the underlying pathophysiologic mechanism of a cytotoxic oedema. MRI DWI findings of diffusion restrictions with a low ADC have also been noticed in Wernicke's encephalopathy (metabolic encephalopathy) and maple syrup urine disease which are differential diagnosis among others. If the previously described lesions appear due to a metronidazole intoxication, their resolution and therefore clinical improvement is likely as soon as the metronidazole therapy is ceased (Roy, 2016).

Metronidazole-induced pancreatitis and liver injury

Metronidazole-induced pancreatitis is one of the more rare but severe side effects, often occurring upon large doses. It is characterised by an elevation of alkaline phosphatase (ALP), amylase, lipase, liver

Fig. 2: Metronidazole-induced encephalopathy



69 year-old, male patient with a 2 mg/day metronidazole treatment regimen for amoebic abscess of the liver. He developed encephalopathy 7 days after treatment initiation. One week after cessation of metronidazole all symptoms completely resolved.

- a) splenium hyperintensities in T2W MRI (black, thin arrow) which correspond with FLAIR sequence
- b) pale dentate hyperintensities in FLAIR (black, bold arrow) and inferior colliculi hyperintensities (white, thin arrows)
- c) diffusion restriction in the splenium with low ADC value in DWI

Source: adapted from Roy et al., 2016

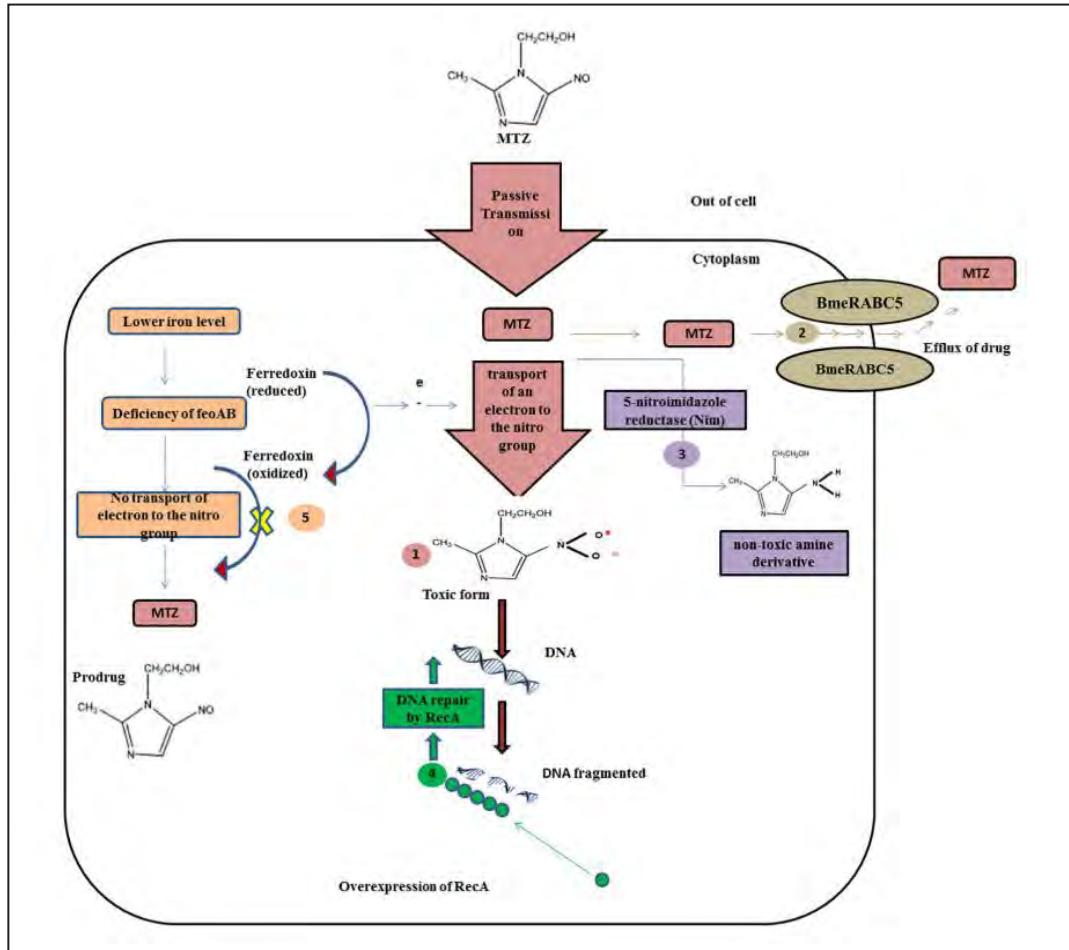
dehydrogenase and triglycerides. However, it is often self-limiting and reversible upon discontinuation of the drug (Kumar, 2017).

Disulfiram-like reaction

Metronidazole inhibits the hepatic enzyme acetaldehyde dehydrogenase which is an essential enzyme in the metabolism of alcohol. It converts the toxic acetaldehyde, produced by the alcohol dehydrogenase, into acetic acid. The cytotoxic acetaldehyde is respon-

sible for a lot of the direct and aftereffect symptoms of alcohol consumption. Therefore, inhibition of the enzyme acetaldehyde dehydrogenase leads to nausea, vomiting, abdominal pain, flushing, cardiac palpitations, headache, and syncope. Severe complications may result in respiratory depression, the collapse of the cardiovascular system, convulsions, arrhythmias and even death (Kumar, 2017; Alonzo, 2019).

Fig. 3: Overview of mechanism of action of metronidazole and possible ways of resistance



- 1) metronidazole's mechanism of action
- 2) efflux of the drug by the efflux pump *BmeRABC5*
- 3) *nim* gene-mediated resistance
- 4) overexpression of RecA protein – DNA repair processes
- 5) reduced ferrous iron transport and decreased levels of iron

Source: adapted from Ghotoslou, 2018

DRUG-DRUG INTERACTION

Certain drugs show a cumulative impact regarding the side effect profile of metronidazole when concomitantly taken in (e. g. medications producing peripheral neuropathy). Lithium levels may get increased when combined with the drug. When metronidazole is combined with phenytoin, which is known as an inducer of the hepatic isoenzyme CYP450 2C9, the plasma levels may be significantly altered. On the other hand, MTZ decreases phenytoin's body clear-

ance and increases the blood warfarin levels by interfering with the metabolism of warfarin in the liver. Faster uptake of metronidazole is achieved by combining it with amoxicillin as seen with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Kumar, 2017).

RESISTANCE TO METRONIDAZOLE

The resistance of bacteria and protozoa to metronidazole is emerging but often not readily noted due to the lack of susceptibility testing. Due to metroni-

dazole's wide distribution and utilisation in medical practice, the increasing number of resistances is of great concern (Smith, 2018).

Resistance of *Bacteroides fragilis*

A metronidazole resistant *Bacteroides fragilis* is rarely seen but was first described 18 years after metronidazole's introduction, in a patient with Crohn's disease who received metronidazole as a treatment for more than 3 years. The resistance of *Bacteroides species* to metronidazole is of great interest as it is an opportunistic pathogen which may possess more resistances to other antimicrobials such as β -lactams, tetracyclines and imipenem among others. Resistant strains show a specific genetic determinant (*nim* gene) which is either plasmid born or directly on the chromosome and thus transferable by a conjugation-like process. Ten isoforms of this gene have been demonstrated (*nimA* to *nimI*) that show the same mechanism and 60 – 70 % homology (Ghotaslou, 2018).

Resistance of *Clostridium difficile*

Metronidazole together with vancomycin and fidaxomicin are mainstay drugs utilised in the therapy of *Clostridium difficile*. Yet, some strains of *C. difficile* have gained resistance to MTZ via the exchange of mobile genetic elements leading to modified redox-active proteins and an improved DNA repair among others. Specifically, the endurance of some strains to MTZ is mostly caused by an altered metabolic pathway, DNA repair and the formation of a biofilm (see Fig. 3). Susceptibility testing should be performed as the number of resistant strains is rising during the last decade. However, the isolation and correctness of *C. difficile* susceptibility testing is highly dependent on proper anaerobic sampling, anaerobic growth environment and quality of the used medium (Peng, 2017). If the tested strain shows resistance to metronidazole, another antimicrobial agent that is active against *C. difficile* should be used, as the infection often results from a microbial imbalance previously triggered by an antibiotic agent.

METRONIDAZOLE AND PREGNANCY

Metronidazole is a highly lipid-soluble drug and therefore penetrates the placenta well and is moreover found in the breast milk (Moreta, 2018). Its administration during the early phase of the pregnancy is affiliated with an increased risk of spontaneous abortions, which occurs most likely due to DNA damage by reactive intermediates (Muanda, 2020). Most studies that were investigating the malformations associated with metronidazole intake, did not show any harmful side effects (Kallén, 2019). However, as MTZ affects DNA synthesis, the possibility of causing birth defects is still present. According to Kumar (2017), metronidazole's risk of causing congenital abnormalities, low birth weight or preterm delivery is low and its FDA pregnancy classification is B (Kumar, 2017).

SUMMARY

The reason for writing this review was that metronidazole is a drug used for many indications that are described in different parts of medical discussions in medical literature and published papers. So this review gives a summary information regarding metronidazole's (MTZ) pharmacokinetics and pharmacodynamics as well as the basic chemical characteristics. The mechanism of action is described, and the adverse drug reactions are given together with a detailed overview concerning the drug-drug interactions between MTZ and other currently known drugs. Furthermore, its application and pharmacokinetic changes of metronidazole in high-risk patient groups are provided here.

Finally, it is difficult to predict metronidazole's future, as like with every other antimicrobial drug, the development of resistant strains is of special concern. However, MTZ is successfully used long time and only a limited number of resistant strains have occurred.

Here are also provided some mechanisms of resistance of currently resistant strains of bacteria and

protozoa. Nevertheless, restricted use of all antimicrobials, including metronidazole, should always be considered, but, in case of clear indications, MTZ provides a great choice in treating anaerobic bacterial and protozoal infections.

REFERENCES

- Agarwal, A., Kanekar, S., Sabat, S., Thamburaj, K.: Metronidazole-induced cerebellar toxicity. *Neurol Int.*, 2016, 8 (1), 4 – 6. Doi: 10.4081/ni.2016.6365.
- Alonzo, M. M., Lewis, T. V., Miller, J. L.: Disulfiram-like reaction with metronidazole: an unsuspected culprit. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.*, 2019, 24 (5), 445 – 449. Doi: 10.5863/1551-6776-24.5.445.
- Buensalido, J. A. L., Valencia, J. C. B., Chandrasekar, P. H.: *Helicobacter pylori* infection treatment: *Helicobacter pylori* infection treatment 2018. <https://emedicine.medscape.com/article/2172395-overview>. Accessed May 11, 2023.
- Cover, T. L., Blaser, M. J.: *Helicobacter pylori* and other gastric *Helicobacter* species. In: Bennet, J. E., Dolin, R., Blaser, M. J. (Eds.). *Mandell, Douglas and Bennet's Infectious Disease Essentials*. 1st edn. Philadelphia: Elsevier; 2017. p. 315.
- Cudmore, S. L., Delgaty, K. L., Hayward-McClelland, S. F., Petrin, D. P., Garber, G. E.: Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, 17 (4), 783 – 793. <https://cmr.asm.org/content/17/4/783>. Doi: 10.1128/CMR.17.4.783-793.2004.
- de A. Silva, C., Dias, L., Cardona, R. S. B., Variane, G. F. T., do Nascimento, S. D., de Oliveira, S. R. P., Richtmann, R.: Anaerobic neonatal meningitis: A diagnostic challenge. *Anaerobe*, 2020, 61, 102 134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31838318>. Doi: 10.1016/j.anaeobe.2019.102134.
- Dellinger, E. P.: Cephalosporin plus metronidazole for surgical prophylaxis. *Surg. Infect. (Larchmt.)*, 2018, 19 (4), 359 – 361. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29717907>. Doi: 10.1089/sur.2018.023.
- Dellinger, E. P.: Antibiotic prophylaxis for colorectal surgery. *J. Am. Coll. Surg.*, 2020, 230 (1), 168 – 169. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31879003>. Doi: 10.1016/j.jamcoll-surg.2019.10.004.
- Dhawan, V. K., Cleveland, K. O., Cantey, J. R., Bronze, M. S.: Amebiasis. *E-medicine. medscape*, 2019. <https://emedicine.medscape.com/article/212029-medication>. Accessed May 22, 2023.
- Dingsdag, S. A., Hunter, N.: Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2018, 73 (2), 265 – 279. <http://academic.oup.com/jac/article/73/2/265/4565576>. Doi: 10.1093/jac/dkx351.
- Fischbach, W., Malfertheiner, P., Lynen Jansen, P., Bolten, W., Bornschein, J., Buderus, S., Glocker, E., Hoffmann, J. C., Koletzko, S., Labenz, J., Mayerle, J., Miehlke, S., Mössner, J., Peitz, U., Prinz, C., Selgrad, M., Suerbaum, S., Venerito, M., Vieth, M.: S2k-Leitlinie *Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit. *Z. Gastroenterol.*, 2016, 54 (04), 327 – 363. <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0042-102967>. Doi: 10.1055/s-0042-102967.
- Gerding, D. N., Young, V. B.: *Clostridium difficile* infection. In: Bennet, J. E., Dolin, R., Blaser, M. J. (Eds.). *Mandell, Douglas and Bennet's Infectious Disease Essentials*. 1st edn. Philadelphia: Elsevier, 2017. 358 – 359.
- Ghotaslou, R., Bannazadeh Baghi, H., Ali-zadeh, N., Yekani, M., Arbabi, S., Memar, M. Y.: Mechanisms of *Bacteroides fragilis* resistance to metronidazole. *Infection, Genetics and Evolution*, 2018, 64, 156 – 163. Doi: 10.1016/j.meegid.2018.06.020.
- Giske, A., Nymo, L. S., Fuskevåg, O.-M., Amundsen, S., Simonsen, G. S., Lassen, K.: Systemic antibiotic prophylaxis prior to gastrointestinal surgery – is oral administration of doxycycline and metronidazole adequate? *Infect. Dis. (Auckl.)*, 2017, 49 (11 – 12), 785 – 791. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28657405>. Doi: 10.1080/23744235.2017.1342044.
- Henderson, M., Bragg, A., Fahim, G., Shah,

- M., Hermes-DeSantis, E. R.: A review of the safety and efficacy of vaccines as prophylaxis for *Clostridium difficile* infections. *Vaccines (MDPI AG)*, 2017, 5 (3), p. 9. Doi: 10.3390/vaccines5030025.
- Herold, G.: *Innere Medizin*. Herold, G. (Ed.) 2017th edn. Köln: Herold, Gerd, 2017. 997 p.
- Hill, D. R., Nash, T. E.: *Giardia lamblia*. In: Bennet, J. E., Dolin, R., Blase, M. J. (Eds.). *Mandell Douglas and Bennet's Infectious Disease Essentials*. 1st edn. Philadelphia: Elsevier; 2017. 426 – 427.
- Källén, B.: Maternal use of antiprotozoans, antihelminthics, or insecticides and infant congenital malformations. In: *Maternal Drug Use and Infant Congenital Malformations*. Springer International Publishing, 2019. 331 – 341. Doi: 10.1007/978-3-030-17898-7_29.
- Kissinger, P., Muzny, C A., Mena, L. A., Lillis, R. A., Schwebke, J. R., Beauchamps, L., Taylor, S. N., Schmidt, N., Myers, L., Augostini, P., Secor, W. E., Bradic, M., Carlton, J. M., Martin, D. H.: Single-dose versus 7-day-dose metronidazole for the treatment of trichomoniasis in women: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.*, 2018, 18 (11), 1251 – 1259. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30297322>. Doi: 10.1016/S1473-3099(18)30423-7.
- Kumar, P.: Pharmacology of specific drug groups. In: Dowd, F. J., Johnson, B. S., Mariott, A. J. (Eds.). *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*. 7th edn. Elsevier, 2017. 457 – 487. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323393072000333>. Doi: 10.1016/B978-0-323-39307-2.00033-3.
- Lee, J. J., Lien, C. Y., Chien, C. C., Huang, C. R., Tsai, N. W., Chang, C. C., Lu, Ch.-H., Chang, W.-N.: Anaerobic bacterial meningitis in adults. *J. Clin. Neurosci.*, 2018, 50, 45 – 50. Doi: 10.1016/j.jocn.2018.01.014.
- Ma, J., Dubberke, E.: Current management of *Clostridioides* (*Clostridium*) difficile infection in adults: a summary of recommendations from the 2017 IDSA/SHEA clinical practice guideline. *Polish Archives of Internal Medicine. Medycyna Praktyczna*, 2019. 189 – 198. DOI: 10.20452/pamw.4377.
- Martin, L. C.: *Antiprotozoal Drugs*. In Whalen, K., Finkelman, R., Panavelil, T. A. (Eds.). *Lippincott Illustrated Reviews: Pharmacology*. 6th edn. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2015. 561 – 574 p.
- McDonald, L. C., Gerding, D. N., Johnson, S., Bakken, J. S., Carroll, K. C., Coffin, S. E., et al.: Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clinical Infectious Diseases*, 2018, 66 (7), e1 – 48. Doi: 10.1093/cid/cix1085.
- McFarland, L. V., Ozen, M., Dinleyici, E. C., Goh, S.: Comparison of pediatric and adult antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *World Journal of Gastroenterology. Baishideng Publishing Group Co. Limited*, 2016, 22, 3078 – 3104. Doi: 10.3748/wjg.v22.i11.3078.
- Miljkovic, V., Arsic, B., Bojanic, Z., Nikolic, G., Nikolic, L. J., Kalicanin, B., Savic, V.: Interactions of metronidazole with other medicines: a brief review. *Pharmazie*, 2014. Doi: 10.1691/ph.2014.3951.
- Moreta, L., McGovern, P.: Antibiotic use in pregnancy. *Top. Obstet. Gynecol.*, 2018, 38 (7), p. 1. Doi: 10.1097/01.PGO.0000532384.40596.5d.
- Muanda, F. T., Sheehy, O., Berard, A.: Use of antibiotics during pregnancy and risk of spontaneous abortion. *CMAJ*, 2017, 189 (17), E625 – E633. Doi: 10.1503/cmaj.161020.
- Peng, Z., Jin, D., Kim, H. B., Stratton, C. W., Wu, B., Tang, Y. W., Sun, X.: Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*: resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology*, 2017, 55 (7), 1998 – 2008. Doi: 10.1128/JCM.02250-16.
- Petri, W. A. J., Haque, R.: Entamoeba species, including amebic colitis and liver abscess. In: Bennet, J. E., Dolin, R., Blaser, M. J. (Eds.). *Mandell, Douglas and Bennet's Infectious Disease Essentials*. 1st edn. Philadelphia: Elsevier, 2017. 413 – 414.
- PubChem USNL of M.: Metronidazole (Compound). Experimental Properties. Physical*

Description. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metronidazole>. Doi: 10.5517/CC5T9V3.

Roy, U., Panwar, A., Pandit, A., Kumar Das, S., Joshi, B.: Clinical and neuroradiological spectrum of metronidazole induced encephalopathy: our experience and the review of literature. Vol. 10, Journal of Clinical and Diagnostic Research, 2016. OE01 – OE09. Doi: 10.7860/JCDR/2016/19032.8054.

Schwebke, J. R.: *Trichomonas vaginalis*. In: Bennet, J. E., Dolin, R., Blaser, M. J. (Eds.). *Mandell, Douglas and Bennet's Infectious Disease Essentials*. 1st edn. Philadelphia: Elsevier, 2017. p. 428.

Singh, S., Goyal, V., Padhi, P., Aoun, E.: *Bacteroides fragilis endocarditis in a patient with Crohn's disease. Case Report*, 2013. <http://casereports.bmjjournals.org/cgi/doi/10.1136/bcr-2013-009248>. Doi: 10.1136/bcr-2013-009248.

Smith, A.: Metronidazole resistance: a hidden epidemic? *Br. Dent. J.*, 2018, 224 (6), 403 – 404. Doi: 10.1038/sj.bdj.2018.221.

Smith, D., S., Cole Holderman, J., Buguayong, K. T., Bronze, M. S.: Trichomoniasis: background, pathophysiology, etiology. *E-medicine. medscape*, 2020. <https://emedicine.medscape.com/article/230617-overview>. Accessed May 22, 2023.

Till, S. R., Morgan, D. M., Bazzi, A. A., Pearlman, M. D., Abdelsattar, Z., Campbell, D. A., Uppal, S.: Reducing surgical site infections after hysterectomy: metronidazole plus cefazolin compared with cephalosporin alone. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2017, 217 (2), 187. e1-187.e11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28363438>. Doi: 10.1016/j.jog.2017.03.019.

Wehkamp, J., Götz, M., Herrlinger, K., Steurer, W., Stange, E. F.: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. *Dtsch. Arztebl. Int.*, 2016, 113 (5), 72 – 81. Doi:10.3238/arztebl.2016.0072.

Weir, C. B., Le, J. K.: *Metronidazole. StatPearls*. StatPearls Publishing; 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539728/>. Accessed November 19, 2022.



NOVÁ GENERÁCIA LIEČIV NA BÁZE KMEŇOVÝCH BUNIEK

A NEW GENERATION OF DRUGS BASED ON STEM CELLS

Hudáková, Nikola; Maloveská, Marcela; Petroušková, Patrícia; Humeník, Filip;
Čížková, Daša

Centrum experimentálnej a klinickej regeneračnej medicíny
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice
Slovenská republika

nikola.hudakova@student.uvlf.sk

ABSTRAKT

Podľa najnovších poznatkov multipotentné mezenchýmové kmeňové bunky (MSC) ovplyvňujú mnohé patologické stavy vrátane ochorení a defektov nervového systému, čím predstavujú vhodných kandidátov pre bunkovú terapiu. Ich presná úloha a mechanizmus, akým pôsobia na viabilitu a neuroprotekciu buniek však ešte nie sú úplne objasnené. MSC sprostredkúvajú svoju funkciu najmä prostredníctvom parakrinného účinku, ktorý je zabezpečený uvoľnením rôznych bioaktívnych molekúl do kultivačného média, tzv. sekretómu. Experimentálne skúmanie interakcie sekretómu MSC s modelovými bunkovými líniami môže poskytnúť výsledky, ktoré sú klíčové pre testovanie novej generácie liečiv na báze buniek v prípade klinických skúšok s následným prenesením do klinickej praxe. V tejto štúdii sme izolovali MSC z ľudského popočníka, z Whartonovho rôsola (WJ-

-MSC), ktoré sme následne charakterizovali podľa kritérií Medzinárodnej spoločnosti pre bunkovú terapiu (ISSCR). Získané MSC sme použili na prípravu sekretómu, ktorého parakrinné účinky sme testovali na ľudskej bunkovej línii SH-SY5Y s neurogénnym charakterom. Na vyhodnotenie viability a proliferačného účinku sekretómu WJ-MSC (WJ-MSC CM) na bunky SH-SY5Y sme použili štandardný MTT test a xCELLigence systém (RTCA – Real-Time Cell Analysis) na analýzu buniek v reálnom čase.

WJ-MSC CM významne zvýšilo viabilitu a indukovalo proliferáciu SH-SY5Y, čo naznačuje, že s podrobnejšími štúdiami a klinickým skríningom by terapia sekretómom MSC mohla byť alternatívou liečbou ochorení nervového systému.

Klíčové slová: multipotentné mezenchýmové kmeňové bunky; nervový systém; sekretóm; Whartonov rôsol

ABSTRACT

According to the latest findings, multipotent mesenchymal stem cells (MSC) affect many pathological conditions, including diseases and defects of the nervous system, thus representing suitable candidates for cell therapy. However, their exact role and the mechanism by which they affect cell viability and neuroprotection are not yet fully understood. MSC mediate their function mainly through a paracrine effect, which is ensured by the release of various bioactive molecules into the culture medium, the so-called secretome. Experimental investigation of the interaction of the MSC secretome with model cell lines can provide results that are crucial for testing a new generation of cell-based drugs in the case of clinical trials with subsequent translation into clinical practice. In this study, we isolated MSC from the human umbilical cord, from Wharton's jelly (WJ-MSC), which we subsequently characterized according to the criteria of the International Society for Cell Therapy (ISSCR). We used the obtained MSC to prepare the secretome, whose paracrine effects we tested on the human cell line SH-SY5Y with a neurogenic character. We used standard MTT assay and xCELLigence RTCA (Real-Time Cell Analysis) real-time cell analysis to evaluate the viability and proliferative effect of WJ-MSC secretome (WJ-MSC CM) on SH-SY5Y cells; WJ-MSC CM significantly increased the viability and induced proliferation of SH-SY5Y, suggesting that with more detailed studies and clinical screening, MSC secretome therapy could be an alternative treatment for nervous system diseases.

Key words: multipotent mesenchymal stem cells; nervous system; secretome; Wharton's jelly

ÚVOD

Mezenchýmové stromálne kmeňové bunky (MSC) sú podskupinou heterogénnych nefhematopoetických

buniek, ktoré dokážeme získať z rôznych tkanív. Hoci sa za zlatý štandard zdroja MSC považuje kostná dreň (BM), perinatálne tkanivá, napríklad pupočníková krv (UCB) alebo Whartonov rôsol (WJ), sa považujú za atraktívne zdroje MSC, pretože ich možno získať menej invazívnymi metódami bez poškodenia donorov. Podľa ISSCR musia MSC splňať minimálne kritériá, a to mať schopnosť prilnúť k plastovým kultivačným miskám, ako aj trilíniový diferenciáčny potenciál (osteogénny, adipogénny a chondrogénny); a musia exprimovať povrchové markery CD29, CD90, CD105 a CD73 a nesmú exprimovať antigény bunkového povrchu CD45, CD34, CD14 alebo CD11b, CD79a alebo CD19 a HLA-DR (Dominici a kol., 2006).

Najnovšie štúdie sú zamerané na bioaktívne molekuly produkované MSC, všeobecne označované ako sekretóm (kondicionované médium, CM). Medzi tieto súbory faktorov/molekúl produkovaných MSC môžeme zaradiť rozpustné proteíny (napr. cytokíny, chemokíny a rastové faktory), lipidy a extracelulárne vezikuly, ktoré sú známe svojou schopnosťou podporovať prežívanie buniek, ich proliferáciu a differenciáciu, ale aj chrániť bunky pred oxidačným stresom alebo dokonca regulovať zápalové procesy (Mendes-Pinheiro a kol., 2019). Sekretóm získaný z MSC (kondicionované médium, MSC CM) ako súbor bioaktívnych látok a molekúl, ktoré tieto bunky vylučujú do extracelulárneho priestoru, je možným nástrojom v acelulárnej terapii centrálneho nervového systému (CNS) (Drago a kol., 2013). Účinok MSC CM *in vivo* bol sledovaný hned' v niekoľkých štúdiach, ktoré ukázali, že transplantované MSC (z rôznych zdrojov) boli schopné vylučovať dôležité trofické faktory, ako je epidermálny rastový faktor (EGF), vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF), neurotrofin-3, fibroblastový rastový faktor-2 (FGF-2), rastový faktor hepatocytov (HGF), mozgový neurotropický faktor (BDNF), stromálny faktor 1, glioívny neurotropický faktor (GDNF) (Drago a kol., 2013; Teixeira a kol., 2016).

Vzhľadom na skutočnosť, že MSC majú na základe sekrécie týchto trofických a neurotropických faktorov slúbný potenciál v terapii rôznych ochorení,

je teda dôležité skúmať interakciu a funkčný účinok vyučovaných faktorov na cielových bunkách. Preto sme sa v našej experimentálnej štúdii zamerali na analýzu účinku sekretómu WJ-MSC na bunkovú líniu ľudského neuroblastómu SH-SY5Y, bežne používanú ako modelovú bunkovú líniu s vlastnosťami ľudských neurónov.

MATERIÁL A METÓDY

Izolácia WJ-MSC

Výskum prebiehal v spolupráci s Nemocnicou AGEL Košice-Šaca, a. s. Pacienti poskytli informovaný písomný súhlas s použitím tkaniva pupočníka na výskumné účely (schválené etickou komisiou Nemocnice AGEL Košice-Šaca, a. s.). Humánné tkanivo pupočníka bolo získané za sterilných aseptických podmienok po pôrode placenty donoseného plodu v treťom trimestri cisárskym rezom. Pupočník bol dvakrát premytý pufrovaným fosfátom (PBS, Sigma Aldrich, USA) s obsahom antibiotika (Penicilín, Streptomycín, Sigma Aldrich, USA). Tkanivo bolo rozdelené na menšie kúsky ($5 - 10 \text{ mm}^3$) a po odstránení ciev a izolácie Whartonovho rôsola sme explantáty vložili do kultivačných Petriho misiek, kde sa kultivovali v podmienkach $5\% \text{ CO}_2$ a 37°C v kultivačnom médiu DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12 – Sigma Aldrich, USA), s obsahom 10 % fetálneho bovinného séra, 2 % antibiotík (Penicilín, Streptomycín, Sigma Aldrich, USA), kým bunky nemigrovali z explantátorov. Bunky boli pasážované po dosiahnutí 70 – 80 % konfluencie a ich charakterizácia prebiehala v tretej pasáži.

Trojliniová diferenciácia

Pre dokázanie chondrogénnej, osteogénnej a adipogénnej diferenciácie sa WJ-MSC kultivovali v STEM[®] (STEMPRO, Life Technologies, USA) diferenciačných médiách s diferenciačnými suplementmi podľa pokynov výrobcu kitu. Testované bunky boli kultivované v 24-jamkových platničkách a boli nasadené v koncentráции 30×10^3 buniek na jam-

ku. Média boli vymené za čerstvé každé 2 – 3 dni. Diferenciácia prebiehala po dobu 21 dní, následne sme bunky fixovali v 4 % paraformaldehyde a farbili Alizarínovou červenou (špecifické farbivo pre osteocyty), Alciánovou modrou (chondrocyty) a Oil red O (adipocyty).

Povrchové CD markery

Čistota a homogenita MSC bola overená použitím fluorescenčne označených protilátkov na prietokovom cytometri BD FACSCantoTM (Becton Dickinson Biosciences, USA), kde sme izolované bunky v tretej pasáži najskôr po premytí kultivovali s fluorescenčne značenými protilátkami CD29 (PE), CD44 (PE) a CD90 (PE) voči antigénom špecifickým pre MSC. Prítomnosť povrchových markerov bola hodnotená pomocou prietokového cytometra BD FACSCantoTM, analýza dát prebehla pomocou softvéru BD FACS DivaTM (Becton Dickinson Biosciences, USA).

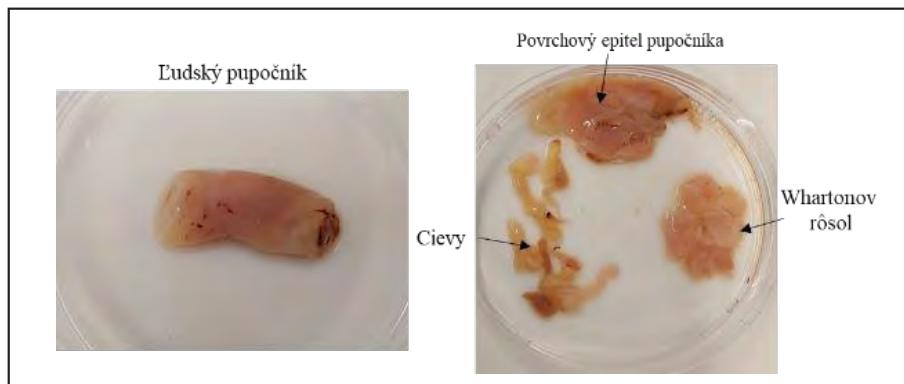
Príprava sekretómu

Bunky v tretej pasáži sme kultivovali do 90 % konfluencie v štandardnom kultivačnom médiu, ktoré sme potom nahradili médiom bez séra zloženým z DMEM F12 s príďavkom 2 % antibiotík (Penicilín/Streptomycín). Bunky sme inkubovali pri 37°C a $5\% \text{ CO}_2$. Po 30 hodinách bolo médium zozbierané a označené, následne centrifugované pri 2700 rpm. Takto pripravené médium sme označili ako MSC CM a uskladnili pri -80°C až do použitia v experimente.

Kultivácia SH-SY5Y

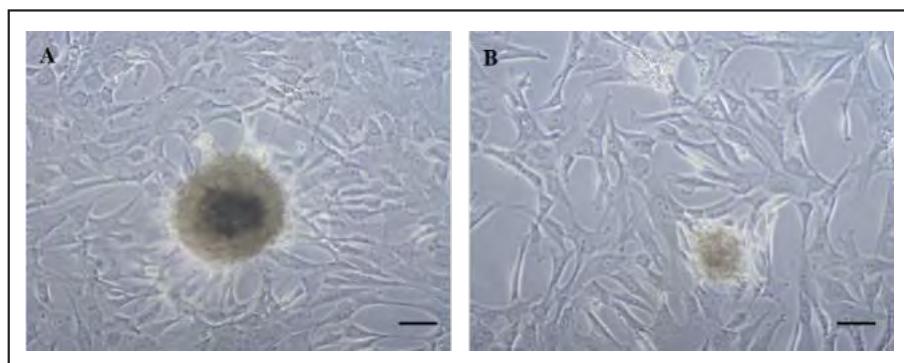
Humánná neuroblastómová línia SH-SY5Y bola poskytnutá Neuroimunologickým ústavom Slovenskej akadémie vied (NIU SAV, zakúpené z ATCC CRL-2266). Bunkovú kultúru sme udržiavalí za štandardných podmienok pri 37°C a $5\% \text{ CO}_2$, v médiu DMEM High glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium High glucose, Sigma Aldrich, USA) s obsahom 10 % FBS a 2 % antibiotík. V našich predchádzajúcich experimentálnych štúdiách sme s použitím štandardizovaných protokolov dokázali indukovať líniu SH-SY5Y do neurónov. Línia je citlivá na prítom-

Obr. 1: Disekcia humánneho popočníka



Mierka 1 cm

Obr. 2: Kultivácia MSC explantátovou metódou



A: migrácia MSC z tkaniva WJ deň kultivácie (day *in vitro*, DIV) 7. B: rozpadanie explantátu DIV 9. Mierka 50 µm.

nosť FBS, ktoré pri 10 % zabezpečuje podporu rastu buniek pri kultivácii, pretože obsahuje rastové faktory, proteíny, elektrolyty, lipidy, hormóny, enzymy a ďalšie zložky. Preto sme sa rozhodli v našej štúdii znížiť koncentráciu na 3 % a sledovať, či nami získa- ný sekretom dokáže simulovať funkciu séra, keďže obsahuje rastové faktory, proteíny a rôzne enzymy.

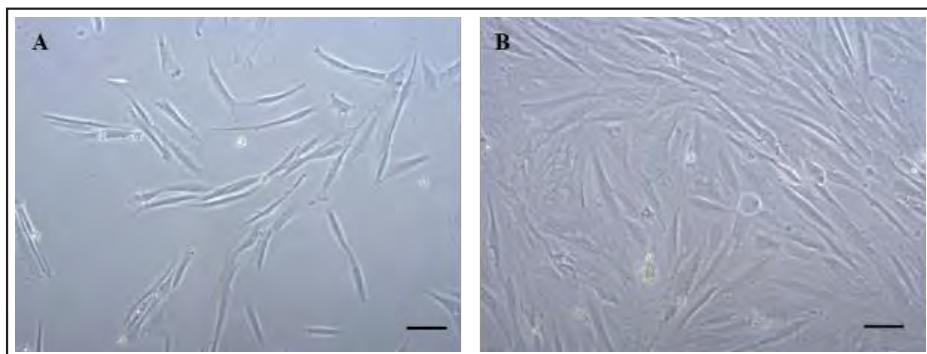
MTT test

Na stanovenie viability sme použili kolorimetrický MTT kit (Invitrogen, USA). Bunky SH-SY5Y boli nanesené na 96-jamkové platničky, hustota 2×10^3 buniek/jamku a kultivované v štandardnom kultivačnom médiu (DMEM High Glucose + 10 % FBS + 2 % antibiotík) pri 37 °C a 5 % CO₂. Po 24 hodinách

sme médium nahradili 100 µl čerstvého kultivačného média. Bunky v štandardnom médiu boli použité ako negatívna kontrola, jamky so štandardným médiom bez buniek boli považované za blank. V ďalšom kroku sa do každej jamky pridalo 10 µl 12 mM zásobného roztoku MTT a inkubovalo sa pri 37 °C počas 4 hodín. Na konci inkubačného času sme pridali 100 µl roztoku DMSO (dimethylsulfoxid), premiešali a inkubovali. Po 12 hodinách bol obsah každej jamky opatrne premiešaný a absorbancia bola meraná pri 572 nm pomocou spektrofotometra Synergy HT (Biotek, Winooski, VT, USA). Štatistické analýzy boli spracované pomocou t-testu, rozdiel p < 0,05 bol považovaný za štatisticky významný.

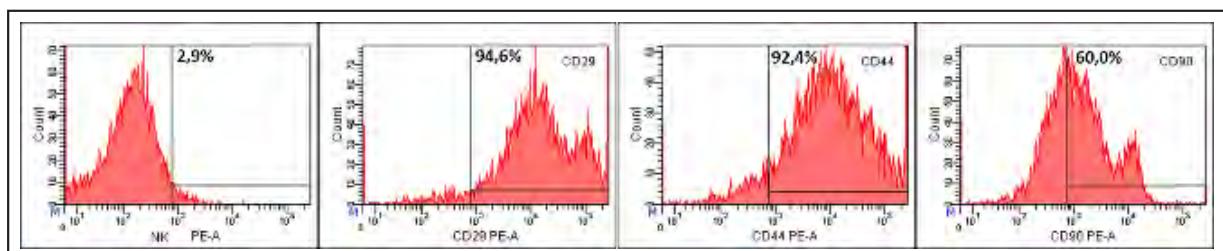
xCELLigence (Acea Bioscience, Inc., San Diego,

Obr. 3: Morfológia MSC



A: morfológia izolovaných humánnych WJ-MSC, bunky majú tvar podobný fibroblastom, pasáž 2 (P2) DIV 2, konfluencia 30 %. B: WJ-MSC P2, DIV 5, 80 % konfluencia buniek. Mierka 50 μ m.

Obr. 4: Imunofenotypizácia WJ-MSC



Výsledky analýzy prietokovou cytometriou ukázali, že WJ-MSC v tretej pasáži boli pozitívne na MSC markery CD29, CD44 a CD90. Negatívna kontrola predstavuje neznačené bunky.

CA, USA) je mikrofluidný systém navrhnutý tak, aby umožňoval nepretržité monitorovanie bunkovej adherencie v *in vitro* systéme pomocou merania impedancie v podobe tzv. bunkového indexu, ktorý predstavuje bunkovú adhéziu v jamkách. Dáta sme získali použitím softvéru xCELLigence verzie 1.2.1. Po kalibrácii prístroja sme SH-SY5Y bunky nasadili v denzite 2×10^3 buniek na jamku a 16-jamkové e-platne (Acea Bioscience, Inc. San Diego, CA, USA) sme vložili do xCELLigence systému po dobu 130 hodín.

VÝSLEDKY

Izolácia WJ-MSC

Ľudský pupočník je perinatálne tkanivo obsahujúce dve tepny a jednu žilu ako aj dve zóny: povrchový

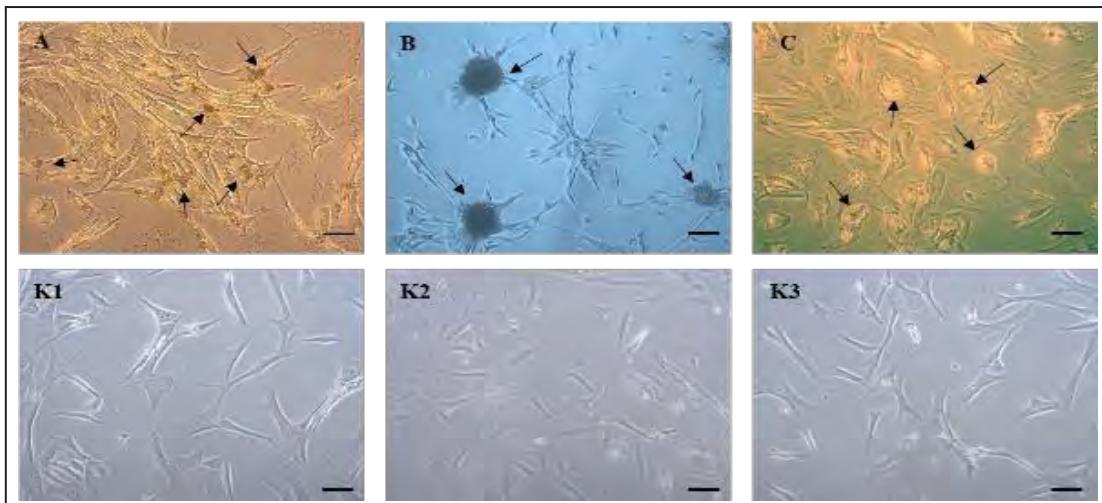
epitel a WJ (rôsolovitý materiál obklopujúci krvné cievky vo vnútri povrazca) (viď obr. 1).

V našich experimentoch sme izolovali mezenchymové kmeňové bunky z tkaniva WJ pomocou explantátovej metódy. Adherentné bunky boli pozorované po 7 – 8 dňoch kultivácie WJ explantátov, rast buniek z explantátov je znázornený na obr. 2. Tieto bunky boli považované za P1. Keď boli bunky P1 subkulтивované, vykazovali morfológiu podobnú fibroblastom.

Charakterizácia WJ-MSC

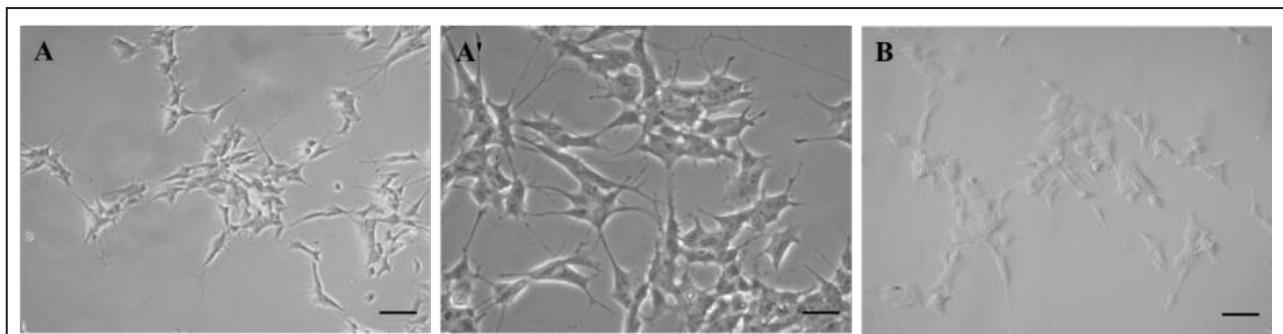
Na potvrdenie identity buniek sme *in vitro* charakterizovali MSC izolované z Whartonovho rôsola podľa minimálnych kritérií navrhnutých ISSCR. Po izolácii bunky adherovali na povrch kultivačnej fláše

Obr. 5: Multilíniová diferenciácia WJ-MSC



A: farbenie alizarínovou červenou dokázalo, že vo WJ-MSC sa po 3 týždňoch osteogénnej indukcie vytvorili kalciové depozity (indikované šípkami). B: po 3 týždňoch chondrogénnej indukcie boli bunky farbené alcianovou modrou; pozitívne (modro sfarbené) kyslé proteoglykány (šípky) indikovali tvorbu buniek podobných chondrocytom. C: intracelulárne farbenie Oil red O ukázalo menšiu tvorbu lipidových vakuol (znázornené šípkami) typických pre adipocyty po 3 týždňoch adipogénnej indukcie. Kontroly (K1, K2, K3) predstavujú bunky bez indukcie, mierka: 50 μ m.

Obr. 6: Bunková línia SH-SY5Y



Kultivované bunky SH-SY5Y v pasáži 16, DIV 2. Obrázok A' zobrazuje detail A. B znázorňuje DIC (diferenciálny interferenčný kontrast) fotografiu týchto buniek. Mierka 50 μ m (A, B), 20 μ m (A').

a vykázali morfológiu podobnú fibroblastom špecifickú pre MSC (vid' obr. 3).

Imunofenotypizácia

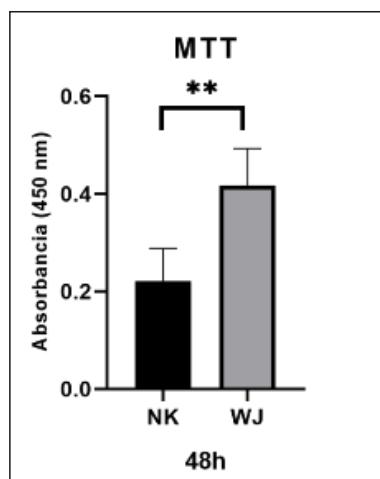
Izolované bunky v druhej pasáži boli charakterizované na expresiu povrchových markerov MSC buniek pomocou prietokovej cytometrie. WJ-MSC boli pozitívne na CD29, CD44 a CD90 (typické povrchové markery pre humánne MSC), percentá expresie

týchto markerov boli 94,6 % pre CD29; 92,4 % pre CD44 a 60,0 % pre CD90, negatívna kontrola vykazovala 2,9 % (vid' obr. 4).

Multilíniový diferenciačný potenciál

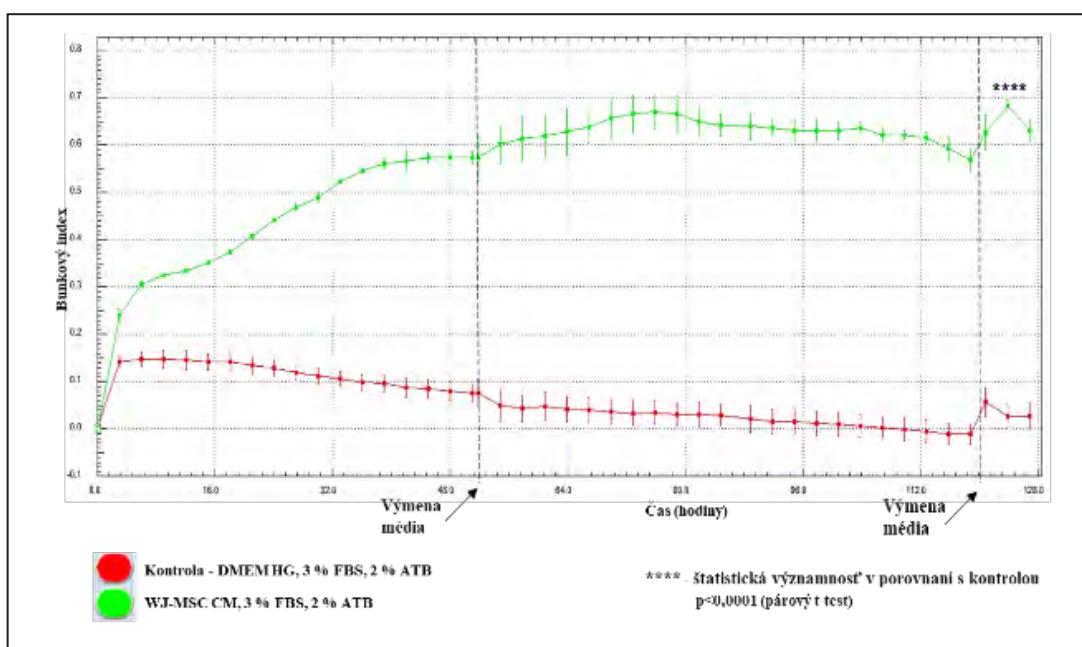
Na dokádzanie multilíniového diferenciačného potenciálu boli WJ-MSC bunky v druhej pasáži indukované smerom k adipogénnej, chondrogénnej a osteogénnej línii pomocou komerčného diferenciačného

Obr. 7: Výsledky MTT testu



Graf predstavuje výsledky porovnania viability SH-SY5Y po 48 hodinách inkubácie v WJ-MSC CM (WJ-MSC CM, 3 % FBS, 2 % ATB) a v kontrolnom médiu (DMEM HG, 3 % FBS, 2 % ATB). Štatisticky významný rozdiel – hodnota $P < 0.01$ (**).

Obr. 8: XCELLligence – RTCA analýza



xCELLligence RTCA analýza. Výsledky RTCA analýzy, kde boli SH-SY5Y bunky 130 hodín (výmena média po 48 a 120 hodinách) kultivované v WJ-MSC CM (WJ-MSC CM, 3 % FBS, 2 % ATB) a v kontrolnom médiu (DMEM HG, 3 % FBS, 2 % ATB) ukazujú, že v skupine WJ-MSC CM bola proliferácia výrazne vyššia. Už od tretej hodiny od začiatku experimentu sme zaznamenali zvýšenie proliferácie v skupine buniek kultivovaných vo WJ-MSC CM oproti kontrole, v priemere vykazovala táto skupina približne 5,44-násobný nárast počas celej doby monitorovania.

kitu (StemPro). Populácia WJ-MSC sa úspešne diferencovala smerom k chondrogénnej a osteogénnej línií, čo bolo identifikované farbením alizarínovou červenou reagujúcou s depozitmi vápnika (viď obr. 5A) a farbením alciánovou modrou interagujúcou s proteoglykánmi typickými pre zrelé chondrocyty (viď obr. 5B). Bunky vykazovali slabší potenciál diferencovať sa smerom k adipogénnej línií, čo bolo dokázané farbením olejovou červenou O identifikujúcou tvorbu lipidových vakuol (viď obr. 5C). Celkovo tiež to výsledky naznačujú, že kultivované WJ-MSC mali potenciál diferencovať sa na mezodermálne línie, čo patrí k charakteristickým črtám MSC.

MTT

Vplyv WJ-MSC CM na viabilitu bunkovej línie SH-SY5Y (viď obr. 6) sme určili pomocou MTT testu po 48 hodinách. Z obr. 7 vyplýva, že kultivácia buniek vo WJ-MSC CM signifikantne zvýšila prežívanie buniek SH-SY5Y, pričom viabilita a proliferácia v skupine WJ-MSC CM bola 1,88-násobne vyššia ako pri negatívnej kontrole (DMEM, FBS, ATB).

RTCA (xCELLigence Real-Time Cell Analysis)

Hodnoty bunkového indexu (CI) získané pomocou systému xCELLigence RTCA počas 130 hodín ukázali, že WJ-MSC CM významne zvýšilo proliferáciu neuroblastómovej bunkovej línie. Obr. 8 znázorňuje fakt, že proliferácia SH-SY5Y buniek bola signifikantne zvýšená oproti kontrole.

DISKUSIA

Najnovšie pokroky vo výskume kmeňových buniek nielen zlepšili pochopenie základných vývojových procesov, ale tiež otvárajú dvere využitiu kmeňových buniek v biotechnológii, farmaceutických odvetviach, v bunkovej terapii, regeneračnej medicíne a tkanivovom inžinierstve (Beeravolu a kol., 2017).

Mezenchýmové stromálne perivaskulárne bunky (MSC) patria medzi hlavné typy buniek používané v regeneračnej medicíne a predstavujú sľubný terapeutický nástroj pre mnohé v súčasnosti nevyriešiteľ-

né ochorenia. MSC, ktoré boli prvýkrát izolované z kostnej drene, je možné izolovať z takmer akéhokoľvek dospelého tkaniva, vrátane tuku, periférnej krvi, svalov, kože a zubov, okrem toho tiež z neonatálnych tkanív, ako je pupočník (Whartonov rôsol a pupočníková krv), amnion a placenta (Friedenstein a kol., 1970; Soares a kol., 2022). MSC predstavujú heterogénnu populáciu multipotentných samoobnovujúcich sa buniek podobných fibroblastom. Napriek spoločným charakteristikám MSC buniek určeným ISSCR sú medzi MSC izolovanými z rôznych zdrojov rozdiely, ktoré ovplyvňujú ich použiteľnosť. V súčasnosti je kostná dreň (BM) v klinických štúdiách najvyužívanejším zdrojom MSC, po nej nasleduje pupočná šnúra (UC) a tukové tkaniwo (AT).

V našej štúdii sme ako zdroj pre primárnu kultúru MSC využili humánne perinatálne (extraembryonálne) tkaniwo Whartonovho rôsola (WJ). Pupočník spájajúci plod s placentou je pomerne veľký orgán s odlišnými anatomickými časťami, vrátane dvoch tepien, žily, WJ (tkaniwo obklopujúce krvné cievky) a povrchového epitelu (Beeravolu a kol., 2017). Tkanivo pupočníka je bohatým zdrojom cytokínov a rastových faktorov, ako sú bFGF, doštičkový rastový faktor (PDGF), EGF, transformujúci rastový faktor β (TGF- β) a inzulínový rastový faktor 1 (IGF-1) s najvyššou koncentráciou (takmer 350 ng na 1 g WJ). TGF- β , α -FGF a β -FGF sa objavujú v desiatkach nanogramov, ich množstvo je oproti IGF-1 výrazne nižšie. PDGF a EGF boli namerané v pikogramových koncentráciách (Hendijani, 2017). Niekoľko štúdií uvádzá izoláciu MSC z celého pupočníka, WJ alebo z placenty s variabilným proliferáčnym a differenciačným potenciáлом pomocou metódy enzymatickej digescie (enzymatická metóda), explantátovej metódy alebo kombinovanej metódy (enzymatickej a explantátovej) (Beeravolu a kol., 2017; Hendijani, 2017). V našej štúdii sme použili explantátovú metód. Týmto spôsobom izolované MSC vykazujú podľa autorov podobné charakteristiky ako tie, ktoré sú získané enzymatickým štiepením. Metóda používajúca explantáty má však v porovnaní s použitím enzymov niekoľko výhod. Pri izolácii explantátov nepôsobí na

bunky proteolytický stres a bunky sú v úzkom kontakte s inými bunkami pôvodného tkaniva, čo zvyšuje pravdepodobnosť úspešnej izolácie primárnej kultúry s vysokým výťažkom. Nižšia cena a menšie riziko biologickej kontaminácie sú ďalšími výhodami, ktoré potvrdzujú, že výber explantátovej metódy izolácie MSC vo výskume a klinickom prostredí je v porovnaní s enzymatickou metódou dobrou voľbou (El Omar a kol., 2014; Beeravolu a kol., 2017; Hendijani, 2017). Pozorovali sme, že disekcia tkaniva WJ na približne 10 mm kúsky bola optimálna pre izoláciu buniek, pričom bunky v tvare fibroblastov sa objavili 7 – 8 dní po izolácii. Bunky migrovali z explantátu do okolitého prostredia s pomerne vysokým výťažkom izolácie a dobrou proliferačnou kapacitou.

Štandardom pre charakterizáciu MSC je preukázanie schopnosti buniek prilnúť k plastu, morfológia podobná fibroblastom a diferenciácia do viacerých línii (Dominici a kol., 2006). V našej štúdii boli WJ-MSC morfologicky podobné fibroblastom, adherentné ku povrchu kultivačných plastov a exprimovali mezenchýmové povrchové markery CD29, CD44 a CD90 (94,6 % pre CD29; 92,4 % pre CD44 a 60,0 % pre CD90, negatívna kontrola 2,9 %). Tieto výsledky sú v súlade s predchádzajúcimi štúdiami UC-MSC a WJ-MSC. Nízka pozitivita CD 90 (THY-1) môže byť spôsobená vysokou expresiou CD44 (Campioni a kol., 2009). Štúdie tiež popísali stratu CD90 ako proces, ktorý môže zvýšiť diferenciáčny potenciál MSC (Humenik a kol., 2022). Expressia povrchových markerov, ako aj multilíniový a proliferačný potenciál závisí od zdroja izolácie MSC a pasáže buniek (Maleki a kol., 2014; Humenik a kol., 2022). Tiež je známe, že ako marker dospelých kmeňových buniek je CD90 spojený s imunomodulačnou funkciou a diferenciáciou na adipogénnu a osteogénnu bunkovú líniu. Absencia alebo nízka pozitivita CD90 v prípade WJ-MSC môže byť spojená s nízkymi imunosupresívnymi vlastnosťami MSC (Maleki a kol., 2014). Vďaka svojim imunosupresívnym vlastnostiam sa MSC používajú na liečbu akútnej fázy choroby štěpu proti hostiteľovi (GvHD), taktiež sa skúma ich účinnosť v klinických skríningsoch v terapii ďalších autoimunit-

ných ochorení (Crohnova choroba, ALS) (Harman a kol., 2021).

Nami izolované WJ-MSC vykazovali trojlíniový diferenciáčny potenciál (t. j. smerom k adipogénnnej, chondrogénnnej a osteogénnnej líni), aj keď diferenciáčny potenciál na adipocyty bol slabý. To koreluje s prácami niektorých autorov popisujúcich súvis s nízkou expresiou CD90 (Humenik a kol., 2022). Nízky diferenciáčny potenciál k adipogénnnej líni môže súvisieť s vysokým počtom CD29 pozitívnych buniek v populácii, pretože publikácie uvádzajú, že zvýšená expressia CD29 má vplyv na zníženú adipogénnu diferenciáciu (Humenik a kol., 2022). Okrem toho treba spomenúť aj bioaktívne molekuly sprostredkujúce osteogenézu a potláčajúce adipogenézu, ako sú Wnt10b, RhoA a Runx2 (Kozlowska a kol., 2019; Humenik a kol., 2022).

MSC majú slúbný terapeutický potenciál v liečbe mnohých ochorení. Terapeutický potenciál MSC sa pripisuje ich schopnosti migrovať na miesto poškodenia, viaclínovej diferenciácií a najmä parakrinnnej funkcie. MSC môžu migrovať do poškodených tkanív a diferencovať sa na niektoré funkčné bunky. Namiesto náhrady poškodených buniek však MSC prispievajú k reparácii tkaniva hlavne parakrinným pôsobením ich sekretómu, ktorý obsahuje širokú škálu imunomodulačných, angiogénnych, antiapoptotických a rastových faktorov, ktoré podporujú prežitie buniek a regeneráciu tkaniva. Tieto vlastnosti MSC z nich robia slúbných kandidátov na liečbu neurologických ochorení práve moduláciou zápalového mikroprostredia poraneného/degenerujúceho nervového tkaniva (Soares a kol., 2022).

V súčasnosti je globálne zaregistrovaných viac ako 1 000 klinických štúdií s MSC, ktoré umožňujú skúmať bezpečnosť aplikácie SC. Pochopenie základného molekulárneho mechanizmu MSC v rôznych patologických stavoch je pre dosiahnutie optimálneho krátkodobého a dlhodobého terapeutického prínosu klúčové (Harman a kol., 2021). Fakt, že faktory využívané MSC sú zodpovedné za pozitívne účinky MSC pri oprave tkanív položil základ pre skúmanie nového typu terapie pomocou MSC, ktorá ale nevy-

žaduje podanie samotných buniek, čím sa predchádza negatívnym imunitným reakciám alebo nežiaducej tumorogenicite.

Sekretóm buniek je zmesou rozpustných faktorov, molekúl, extracelulárnych vezikúl, lipidových častíc rôznej veľkosti, ako aj proteínov a nukleových kyselín uvoľňovaných bunkami do extracelulárneho priestoru. Ropustné faktory, ako sú nukleové kyseliny, proteíny a lipidy, možno detegovať v bunkovom sekretóme pri rôznych koncentráciách a úrovniach aktivity určených typom bunky a prostredí. Sekretóm humánnych MSC nie je výnimkou a bol charakterizovaný ako zmes extracelulárnych vezikúl (EV), množstva regulačných nekódujúcich RNA ako aj množstva proteínov vrátane rastových faktorov, cytokínov, peptidov, hormónov a lipidových mediatátorov (Harman a kol., 2021). Účinnosť sekretómu MSC *in vivo* bola skúmaná v niekoľkých štúdiach, ktoré ukázali, že podané MSC (z rôznych zdrojov) boli schopné vyuľučovať dôležité trofické faktory, ako je EGF, VEGF, neurotrofín-3, FGF-2, HGF, BDNF, stromálny faktor 1, GDNF, IGF-1, TGF- β 1, PGF, stromálny rastový faktor (SDF-1/CXCL12), monocytový chemoatraktant proteín-1 (MCP-1/CCL2), interleukíny IL-6, IL-8, IL-10 a IL-13. Sekretóm získaň z rôznych bunkových populácií je heterogénny. Uvádzia sa, že MSC izolované z tukového tkaniva majú vyššiu mRNA expresiu VEGF-D, IGF-1 a IL-8, zatiaľ čo bunky z dermálnej papily vyuľučujú vyššie koncentrácie CCL2 a leptínu. Okrem toho Du a kol. zistili zvýšené hladiny expresie HGF (hepatocytový rastový faktor), bFGF, IL-6, IL-8, IL-1 α a IL-1 β v placentárnych MSC, množstvo VEGF-A, NGF však bolo najvyššie u buniek z kostnej drene (Du a kol., 2016). MSC teda vyuľučujú množstvo faktorov, ktoré by mohli podporovať angiogenézu a neurogenézu, predchádzať apoptóze a modulovať zápalové reakcie. Sekretóm MSC má preto veľký potenciál v regeneračnej terapii ochorení, ako sú amyotrofická laterálna skleróza, roztrúsená skleróza, traumatické poranenie mozgu, mozgová príhoda, poranenie miechy, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a Huntingtonova choroba (Harman a kol., 2021).

MSC vyuľučujú množstvo trofických faktorov, vrátane neurotrofických faktorov, ktoré ovplyvňujú viabilitu, proliferáciu, diferenciáciu, prežívanie, reparáciu a bunkovú smrť neurálnych (neurónov a gliových) buniek (Soares a kol., 2022). V našej štúdii sme funkčnými analýzami potvrdili účinok sekretómu získaného z WJ-MSC (WJ-MSC CM) na viabilitu bunkovej línie SH-SY5Y. Bunkové línie ľudského neuroblastómu, ako je SH-SY5Y, sú široko používaným modelovým systémom *in vitro* a využívajú sa v neurovedách na množstvo aplikácií vrátane testov viability buniek, skúmanie ultraštruktúry neurónov, štúdium neurofiziologie a testovanie farmakologických prípravkov (Strother a kol., 2021). Práca s líniemi neuronálnych buniek je oproti použitiu primárnej kultúry neurónov výhodná hned' v niekoľkých aspektoch. Okrem faktu, že v prípade bunkových línií odpadajú etické problémy, ktoré nastávajú pri izolácii primárnych neurónov zo zvierat, hlavnou výhodou práce s bunkami SH-SY5Y je ich ľudský pôvod. Exprimujú teda ľudskú formu proteínov relevantných pre ochorenie na pozadí ľudskej proteínovej a génovej expresie. Môžu sa tiež kultivovať vo veľkých množstvách, čo je výhodné pre biochemickú manipuláciu aj analýzu (Strother a kol., 2021).

V našej práci sme na analýzu viability SH-SY5Y v rôznych podmienkach použili štandardný MTT test ako aj xCELLigence systém, aby sme získané výsledky potvrdili viacerými analýzami a sledovali, či výsledky korelujú, keďže MTT patrí k zlatým štandardom v štúdiu testovania viability buniek. Nami namenané dátá z MTT proliferačného testu po 48-hodinovej inkubácii ukázali, že WJ-MSC CM (WJ-MSC CM, 3 % FBS, 2 % ATB) signifikantne ($p < 0,05$) zvýšilo viabilitu SH-SY5Y buniek v porovnaní s kontrolou skupinou kultivovanou v DMEM (DMEM HG, 3 % FBS, 2 % ATB). Tieto výsledky sme potvrdili aj skúmaním viability a proliferačnej kapacity WJ-MSC CM v reálnom čase na RTCA analýze, kde sme neuroblastómy kultivovali po dobu 130 hodín v WJ-MSC CM, 3 % FBS a 2 % ATB, s tým, že médium bolo menené po 48 a 120-tich hodinách. Zaznamenaním bunkového indexu sme zistili, že použitie

WJ-MSC CM signifikantne ($p < 0,0001$) zvýšilo adherenciu a proliferáciu buniek SH-SY5Y v porovnaní s kontrolou kultivovanou v rovnakých podmienkach v kultivačnom médiu DMEM (DMEM HG, 3 % FBS, 2 % ATB). Naše výsledky podporujú rôzne *in vitro* a *in vivo* štúdie. Sart a kolegovia (2014) pozorovali, že sekretóm z ľudských BM-MSC bol schopný zvýšiť viabilitu, proliferáciu, migráciu a prerastanie neuritov neurálnych progenitorových buniek. Hoci mechanizmy, ktorými sekretóm MSC moduluje správanie neurálnych progenitorov, zostávajú stále nejasné, z molekulárneho hľadiska štúdie predpokladajú, že viabilitu, proliferáciu a diferenciáciu neurálnych progenitorov riadi siet' viacerých signálnych dráh a transkripcívnych regulačných mechanizmov (Teixeira a kol., 2016). Signálna dráha Notch je jednou z dráh schopných regulovať prežívanie, proliferáciu a diferenciáciu neurálnych kmeňových buniek. Okrem toho sa aktivácia Notch signalizácie podieľa aj na dozrievaní neurónov, indukcii prerastania neuritov a prevencii apoptózy (Wang a kol., 2009; Teixeira a kol., 2016). Podľa Eleuteri a Fierabracci (2019) MSC modulujú tiež syntázu oxidu dusnatého (NOS), ktorá produkuje oxid dusnatý (NO), ten je schopný inhibovať bunkový cyklus prostredníctvom dráhy JAK-STAT (Janus kináza/modulátory signálu a aktivátory transkripcie); okrem toho moduluje aktivitu MAPK (mitogénom aktivovaná proteínska kináza). Autori uvádzajú, že signálna dráha MAPK sa podieľa na regulácii viabilitu, bunkovej proliferácie, prežívania a diferenciácie v embryonálnom vývoji a študuje sa jej úloha pri neurodegeneratívnych ochoreniach (Jiao a kol., 2017; Eleuteri, a Fierabracci, 2019). Experimenty *in vivo* ukázali, že aplikácia sekretómu z BM-MSC bola schopná zvýšiť bunkovú viabilitu a proliferáciu u hlodavcov 7 dní po ich injekcii, podľa hodnotenia počtu Ki-67 pozitívnych buniek. Podobné dáta boli namerané aj (s BrdU pozitívnymi bunkami) v iných prácach, kde sa porovnávalo injekčné podanie MSC izolovaných z tkaniva pupočníka alebo ich sekretómu hlodavcom (Teixeira a kol., 2016). Pre lepšiu predstavu, ktoré faktory prítomné v sekretóme MSC sú dôležité pre viabilitu, prežívanie, neuroproliferáciu, neu-

ronálnu diferenciáciu a neuroregeneráciu, intenzívne a cielene sa študuje proteomické zloženie sekretómu MSC. Proteomická analýza dokázala, že MSC vylučujú aktívne molekuly a trofické faktory vplývajúce na neurálne bunky ako napríklad VEGF, BDNF, IL-6, neurotrofin-3 a GDNF (Teixeira a kol., 2016). Údaje však naznačujú, že stimulácia neurogenézy *in vitro* aj *in vivo* nezávisí od prítomnosti jedného sekretovaného faktora, ale kombinácie niekoľkých faktorov súčasne (Teixeira a kol., 2016). Výsledky našej *in vitro* štúdie korelujú s týmito štúdiami, čo len dokazuje, že skúmanie a získavanie nových poznatkov o sekrecii a vzájomnej interakcii týchto rozpustných faktorov a ich neurogénnych účinkoch, môže viesť k návrhu nových terapeutických stratégii pri liečbe neurologickej porúch alebo neurodegeneratívnych ochorení.

ZÁVER

Naša štúdia je zameraná na hodnotenie účinku WJ-MSC sekretómu na SH-SY5Y bunkách. Izolovali sme WJ-MSC bunky z ľudského pupočného povrazca, ktoré sme následne charakterizovali pomocou kritérií ISSCR a dokázali sme schopnosť adherencie, expresie vybraných povrchových markerov a schopnosť trojliniovej diferenciácie *in vitro*. Následne sme z našich buniek získali sekretóm, ktorým sme ovplyvňovali rast SH-SY5Y buniek. MTT analýza ako aj xCELLigence RTCA analýza ukázali, že sekretóm z WJ-MSC buniek významne zvyšuje *in vitro* viabilitu a proliferáciu neuroblastómovej línie.

Celkovo naše výsledky naznačujú, že použitie sekretómu WJ-MSC môže byť inovatívnym nástrojom na liečbu ochorení nervového systému, pretože sekretóm je schopný modulovať viabilitu a proliferáciu bunkovej línie ľudského neuroblastómu. Efektivita sekretómu MSC je popísaná v množstve *in vitro* ako aj *in vivo* štúdií, čo potvrdzuje potenciál sekretómu ako inovatívnej formy liečby. Na potvrdenie dát získaných štúdiami *in vitro* a *in vivo* sú však potrebné rozsiahle klinické štúdie, ktoré by umožnili preniesť získané poznatky do klinickej praxe.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola podporená grantom APVV-19-0193: Noví hráči v nanoterapii neurodegeneračných ochorení: kondiciované médium (KM) a extracelulárne vezikuly (EV) somatických kmeňových buniek, VEGA 1/0376/20: Sekretóm a extracelulárne vezikuly kmeňových buniek vo vzťahu ku neuroregenerácii a neuroplasticite. Systém xCELLigence bol použity vďaka podpore Národného referenčného laboratória pre pesticídy Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

ZOZNAM LITERATÚRY

Beeravolu, N., McKee, C., Alamri, A., Michael, S., Brown, C., Perez-Cruet, M., Chaudry, G. R.: Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta. *J. Vis. Exp.*, 2017, 3 (122), 55 224.

Campioni, D., Rizzo, R., Stignani, M., Melchiorri, L., Ferrari, L., Moretti, S., Russo, A., Bagnara, G. P., Bonsi, L., Alviano, F., Lanzoni, G., Cuneo, A., Baricordi, O. R., Lanza, F.: A decreased positivity for CD90 on human mesenchymal stromal cells (MSCs) is associated with a loss of immunosuppressive activity by MSCs. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2009, 76 (3), 225 – 230.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, 8 (4), 315 – 317.

Drago, D., Cossetti, C., Iraci, N., Gaude, E., Musco, G., Bachi, A., Pluchino, S.: The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie*, 2013, 95 (12), 2271 – 2285.

Du, W. J., Chi, Y., Yang, Z. X., Li, Z. J., Cui, J. J., Song, B. Q., Li, X., Yang, S. G., Han, Z. B., Han, Z. Ch.: Heterogeneity of proangiogenic features in mesenchymal stem cells derived from bone

marrow, adipose tissue, umbilical cord, and placenta. *Stem Cell Research & Therapy*, 2016, 7, 163.

El Omar, R., Beroud, J., Stoltz, J.-F., Menu, P., Velot, E., Decot, V.: Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2014, 20 (5), 523 – 544.

Eleuteri, S., Fierabracci, A.: Insights into the secretome of mesenchymal stem cells and its potential applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (18), 4597.

Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., Lalykina, K. S.: The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*, 1970, 3, 393 – 403.

Harman, R. M., Marx, C., Van de Walle, G. R.: Translational animal models provide insight into mesenchymal stromal cell (MSC) secretome therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9, 654 885. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.654885>. Accessed April 20, 2023.

Hendijani, F.: Explant culture: an advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell Proliferation*, 2017, 50, e12334.

Humenik, F., Maloveska, M., Hudakova, N., Petrouskova, P., Hornakova, L., Domaniza, M., Mudronova, D., Bodnarova, S., Cizkova, D.: A comparative study of canine mesenchymal stem cells isolated from different sources. *Animals (Basel)*, 2022, 12 (12), 1502.

Jiao, Q., Li, X., An, J., Zhang, Z., Chen, X., Tan, J., Zhang, P., Lu, H., Liu, Y.: Cell-cell connection enhances proliferation and neuronal differentiation of rat embryonic neural stem/progenitor cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2017, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2017.00200>. Accessed April 20, 2023.

Kozlowska, U., Krawczenko, A., Futoma, K., Jurek, T., Rorat, M., Patrzalek, D., Klimczak, A.: Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human

- tissues. *World Journal of Stem Cells*, 2019, 11 (6), 347 – 374.
- Maleki, M., Ghanbarvand, F., Reza Behvarz, M., Ejtemaei, M., Ghadirkhomi, E.: Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int. J. Stem Cells*, 2014, 7 (2), 118 – 126.
- Mendes-Pinheiro, B., Anjo, S. I., Manadas, B., Da Silva, J. D., Marote, A., Behie, L. A., Teixeira, F. G., Salgado, A. J.: Bone marrow mesenchymal stem cells' secretome exerts neuroprotective effects in a Parkinson's disease rat model. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00294>. Accessed April 20, 2023.
- Sart, S., Liu, Y., Ma, T., Li, Y.: Microenvironment regulation of pluripotent stem cell-derived neural progenitor aggregates by human mesenchymal stem cell secretome. *Tissue Engineering Part A*, 2014, 20 (19 – 20), 2666 – 2679.
- Soares, M. B. P., Gonçalves, R. G. J., Vasques, J. F., da Silva-Junior, A. J., Gubert, F., Santos, G. C., de Santana, T. A., Almeida Sampaio, G. L., Nascimento Silva, D., Dominici, M., Mendez-Otero, R.: Current status of mesenchymal stem/stromal cells for treatment of neurological diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2022, 15. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2022.883378>. Accessed April 20, 2023.
- Strother, L., Miles, G. B., Holiday, A. R., Cheng, Y., Doherty, G. H.: Long-term culture of SH-SY5Y neuroblastoma cells in the absence of neurotrophins: A novel model of neuronal ageing. *J. Neurosci. Methods*, 2021, 362, 109 301.
- Teixeira, F. G., Panchalingam, K. M., Assunção-Silva, R., Serra, S. C., Mendes-Pinheiro, B., Patrício, P., Jung, S., Anjo, S. I., Manadas, B., Pinto, L., Sousa, N., Behie, L. A., Salgado, A. J.: Modulation of the mesenchymal stem cell secretome using computer-controlled bioreactors: impact on neuronal cell proliferation, survival and differentiation. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 27 791.
- Wang, Y., Tu, W., Lou, Y., Xie, A., Lai, X., Guo, F., Deng, Z.: Mesenchymal stem cells regulate the proliferation and differentiation of neural stem cells through Notch signaling. *Cell Biology International*, 2009, 33 (11), 1173 – 1179.



VPLYV KONZUMÁCIE TOKAJSKÉHO VÍNA NA METABOLIZMUS A BIOCHEMICKÝ PROFIL KRVI

THE EFFECT OF TOKAJ WINE CONSUMPTION ON METABOLISM AND BLOOD BIOCHEMICAL PROFILE

Megyesy Eftimová, Zuzana²; Eftimová, Jarmila¹

¹Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky

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

²Fatranská 10, 949 01 Nitra

jamila.eftimova@uvlf.sk

ABSTRAKT

Cieľom krátkodobej, dvojtýždňovej štúdie bolo vyhodnotenie metabolickej reakcie na konzumáciu 150 ml vína „Tokajský výber 4-putňový“ počas večere u zdravých dospelých mužov a ako tátó konzumácia ovplyvnila ich biochemický profil krvi. Reprezentatívnu vzorku tvorili zdraví, dospelí muži ($n = 10$), vo veku od 21 do 29 rokov. Probandi boli nefajčiai alebo fajčili do päť cigaret denne, neužívali lieky, výživové doplnky, do-držiavali abstineniu, nemenili stravovacie návyky, denne vypĺňali nutričný protokol a vykonávali bežné činnosti. V krvnej plazme probandov sme merali biochemické parametre, ktoré sú konzumáciou alkoholu najviac ovplyvňované. Merali sme hladinu glukózy (GLU), aspartátaminotransferázy (AST), alanínaminotransferázy (ALP), gama-

-glutamyltransferázy (GMT), alkalickú fosfatázu (ALP), celkový cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C), LDL-cholesterol (LDL-C), triacylglyceroly (TAG) a vysoko senzitívny C-reaktívny proteín (hsCRP). Namerané hodnoty sme porovnali s referenčnými hodnotami pre zdravých, dospelých mužov. Z výsledkov krátkodobej, dvojtýždňovej štúdie vyplynulo, že konzumácia 150 ml vína „Tokajský výber 4-putňový“ počas večere nevyvolala metabolickú reakciu, ktorá by výrazne ovplyvnila biochemické parametre krvi. Konzumácia vína mierne zvyšovala alebo znížovala hodnoty GLU, AST, ALP, ALT, GMT, TC, TG, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu a hsCRP oproti kontrole, avšak priemerné hodnoty zostávali v rozsahu referenčných hodnôt pre zdravých, dospelých mužov. Vyššie hladiny TG nad referenčnú hodnotu sme zaznamenali pri probandovi 7 (z 0,91 na 1,91

mmol.l⁻¹) a probandovi 10 (z 1,04 na 1,95 mmol.l⁻¹). Medzi aktivitami enzýmov AST a ALT sme zaznamenali vysokú vzájomnú koreláciu. Z hľadiska zachovania zdravia a dynamickej rovnováhy organizmu je veľmi dôležité zistenie, že krátkodobá umiernená konzumácia vína „Tokajský výber 4-putňový“ spolu s jedlom výrazne neovplyvňuje biochemické parametre v krvi.

Kľúčové slová: biochémia krvi; metabolický vplyv; probandi; tokajské víno

ABSTRACT

The aim of the short-term, two-week study was to evaluate the metabolic response to the consumption of 150 ml of “Tokaj Selection 4-Putna” wine during dinner in healthy adult males and how it affected their blood biochemical profile. The representative sample consisted of healthy, adult males ($n = 10$), aged between 21 and 29 years. The probands were nonsmokers or smoked up to five cigarettes per day, did not take medications or nutritional supplements, maintained abstinence, did not change their dietary habits, completed a daily nutritional log, and performed normal activities. We measured biochemical parameters in the blood plasma of probands that are most affected by alcohol consumption. We measured glucose (GLU), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALP), gamma-glutamyltransferase (GMT), alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol [HDL-cholesterol (HDL-C)], low-density lipoprotein cholesterol [LDL-cholesterol (LDL-C)], triacylglycerols (TAG), and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP). The measured values were compared with reference values for healthy, adult males. The results of a short-term, two-week study showed that consumption of 150 ml of “Tokaj Selection 4-Putna” wine during dinner did not induce a metabolic response that would significantly affect blood biochemical parameters. Wine

consumption slightly increased or decreased GLU, AST, ALP, ALT, GMT, TC, TG, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and hsCRP values compared to the control, but the mean values remained within the reference range for healthy adult males. Higher TG levels above the reference value were observed in Proband 7 (from 0.91 to 1.91 mmol.l⁻¹) and Proband 10 (from 1.04 to 1.95 mmol.l⁻¹); we observed a high correlation between AST and ALT enzyme activities. From the point of view of preserving the health and dynamic balance of the organism, the finding that short-term moderate consumption of “Tokaj Selection 4-Putna” wine together with food does not significantly affect the biochemical parameters in the blood is very important.

Key words: blood biochemistry; metabolic influence; probands; tokaj wine

ÚVOD

Alkoholické nápoje sa používali v rôznych kultúrach ako dôležitá zložka medicíny (Kang a kol., 2023). Víno je prírodný, viaczložkový, priebežne zrejúci alkoholický nápoj vyrobený z hrozna a jeho kvalitu a charakter ovplyvňuje odroda, pôda, priebeh počasia, agrotechnika, technológia spracovania hrona, výroba vína a samotné uskladnenie (Eftimová, Z., 2019). V ostatnom období rastie záujem vedcov o víno ako biologický nápoj a bioaktívne zložky, ktoré ovplyvňujú zdravie človeka (Haseeb a kol., 2019).

Výroba vína z hroznového muštu je náročný biochemický proces vzájomných interakcií medzi kvasinkami, baktériami kyseliny mliečnej a baktériami kyseliny octovej. Činnosťou mikroorganizmov dochádza k uvoľňovaniu rôznych metabolítov, ktoré vytvárajú buket a kvalitu vín (Swiegers a kol., 2005). Okrem vody, etanolu, cukrov, organických kyselín, metanolu, vyšších alkoholov sú vo víne prítomné fenoly, ktoré vykazujú antioxidačnú a biologickú aktivitu (Vázquez-Agell a kol., 2007). Polyfenoly, flavonoidy, triesloviny, stilbény, vitamíny, minerálne látky vo

víne pôsobia na zdravie človeka pozitívne a metanol, vyššie alkoholy, glycerín, biogénne amíny, SO₂, Al, Fe negatívne (Rohály, Mészáros, Nagymarosy, 2003). Protektívny účinok na zdravie ľudí majú flavonoidy, ktoré v spojitosti s alkoholom vykazujú antioxidačný, antitrombotický, kardioprotektívny, antikarcinogénny a iné účinky (Košťálová a kol., 2012).

Na polyfenoly sú bohaté aj botrytické tokajské vína (Hartman, 2009; Magyar, Tóth, 2011; Eftimová, Z., 2019). Základom pre výrobu Tokajských výberových 3 až 6-putňových vín výberovej esencie a samorodného sladkého vína sú cibéby, ktoré sa vytvárajú v klimaticky priaznivých ročníkoch na neskoro dozrievajúcich odrodách Muškát žltý, Lipovina a Furmint. Cibéby sa tvoria za teplého, suchého, jesenného počasia s rannými hmlami a v čase infekcie plesňou sivou, anamorfa: *Botrytis cinerea* (Pers. et Fries.); hrozn musí mať cukornatosť najmenej 21 °NM. Mycélium huby prerastá do vnútra bobule, vyvoláva biochemické a morfologické zmeny, voda sa odparuje a tvoria sa cibéby (Kakaš, 2002; Eftimová, J., 2010; Eftimová Z., 2019) (URL1). V 3. vydaní Viedenského liekopsisu (1909) bolo zapísané „Tokajské víno 3-putňové“ (13 – 18 % alkoholu a 9 g suchého výtažku na liter) ako „*Vinum tokajense passum*“. V 4. a 5 vydaní *Pharmacopea Hungarika* bolo tokajské víno zapísané ako oficiálne liečivo a tonikum pri rôznych ochoreniach (Molnár a kol., 2001; Chlebo a kol., 2011).

Cieľom krátkodobej, dvojtýždňovej štúdie bolo vyhodnotenie metabolickej reakcie na konzumáciu 150 ml vína „Tokajský výber 4-putňový“ počas večere na zdravých dospelých mužov a ako ovplyvnila ich biochemický profil krvi. Štúdiu je nutné považovať za pilotný (predbežný) návrh. Za účelom určovania štatistickej signifikancie jednotlivých pozorovaných zmien by bolo potrebné súbor rozšíriť.

MATERIÁL A METÓDY

Počas dvoch týždňov sme vyhodnocovali biochemický profil krvi reprezentatívnej vzorky probandov, ktorí konzumovali 150 ml vína „Tokajský výber 4-putňový“ počas večere.

Materiál

„Tokajský výber 4-putňový“ je víno s chráneným označením pôvodu a do experimentu nám ho dodala firma „TOKAJ & CO“, Malá Tŕňa.

Charakteristika vína „Tokajský výber 4-putňový“

Tokajské víno – výber sa získava alkoholovým kvašením muštu s cukornatosťou > 21 °NM alebo vína rovnakej kvality a rovnakého ročníka pochádzajúceho z kvalifikovaných honov, ktorým sa zalievajú cibéby. Podľa množstva pridaných cibieb sa člení tokajský výber na 3 až 6-putňový. Výbery vyzrievajú tri roky, z toho dva roky v drevenom sude a až potom sa môžu uviesť na trh.

Analytické vlastnosti:

skutočný obsah alkoholu najmenej 9 % obj.
obsah zvyškového cukru 4-putňový najmenej 90 g.l⁻¹
bezukorný extrakt najmenej 4-putňový najmenej 30 g.l⁻¹
obsah titrovateľných kyselín najmenej 6 g.l⁻¹
celkový obsah oxidu siričitého najviac 400 mg.l⁻¹
celkový obsah prchavých kyselín najviac 2,1 g.l⁻¹.

Organoleptické vlastnosti:

Farba: žltá až hlboko jantárová
Vôňa: výrazná, tokajského charakteru – medovinka, prezreté ovocie, orechy
Chuť: tokajská chlebovinka, medová až karamelová, prezreté ovocie (URL1, 2022).

Do dvojtýždňovej štúdie (7 dní v týždni) boli zaradení 10 muži (n = 10) vo veku od 21 do 29 rokov. Reprezentatívnu vzorku tvorili zdraví, dospelí, muži, nefajčiai alebo fajčili do päť cigaret denne, neužívali lieky, výživové doplnky, nemenili stravovacie návyky, dodržiavalí abstinenciu a vykonávali bežné činnosti. V priebehu štúdie probandi pravidelne počas večere konzumovali nami odporúčanú dávku 150 ml vína „Tokajský výber 4-putňový“. Pre dôsledné monitorovanie, vyhodnotenie metabolickej reakcie na biochemické parametre krvi a elimináciu mož-

ných iných vplyvov antioxidačne pôsobiacich látok prítomných v konzumovanej strave, probandi denne vypĺňali nutričný protokol.

Pred zahájením štúdie sme probandom urobili vstupný kontrolný test, pozostávajúci z odmerania krvného tlaku, odobratia a analýzy krvi. Ďalšie odbery krvi, ako aj meranie krvného tlaku sa uskutočnili ešte dvakrát počas dvoch týždňov trvania výskumu.

Odber krvi a vybrané biochemické parametre v krvnej plazme

Pred začatím konzumácie vína sa uskutočnil prvý odber venóznej krvi (V1 = K), ktorý slúžil ako kontrolná vzorka. Po týždňovej konzumácii vína sa uskutočnil druhý odber (V2) a tretí odber (V3) po ukončení dvojtýždňovej konzumácie vína. Odbery sa realizovali ráno, nalačno, za štandardizovaných podmienok (deň pred odberom ľahká strava s vylúčením príjmu živočíšnych tukov a odporúčalo sa 12 až 14-hodinové lačenie). Probandi mohli užiť iba vodu alebo bezkarbolicke tekutiny. Žilová krv sa odoberala z kubitálnej jamky pomocou ihly v množstve 10 ml do sterilných S-Monovette skúmaviek. Krvné vzorky sa následne pri izbovej teplote centrifugovali. Sérum sa oddelilo od sedimentu a následne sa vykonala analýza.

V krvnej plazme probandov sme stanovili vybrané biochemické ukazovatele, ktoré môžu byť konzumáciou alkoholu najviac ovplyvňované. Získané vzorky krvi sme skladovali pri teplote – 20 °C a následne po rozmrazení sme stanovili hladinu glukózy (GLU), aspartátaminotransferázy (AST), alanínaminotransferázy (ALP), gama-glutamyltransferázy (GMT), alkalickú fosfatázu (ALP), celkový cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C), LDL- cholesterol (LDL-C), triacylglyceroly (TAG), vysoko senzitívny C-reaktívny proteín (hsCRP). Hodnoty sme porovnali s referenčnými hodnotami pre optimálne biochemické parametre pre zdravých, dospelých mužov (SYN-LAB laboratórium, Nitra, SR).

Všetci probandi sa zúčastnili na výskume dobrovoľne, boli oboznámení s podmienkami a priebehom výskumu a podpisali informovaný súhlas so zaradením do štúdie. Štúdia bola schválená Etickou

komisiou pri Špecializovanej nemocnici sv. Svorada Zobor, n. o. , Kláštorská 134, 949 88 Nitra (protokol u autora). Biochemické analýzy sme zabezpečili v laboratóriu Katedry výživy ľudí na SPU v Nitre.

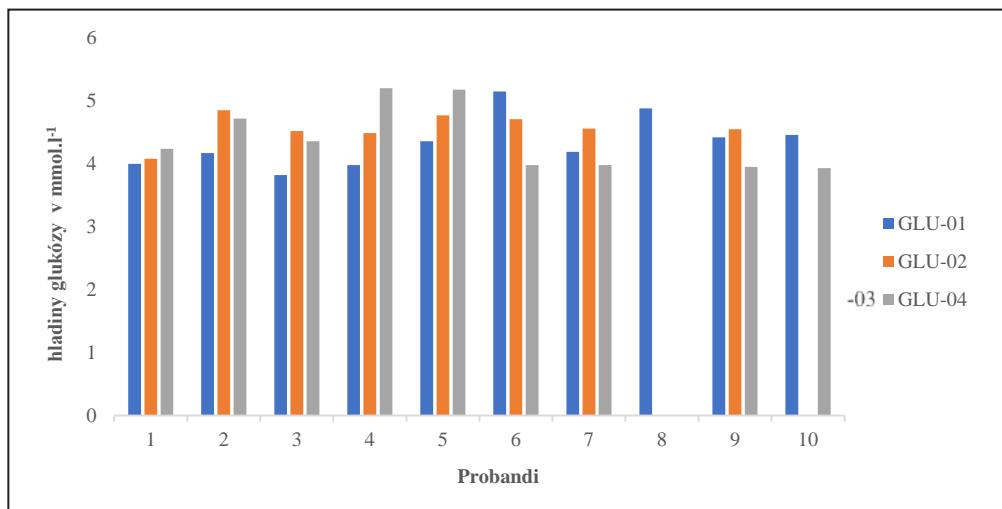
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počas krátkodobej štúdie (14 dní) sme vyhodnocovali, akú metabolickú reakciu vyvoláva konzumácia 150 ml prírodné sladkého, alkoholického vína (Tokajský výber 4- putňový) s večerou a ako ovplyvňuje hodnoty biochemických parametrov v krvnej plazme zdravých, dospelých mužov. Stanovili sme hladinu glukózy (GLU), aspartátaminotransferázy (AST), alanínaminotransferázy (ALP), gama-glutamyltransferázy (GMT), fosfatázu alkalickú (ALP), celkový cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C), LDL-cholesterol (LDL-C), triacylglyceroly (TAG) a vysoko senzitívny C-reaktívny proteín (hsCRP).

Hodnoty hladín biochemických parametrov z troch odberov krvi sme zaznamenali do tabuľky a graficky spracovali do obrázkov 1 až 8 (vid' obr.1 – 8). Vstupný odber vzorky krvi (V1) pred konzumáciou vína absolvovalo 10 probandov a tieto údaje nám slúžili ako kontrola (K). Namerané hodnoty biochemických parametrov sme porovnávali s referenčnými hodnotami pre optimálne parametre zdravých, dospelých mužov. Po týždňovej konzumácii vína „Tokajský výber 4-putňový“ musel pre zdravotné komplikácie štúdiu ukončiť proband 8.

Kedže víno „Tokajský výber 4-putňový“ patrí k vínam s vyšším podielom cukru ($\geq 90 \text{ g.l}^{-1}$ zvyškového cukru, 30 g.l^{-1} bezcukorného extraktu, 9 % alkoholu), zaujímalo nás, ako bude konzumácia 150 ml vína ovplyvňovať metabolizmus glukózy. Vplyv večernej konzumácie stravy a 150 ml tokajského vína sme sledovali meraním hladín glukózy (GLU) v krvnej plazme probandov. Výsledky nameraných hodnôt hladín GLU z troch meraní sme graficky zaznamenali na obrázku 1 (vid' obr. 1). Namerané hodnoty sme porovnávali s referenčnými hodnotami pre optimálnu hladinu glukózy zdravých, dospelých mužov, ktoré sa pohybujú od $4,4 - 5,5 \text{ mmol.l}^{-1}$.

Obr. 1: Porovnanie hodnôt hladín GLU (mmol.l^{-1}) v krvi probandov



GLU-01 – kontrola, pred konzumáciou vína; GLU-02 – po 1-týždňovej konzumácii vína;
GLU-03 – po ukončení 2-týždňovej konzumácie vína

Po týždňovej konzumácii 150 ml vína „Tokajský výber 4-putňový“ sme pri všetkých probandoch zaznamenali mierny vzostup hladiny glukózy. Po dvoch týždňoch konzumácie vína došlo k opäťovnému poklesu hladiny glukózy pri štyroch probandoch (6, 7, 9, 10). Pri probandovi 6 sme zaznamenali výraznejší pokles hladiny glukózy oproti kontrole (z 5,15 na 3,98 mmol.l^{-1}). Mierny vzostup hladiny glukózy sme zaznamenali pri probandoch (1, 2, 3, 5). K výraznejšiemu vzostupu hladiny glukózy oproti kontrole došlo pri probandovi 4 (z 3,98 na 5,2 mmol.l^{-1}) (viď obr.1). Priemerná hodnota glukózy (GLU) sa pohybovala pri všetkých odberoch v rozsahu 4,11 – 4,88 mmol.l^{-1} krvnej plazmy probandov. Zistili sme, že počas experimentu mali hladiny glukózy vzostupnú alebo klesajúcu tendenciu, avšak zostávali v rozsahu s referenčných hodnôt pre optimálnu hladinu glukózy pre zdravých dospelých mužov.

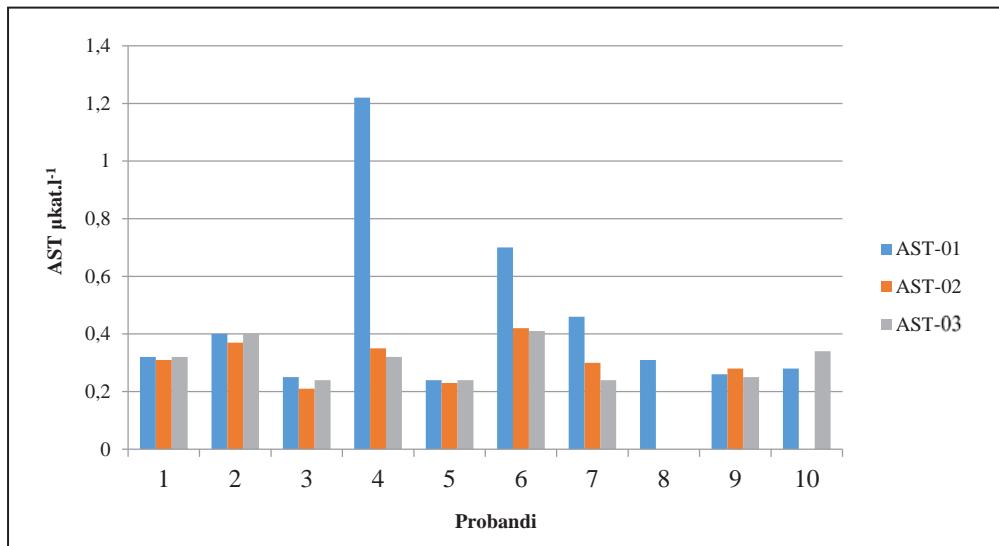
K podobným záverom dospeli Chlebo, Čižmárová, Schwarzová (2010). Autori počas 6- týždňovej štúdie sledovali vplyv konzumácie 200 ml červeného vína „Frankovka modrá“ na biochemické parametre v krvnom sére. Po týždňovej konzumácii zaznamenali

mierny nárast hladiny glukózy v krvi probandov. Po 6 týždňoch pri probandoch namerali hodnoty glukózy od 5,1 až 5,5 mmol.l^{-1} glukózy v krvi. Autori tento biochemický parameter považovali za stabilný, pretože hodnoty glukózy sa pohybovali v rozsahu referenčných hodnôt.

Chiva-Blanch a kol. (2013) sledovali vplyv štvrtýždňovej miernej konzumácie alkoholu (červené víno, nealkoholické červené víno, gin) na metabolizmus glukózy. Z experimentu vyplynulo, že mierny príjem alkoholu (červené víno – alkoholické a nealkoholické) znížil plazmatický inzulín a hodnotenie rezistencie na inzulín v modeli homeostázy. Autori zistili, že červené víno zvyšovalo citlivosť na inzulín a má protektívny účinok na *diabetes mellitus* 2. Taktiež Da Luz a kol. (2014) uvádzajú v záveroch experimentálnej štúdie, že pravidelní konzumenti červeného vína mali v porovnaní s abstinentmi nižšiu hladinu glukózy, ako aj nižší výskyt *diabetes mellitus* 2.

Jedinci, ktorí majú sklon k nadmernému pitiu, majú vyššie riziko alkoholickej steatohepatitídy (Tejero, Sanchez, Bataller, 2023). Z hepatálnych ukazovateľov sme pri probandoch stanovili hladiny enzýmov

Obr. 2: Porovnanie hodnôt AST ($\mu\text{kat.l}^{-1}$) v krvi probandov



AST-01 – kontrola, pred konzumáciou vína; AST-02 – po 1-týždňovej konzumácii vína;
AST-03 – po ukončení 2-týždňovej konzumácie vína

AST, ALT, GMT, ktoré môžu poukazovať na poškozenie pečene v súvislosti s konzumáciou alkoholu.

Enzým aspartátaminotransferáza (AST) je prítomný v tkanivách v srdci, kostrových svaloch, obličkách, mozgu, pečeni a pankrease. K vyplavovaniu AST do krvi dochádza pri poškodení pečene a hodnoty AST stúpajú oproti referenčným hodnotám. Stanovenie hladiny aspartátaminotransferázy (AST) a alanínaminotransferázy (ALT) sa využíva pri diagnostike a monitorovaní ochorení pečene, hlavne chorôb, ktoré vedú k deštrukcii hepatocytov (Rifai, 2018).

Namerané hodnoty aktivity aspartátaminotransferázy (AST) z troch meraní (množstvo pečeňových enzýmov v krvi) pri všetkých probandoch sme zaznamenali na obrázku 2 (viď obr. 2).

Namerané hodnoty aktivity AST sme porovnávali s referenčnými hodnotami pre optimálnu hladinu, ktoré sú v rozsahu od 0,10 do 0,7 $\mu\text{kat.l}^{-1}$ pre zdravých, dospelých mužov. Počas dvojtýždňovej konzumácie vína „Tokajský výber 4-putňový“ sme pri siedmych probandoch (1, 2, 3, 4, 6, 7, 9) zaznamenali pokles hodnôt aktivity AST. Pri dvoch probandoch (5, 10) došlo k mierнемu zvýšeniu hodnoty aktivity AST (viď obr. 2). Pri probandoch (4, 6, 7) sme zistí-

li výrazné zníženie hodnoty aktivity AST. Priemerná hodnota aktivity AST pri všetkých odberoch sa pohybovala v rozsahu od 0,23 – 0,63 $\mu\text{kat.l}^{-1}$ v plazme probandov a bola v rozsahu s referenčnými hodnotami pre optimálnu hladinu zdravých, dospelých mužov.

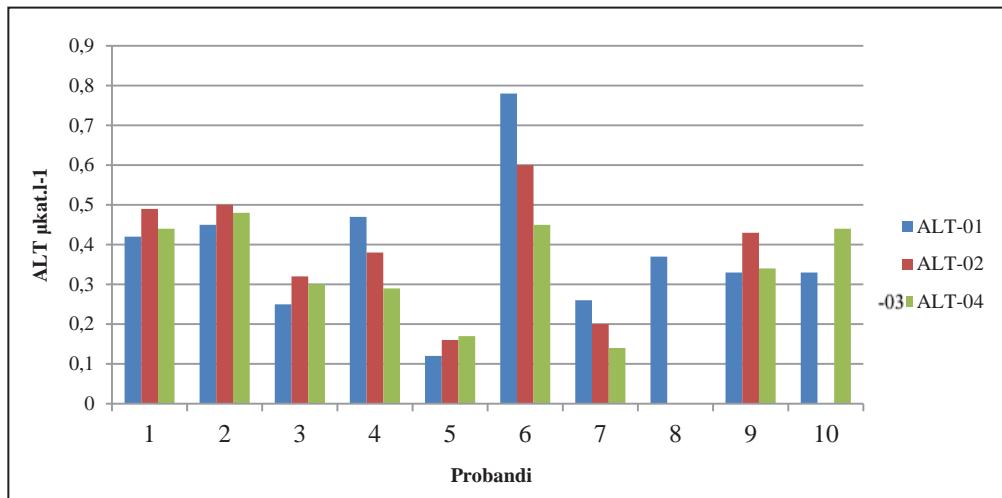
Enzým alanínaminotransferáza (ALT) je primárne lokalizovaný v pečeni. Pri väčšine pečeňových chorôb bývajú zvýšené sérové aktivity AST a ALT. Výnimkou je alkoholické poškodenie pečene a Reyeov syndróm, kedy býva aktivita ALT vyššia ako AST. Pri vírusových hepatitídach a po liekovom toxickej poškodení pečene sú hodnoty najvyššie (Zima, 2009).

Chronický príjem alkoholu spôsobuje zvýšenie aktivity mitochondriálnej AST v plazme a dosahuje pomery $\text{AST/ALT} > 1,5$ (Botros, 2013). Pri alkoholickom poškodení pečene je hodnota Ritisovho indexu $\text{AST/ALT} > 2$. V prípade, že $\text{AST/ALT} < 1$, potom to poukazuje na vírusovú hepatitidu (Vlniešková, 2016).

Namerané hodnoty aktivity alanínaminotransferázy (ALT) z troch meraní, pri všetkých probandoch sme zaznamenali na obrázku 3 (viď obr. 3).

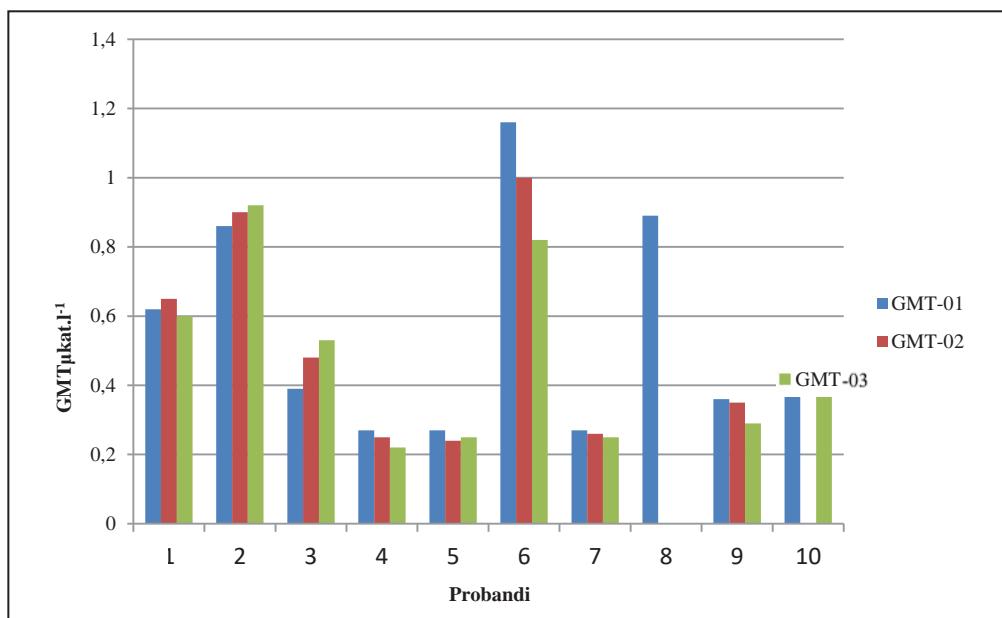
Priemerná hodnota aktivity ALT pri zdravých, dospelých mužoch sa pohybuje v rozsahu od 0,10 do 0,85 $\mu\text{kat.l}^{-1}$. Z nameraných hodnôt vyplýva, že pri

Obr. 3: Porovnanie hodnôt ALT ($\mu\text{kat.l}^{-1}$) v krvi probandov



ALT-01 – kontrola, pred konzumáciou vína; ALT-02 – po 1-týždňovej konzumácii vína;
ALT-03 – po ukončení 2-týždňovej konzumácie vína

Obr. 4: Porovnanie hodnôt GMT ($\mu\text{kat.l}^{-1}$) v krvi probandov

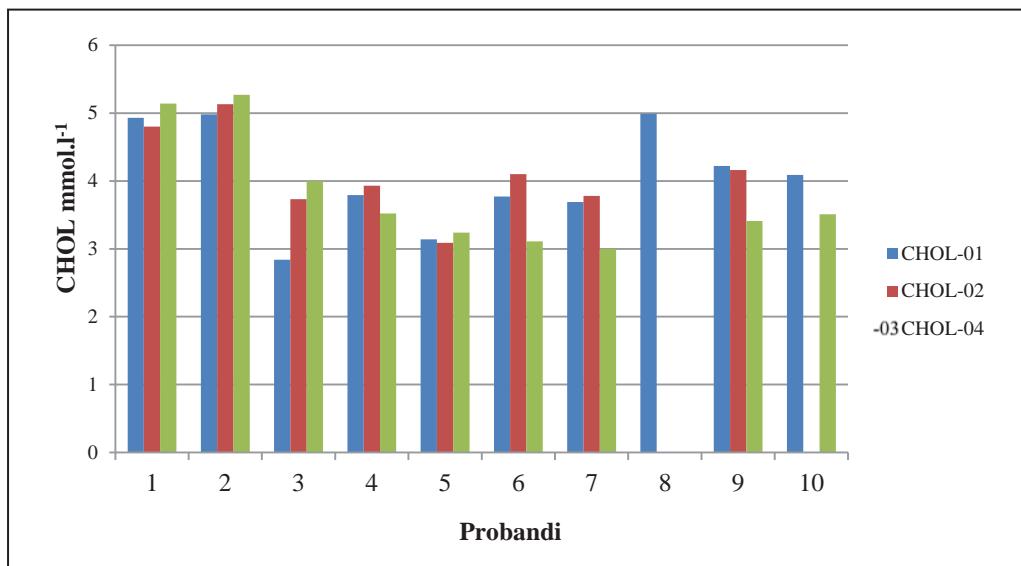


GMT1 – kontrola, pred konzumáciou vína; GMT2 – po 1-týždňovej konzumácii vína;
GMT3 – po ukončení 2-týždňovej konzumácie vína

všetkých probandoch sme zaznamenali pokles aktivity ALT, okrem 4 probandov (1, 2, 3, 10); kde došlo k miernemu zvýšeniu aktivity (viď obr. 3). Výraznejšie zníženie hodnôt aktivity ALT sme zaznamenali

pri probandovi 6 (z $0,47 - 0,29 \mu\text{kat.l}^{-1}$) a 4 (z $0,78 - 0,45 \mu\text{kat.l}^{-1}$). Pri týchto probandoch sme rovnako zaznamenali výrazné zníženie hodnôt aktivity AST. Naopak, pri probandovi 10 sme zaznamenali nárast

Obr. 5: Porovnanie hodnôt (TC) (mmol.l^{-1}) v krvi probandov



AST-01 – kontrola, pred konzumáciou vína; AST-02 – po 1-týždňovej konzumácii vína;
AST-03 – po ukončení 2-týždňovej konzumácie vína

hodnôt AST (z $0,28 - 0,34 \mu\text{kat.l}^{-1}$), rovnako ako to bolo pri ALT (z $0,33 - 0,44 \mu\text{kat.l}^{-1}$). Naše výsledky sú v zhode s výsledkami Xia a kol. (2010), ktorí uvádzajú, že aktivity enzymov AST a ALT navzájom veryšo korelujú. Pri všetkých odberoch krvi probandov sa priemerná hodnota ALT pohybovala v rozsahu od $0,15 - 0,61 \mu\text{kat.l}^{-1}$; čo sú stále hodnoty v rozsahu referenčných hodnôt pre optimálnu hladinu ALT.

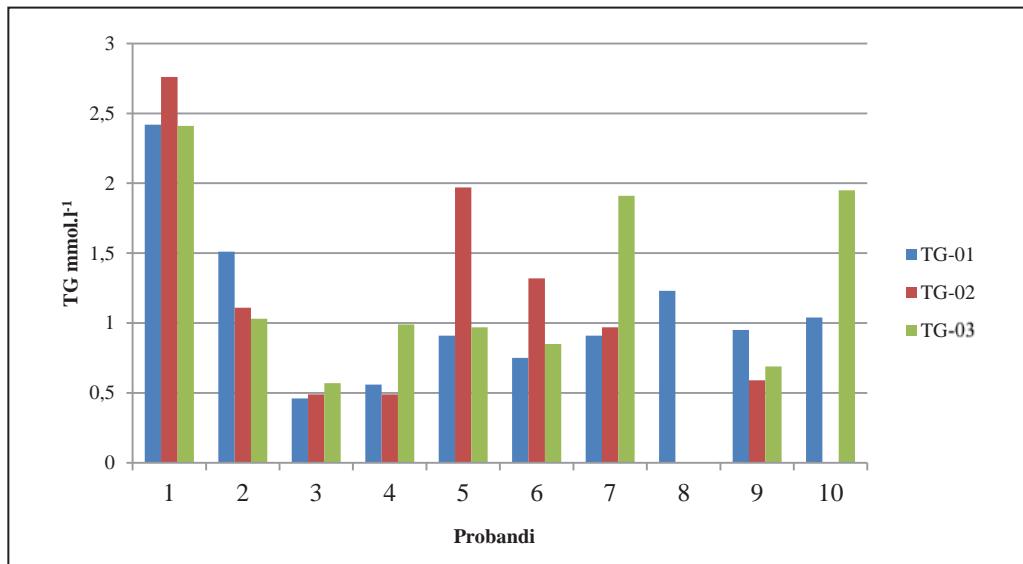
Kľúčový, membránovo viazaný enzym gama-glutamyltransferáza (GMT), sa nachádza v pečeni, žlčových cestách, hepatocytoch, tkanivách pankreatických vývodov. Aktivita GMT stúpa s vekom. Hodnota GMT je citlivejší ukazovateľ hepatobiliárneho ochorenia ako fosfatáza alkalická (ALP). Pri pečenových ochoreniach koreluje GMT s hodnotou ALP (Vlniešková, 2016).

Hodnoty aktivity enzymu gama-glutamyltransferázy GMT v krvi probandov z troch meraní sme zaznamenali na obrázku 4 (vid' obr. 4). Získané hodnoty aktivity (GMT) pri všetkých probandoch sme porovnávali s referenčnými hodnotami pre optimálnu hodnotu aktivity GMT u zdravých dospelých mužov v rozsahu od $0,13$ do $1,0 \mu\text{kat.l}^{-1}$.

Po skončení 14-dňovej konzumácie vína „Tokaj-ský výber 4-putňový“ sme zaznamenali pri šiestich probandoch (1, 4, 5, 6, 7, 9) pokles hodnoty aktivity GMT a v troch prípadoch (2, 3, 10) mierne zvýšenie hodnoty (vid' obr. 4). Pri probandovi 6 sme opäť zaznamenali výraznejší pokles hodnoty aktivity GMT, rovnako ako to bolo pri hodnotách AST, ALT (vid' obr. 2, 3, 4). Priemerná hodnota aktivity GMT sa pri všetkých probandoch a odberoch pohybovala od $0,25 - 0,99 \mu\text{kat.l}^{-1}$, čo je v rozsahu referenčných hodnôt pre optimálnu hodnotu GMT zdravých, dospelých mužov.

Riziko srdcových ochorení a cievnej mozgovej príhody stúpa so zvýšeným cholesterolom (URL2, 2021). Väčšina kardiovaskulárnych ochorení (KVO) je spôsobená aterosklerózou, degeneratívnym procesom artérií, ktorý je vyvolaný oxidačným stresom a chronickým zápalovým stavom. Rizikovými faktormi tohto ochorenia sú okrem iného aj fajčenie, *diabetes mellitus*, arteriálna hypertenzia, abnormality sérových hladín celkového cholesterolu a jeho frakcií, nadváha, obezita, rodinná anamnéza skorého KVO a fyzická nečinnosť (Chiva-Blanch a kol., 2013).

Obr. 6.: Porovnanie hodnôt TG (mmol.l⁻¹) v krvi probandov



TG-01 – kontrola, pred konzumáciou vína; TG-02 – po 1-týždňovej konzumácii vína;
TG-03 – po ukončení 2-týždňovej konzumácie vína

Systematická tabuľka odhadu koronárneho rizika pre európske populácie (SCORE) uvádzajúca medzi rizikové faktory: vek, pohlavie, fajčenie, systolický krvný tlak a celkový cholesterol. Za rozhodujúci faktor sa považuje vek, čo znamená čas vystavenia rizikovým faktorom (Smernice ESC/EAS 2019; Mach a kol., 2020).

Namerané hodnoty hladiny (TC) z troch meraní, pri všetkých probandoch sme zaznamenali na obrázku 5 (viď obr. 5).

Referenčné hodnoty pre optimálnu hladinu cholesterolu sa pohybujú od 3 do 5,2 mmol.l⁻¹ pre zdravých, dospelých mužov. Po týždňovej konzumácii vína „Tokajský výber 4-putňový“ sme zaznamenali mierny vzostup hladín TC (2, 3, 4, 6, 7); okrem probandov 1, 5, 9, pri ktorých došlo k miernemu poklesu. Po dvojtýždňovej konzumácii sme zaznamenali pokles hladiny celkového cholesterolu (TC) pri piatich probandoch (4, 6, 7, 9, 10). Pri probandoch (1, 2, 5) sme zaznamenali iba mierny vzostup hladiny celkového cholesterolu (TC) oproti kontrole. Výraznejší vzostup hladín sme zaznamenali oproti kontrole pri probandovi 3 (viď obr. 5). Pri všetkých odberoch sa priemerná

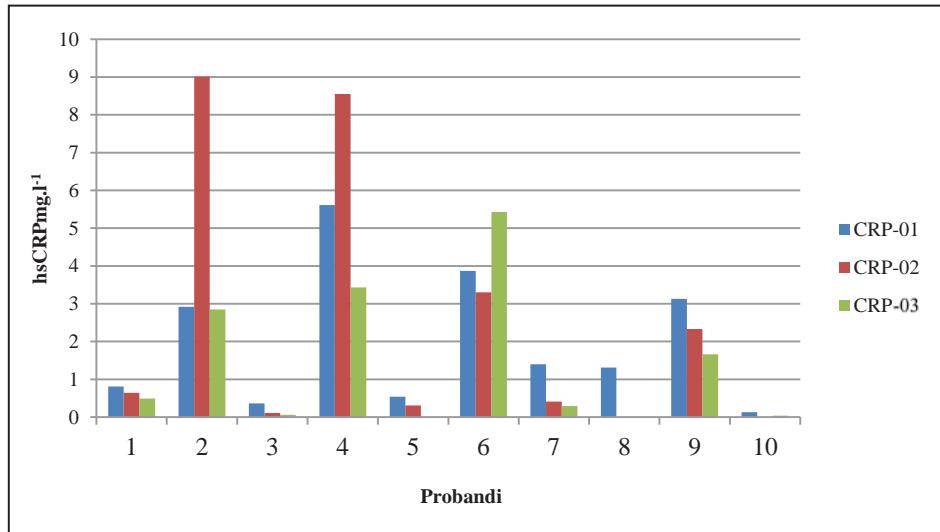
hodnota TC v krvi probandov pohybovala od 3,66 – 5,15 mmol.l⁻¹, čo je ešte stále v rozsahu referenčných hodnôt pre optimálnu hladinu pre zdravých dospelých mužov.

K podobným výsledkom dospeli Chlebo, Čižmárová, Schwarzová (2010), ktorí zaznamenali po prvom týždni konzumácie 200 ml červeného vína (Frankovka modrá) s večerou nepatrný vzostup hladiny TC z $5,66 \pm 1,12$ mmol.l⁻¹ na $5,76 \pm 1,23$ mmol.l⁻¹ v krvi probandov. K pozvoľnému poklesu hladín TC v krvi probandov až na kontrolnú pôvodnú hladinu došlo po 3 týždňoch. Po ďalších 3 týždňoch zaznamenali pokles až na hladinu $5,36 \pm 1,03$ mmol.l⁻¹. Aj keď namerané hodnoty TC pri probandoch prevyšovali hornú referenčnú hranicu, dochádzalo k poklesu TC, čo je veľmi pozitívne z hľadiska rizika srdečnokrevných príhod.

Matsumoto a kol. (2014) zistili, že konzumáciou 0,33 l piva alebo 0,15 l vína alebo 0,03 l alkoholu sa znížilo riziko kardiomyopatie, ischemického myokardu a celkovej mortality.

Hodnoty celkového, HDL, LDL-cholesterolu a TAG ovplyvňujú rizikové faktory ako vek, pohlavie

Obr. 7.: Porovnanie hodnôt hsCRP (mg.l^{-1}) v krvi probandov



CRP-01 – kontrola, pred konzumáciou vína; CRP-02 – po 1-týždňovej konzumácii vína;
CRP-03 – po ukončení 2-týždňovej konzumácie vína

(Oravec, 2011). Zvýšený LDL-cholesterol, znížený HDL-cholesterol a zvýšené TG poukazujú u pacientov na izolovanú alebo kombinovanú dyslipidémiu. Viaceré štúdie poukázali na to, že v primárnej a sekundárnej prevencii na zníženie kardiovaskulárneho rizika sú potrebné diétne opatrenia. Zistilo sa, že existujú súvislosti medzi koronárnou úmrtnosťou a vysokou mierou konzumácie transmastných kyselín (Chevallier, 2021).

Zvýšená hladina TG v krvi vypovedá o zvýšenej hladine tukových látok a niektorých lipoproteínov v krvi, ktoré môžu pôsobiť aterogénne. Samotné TG nezasahujú do procesu aterogenézy (Chlebo, Čižmárová, Schwarzová, 2010).

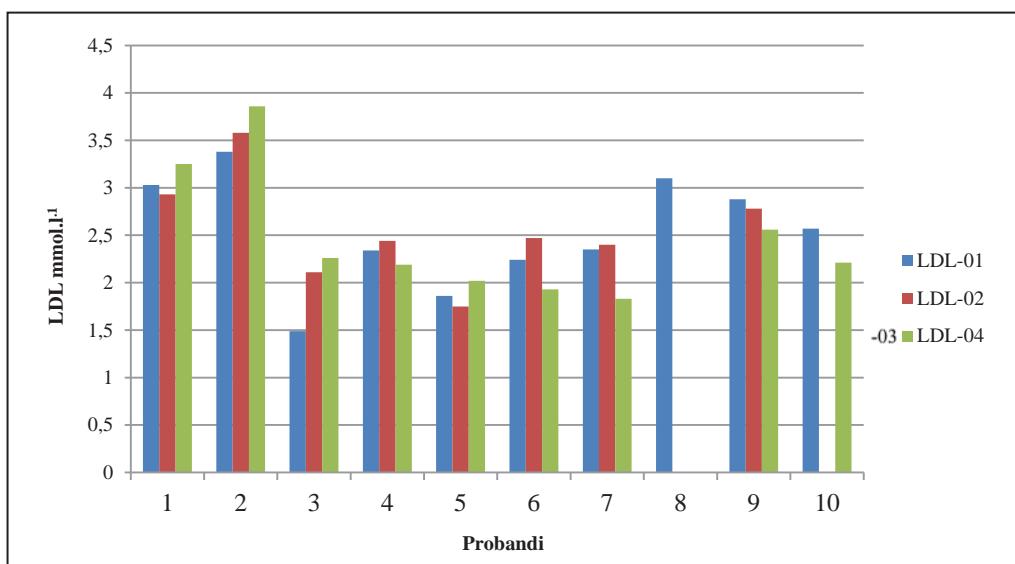
Namerané hodnoty hladiny triacylglycerolov (TG) z troch meraní, pri všetkých probandoch sme zaznamenali na obrázku 6 (viď obr. 6). Výsledky sme porovnávali s referenčnými hodnotami hladín TG pre dospelých, zdravých mužov. Referenčné hodnoty pre optimálnu hladinu triacylglycerolov (TG) sa pohybujú v rozmedzí od 0,45 do 1,7 mmol.l^{-1} pre zdravých, dospelých mužov.

Pri kontrolnom vstupnom meraní hladiny TG pri probandovi 2 sme zaznamenali zvýšenú hodnotu TG

(2,42 mmol.l^{-1}); ktorá bola nad najvyššiu prípustnú referenčnú hodnotu 1,7 mmol.l^{-1} . Aj keď po dvoch týždňoch došlo k nepatrnému poklesu oproti kontrole (2,41 mmol.l^{-1}), hodnota zostávala nad referenčnú hodnotu. Pozvolný mierny pokles hladiny TG oproti kontrole sme zaznamenali pri probandoch (1, 2, 9) a mierny vzostup pri probandoch (3, 10). Pri probandovi 7 stúpla hodnota TG (z 0,91 na 1,91 mmol.l^{-1}) a probandovi 10 (z 1,04 na 1,95 mmol.l^{-1}); čo sú hodnoty nad rozsah referenčných hodnôt pre optimálnu hladinu TG. Po prvom týždni konzumácie vína pri probandoch (5, 6) hodnoty TG najskôr stúpali a potom poklesli na hodnotu mierne nad kontrolu. Pri probandovi 4 po týždni došlo k poklesu hodnoty TG oproti kontrole a po dvoch týždňoch sa hodnoty ustálili mierne nad kontrolu. Priemerná hodnota TG sa pri všetkých odberoch pohybovala od 0,74 – 2,53 mmol.l^{-1} v krvi (viď obr. 6).

Vyhodnotením nutričných protokолов u probandov sme došli k záveru, že pokles hladiny TG pri troch probandoch neboli spôsobený znížením energetického príjmu potravy, pretože probandi počas krátkodobej štúdie nemenili svoje stravovacie návyky. Predpokladáme, že tento mierny pokles TG spôsobil konzumá-

Obr. 8: Porovnanie hodnôt LDL-cholesterolu (mmol.l^{-1}) v krvi probandov



LDL1 – kontrola, pred konzumáciou vína; LDL2 – po 1-týždňovej konzumácii vína;
LDL3 – po ukončení 2-týždňovej konzumácie vína

cia vína.

Pri kardiovaskulárnych ochoreniach má hladina C-reaktívneho proteínu v krvi (CRP) podstatný význam. Hlavným patofyziologickým rysom zápalu je C-reaktívny proteín (hsCRP), ktorý je úzko spätý s akútnou fázou odpovede (Podracká, 2008).

Namerané hodnoty hladiny C-reaktívneho proteínu (hsCRP) z troch meraní pri všetkých probandoch sme zaznamenali na obrázku 7 (viď obr. 7).

Za optimálnu hladinu C-reaktívneho proteínu (hsCRP) v krvi sa považuje $0 - 5 \text{ mg.l}^{-1}$ pre zdravých, dospelých mužov. Pri všetkých probandoch, okrem probanda číslo 6 ($5,43 \text{ mg.l}^{-1}$); došlo k poklesu hodnoty C-reaktívneho proteínu v krvi (viď obr. 7). Priemerná hodnota hladiny C-reaktívneho proteínu (hsCRP) pri všetkých odberoch sa pohybovala od $0,09 - 2,09 \text{ mg.l}^{-1}$ v krvi, čo je v rozsahu referenčných hodnôt.

Mnohé vedecké a klinické údaje demonštrujú príčinnú súvislosť medzi koncentráciami lipoproteínového cholesterolu s nízkou hustotou (LDL-C) v sére a kardiovaskulárnym ochorením. Akýkoľvek pokles koncentrácií LDL-C v sére je spojený so zníženým rizikom KVO. Pokles je porovnatelný so znížením

LDL-C po medikamentóznej liečbe a diétnej intervencii (Inada a kol., 2021).

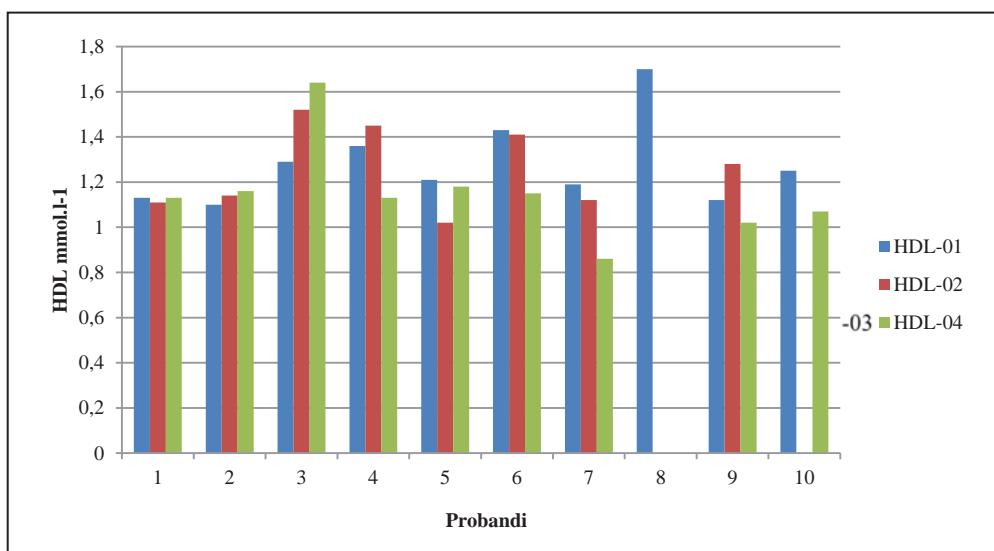
Namerané hodnoty hladiny LDL-cholesterolu z troch meraní, pri všetkých probandoch sme zaznamenali na obrázku 8 (viď obr. 8).

Referenčné hodnoty pre optimálnu hladinu LDL-C sa pohybujú menej ako 4 mmol.l^{-1} pre zdravých, dospelých mužov. Vyššie hodnoty hladín predstavujú zvýšené riziko vzniku kardiovaskulárnych ochorení. Pokles hladiny LDL-cholesterolu sme zaznamenali pri 5 probandoch (4, 6, 7, 9, 10) a pri 4 probandoch (1, 2, 3, 4) sa hodnota zvýšila (viď obr. 8). Priemerná hodnota LDL-C pri všetkých odberoch sa pohybovala od $1,88 - 3,61 \text{ mmol.l}^{-1}$ v krvi, čo je v rozsahu s referenčnou hodnotou pre optimálnu hladinu LDL-cholesterolu.

Chlebo, Čižmárová, Schwarzová (2010) zistili, že krátkodobá 3-týždňová konzumácia červeného vína mala priaznivý vplyv na ľudský organizmus, hlavne vo vzťahu ku kardiovaskulárnym ochoreniam. Pri probandoch zaznamenali pokles hladiny celkového cholesterolu, TG a LDL-cholesterolu.

V súčasnej dobe rastie význam spoločného rozhodovania lekárov a dietológov s pacientmi, ako pri-

Obr. 9: Porovnanie hodnôt HDL-cholesterolu (mmol.l^{-1}) v krvi probandov



HDL1 – kontrola, pred konzumáciou vína; HDL2 – po 1-týždňovej konzumácii vína;
HDL3 – po ukončení 2-týždňovej konzumácie vína

stupovať k zníženiu LDL-C tak, aby sa zabezpečilo správne dodržiavanie diétnych prístupov (Inada, a kol. 2021).

Za protektívny faktor z hľadiska rozvoja kardiovaskulárnych chorôb sa považuje hladina HDL-cholesterolu. Nízka hladina HDL-cholesterolu predstavuje zvýšené kardiovaskulárne riziko bez ohľadu na hladinu LDL-cholesterolu a prítomnosť iných rizikových faktorov (Sabaka, 2012).

Namerané hodnoty hladiny HDL-cholesterolu z troch meraní, pri všetkých probandoch sme zaznamenali na obrázku 9 (viď obr. 9).

Referenčné hodnoty pre optimálnu hladinu HDL-cholesterolu by sa mali pohybovať od 1 mmol.l^{-1} do $2,7 \text{ mmol.l}^{-1}$ pre zdravých, dospelých mužov. Po dvojtýždňovej konzumácii vína „Tokajský výber 4-putňový“ sme zaznamenali iba mierny pokles hladiny HDL-cholesterolu pri šiestich probandoch (4, 5, 6, 7, 9, 10). Pri dvoch probandoch (2, 3) sme zaznamenali zvýšenie hladiny HDL-cholesterolu a v jednom prípade sa hladina oproti kontrole nezmenila ($1,13 \text{ mmol.l}^{-1}$) (viď obr. 9). Nárast hladín HDL-cholesterolu môžeme pozitívne hodnotiť, pretože inhibuje

procesy aterogenézy. Po dvojtýždňovej konzumácii vína sa hladiny HDL-cholesterolu pri všetkých odberoch pohybovali v rozsahu $1,06 – 1,70 \text{ mmol.l}^{-1}$ v krvi a boli v rozsahu referenčných hodnôt pre optimálnu hladinu HDL-cholesterolu.

Rohály, Mészáros, Nagymarosy (2003) uvádzajú, že príjem alkoholu vo víne v primeraných, striedavých dávkach zvyšuje hodnoty HDL, čo je vnímané ako veľký benefit pre zdravie. Taktiež Košťálová a kol. (2012) potvrdzujú pozitívny vplyv vína na pokles hladiny LDL-cholesterolu a stúpanie hladiny HDL-cholesterolu, ktorý chráni srdce. Polyfenoly vo víne zvyšujú lokálnu produkciu NO, ktorý je inhibítorm doštičkovej agregácie, čím dochádza k zníženiu zrážalivosti krvi. Flavonoidy v spojitosti s alkoholom vykazujú antioxidačný, antitrombotický, kardio-protectívny, antikarcinogénny, antisklerotický a iné účinky. Inada a kol. (2021) uvádzajú, že je nedostatok klinických štúdií o metabolizme a bioaktivite polyfenolov. Autori poukazujú na to, že nízka biologická dostupnosť nemusí znamenať aj nízku biologickú aktivitu, pretože neabsorbovaná frakcia môže byť črevnou mikroflórou metabolizovaná na biologicky

dostupnejšie a aktívnejšie metabolity.

Väčšina epidemiologických štúdií potvrdila, že pri konzumácii miernych až stredných dávok vína došlo k zvýšeniu HDL-cholesterolu, znížila sa agregácia krvných doštičiek (Haseeb, a kol., 2019).

Väčšina botrytizovaných vín je bohatá na polyfenoly, ktoré majú vysokú antioxidačnú kapacitu (Magyar, Tóth, 2011). Polyfenoly zabraňujú tvorbe reaktívnych metabolitov (Košťálová a kol., 2012). Eftimová, Z. (2019) stanovila obsah celkových polyfenolov v Tokajskej výberovej esencii, 6, 5, 4, 3-putňových vínach, Tokajskom víne samorodnom, suchom a sladkom a odrodotových vínach (od firmy TOKAJ & CO, Malá Tŕňa, SR) v rozsahu $176 \pm 18,8$ mgQ.l⁻¹ do $509 \pm 78,0$ mgQ.l⁻¹. V Tokajskom 4-putňovom víne stanovila celkové množstvo polyfenolov $231,6 \pm 33,30$ mgQ.l⁻¹ a pomocou DPPH metódy antioxidačné aktivity $84,9 \pm 6,67$ µmol TEAC.dm⁻³. V tokajských vínach sa zo stilbénov nachádza resveratrol, ktorý existuje ako izomér v trans a cis polohe alebo v glykozylovannej forme ako di a trimér- resveratrolu (polydatín, viniferín). V hrozne prevláda ako trans-resveratrol (Domin a kol., 2017). Tieto zlúčeniny sa výrazne podielajú na zdravotných účinkoch hrozna a vína (Keylor a kol., 2015).

Košťálová a kol., (2012) odporúča striedme pitie vína najmä v podmienkach oxidačného stresu (kalorická tučná strava, fajčenie, koronárne ochorenie srdca). Pri prekročení striedmeho pitia vína sa v organizme vyvolá oxidačný stres.

Z epidemiologických a experimentálnych výskumov vyplynulo, že ľahká až mierna konzumácia alkoholu bez ohľadu na druh nápoja je spojená so znížením výskytu kardiovaskulárnych ochorení a úmrtnosti. Avšak nadmerná konzumácia alkoholu (≥ 15 nápojov týždenne) spôsobuje chronické ochorenia a mnohé iné zdravotné ťažkosti (Kang a kol. 2022).

Výsledky experimentu preukázali, že dvojtýždňová pravidelná konzumácia 150 ml vína „Tokajský výber 4-putňový“ počas večere nespôsobila metabolickú reakciu, ktorá by výrazne ovplyvnila biochemické parametre v krvi. Priemerné hodnoty GLU, AST, ALP, ALT, GMT, TC, TG, HDL-cholesterolu, LDL-choles-

terolu a hsCRP oproti kontrole pri probandoch mierne stúpali alebo klesali, ale pohybovali sa v rozsahu referenčných hodnôt, čo je z hľadiska zachovania dynamickej rovnováhy organizmu veľmi dôležité.

ZÁVER

Medzi vedeckou komunitou pretrváva značne rozporuplný názor na víno a jeho vplyv na zdravie človeka. V mnohých vedeckých a odborných štúdiách sú zdokumentované pozitívne prínosy konzumácie červeného, bieleho vína, hlavne v spojitosti so srdcovocievnymi ochoreniami. Víno znižuje hladinu LDL-cholesterolu, zvyšuje hladinu HDL-cholesterolu a znižuje aggregáciu krvných doštičiek. Polyfenolické látky v spojitosti s alkoholom vykazujú antioxidačný, kardioprotektívny antitrombotický, antikarcinogénny a mnoho ďalších účinkov. Z výsledkov krátkodobej, dvojtýždňovej štúdie vyplynulo, že konzumácia 150 ml vína „Tokajský výber 4-putňový“ počas večere mierne zvyšovala alebo znižovala hodnoty GLU, AST, ALP, ALT, GMT, TC, TG, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu a hsCRP oproti kontrole, avšak hodnoty zostávali stále v rozsahu referenčných hodnôt pre zdravých, dospelých mužov. Zistili sme, že aktivity enzymov AST a ALT navzájom vysoko korelujú. Napriek tomu, že víno patrí k prírodne sladkým vínam s vyšším množstvom cukru, priemerná hodnota glukózy sa pohybovala v rozsahu $4,11 - 4,88$ mmol.l⁻¹ v krvi, čo je v rozsahu referenčných hodnôt. Vzhľadom na tieto benefity môžeme odporúčať miernu konzumáciu (150 ml) vína „Tokajský výber 4-putňový“ spolu s večerou ako prevenciu a podpornú terapiu ochorení vyvolaných oxidačným stresom, hlavne pri srdcovocievnych ochoreniach. Za účelom určovania štatistickej signifikancie jednotlivých pozorovaných zmien by bolo potrebné rozšíriť súbor respondentov.

ZOZNAM LITERATÚRY

Botros, M., Sikaris, K.: The De Ritis ratio: test of time. *Clin. Biochem. Rev.*, 2013, 34 (3), 117

- 130. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3866949/> Accessed May 21, 2022.
- Da Luz, P. L., Coimbra, S., Favarato, D., Albuquerque, C., Mochiduky, R. I., Rochitte, C. E., Laurindo, F. R.: Coronary artery plaque burden and calcium scores in healthy men adhering to long-term wine drinking or alcohol abstinence. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2014, 47, 697 – 705. DOI: 10.1590/1414-431X20143880. Accessed December 1, 2022.
- Domin, J., Furdíková, K., Báleš, V., Timár, P., Ťembeová, A.: *Hrozno a víno* [Grapes and wine]. Bratislava: VINO NATURAL Domin&Kušík s. r. o., 2017. 352 s.
- Eftimová, J.: *Agroenvironmentálne a udržateľné aspekty pestovania viniča vo vinohradníckej oblasti Tokaj* [Agroenvironmental and sustainable aspects of viticulture in the Tokaj wine-growing region]. Habilitačná práca. Nitra: SPU, 2010. 136 s.
- Eftimová, Z.: Zdravotné benefity vín z vinohradníckej oblasti Tokaj [Health benefits of wines from the Tokaj wine-growing region]. *Sady a vinice*, 2019, 2, 62 – 64.
- Harmatha, J.: Kvalita vína z pohľedu chemika a someliera [Wine quality from the point of view of a chemist and a sommelier]. In *Víno ako multikultúrny fenomén*, 23 – 24. 4. 2009. Olomouc: Filozofická fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, 2009. 69 – 75.
- Haseeb, S., Alexander, B., Lopez Santi, R., Sosa Liprandi, A., Baranchuk, A.: What's in wine? A clinician's perspective. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2019, 29 (2), 97 – 106. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2018.06.010>. Accessed February 15, 2023.
- Chlebo, P., Gažarová, M., Dianiška, J.: Alcohol and nutritional [Alkohol a výživa]. In *Zdravie a výživa ľudí*. Bratislava, Slovakia: NIKA, s. r. o., 2011, 1037.
- Chlebo, P., Čižmárová, M., Schwarzová, M.: Účinky umiernenej konzumácie červeného vína na ľudský organizmus [Effects of mild consumption of red wine on human body]. In *Víno a človek*. Zborník príspevkov z medzinárodného vedeckého seminára EEDA, Búč, 22 – 23. 4. 2010. 24 – 38.
- Chiva-Blanch, G., Arranz, S., Lamuela-Raventos, R. M., Estruch, R.: Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies. *Alcohol and alcoholism*, 2013, 48 (3), 270 – 277, <https://doi.org/10.1093/alc/agt007>. Accessed January 21, 2023.
- Chevallier, L.: Chapter 31 – Dyslipidémie, hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie [Dyslipidemia, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia]. In Chevallier, L. (Ed.). *Ordonnances Alimentaires* (Troisième Édition). Elsevier Masson, 2021. 185 – 194. <https://doi.org/10.1016/B978-2-294-76804-0.00031-3>. Accessed February 20, 2023.
- Inada, K. O. P., Leite, I. B., Martins, A. B. N., Fialho, E., Tomás-Barberán, F. A., Perrone, D., Monteiro, M.: *Jaboticaba berry*: A comprehensive review on its polyphenol composition, health effects, metabolism, and the development of food products, *Food Research International*, 2021, 147, 110 518. Health benefits of wines from the Tokaj wine-growing region. Accessed February 21, 2023.
- Kakaš, M.: The influence of biochemical processes on the creation of Tokaj wine [Vplyv biochémických procesov na tvorbu tokajského charakteru vína]. In *Tokajské vinohradníctvo a vinárstvo na Slovensku*. Nitra, Slovakia: SPU, 2005. 163 p.
- Kang, Q., Sun, J., Wang, B., Sun, B.: Wine, beer and Chinese Baijiu in relation to cardiovascular health: the impact of moderate drinking, *Food Science and Human Wellness*, 2023, 12 (1), 1 – 13. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.07.013>. Accessed February 21, 2023.
- Keylor, M. H., Matsuura, B. S., Stephenson, C. R. J.: Chemistry and biology of resveratrol-derived natural products. *Chemical Reviews*, 2015, 115 (17), 8976 – 9027. <https://doi.org/10.1021/cr500689b>. Accessed January 21, 2023.
- Košťálová, D., Fialová, S., Račková, L.: *Fytotherapia v súčasnej medicíne* [Phytotherapy in contemporary medicine]. Martin: Osveta, spol. s. r. o., 2012, 384 s.

Mach, F., Baigent, C., Catapano, A. L., Koskinas, K. C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M. J., De Backer, G. G., Delgado, V., Ference, B. A., Graham, I. M., Halliday, A., Landmesser, U., Mihaylová, B., Pedersen, T. R., Riccardi, G., Richter, D. J., Sabatine, M. S., Taskinen, M.-R., Tokgozoglu, L., Wiklund, O., Mueller, C., Drexel, H., Aboyans, V., Corsini, A., Doehner, W., Farnier, M., Erratum: 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk: The task force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *European Heart Journal*, 2020, 41 (44), 4255. Doi: 10.1093/eurheartj/ehz455. Accessed February 21, 2023.

Magyar, I., Tóth, T.: Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 2011, 28 (1), 94 – 100. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002010002224?via%3Dihu>. Accessed February 21, 2023.

Matsumoto, C., Miedema, M. D., Ofman, P., Gaziano, J. M., Sesso, H. D.: An expanding knowledge of the mechanisms and effects of alcohol consumption on cardiovascular disease. *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.*, 2014, 34, 159 – 171. Doi:10.1097/HCR.0000000000000042. Accessed February 21, 2023.

Molnár, A., Nicák, A., Škvarla, J., Návesňáková, Y., Škvarlová, A.: Vplyv tokajského vína v kombinácii s vodou a 10 % roztoku alkoholu na dĺžku života a rozvoj alkoholovej progérie u potkanov kmeňa Wistar SPF. [Effect of Tokaj wine in combination with water and 10% alcohol solution on lifespan and development of alcoholic streak in Wistar rats SPF]. In *Tokajské vinohradníctvo a vinárstvo na Slovensku*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2002, 133.

Oravec, S.: *Lipoproteíny plazmy* [Plasma lipoproteins]. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2011, 71. https://www.fmed.uniba.sk/fileadmin/lf/sluzby/akademicka_kniznica/PDF/Elektronicke_knihy_LF_UK/Lipoproteiny_plazmy2011_.pdf. Accessed February 21, 2023.

Podracká, L.: CRP – Cenný radca v klinickej praxi [CRP – Precious advicer in clinical practice]. *Ambulantná terapia*, 2008, 6 (4), 241 – 243. http://www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=3495. Accessed December 2, 2022.

Rifai, N., Horwath, A., Witter, R., Tietz, C.: *Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. St. Louis, Mo1: Elsevier, 2018, 6, 1888. [https://Doi.Org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://Doi.Org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3). Accessed February 21, 2023.

Rohály, G., Meszáros, G., Nagymarosy, A.: *Terra bene dicta the land of Hungarian wine Tokaj and beyond*. Budapest: Akó Kiadó, 2003, 247 p.

Sabaka, P., Mistríková, L., Wawruch, P., Baláň, D., Oravec, S., Dukát, A.: HDL- cholesterol – význam pre klinickú prax [HDL-cholesterol – relevance in clinical practice]. *Súčasná klinická prax*, 2012, 1, 31 – 35.

Strandberg, T. E., Strandberg, A. Y., Salomaa, V. V., Pitkälä, K., Tilvis, R. S., Miettinen, T. A.: Alcoholic beverage preference, 29-year mortality, and quality of life in men in old age. *J. Gerontol. Ser. A: Biol. Sci. Med. Sci.*, 2007, 62 (2), 213 – 218.

Shield, K. D., Gmel, G., Mäkelä, P., Probst, Ch., Room, R., Rehm, J.: Life-time risk of mortality due to different levels of alcohol consumption in seven European countries: implications for low-risk drinking guidelines. *Addict Abingdon Engl.*, 2017, 112, 1535 – 1544. Doi: 10.1111/add.13827. Accessed December 1, 2022.

Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., Pretorius, I. S.: Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2005, 11 (2), 139 – 173. <https://www.researchgate.net/publication/227806345>. Accessed December 15, 2022.

Tejero, M. H., Sanchez, A. C., Bataller, R.: Spectrum, screening, and diagnosis of alcohol-related liver disease. Review article. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 2023, 13 (1), 75 – 87. Doi:

<https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.10.002>. <https://www.jcehepatology.com/home>. Accessed November 18, 2022.

Vázquez-Agell, M., Sacanella, E., Tobias, E., Monagas, M., Antúnez, E., Zamora-Ros, R., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., Fernández-Solá, J., Nicolás, J. M., Estruch, R.: Inflammatory markers of atherosclerosis are decreased after moderate consumption of cava (sparkling wine) in men with low cardiovascular risk *J. Nutr.*, 2007, 137, 2279 – 2284. Doi: 10.1093/jn/137.10.2279. Accessed December 11, 2022.

Vlniešková, K.: Biochemické vyšetrenia pri ochoreniach pečene [Biochemical markers of liver damage]. *Newslab: časopis laboratórnej medicíny*, 2016, 7 (1), 57 – 61.

Zima, T.: *Laboratórní diagnostika* [Laboratory Diagnostics]. 2. vyd. Galén Karolinum Praha, 2009, 906 s.

Xia, E., He, X., Li, H., Wu, S., Li, S., Deng, G.: Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11 (2), 622 – 646. <https://www.mdpi.com/1422-0067/11/2/622>. Accessed December 18, 2022.

URL1: <http://www.mpsr.sk;/file:///H:/tokaj-specifikacia.pdf>., 2022. Accessed December 15, 2022.

URL2: The interactive tool for predicting and managing the risk of heart attack and stroke, 2022. <http://www.heartscore.org>. Accessed December 18, 2022.



THE ROLE OF MATERNAL NUTRITION DURING PREGNANCY – OVERVIEW OF DAILY DOSAGES RECOMMENDATIONS (REVIEW ARTICLE)

Podolská, Kristína¹; Mazánková, Dana¹; Göböová, Mária²; Vaňo, Ivan²

¹Department of Applied Pharmacy, Faculty of Pharmacy
Masaryk University, Palackého třída 1946/1, 612 00 Brno
The Czech Republic

²Department of Internal Medicine, Teaching Hospital Nitra, Špitálska č. 6, 950 01 Nitra
The Slovak Republic

podolskakristina.sk@gmail.com

ABSTRACT

This article focuses on the aspects of the role of nutrition during pregnancy. The nutritional requirements differ in comparison to non-pregnant women. A balanced diet and a sufficient supply of recommended macronutrients and micronutrients have an impact on proper foetal development. Balanced maternal nutrition may not only affect neonatal outcomes, but it may also have a far-reaching health impact on life of the neonate. The article primarily summarizes maternal nutrition, then the consequences of overnutrition and malnutrition, but it also informs about maternal nutrition during the preconception time and the influence of paternal nutrition on foetal health. Restricted vitamin intake by mother can result in a deficiency, which can have minor, but also significant impacts on foetal health. The main focus

is given to micronutrient importance and the risk of micronutrient deficiency.

Key words: deficiency; healthy diet; maternal nutrition; pregnancy; vitamins

INTRODUCTION

During the regular maternal diet, certain nutrients can be obtained in low or inadequate amounts and the recommended doses for pregnant women are not followed. Balanced nutrition during pregnancy is important for pregnant women, for developing foetuses and embryos. Nowadays, there are many informative articles about a balanced diet during pregnancy. In the following review article, our aim is to sum up the most important facts about nutrition in pregnancy, essential nutrients in pregnancy, which are significant for appropriate embryonal and foetal development

and the proper pregnancy proceeding. This review article informs about the basic facts relating to micro-nutrients in pregnancy, which can be useful for health care specialists and patients. Maternal nutritional status has an ability to affect the offspring's health. The aim of this review article is to provide evidence-based information about nutritional aspects during physiologic pregnancy and to provide an overview and emphasize the importance of macro and micronutrients. The objective is to provide information about micro-nutrients, recommended allowed daily dosing and consequences of micronutrient deficiencies. Altered maternal nutrition during pregnancy can affect foetal nutritional genomics, foetal development, foetal immune system, and disease development.

MATERIALS AND METHODS

This literature review informs about basic facts related to maternal nutrition during pregnancy and macro and micronutrient deficiencies. Articles were obtained mainly from the source database PubMed. Websites and books were used as the next source. A search was performed using the following terms as key words: pregnancy and nutrition, nutrition requirement during pregnancy, paternal nutrition and pregnancy, preconception nutrition, overnutrition during pregnancy, malnutrition during pregnancy, micronutrients in pregnancy, vitamin deficiency in pregnancy, macronutrients in pregnancy, pregnancy nutrition recommendations, trace elements and pregnancy, healthy diet during pregnancy, vitamins and pregnancy. There were no exclusion criteria. Scientific publications covering the period from the year 1989 up to the year 2022 were used for this article.

Composition of macronutrients in diet

The three main macronutrients are carbohydrates, proteins, and fats, which are considered as essential macronutrients. Essential macronutrients are necessary for successful pregnancy outcomes (Kominiarek and Rajan, 2016). Protein intake during pregnancy should represent 10 % to 25 % of total energy intake

and should be kept at a moderate level. Protein molecules have a certain function in the structural formation of keratin and collagen fibres. Proteins also have functional properties as enzymes, for protein transport and as hormones (Mousa, Naquash, Lim, 2019). Carbohydrates in the maternal diet should represent between 45 % to 60 % of the calories (Amezcu-Prieto et al., 2019). Fats in the maternal diet should represent between 20 % to 35 % of total energy intake (Kominiarek and Rajan, 2016). Omega-3 supplementation can lower the risk of preterm birth, and supplementation with PUFA (polyunsaturated fatty acids) can improve neonatal outcomes in high-risk pregnancies (Mousa, Naquash, Lim, 2019).

Importance of micronutrients in pregnancy

Vitamins in pregnancy

Vitamin B9 (folic acid) is an important nutrient, mainly during the period of pregnancy. The key role of folate during pregnancy is DNA replication. It is also a substrate for enzymatic reactions, amino acid metabolism and is important for the appropriate development of the foetus (Greenberg et al., 2011). Recommended daily allowance for pregnant women is 600 ($\mu\text{g/day}$) (Kominiarek and Rajan, 2016). Deficiency in pregnant women leads to neural tube defects. In adult non-pregnant patients, it was described that the deficiency can lead to problems with cell division, and it can decrease elimination of toxic metabolites (Khan and Jialal, 2022).

Vitamin A (retinoid) is necessary for ocular integrity and bone development, it has a protective effect on skin, mucosa, hair, reproductive organs, epithelial tissue and immune system. Vitamin A has its role in the normal development of embryos, it plays a key role in proper foetal ocular health, foetal bone health and foetal immune system. Vitamin A deficiency is more common in the last quarter of pregnancy. Vitamin A deficiency can increase the risk of foetal growth restriction and insulin resistance of the offspring in the future (Maia et al., 2019). Recommended daily allowance for pregnant women is 770 ($\mu\text{g/day}$) (Komini-

arek and Rajan, 2016). The deficiency can increase the risk of maternal anaemia (Hamdy, Aleem, El-Shazly, 2013). Despite the fact that vitamin A plays an important role in normal embryonic development, higher doses increase the risk of teratogenic effect and birth defects (Dibley and Jeacocke, 2001). High doses of vitamin A can represent a teratogenic effect and high doses in the first quarter of the pregnancy can lead to congenital malformations up to spontaneous abortion (Maia et al., 2019).

Vitamin C (ascorbic acid) is a water-soluble vitamin having many metabolic functions such as activations of vitamin B, folic acid and conversion of amino acids up to antioxidant function (Chambial et al., 2013). Recommended daily allowance for pregnant women is 85 mg/day (Kominiarek and Rajan, 2016). Its deficiency in pregnant women relate to anaemia, infections, and it may worsen wound healing in severe cases of deficiency; it can lead to capillary haemorrhage (Chambial et al., 2013). Lee et al. (2004) studied the relationship between maternal serum levels of ascorbic acid and vitamin E in the second trimester in relation to birthweight and length. It was found that sufficient maternal serum concentration of ascorbic acid and vitamin E in the second trimester was positively associated with birth weight and length of newborns (Lee et al., 2004).

Vitamin E is a fat-soluble micronutrient that reduces oxidative damage. Vitamin E can reduce the risk of pregnancy complications involving oxidative stress, but the range of beneficial roles of vitamin E in pregnancy is still a subject of discussions. In the preclinical studies, it was described that vitamin E can have a preventive role in the reduction of preeclampsia, however, the clinical studies did not confirm a significant impact on preeclampsia occurrence. Moreover, deficiency of vitamin E can increase the risk of female infertility and miscarriage. Vitamin E and ascorbic acid can reduce the effect of foetal intrauterine growth restriction in animals (Siddiqui et al., 2021). Recommended daily allowance for pregnant women is 15 mg/day (Kominiarek and Rajan, 2016).

Vitamin D is a steroid vitamin from the group of

fat-soluble vitamins (American Pregnancy Association, 2022). It remains controversial, if the deficiency of vitamin D in pregnant women can increase risk of preeclampsia and hypertension. It was found that maternal vitamin D concentration can positively correlate with birth weight. Vitamin D deficiency can affect foetal skeletal, lung and immune development (Lo et al., 2019). Recommended daily allowance for pregnant women is 15 ($\mu\text{g}/\text{day}$) (Kominiarek and Rajan, 2016).

B-vitamins, such as B_1 (thiamine), B_2 (riboflavin), B_3 (niacin), B_6 (pyridoxine) and B_{12} (cyanocobalamin), have a role of coenzymes in metabolism, they are pathways for energy generation and blood cell formation. Their deficiency can lead to cellular growth dysfunctions and nerve tissue development dysfunctions. Each of these vitamins has its specific role (Mousa, Naquash, Lim, 2019). Recommended daily allowance for pregnant women for B_1 (thiamine) is 1.4 (mg/day), B_2 (riboflavin) is 1.4 (mg/day), B_3 (niacin) is 18 (mg/day), B_6 (pyridoxine) is 1.9 (mg/day) and for B_{12} (cyanocobalamin) it is 2.6 ($\mu\text{g}/\text{day}$) (Kominiarek and Rajan, 2016).

Trace elements and minerals in pregnancy

Calcium (Ca), is the most abundant mineral, important for muscle activity, bone formation, and endocrine activity (Kumar and Kaur, 2017). Recommended daily allowance in pregnancy is 1,000 (mg/day), in case of women with low calcium intake (Kominiarek and Rajan, 2016). Foetal calcium deposition can be increased in the third trimester up to 350 mg/day (Hacker, Fung, King, 2012). Calcium deficiency increase risk of hypertension, preterm birth and severe deficiency of calcium can lead to foetal mortality. Simultaneous deficiency of calcium and vitamin D can result to osteoporosis (Kumar and Kaur, 2017).

Iodine is an essential micronutrient for thyroid hormone synthesis (Lee and Pearce, 2015). Recommended daily allowed dose for pregnant women is approximately 250($\mu\text{g}/\text{day}$) (Yarrington and Pearce, 2011). The requirement is mainly increased at the be-

ginning of pregnancy because of increased maternal thyroid hormone production, increased renal iodine losses and due to transport of iodine to the foetus (Lee and Pearce, 2015). Deficiency of this essential micronutrient can lead to maternal and foetal hypothyroidism and neurodevelopmental foetal disorders; the most severe case is cretinism (Zimmermann, 2012).

The importance of Fe (Iron) lies in oxygen transport by red blood cells, further in energy production, growth and development. Recommended daily allowance for pregnant women is 27 (mg/day) (Kominiarek and Rajan, 2016; Brannon and Taylor, 2017). The foetus is completely dependent on maternal iron passing via the placenta (Cerami, 2017). Iron is important for the foetus due to haematopoiesis (Brannon and Taylor, 2017). Deficiency during pregnancy leads to maternal illness, low birth weight, prematurity, and intrauterine growth restriction. Iron deficiency at the time of conception can increase the risk of autism, and iron deficiency in the second trimester can increase the risk of schizophrenia by 30 % in the offspring (Georgieff, 2020).

Zn (Zinc) has a key role in protein synthesis, cellular division, and nucleic acid metabolism (Chaffee and King, 2012). Recommended daily intake for pregnant women is 11 (mg/day) (Kominiarek and Rajan, 2016). Maternal zinc sufficiency is important for embryonal and foetal growth, development, and immune function (Shah and Sachdev, 2006; Terrin et al., 2015). Association was observed between maternal zinc supplementation and a reduction of the risk of preterm birth, in the meaning of reducing the incidence of maternal infections, which can lower the risk of preterm birth (Chaffee and King, 2012).

Trace elements are also important during pregnancy nutrition. Deficiency of these elements leads mainly to water and electrolyte abnormalities (Wada, 2004). Between trace elements belong iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), selenium (Se), chromium (Cr), cobalt (Co), iodine (I), manganese (Mn), molybdenum (Mo) and fluorine (F) (National Academies Press, 1989; Wada, 2004). Deficiency of these trace elements can increase the risk of anaemia, hypertension, foetal

growth restriction, preeclampsia and labour complications. It was observed that the sufficiency of minerals and trace elements can significantly reduce the risk of developing preeclampsia and preterm delivery. The diet with a lower amount of minerals and vitamins during pregnancy may increase the risk of infertility, abortion, placental abruption, premature rupture of membranes, stillbirths and low birth weight (Pathak and Kapil, 2004; Spencer, Vanderlelie, Perkins, 2015).

Paternal nutrition

Paternal nutrition can have a long-lasting effect on future neonate's health, paternal nutrition can increase the risk of neonate disease development in the future. According to the study of Dimofski et al. (2021), paternal consumption of a diet rich in fat in animal models can have a negative influence on pancreatic β -cells in the offspring. Consequently, a paternal diet rich in fat can influence metabolic outcomes in the offspring, furthermore it can increase the risk of chronic kidney disease and the risk of development of a metabolic syndrome in the offspring (Dimofski et al., 2021).

Maternal nutrition in the preconception time

Appropriate diet during the preconception time can improve perinatal outcomes and micronutrient deficiencies. According to Stephenson et al. (2018), a very critical period are weeks around conception; in this period when fertilization occurs or a developing embryo is already present, it is sensitive to environmental factors and also to deficiency and availability of macro and micronutrients (Stephenson et al., 2018). For a more severe impact on preconception health, there is a needed strategy in nutritional attitude as a part of the lifestyle with a focus on the reproductive ages of women (Stephenson et al., 2018).

Maternal malnutrition and its effect on foetal and newborn's health

Disbalance in maternal nutrition very frequently leads to changes in the birthweight. However, mater-

nal undernutrition or malnutrition can lead to negative long-term outcomes for foetal health. Maternal malnutrition usually leads to lower birth weight of neonates (shorter stature, lower cognitive performance). Subsequently, lower birth weight can increase the risk of diseases in the future of the infant's life, such as higher blood pressure and reduced glucose tolerance. Lower birth weight can later negatively impact a newborn's immune, cardiovascular, renal or respiratory system. Maternal malnutrition can also lead to the creation of foetal malformations. Insufficient maternal nutrient intake can lead to higher perinatal death rates (Tláskal, 2009; Fall, 2013).

Maternal overnutrition and its effect on newborn's health

Maternal overnutrition can lead to different negative outcomes depending on the critical periods of embryo and foetus development. High maternal nutrient intake during pregnancy can have negative impact on foetal organ levels and metabolism, and therefore, maternal overnutrition is also a determinant of pregnancy outcomes. According to the data from animal studies, the outcomes revealed that maternal high fat diet in rodents can increase the risk of adiposity, hyperglycaemia, insulin resistance, and dyslipidaemia in the rodent's offspring. Maternal high-fat diet in rodents can increase the risk of worsening the cognitive functions of animal offspring (Sarker et al., 2019).

Particular severe deficiencies of nutrients and effect on foetal and neonatal health

Vitamin deficiency

Folic acid during pregnancy is very important; folate, also known as vitamin B₉, is a nutrient essential for DNA replication involved in amino acid synthesis and for vitamin metabolism (Greenberg et al., 2011). Approximately 4 to 6 weeks of folic acid administration are necessary to ensure adequate levels before the neurulation begins three weeks after the conception. Folic acid has an essential role in the prevention of neural tube defects (Stephenson et al., 2018). Folic

acid deficiency in periconception time is connected with an increased risk of preeclampsia, miscarriage, low birth weight and neonatal mortality (Stephenson et al., 2018). Consequently, folic acid deficiency relates to maternal peripheral neuropathy and anaemia, as well as to foetal congenital anomalies (Tláskal, 2009; Greenberg et al., 2011).

Vitamin D deficiency in pregnant women can be caused by insufficient dietary intake or supplementation influenced by the short time spent outdoors, the season, and the nutrition requirement of the foetus during development and according to the gestational age (Chen, Chen, Xu, 2021). Vitamin D deficiency can impact foetal health in the manner of preeclampsia, low birthweight, neonatal hypocalcaemia, increased risk of low postnatal growth and bone fragility, but it can also impair the immune system functioning (Mulligan et al., 2010).

Deficiency of minerals, trace elements and other nutrients

Iron deficiency during pregnancy can have symptoms, such as: fatigue, apathy, headache, palpitation, hair loss and tinnitus. A mother to be can also have more severe symptoms, such as: breathing difficulties, fainting, and tiredness. Maternal iron deficiency can increase the risk of preeclampsia. Severe iron deficiency can increase the risk of intrauterine growth retardation, prematurity, low birth weight, and other foetal morbidity risks (Tláskal, 2009; Abu-Ouf and Jan, 2015).

Maternal iodine deficiency can affect foetal neurodevelopment, in certain cases with severe maternal iodine deficiency, it can lead to cretinism (Tláskal, 2009; Zimmermann, 2012).

Deficiency of omega-3 fatty acids can increase the risk of intrauterine growth restriction, maternal depression, preterm birth allergies and asthma later in the child's life. Deficiency of omega-3 fatty acids can increase the risk of worsening the neurocognitive outcomes later in the neonates' life (Nordgren et al., 2017).

Another important nutrient during pregnancy is cal-

cium. Calcium deficiency during pregnancy according to the professional literature appears in the cases of women with hypoparathyroidism and those who have severe calcium diet deficiency (Almaghamsi, Almalki, Buhary, 2018). Deficiency in calcium usually leads to hypertensive disorders, preeclampsia, and foetal growth complications. Moderate deficiency can occur, but can differ in manifestations and symptoms. Some patients do not have symptoms, but some patients may experience pain or ache in muscles. Patients with acute hypocalcaemia have symptoms on the neuromuscular and cardiac level, but also autonomic symptoms can be present. Chronic hypocalcaemia can be manifested by dermal, ophthalmologic and central nervous system complications (Almaghamsi, Almalki, Buhary, 2018).

Additional information in relation to maternal nutrition

Mediterranean-style diet can reduce the risk of preeclampsia by at least 20 % (Minhas et al., 2022, News Medical Life Sciences; Minhas et al., 2022, ScienceDaily). Mediterranean-style diet is in general mainly composed of vegetables, fruits, legumes, nuts, olive oil, whole grains and fish, and can diminish the risk of cardiovascular diseases (Minhas et al., 2022, ScienceDaily). An inappropriate choice or diet can increase the health risk of the foetus or embryo and can even lead to harmful outcomes. Unpasteurized milk, raw and undercooked food, repeatedly defrosted meals, or food incorrectly stored, and raw seafood should not be consumed during pregnancy (John Hopkins Medicine, 2022; The British Dietetic Association, 2022). Deficiency in the critical nutrients and an improperly set diet can cause malformations and negative health outcomes (Brown and Wright, 2020). It was described in a study, that women who did not take daily prenatal vitamins immediately before and during the first month of pregnancy were almost twice at risk to have a child with an autistic spectrum disorder (University of California – Davis Health System, 2011). A study by Braun et al. (2014) described a protective association between prenatal vitamin intake

and autism spectrum diagnosis; if prenatal vitamin or folic acid supplements were taken by women preconceptionally or during the first 2 months of pregnancy than in the next months of pregnancy, they had 40 % reduction in the risk of autism spectrum disorders (Braun et al., 2014).

On the other hand, the reduced risk of autism was observed in high-quality observational studies when there was prenatal vitamin use present, also in the prospective studies and early pregnancy (Friel et al., 2021).

CONCLUSION

Nutritional and vitamin requirements are increased during pregnancy due to gestational age, increased metabolic rate and other factors relating to pregnancy. If the balanced maternal nutrition does not remain preserved, there can be subsequent vitamin deficiencies, which can result in negative foetal health outcomes. Maternal malnutrition, but also maternal overnutrition during pregnancy can result in negative foetal or neonatal outcomes and can have a far-reaching health impact, which is highlighted later in the infant's life. A balanced diet, healthy unprocessed foods, naturally occurring abundant range and spectrum of vitamins is beneficial for maternal and foetal health. Diversity of nutrients target the specific vitamin and mineral needs to support a healthy pregnancy. Prenatal vitamin supplementation can improve perinatal outcomes and maternal micronutrient deficiencies. A very essential prenatal vitamin remains the folic acid (Vitamin B₉), which is involved in the DNA replication, and its deficiency leads to neural tube defects. Trace elements deficiency increases the risk of water and electrolyte abnormalities and may represent a risk of foetal complications. Mediterranean-style diet is recommended as a part of the maternal diet.

ACKNOWLEDGEMENTS

I am grateful to the co-authors with whom I had the opportunity to work during this review article.

FUNDING

None.

REFERENCES

- Abu-Ouf, N. M., Jan, M. M.: The impact of maternal iron deficiency and iron deficiency anemia on child's health. *Saudi Med. J.*, 2015, 36 (2), 146 – 149. Doi: 10.15537/smj.2015.2.10289.
- Almaghamsi, A., Almalki, M. H., Buhary, B. M.: Hypocalcemia in pregnancy: a clinical review update. *Oman Med. J.*, 2018, 33 (6), 453 – 462. Doi: 10.5001/omj.2018.85.
- American Pregnancy Association. Vitamin D and pregnancy. <https://americanpregnancy.org/healthy-pregnancy/pregnancy-health-wellness/vitamin-d-and-pregnancy/>. Accessed September 10, 2022.
- Amezcuá-Prieto, C., Martínez-Galiano, J. M., Cano-Ibáñez, N., Olmedo-Requena, R., Bueno-Cavanillas, A., Delgado-Rodríguez, M.: Types of carbohydrates intake during pregnancy and frequency of a small for gestational age newborn: a case-control study. *Nutrients*, 2019, 11 (3), 523. Doi: 10.3390/nu11030523.
- Braun, J. M., Froehlich, T., Kalkbrenner, A., Pfeiffer, CH. M., Fazili, Z., Yolton, K., Lanphear, B.P.: Are autistic-behaviors in children related to prenatal vitamin use and maternal whole blood folate concentrations? *J. Autism Dev. Disord.*, 2014, 44 (10), 2602 – 2607. Doi: 10.1007/s10803-014-2114-x.
- Brannon, P. M, Taylor, Ch. L.: Iron supplementation during pregnancy and infancy: uncertainties and implications for research and policy. *Nutrients*, 2017, 9 (12), 1327. Doi: 10.3390/nu9121327.
- Brown, B., Wright, C.: Safety and efficacy of supplements in pregnancy. *Nutr. Rev.*, 2020, 78 (10), 813 – 826. Doi: 10.1093/nutrit/nuz101.
- Cerami, C.: Iron nutriture of the fetus, neonate, infant, and child. *Ann. Nutr. Metab.*, 2017, 71 (Suppl. 3), 8 – 14. Doi: 10.1159/000481447.
- Dibley, M. J., Jeacocke, D. A: Safety and toxicity of Vitamin A supplements in pregnancy. *Food Nutr. Bull.*, 2001, 22 (3). Doi: 10.1177/156482650102200304.
- Dimofski, P., Meyre, D., Dreumont, N., Leininger-Muller, B.: Consequences of Paternal Nutrition on Offspring Health and Disease. *Nutrients*, 2021, 13 (8), 2818. Doi: 10.3390/nu13082818.
- Fall, C. H. D.: Fetal malnutrition and long-term outcomes. Nestle Nutr. Institute Workshop Ser. *Maternal and Child Nutrition*, 2013, 74, 11 – 25. Doi: 10.1159/000348384.
- Friel, C., Leyland, A. H., Anderson, J. J., Havdahl, A., Borge, T., Shimonovich, M., Dundas, R.: Prenatal vitamins and the risk of offspring autism spectrum disorder: systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, 2021, 13 (8), 2558. Doi: 10.3390/nu13082558.
- Georgieff, M. K.: Iron Deficiency in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2020, 223 (4), 516 – 524. Doi: 10.1016/j.ajog.2020.03.006.
- Greenberg, J. A., Bell, S. J., Guan, Y., Yu, Y.: Folic acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention. *Rev. Obstet. Gynecol.*, 2011, 4 (2), 52 – 59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3218540/>. Accessed July 7, 2022.
- Hacker, A. N., Fung, E. B., King, J. C.: Role of calcium during pregnancy: maternal and fetal needs. *Nutr. Rev.*, 2012, 70 (7), 397 – 409. Doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00491.x.
- Hamdy, A. M., Aleem M. M. A, El-Shazly, A. A.: Maternal Vitamin A deficiency during pregnancy and its relation with maternal and neonatal hemoglobin concentrations among poor Egyptian families. *ISRN Pediatr.*, 2013, 652148. Doi: 10.1155/2013/652148.
- Chaffee, B. W, King, J. C: Effect of zinc supplementation on pregnancy and infant outcomes: a systematic review. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.*, 2012, 26 (0 1), 118 – 137. Doi: 10.1111/j.1365-3016.2012.01289.x.
- Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K. K.,

John, P. J., Sharma, P.: Vitamin C in disease prevention and cure: an overview. *Indian J. Clin. Biochem.*, 2013, 28 (4), 314 – 328. Doi: 10.1007/s12291-013-0375-3.

Chen, B., Chen, Y., Xu, Y.: Vitamin D deficiency in pregnant women. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100 (41), e27505. Doi: 10.1097/MD.00000000000027505.

John Hopkins Medicine. Nutrition during pregnancy. <https://www.hopkinsmedicine.org/health/wellness-and-prevention/nutrition-during-pregnancy>. Accessed September 25, 2022.

Khan, K. M., Jialal, I.: *Folic acid deficiency*, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535377/>. Updated June 27, 2022. Acccessed September 2, 2022.

Kominiarek, M. A. Rajan, P.: Nutrition recommendations in pregnancy and lactation. *Med. Clin. North Am.*, 2016, 100 (6), 1199 – 1215. Doi: 10.1016/j.mcna.2016.06.004.

Kumar, A., Kaur, S.: Calcium: a nutrient in pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. India*, 2017, 67 (5), 313 – 318. Doi: 10.1007/s13224-017-1007-2.

Lee, B. E, Hong, Y. C., Lee, K. H., Kim, Y. J., Kim, W. K., Chang, N. S., Park, E. A., Park, H. S., Hann, H. J.: Influence of maternal serum levels of vitamins C and E during the second trimester on birth weight and length. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2004, 58 (10), 1365 – 1371. Doi: 10.1038/sj.ejen.1601976.

Lee, S. Y., Pearce, E. N.: Iodine intake in pregnancy – even a little excess is too much. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2015, 11 (5), 260 – 261. Doi: 10.1038/nrendo.2015.28.

Lo, T.-H., Wu, T.-Y., Li, P.-CH., Ding, D.-CH.: Effect of Vitamin D supplementation during pregnancy on maternal and perinatal outcomes. *Tzu Chi Med. J.*, 2019, 31 (4), 201 – 206. Doi: 10.4103/tcmj.tcmj_32_19.

Maia, S. B., Souza, A. S. R., Caminha, M. F. C., Silva, S. L., Cruz, R. S. B. L. C., Dos Santos, C. C., Filho, M.B.: Vitamin A and pregnancy: a narrative review. *Nutrients*, 2019, 11 (3), 681. Doi: 10.3390/nu11030681.

Minhas, A. S., Hong, X., Wang, G., Rhee, D. K., Liu, T., Zhang, M., Michos, E. D, Wang, X., Mueller N. T.: Mediterranean-style diet could reduce preeclampsia risk by at least 20 %. *News Medical Life Sciences*, 2022. <https://www.news-medical.net/news/20220420/Mediterranean-style-diet-could-reduce-preeclampsia-risk-by-at-least-2025.aspx>. Updated April 20, 2022. Accessed September 10, 2022.

Minhas, A. S., Hong, X., Wang, G., Rhee, D. K., Liu, T., Zhang, M., Michos, E. D, Wang, X., Mueller N. T.: Following a Mediterranean-style diet during pregnancy may reduce the risk of preeclampsia. *ScienceDaily*, 2022. <https://www.sciencedaily.com/releases/2022/04/220420092129.htm>. Updated April 20, 2022. Accessed September 10, 2022.

Mousa, A., Naqash. A., Lim, S.: Macronutrient and micronutrient intake during pregnancy: an overview of recent evidence. *Nutrients*, 2019, 11 (2), 443. Doi: 10.3390/nu11020443.

Mulligan, M. L., Felton, S. K., Riek, A. E., Bernal-Mizrachi, C.: Implications of vitamin D deficiency in pregnancy and lactation. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2010, 202 (5), 429. e1-9. Doi: 10.1016/j.ajog.2009.09.002.

Nordgren, T. M., Lyden, E., Anderson-Berry, A., Hanson, C.: Omega-3 fatty acid intake of pregnant women and women of childbearing age in the United States: potential for deficiency? *Nutrients*, 2017, 9 (3), 197. Doi: 10.3390/nu9030197.

Pathak, P., Kapil, U.: Role of trace elements zinc, copper and magnesium during pregnancy and its outcome. *Indian J. Pediatr.*, 2004, 71, 1003 – 1005. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF02828116>.

Sarker, G., Litwan, K., Kastli, R., Peleg-Raibstein, D.: Maternal overnutrition during critical developmental periods leads to different health adversities in the offspring: relevance of obesity, addiction and schizophrenia. *Sci. Rep.*, 2019, 9, 17322. Doi: 10.1038/s41598-019-53652-x.

Siddiqui, M. A., Ahmad, U., Ali, A., Ahsan, F., Haider F.: Chapter 6 – Role of Vitamin E in Pregnancy. Erkekoglu, P., Santos, J. S., Blumenberg, M. (Eds.) *Vitamin E in Health and Disease – Interac-*

tions, Diseases and Health Aspects. London: Intechopen, 2021. 300 p.

Shah, D., Sachdev, H. P. S.: Zinc deficiency in pregnancy and fetal outcome. *Nutr. Rev.*, 2006, 64 (1), 15 – 30. Doi: 10.1111/j.1753-4887.2006.tb00169.x.

Spencer, B. H., Vanderlelie, J. J., Perkins, A. V.: Essentiality of trace element micronutrition in human pregnancy: a systematic review. *J. Preg. Child Health*, 2015, 2,157. Doi: 10.4172/2376-127X.1000157.

Stephenson, J., Heslehurst, N., Hall, J., Schoenaker, D. A. J. M., Hutchinson, J., Cade, J. E., Poston, L., Barrett, G., Crozier, S. R., Barker, M., Kumaran, K., Yajnik, C.H. S., Baird, J., Mishra, G. D.: Before the beginning: nutrition and lifestyle in the preconception period and its importance for future health. *Lancet*, 2018, 391 (10 132), 1830 – 1841. Doi: 10.1016/S0140-6736(18)30311-8.

Tláskal, P.: Výživa ženy v těhotenství a v době laktace. [Nutrition of a woman during pregnancy and during lactation]. PowerPoint presentation. *Konference Dietní výživa, 2009. Společnost pro výživu, Z. S.*, 6 – 7. 10. 2009, Pardubice, Česká republika.

The British Dietetic Association. Pregnancy and diet: Food Fact Sheet. <https://www.bda.uk.com/resource/pregnancy-diet.html>. Accessed September 25, 2022.

National Academies Press. Trace Elements. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK218751/>. Updated July, 1989. Accessed September 24, 2022.

Terrin, G, Canani, R. B., Di Chiara, M., Pietravalle, A., Aleandri, V., Conte, F., De Curtis, M.: Zinc in early life: a key element in the fetus and preterm neonate. *Nutrients*, 2015, 7 (12), 10 427 – 10 446. DOI: 10.3390/nu7125542.

University of California – Davis Health System: Taking prenatal vitamins early during pregnancy can reduce risk of having children with autism. <https://www.news-medical.net/news/20110526/Taking-prenatal-vitamins-early-during-pregnancy-can-reduce-risk-of-having-children-with-autism.aspx>. Updated May 26, 2011. Accessed September 25, 2022.

Wada, O.: What are trace elements? Their deficiency and excess states. *JMAJ*, 2004, 47 (8), 351 – 358.

Yarrington, C.H., Pearce, E. N.: Iodine and pregnancy. *J. Thyroid Res.*, 2011, 934104. Doi: 10.4061/2011/934104.

Zimmermann, M. B.: The effects of iodine deficiency in pregnancy and infancy. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.*, 2012, 26 (Suppl. 1), 108 – 117. Doi: 10.1111/j.1365-3016.2012.01275.x.

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 štvrtročne 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 nevyžiadane recenzie.

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

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

Za uverejnenie článku v časopise sa nevyžadujú žiadne poplatky.

VŠEOBECNÉ ZÁSADY

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

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

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

Pri zasielaní rukopisu autori pripájajú prehlásenie, že ich článok je pôvodný, neboli 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 teste sa pripojí jej vysvetlenie v zátvorke, pokiaľ sa nejedná o štandardnú jednotku merania.

Názvoslovie a terminológia. V teste 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 čeľad'. Liečivá sa uvádzajú INN názvom v slovenskej, českej, resp. v anglickej mutácii a to podľa jazyka, v ktorom je rukopis napísaný. Ak je známy liekopisný názov, tak sa uprednostní, resp. prípustné sú obidva.

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

Latinské termíny sa píšu kurzívou.

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

Pre lieky sa uvádzajú firemný názov a držiteľ registrácie, resp. výrobca a krajina (pri ich prvom použití), *Priklad:* 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 uvádzajú 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 dojsť pri konvertovaní farebných obrázkov pre potreby čiernobielej tlače sa odporúča zaslať obrázky a ilustrácie vo verzii vhodnej pre takúto tlač. V časopise môžu mať obrázky a ilustrácie šírku len 8,5 cm a nachádzať sa na strane širokej 17,5 cm, preto by veľkosť písmen v legende mala zodpovedať týmto rozmerom (Times New Roman 10). Obrázky, fotografie a grafy majú byť orámované, priebežne očíslované a má k nim byť pripojený príslušný text týkajúci sa obsahu a prípadne aj zdroja. Číslo a text nemá byť súčasťou fotografie/obrázku/grafu. Číslo a názov obrázku, fotografie a grafu sa má umiestniť nad a príslušný text týkajúci sa obsahu a prípadne aj zdroja (legenda) sa má umiestniť pod nimi. Pri mikrofotografiách text obsahuje aj údaje o mierke a technike farbenia. Hlavné objekty, zmeny a zistenia sa v mikrofotografiách označujú šípkou alebo iným symbolom, ktorý je vysvetlený v legende.

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

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

Etické aspekty. Pri popise experimentov vykonávaných na zvieratách sa uvádzajú, 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 štúdiach sa uvádzajú, 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 (pôvodného štúdia) 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 štúdiach je potrebné dodržať usporiadanie rukopisu do nasledovných častí: **ABSTRAKT, ÚVOD, MATERIÁL A METÓDY, VÝSLEDKY, DISKUSIA, ZÁVERY, (POĎAKOVANIE), ZOZNAM LITERATÚRY.**

Každý nadpis sa uvádzá 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 vydelené závery. Zdôrazňuje nové a dôležité aspekty štúdie a pozorovaní.

Key words: Klúčové 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 striktne relevantné zdroje bez zahrnutia podrobných údajov a záverov prezentovaných v týchto zdrojoch. Úvod sa má končiť cieľom, ktorý si autori vytýčili.

MATERIÁL A METÓDY

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

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

VÝSLEDKY

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

Prezentácia výsledkov má byť výstižná, s logickou nadväznosťou a využívaním tabuľiek a názorných grafov. V tabuľkách a grafoch je potrebné vyhnúť sa duplicitne 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 uvádzat odporúčania.

POĎAKOVANIE

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

ZOZNAM LITERATÚRY

Všetky zdroje uvedené v zozname musia byť citované v texte.

Použité zdroje sa v zozname uvádzajú v abecednom poradí (podľa priezviska prvého autora), a každý z nich sa začína písat' 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 teste 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 závorke) 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., Mičkina, 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 Cassoviensis*, 2020, 2 (3), 69 – 78.

Kniha (editovaná, needitovaná):

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

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

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

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

Canganella, F., Balsamo, R.: Isolation and selection of probiotic microorganisms with antagonistic activity against *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://themedicalbiochemstripage.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 prehladových 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 prehladového článku – pre prehľadnosť sa používajú relevantné podnadpisy.

ZÁVER – Zodpovedanie otázok pre výskum, položených v úvode.

ZOZNAM LITERATÚRY – Potvrzuje 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 kazuištok 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 kazuištoky - uvádza sa priebeh, liečba, prognóza a ukončenie prípadu

DISKUSIA – zdôrazňujú sa zaujímavé aspeky prípadu

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

ZOZNAM LITERATÚRY

RECENZIA

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

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

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

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

Redakčná rada



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:

Jozef Nagy

Výkonná redaktorka/Deputy/Managing Editor:

Jana Koščová

Redakčná rada/Editorial Board:

Abu-Darwish, M. S. (*Shoubak, Jordan*), Boknik, P. (*Münster, Germany*), Castejon, A. M. (*Fort Lauderdale, Florida, USA*), Csöllei, J. (*Brno, Czech Republic*), Deelman, L. E. (*Groningen, Netherlands*), Devinyak, O. (*Uzhhorod, Ukraine*), El Naggar, El M. B. A. (*Damanhour, Egypt*), Getova, D. (*Plovdiv, Bulgaria*), Kyselovič, J. (*Košice, Slovak Republic*), Leddy, J. J. (*Ottawa, Canada*), Mojžiš, J. (*Košice, Slovak Republic*), Klimas, J. (*Bratislava, Slovak Republic*), Mučaji, P. (*Bratislava, Slovak Republic*), Opatřilová, R. (*Brno, Czech Republic*), Pirník, Z. (*Bratislava, Slovak Republic*), Pistl, J. (*Košice, Slovak Republic*), Roh, J. (*Hradec Králové, Czech Republic*), Şekeroğlu, N. (*Turkey, Kilis*), Šiminek, 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-vytacky>.