



VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV

**Zborník zo seminára doktorandov venovaného
pamiatke akademika Bod'u**

II. ročník - 2007

Košice, 12. september 2007

Zborník príspevkov prezentovaných na
Seminári doktorandov venovanom pamiatke akademika Boďu,
ktorý sa konal dňa 12. septembra 2007
v Košiciach

Usporiadali:

Univerzita veterinárskeho lekárstva
Ústav fyziológie hospodárskych zvierat Slovenskej akadémie vied
Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu, Východoslovenská pobočka



Zostavil: MVDr. Dušan Fabian, PhD.
Recenzoval: MVDr. Imrich Zelenák, DrSc.
Neprešlo jazykovou úpravou.

ISBN 978-80-969788-4-7

OBSAH

VPLYV DLHODOBEJ HYPODYNAMIE NA OBLIČKY JAPONSKÝCH PREPELÍC Z MORFOLOGICKÉHO ASPEKTU Almášiová V. <i>Ústav histológie a embryológie, UVL, Košice</i>	9
ÚČINOK AKRIDÍNOVÝCH DERIVÁTOV NA AGREGÁCIU LYZOZÝMU Bellová A. ¹ , Gažová Z. ² , Daxnerová, Z. ³ , Antalík M. ^{1,2} ¹ <i>Ústav chemických vied, Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice</i> ² <i>Ústav experimentálnej fyziky, oddelenie biofyziky, SAV, Košice</i> ³ <i>Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice</i>	13
ÚČINKY DEOXYNIVALENOLU A ZEARALENÓNU NA FAGOCYTÁRNU AKTIVITU V KRVI A ANTIOXIDAČNÝ STATUS BROJLEROV Bořutová R. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice</i>	17
VPLYV ROZMARÍNOVÉHO ESENCIÁLNEHO OLEJA NA PRIEBEH TNBS-INDUKOVANEJ KOLITÍDY U MYŠÍ Bukovská A. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice</i>	21
VPLYV IONIZUJÚCEHO ŽIARENIA A CHLORIDU ZINOČNATÉHO NA ZMENY KONCENTRACIE GLUKOZY A ALANÍNAMINOTRANSFERÁZY V SÉRE KURČIAT Daňová D. <i>Ústav rádiobiológie, UVL, Košice</i>	24
OXID DUSNATÝ V MIECHE PO POŠKODENÍ PERIFÉRNEHO NERVU Dávidová A. ¹ , Schreiberová A. ² , Lacková M. ² , Kolesár D. ² , Maršala J. ² , Lukáčová N. ² ¹ <i>Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, SAV, Bratislava</i> ² <i>Neurobiologický ústav, SAV, Košice</i>	27
POROVNANIE VPLYVU RÔZNYCH FORIEM GLYCEROLU NA VYBRANÉ METABOLICKÉ UKAZOVATELE U DOJNÍC Farkašová Z., Reichel P., Kováč G. <i>II. Interná klinika, UVL, Košice</i>	31
ŠTANDARDIZÁCIA DETEKČIE MUTÁCIÍ V PRP GÉNE OVIEC V PRÍSTROJI DNALYSER Hreško S., Tkáčiková L. <i>Ústav mikrobiológie a imunológie, UVL, Košice</i>	36
INTERAKCIE MEDZI NIEKTORÝMI BIOMETRICKÝMI A HORMONÁLNYMI PARAMETRAMI FOLIKULOV VAJEČNÍKOV OVIEC PO INDUKOVANOM ESTRE Jankurová J. ¹ , Vlčková R. ¹ , Kostecká Z. ² ¹ <i>Ústav fyziológie, Katedra normálnej anatómie, histológie a fyziológie, UVL, Košice</i> ² <i>Ústav chémie, biochémie a biofyziky, K. chémie, biológie, a biochémie, UVL, Košice</i>	40

<p>STANOVENIE A IDENTIFIKÁCIA REZÍDUÍ SULFADIMIDÍNU V TKANIVÁCH KRÁLIKOV MIKROBIOLOGICKÝMI SCREENINGOVÝMI METÓDAMI Janošová J., Kožárová I., Máté D. <i>Katedra hygieny a technológie potravín, UVL, Košice</i></p>	45
<p>ISCHEMICKO - REPERFÚZNE POŠKODENIE DNA V KRVNÝCH LYMFOCYTOCH Kravčuková P., Gottlieb M., Matiašová M., Burda J. <i>Neurobiologický ústav, SAV, Košice</i></p>	50
<p>VÝSKYT REZÍDUÍ WARFARÍNU PRI APLIKÁCIÍ NA RASTLINNÉ KULTÚRY Kudrliková D.¹, Hromada R.¹, Ondrašovičová S.², Ondrašovič M.¹, Sasáková N.¹ ¹<i>Ústav hygieny zvierat, Katedra životného prostredia, UVL, Košice</i> ²<i>Štátny veterinárny a potravinový ústav, Košice</i></p>	54
<p>CHROMOZÓMOVÉ ABERÁCIE V LYMFOCYTOCH HOVÄDZIEHO DOBYTKA EXPONOVANÝCH FUNGICÍDOM EUPAREN MULTI (TOLYLFLUANID) Lakatošová M. <i>Ústav genetiky, UVL, Košice</i></p>	59
<p>ÚČINOK TERAPEUTICKEJ AFERÉZY AKO FORMY IMUNOTERAPIE U PSOV S NÁDOROVÝM OCHORENÍM Ledecká K.¹, Ogilvie G.K.², Howel M.D.³, Hajurka J.¹ ¹<i>Klinika chirurgie, ortopédie a röntgenológie, UVL, Košice</i> ²<i>California Veterinary Specialists, Angel Care Cancer Center, Carlsbad, California, USA</i> ³<i>Cytologic, Laboratory Research Center, Fort Collins, Colorado, USA</i></p>	63
<p>PARAMETRE A ŠTANDARDY PRE STANOVENIE WELFARE NA FARMÁCH HOVÄDZIEHO DOBYTKA Mareková J., Kottferová J., Ondrašovičová O., Ondrašovič M. <i>Katedra životného prostredia, UVL, Košice</i></p>	68
<p>ANTIBIOTICKÁ REZISTENCIA KMEŇOV STAFYLOKOKOV IZOLOVANÝCH Z MECHANICKY SEPAROVANÉHO HYDINOVÉHO MÄSA Mártonová M., Pipová M., Jevinová P. <i>Katedra hygieny a technológie potravín, UVL, Košice</i></p>	72
<p>MULTIPLEX PCR –METÓDA NA DETEKCIU ENTEROTOXIGÉNNYCH KMEŇOV STAPHYLOCOCCUS AUREUS Mašlanková J., Tkáčiková Ľ. <i>Ústav mikrobiológie a imunológie, UVL, Košice</i></p>	76
<p>POUŽITIE POSTCONDITIONINGU PRI NEURODEGENERÁCIÍ PO ISCHÉMII V NAJCITLIVEJŠÍCH REGIÓNOCH MOZGU POTKANA Matiašová M., Kravčuková P., Jergová S., Burda J. <i>Neurobiologický ústav, SAV, Košice</i></p>	80
<p>VARIÁCIE ODSŤUPU ARTERIA VERTEBRALIS A ARTERIA THORACICA INTERNA U KRÁLIKA Maženský D. <i>Ústav anatómie, UVL, Košice</i></p>	84

VÝSKYT DEDIČNÝCH OČNÝCH OCHORENÍ U PSOV Mihalová M. <i>Klinika chirurgie, ortopédie a röntgenológie, UVL, Košice</i>	87
KVALITA MÄSOVÝCH VÝROBKOV V DUCHU TRADÍCIE Mikulášová M., Turek P., Korimová L., Pažáková J. <i>Katedra hygieny a technológie potravín, UVL, Košice</i>	93
KOMPARATÍVNA GENOMICKÁ ANALÝZA PLAZMIDOV TREPONÉM Sikorová L. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice</i>	96
LUMBOSAKRÁLNY PRECHODOVÝ STAVEC U NIEKTORÝCH PLEMIEN PSOV Skurková L. <i>Klinika chirurgie, ortopédie a röntgenológie, UVL, Košice</i>	100
NATURÁLNE SUBSTANCIE A CHOV KRÁLIKOV Szabóová R. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice</i>	104
SÉROVÉ PROTEÍNY A PROTEÍNY AKÚTNEJ FÁZY U TELIAT POSTIHNUTÝCH RESPIRAČNÝM SYNDRÓMOM Tóthová Cs., Nagy O., Kováč G. <i>II. interná klinika, UVL, Košice</i>	108
EUBAKTERIÁLNY SYMBIONT PÔDNEHO PRVOKA KAHLIELLA SPP. Tóthová T. <i>Ústav chemických vied, UPJŠ, Košice</i>	112
AKÁ JE ÚROVEŇ POZNANIA SENZORICKÝCH KVALÍT? Václavová A., Maľa P., Baranová M. <i>Ústav hygieny a technológie mlieka, UVL, Košice</i>	116
MORFOLOGICKÉ VARIÁCIE TRUNCUS COSTOCERVICALIS SINISTER, ARTERIA INTERCOSTALIS SUPREMA SINISTRA, ARTERIA CERVICALIS SUPERFICIALIS DEXTRA U KRÁLIKA Vdoviaková K. <i>Ústav anatómie, UVL, Košice</i>	120

Profesor Bod'a (1927-2005) patril medzi popredných slovenských vedeckých pracovníkov a na ňom je postavená bohatá tradícia základného výskumu v oblasti fyziológie hospodárskych zvierat na Slovensku.

Ako mladý docent (31 rokov) Koloman Bod'a v roku 1958 prevzal vedenie Ústavu patologickej fyziológie Veterinárskej fakulty VŠP a o päť rokov neskôr sa stal vysokoškolským profesorom. Na výuke študentov v odbore patologickej fyziológie hospodárskych zvierat sa zúčastňoval počas 31 rokov – až do roku 1989.

V roku 1964 kreoval oddelenie fyziológie hospodárskych zvierat ÚEB SAV v Košiciach, z ktorého v r. 1969 vznikol Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV. Jeho cieľom bolo vybudovať moderný ústav reprezentujúci československú veterinársku fyziológiu nielen v Československu ale aj vo svete.

Profesor Bod'a vychoval niekoľko generácií veterinárnych lekárov ako aj mnohých vedeckých pracovníkov najmä v odbore veterinárnej fyziológie a fyziológie živočíchov. Jeho meno je naozajstným pojmom nielen na Slovensku a okolitých krajinách ale aj vo svete.

Na uctenie jeho pamiatky ÚFHZ SAV spoločne s UVL v Košiciach v r. 2006 usporiadal prvý ročník „Seminára doktorandov“ spojený so súťažou o najlepšie práce doktorandov. 12. septembra 2007 prebehol druhý ročník „Seminára doktorandov“, na ktorý sa prihlásilo 28 doktorandov, z toho 19 z UVL Košice, 4 z ÚFHZ SAV, 3 z NbÚ SAV a 2 z UPJŠ Košice. Sme veľmi radi, že na tomto seminári sa zúčastnil vysoký počet doktorandov, pričom veľmi priaznivo bola ohodnotená kvalita ich prednášok. Tak ako minulý rok súčasťou seminára je zborník prednášok vo forme krátkeho vedeckého článku, ktorý Vám predkladáme.

Prof. Ing. O. Ondrašovičová, PhD.
UVL Košice

Doc. MVDr. J. Koppel, DrSc.
ÚFHZ SAV Košice

VPLYV DLHODOBEJ HYPODYNAMIE NA OBLIČKY JAPONSKÝCH PREPELÍC Z MORFOLOGICKÉHO ASPEKTU

Almášiová V.

Ústav histológie a embryológie, UVL, Košice

ABSTRAKT

Študovali sme vplyv dlhodobej hypodynamie simulujúcej bezváhový stav v kozme na štruktúru, ultraštruktúru a aktivitu alkalickej fosfatázy v obličkách japonskej prepelice (*Coturnix coturnix japonica*). Kurčatá na druhý deň po vyliahnutí boli zavesené v plastových košielkach v klietkach tak, aby sa ich nohy nedotýkali podlahy. Krmivo a vodu mohli konzumovať *ad libitum*. Prepelice boli usmrtené na 14., 21., 28., 35., 42., 49. a 56. deň hypodynamie. Vzorky z obličiek sme spracovali na svetelnú a transmisnú elektrónovú mikroskopiu a na histochemickú analýzu alkalickej fosfatázy. Krátkodobá (14 – 28 dňová) hypodynamia nespôsobila výraznejšie zmeny v morfológickom obraze obličiek a aktivite alkalickej fosfatázy. Avšak pri dlhodobej (35 – 59 dňovej) hypodynamii sme zistili apoptózu niektorých buniek v proximálnych a distálnych kanálikoch. Odumierajúce bunky mali tmavé jadro nepravidelného tvaru a dlhé denzné mitochondrie. Výskyt apoptóz bol len sporadický a dokázali sme ich TUNEL testom. Štruktúra obličkových teliesok, medulárnej slučky a zberacích kanálikov nebola výraznejšie poškodená. Aktivita alkalickej fosfatázy bola mierne znížená ($P < 0.01$). Výsledky našich pozorovaní svedčia o tom, že dlhodobá hypodynamia negatívne pôsobí na štruktúru obličiek. Avšak aj napriek tomu sú japonské prepelice schopné v podmienkach dlhodobej simulovanej beztláče rásť, vyvíjať sa a dosiahnuť produkčný vek.

ÚVOD

Cieľom kozmickej biológie je zabezpečiť život aj za hranicami zemskej biosféry a dosiahnutie biologickej nezávislosti človeka od našej planéty. Úlohou kozmickej veterinárnej medicíny, zakladateľom ktorej na Slovensku bol pán akademik Koloman Boďa, je starostlivosť o zdravie a produkciu zvierat v kozme v súvislosti s medziplanetárnymi letmi a dlhodobými pobytmi ľudí na planetárnych staniciach. Jedným z limitujúcich prvkov pri dlhodobých pobytoch človeka v kozme je zásoba potravín, čiže je nevyhnutné získať základné potraviny z vlastných zdrojov. Riešením je využitie modelu zemskej biosféry, ktorý vytvorí základné podmienky pre život človeka vrátane jeho výživy. Na splnenie týchto zámerov je potrebné vytvorenie uzavretého autonómneho ekologického systému (Boďa, 1997).

Orbitálne stanice alebo kozmické lode s ľudskou posádkou určené pre dlhodobé pobyty v kozme predstavujú vlastne umelý uzavretý ekologický systém ako zjednodušený model zemskej biosféry, ktorý zabezpečí chod života na základe kolobehu CO_2 , O_2 , energie a organickej hmoty. Fungujúci uzavretý systém sa dosiahne jedine spojením autotrofných, heterotrofných organizmov a deštruktorov (Sychev a kol. 1999).

Pri výbere vhodného živočíšneho druhu sa najlepšie osvedčila japonská prepelica, ktorá predstavuje nevyhnutný heterotrofný článok v umelom uzavretom ekosystéme kozmických lodí. Má pomerne nízku telesnú hmotnosť, vysokú produkčnú a reprodukčnú schopnosť, krátky individuálny vývoj, dobrú toleranciu na stiesnené podmienky a adaptabilitu na mikrogravitáciu. Cieľom je, aby vyliahnuté japonské prepelice v podmienkach kozmickej lode dosiahli dospelosť a boli schopné reprodukcie (Boďa a kol. 1991, Boďa 1997).

Kozmické experimenty sú náročné a drahé, preto sa oveľa častejšie využívajú modelové pokusy na Zemi s napodobnením kozmického prostredia. Vesmírne prostredie sa však pri svojej unikátnosti nedá dokonale nahradiť. Chýbanie gravitácie nie je úplné ani v kozme, preto hovoríme o mikrogravitácii. Hypodynamia je metóda, ktorá na Zemi v laboratórnych podmienkach napodobňuje bezváhový stav v kozme (Planel 2004). U vtákov sa používajú špeciálne košielky zo sieťoviny, pomocou ktorých sú zvieratá zavesené na strope klietky tak,

aby sa nemohli dotýkať podlahy, avšak aby mohli prijímať krmivo a vodu *ad libitum*. Táto metóda bola vyvinutá v Ústave Biochémie a Genetiky SAV v Ivanke pri Dunaji (Juráni a kol. 1983) a použili sme ju aj v našich pokusoch.

Cieľom tejto práce, ktorá je súčasťou výskumu zaoberajúceho sa vplyvmi mikrogravitácie na jednotlivé orgány a tkanivá japonskej prepelice, bolo preštudovať morfológický obraz obličiek japonských prepelíc vystavených dlhodobej hypodynamii a opísať charakter histopatologických zmien.

MATERIÁL A METODIKA

Pokusy sa realizovali na Ústave biochémie a genetiky SAV v Ivanke pri Dunaji. Krátko po vyliahnutí boli kurčatá japonskej prepelice sexované a v našom pokuse sme použili 48 kohútikov. Na druhý deň po vyliahnutí sme 24 kohútikov ($n = 24$) zaradili do pokusu, pričom tieto boli vystavené hypodynamii a 24 kohútikov ($n = 24$) slúžilo ako kontrola. Pokusné zvieratá individuálne viseli v špeciálnych plastových flexibilných košielkach na strope klietky tak, že sa voľne nedotýkali podlahy, avšak príjem vody a krmiva mali neobmedzený. Priemerná hmotnosť dvojdnových kurčiat sa pohybovala v rozmedzí $7,46 \pm 0,62$ g. Prepelice toho istého veku a rovnako kŕmené slúžili ako kontrola. Kontrolné zvieratá boli chované v boxe, ktorý sa nachádzal v tej istej miestnosti bez okien s kontrolovanou ventiláciou a elektrickým ohrievaním infračervenými lampami s 24 hodinovým svetelným režimom. Prepelice boli kŕmené granulovanou kŕmnu zmesou HYD – 13 s obsahom $260\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ bielkovín a $11,5$ MJ využiteľnej energie. kg^{-1} . Pri práci sa dodržiavali zásady etiky pokusov na zvieratách (Korim a kol. 2003).

Bezprostredne po usmrtení japonských prepelíc dekapitáciou na 14., 21., 28., 35., 42. a 56. deň sme odoberali vzorky z obličiek pokusných aj kontrolných zvierat, v každej skupine po štyri zvieratá ($n = 4$). Materiál sme spracovali na svetelnú a transmisnú elektrónovú mikroskopiu, ako aj histochemickú analýzu alkalickej fosfatázy.

Svetelná mikroskopia (SM)

Vzorky z obličiek sme fixovali v 4 % neutrálnom formaldehyde, zaliali do parafínu a histologické rezy sme ofarbili hematoxyln – eozinom. Histologické preparáty sme prehliadali a fotografovali svetelným mikroskopom Jenamed s digitálnym mikrofotografickým zariadením Sony.

Transmisná elektrónová mikroskopia (TEM)

Z parenchýmu obličiek sme vyrezali platničky 1 mm hrubé, z ktorých sme vo fixačnom roztoku narezali excízy o veľkosti 1 x 1 mm. Materiál sme imerzne fixovali v 3% glutaraldehyde pri laboratórnej teplote 3 hodiny a postfixovali v 1 % OsO_4 (obidva v 0,15 M kakodylátovom pufri pH 7.2 - 7.4). Fixované vzorky sme premyli v kakodylátovom pufri, odvodnili v acetóne a propylénoxide, a zaliali do Durcupanu ACM. Ultratenké rezy sme rezali na ultramikrotóme Tesla BS 490, kontrastovali dvojfázovo uranylacetátom a citrátom olova a fotografovali elektrónovým mikroskopom Tesla BS 500.

Histochemická analýza alkalickej fosfatázy (AF)

Vzorky z obličiek sme najprv zmrazili v parách tekutého dusíka a až do spracovania uložili v mrazničke pri -20 °C. V kryostatových rezoch sme aktivitu alkalickej fosfatázy histochemicky stanovili modifikovanou azokopulačnou metódou podľa Lojdu a kol. (1979). Enzymovú aktivitu AF hlavne v oblasti mikroklkov proximálnych kanálikov sme stanovili cytofotometricky pomocou mikrodensitometra Vickers M 85a. Výsledky sme štatisticky vyhodnotili jednofaktorovou analýzou variancie (ANOVA). Signifikantné rozdiely medzi kontrolou a pokusom sme štatisticky vyhodnotili Tukeyho testom.

Dôkaz apoptózy

Na stanovenie apoptózy sme použili MEBSTAIN Apoptosis kit Direct (Immunotech, France) na priamu TUNEL reakciu. Parafínové rezy sme odparafinovali xylénom a etanolom a

následne ošetrili proteínkinázou K (PK⁺). DNA bázické konce boli označené využitím TdT reakcie, a farbené DAPI farbivom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Mikroskopická a submikroskopická štruktúra obličiek pri krátkodobej (14 až 21 dňovej) hypodynamii sa podstatnejšie nelíšila od štruktúry obličiek u kontrolných prepelíc. Podocyty glomerulov mali normálnu štruktúru, trabekuly a pedikuly podocytov neboli porušené. Bazálna membrána bola tenká a súvislá. Fenestrovane krvné kapiláry neboli poškodené. Kanáliky proximálneho segmentu mali nepravidelný štrbinovitý lúmen. Tvorili ich bunky cylindrického tvaru so stredne elektródenznou cytoplazmou. Okrúhle jadro s difúzne rozptýleným chromatóm a výrazným jadierkom sa nachádzalo v bazálnej časti bunky. Cytoplazma obsahovala početné veľké mitochondrie pretiahleho tvaru orientované kolmo na bazálnu membránu, ktorá vytvárala početné invaginácie. Cisterny a váčiky Golgiho komplexu sa nachádzali supranukleárne. V cytoplazme sa nachádzali aj cisterny granulovaného endoplazmatického retikula, lyzozómy a početné pinocytózne váčiky. Na apikálnom povrchu buniek boli prítomné vysoké tenké paralelne usporiadané početné mikroklky. Kanáliky distálneho segmentu mali oproti proximálnym kanálikom väčší lúmen, pretože boli tvorené bunkami kubického tvaru. Jadro okrúhleho tvaru s difúzne rozptýleným chromatóm a výrazným jadierkom sa nachádzalo v apikálnej časti bunky. V cytoplazme sa pri bazálnej membráne s hlbokými invagináciami nachádzali tyčinkovité mitochondrie. Henleovu slučku, ktorá sa nachádza len v dreňových nefrónoch tvorili bunky dlaždicovitého tvaru a mali okrúhle alebo oválne centrálné uložené jadro. Na apikálnej časti buniek sa nachádzali ojedinelé krátke nepravidelné mikroklky. V cytoplazme boli roztrúsené malé mitochondrie, granulované endoplazmatické retikulum a voľné ribozómy. Stenu zberacích kanálikov tvorili dva typy buniek. Svetlé bunky kubického tvaru s veľkým centrálnym uloženým jadrom. Ich cytoplazma obsahovala málo organel, mitochondrie boli orientované rôznym smerom a bazálna membrána nevytvárala záhyby. Na apikálnom povrchu sa nachádzali len ojedinelé malé mikroklky. Tmavé bunky obsahovali viac mitochondrií a vezikúl a na povrchu mali vyššie mikroklky. Zistili sme, že krátkodobá hypodynamia nemá negatívny vplyv na štruktúru obličiek, čo je v súlade s pozorovaniami Kočišovej a kol., 1991 a Cigánkovej a kol., 1993; ktoré študovali vplyv 7 dňovej mikrogravitácie v kozme na obličky dospelých japonských prepelíc.

Avšak pri dlhodobej (35 - 59 dňovej) hypodynamii sme pozorovali morfológické zmeny v niektorých bunkách proximálnych a distálnych kanálikov. Avšak štruktúra a ultraštruktúra obličkových teliesok ani kanálikov dreňovej slučky nebola ani vplyvom dlhodobej hypodynamie poškodená. Odumierajúce bunky proximálnych kanálikov v SM boli tmavé a mali jadro nepravidelného tvaru. V TEM mali tmavé scvrknuté jadro a v elektródenznej cytoplazme obsahovali dlhé denzné tyčinkovité mitochondrie s tenkými mitochondriovými kristami. Odumierajúce bunky sme ojedinele pozorovali aj v distálnych kanálikoch. Priamou TUNEL reakciou sme potvrdili, že tieto bunky odumierali formou apoptózy. Avšak tento nález nepovažujeme za alarmujúci a nevedie k zlyhaniu funkcie obličiek. Predpokladáme, že sporadický výskyt odumierajúcich buniek mohol vzniknúť jednako v dôsledku nedostatočného krvného zásobovania obličiek vplyvom hypodynamie a zároveň aj vyšším zaťažením obličiek pri vylučovaní splodín látkového metabolizmu a najmä vápnika. Zároveň v cytoplazme buniek zberacích kanálikov sme u pokusných prepelíc nachádzali veľké svetlé vakuoly, ktoré im dávali penovitý vzhľad. Ich prítomnosť by mohla súvisieť s exkréciou metabolitov.

Histochemickou analýzou na dôkaz alkalické fosfatázy v obličkách sme aj pri dlhodobej hypodynamii zaznamenali u pokusných prepelíc len mierny pokles hladín tohto enzýmu v porovnaní s kontrolou ($P < 0.01$). AF je viazaná najmä na kefkovitý lem proximálnych

kanálikov. Predpokladáme, že funkcia obličiek japonských prepelíc ani pri dlhodobej hypodynamii nebola výraznejšie narušená.

Na základe našich morfológických a histochemických nálezov konštatujeme, že najmä dlhodobá hypodynamia nepriaznivo vplýva na obličky. Avšak aj napriek tomu sú japonské prepelice schopné v podmienkach dlhodobej simulovanej beztiaže rásť, vyvíjať sa a dosiahnuť produkčný vek.

POĎAKOVANIE

Práca bola finančne podporená Grantovou agentúrou VEGA 1/3495/06.

Zároveň chcem poďakovať môjmu školiteľovi Prof. M. Zibrínovi, PhD. za odbornú pomoc a cenné rady pri realizácii tejto práce, ako aj kolegom z Ústavu histológie a embryológie za pomoc pri laboratórnych prácach a fotodokumentácii.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bod'a K, Gurieva T S, Juráni M, Sabo V, Košťál L, Dadasheva O A, Kočišová J, Jankela J, Lauková A, Reháč M, Šnejdárková M. Effect of microgravity on physiological functions of Japanese quail. In: Bod'a K., Baranov V.M. (Eds) Current Trends in Cosmic Biology and Medicine, Vol. II, Institut of Animal Biochemistry and Genetics SASc., Ivanka pri Dunaji, 1991; 185-199.
- Bod'a K Kozmická biológia a veterinárna medicína. Slov. Vet. Čas. 1997; 22: 125-6.
- Cigánková V, Kočišová J, Bod'a K, Tomajková E, Dadasheva O A. Morphological changes in tissue of the testes and kidneys in Japanese quail exposed to microgravity. Acta Vet. Brno 1993; 6, 62: Suppl.69-71.
- Juráni M, Výboh P, Lamošová D, Barošková Ž, Somogyiová E, Bod'a K., Gažo M. The effect of a 90-day hypodynamy on the neurohumoral system, egg laying and metabolism of proteins in Japanese quail. Physiologist 1983; 26, 6: 145-8.
- Korim P., Bugarský A., Juriš P., Hadbavný M., Korimová M. Ochrana pokusných zvierat. Slov. Vet. Čas. 2003; 28, 1: 10-12.
- Kočišová J., Cigánková V., Marčaník J., Bod'a K., Tomajková E., Dadasheva O.A., Sabo V. Ultrastructural and histochemical changes in tissues of Japanese quails exposed to 7-days microgravity. In: Bod'a K., Baranov V.M. (Eds) Current Trends in Cosmic Biology and Medicine, Vol. II, Institut of Animal Biochemistry and Genetics SASc., Ivanka pri Dunaji, 1991; 201-208.
- Lojda Z, Grossrau R, Schibler T H. Enzyme Histochemistry. Springer– Verlag, Berlin, 1979; pp.59-70.
- Planel H. Space and Life. An Introduction to Space Biology and Medicine. Gravity and Weightlessness. CRC Press, London-New York-Washington D.C., 2004; pp. 27-36.
- Sychev V N, Levinskikh M A, Shepelev E I, Podoliskii I G. Biological processes of the human environment regeneration within the Martian crew life support systems. Aviakosm. Ekolog.Med. 2003; 37, 5: 64-70.

ÚČINOK AKRIDÍNOVÝCH DERIVÁTOV NA AGREGÁCIU LYZOZÝMU

Bellová A.¹, Gažová Z.², Daxnerová, Z.³, Antalík M.^{1,2}

¹Ústav chemických vied, Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice

²Ústav experimentálnej fyziky, oddelenie biofyziky, SAV, Košice

³Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Prevenca vzniku amyloidných fibríl alebo ich odstránenie je jednou zo stratégií liečby amyloidných chorôb. Naším cieľom bolo identifikovať nízkomolekulárne látky, ktoré sú schopné potlačiť tvorbu amyloidných fibríl a/alebo deštruovať amyloidné fibrily. Študovali sme účinok štruktúrne rôznorodých akridínových derivátov na tvorbu lysozýmových amyloidných fibríl a na ich disagregáciu *in vitro*. Inhibičné a depolymerizačné vlastnosti akridínových derivátov boli sledované prostredníctvom viazania tioflavínu T (ThT) a Konžskej červenej. Zistili sme, že na antiagregačnú aktivitu akridínových derivátov vplyva štruktúra bočného reťazca a planárnosť molekuly akridínu. V prípade spiroakridínov a tetrahydroakridínov nebol pozorovaný žiadny inhibičný účinok, niektoré tetrahydroakridíny dokonca urýchl'ovali rast amyloidných fibríl. Pre skupinu akridínov, u ktorých bola pozorovaná vysoká inhibičná a disagregačná aktivita sme pomocou fluorescenčnej intenzity ThT určili hodnoty koncentrácie IC₅₀ (50% inhibícia) a DC₅₀ (50% disagregácia). Tieto hodnoty sa pre najviac účinné akridínové deriváty pohybovali v rozmedzí od 5-100 μM. Tvorba lysozýmových fibríl a účinok akridínov boli potvrdené elektrónovou mikroskopiou. Predmetom nášho záujmu bola aj interakcia študovaných akridínových derivátov s DNA, pretože interkalácia akridínu môže spôsobiť výraznú modifikáciu štruktúry DNA a tým smrť bunky. Spektrofotometrickou titráciou akridínov s DNA sme určili väzobné konštanty a počet väzobných miest sledovaných akridínov na DNA. Naším cieľom bola selekcia akridínových zlúčenín s vysokou antiagregačnou a minimálnou interkalačnou aktivitou.

ÚVOD

V poslednom desaťročí sa venuje štúdiu proteínovej agregácie veľká pozornosť najmä po zistení, že sprievodným znakom mnohých závažných chorôb je tvorba nerozpustných proteínových depozitov, ktorých hlavnú zložku tvoria amyloidné fibrily. V súčasnosti je známych viac ako 20 amyloidných ochorení, ktoré postihujú veľkú časť populácie hlavne v rozvinutých krajinách. Proteínové amyloidné agregáty sa nachádzajú v rozličných orgánoch a tkanivách, pričom proteín, ktorý tvorí hlavnú zložku depozitu je charakteristický pre danú chorobu (Sipe, 2005). Napríklad akumulácia Aβ-peptidov spolu s tau proteínom je typická pri Alzheimerovej chorobe a α-synukleín je spojený s Parkinsonovou chorobou. Peptid amylin vytvára amyloidné vlákna v pankrease pri diabetes typu II. Amyloidóza je detekovaná aj pri tvorbe lysozýmových agregátov v rôznych častiach celého tela (Sipe, 2005). Zaujímavou charakteristikou amyloidných ochorení je prekvapivo podobná štruktúra amyloidných fibríl aj napriek tomu, že proteíny spájané s amyloidnými chorobami sa líšia v svojej primárnej, terciárnej štruktúre ako aj vo veľkosti a funkcii. Amyloidné fibrily sa skladajú z niekoľkých navzájom prepletených protofilamentov a usporiadané jadro fibríl sa vyznačuje "cross-β" štruktúrou (Sunde a kol., 1997).

V súčasnosti nie je možné efektívne liečiť amyloidné ochorenia, ale veľmi sľubnou stratégiou sa zdá byť blokácia agregácie proteínu, prípadne rozbitie amyloidných štruktúr, pretože tento krok v procese tvorby amyloidných depozitov je prvým krokom patologického procesu, ktorý nie je spojený s biologickou funkciou proteínu (Mason a kol., 2003). Ukázalo sa, že mnoho organických zlúčenín ako napríklad nikotín, antracyklín, donepenzil, dekametionín sú schopné *in vitro* inhibovať alebo aspoň znížiť amyloidnú agregáciu rôznych proteínov, napr. v súvislosti s ukladaním Aβ-peptidu, agregáciou hungtingtínu a transtyreínu (Sipe, 2005).

Nedávne výskumy ukázali, že antrachinóny sú schopné inhibovať tvorbu tau agregátov (Pickhardt a kol., 2005). Napriek týmto zisteniam zatiaľ neboli nájdené látky vhodné na klinické účely, preto je potrebná identifikácia ďalších látok.

Študovali sme antiagregačné vlastnosti akridínových zlúčenín vzhľadom na skutočnosť, že niektoré akridínové a bisakridínové deriváty boli identifikované ako inhibítory tvorby špecifických foriem priónového proteínu rezistentných voči proteázam (Korth a kol., 1998). Sledovali sme *in vitro* účinok rôznych akridínových derivátov na vznik a disagregáciu lyzozýmových amyloidných fibríl, ktoré vytvárajú masívne amyloidné depozity v pečeni a obličkách u ľudí trpiacich dedičnou systémovou amyloidózou. Sústredili sme sa na skúmanie vplyvu štruktúry bočného reťazca a planárnosť molekuly akridínových derivátov na ich disagregačné vlastnosti. Študovali sme tiež interakciu akridínových derivátov s DNA s cieľom identifikovať akridínové deriváty s minimálnou interkalačnou (minimalizácia zmien DNA) avšak s vysokou antiagregačnou aktivitou.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie - Lyzozým z vaječného bielka, tioflavín T (ThT), Konžská červená (CR), DNA z teľacieho týmusu boli získané od firmy Sigma. Rôzne deriváty akridínu boli poskytnuté Katedrou organickej chémie, PF UPJŠ. Guanidín hydrochlorid (GdnHCl) bol z firmy Fluka Chemika. Chemikálie potrebné na prípravu tlmivých roztokov (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4) boli dodané firmou mikroCHEM.

Tvorba lyzozýmových amyloidných fibríl – amyloidné fibrily boli pripravené 2 hodinovou inkubáciou 10 μM lyzozýmu (10 μM) v 20 mM fosfáte draselnom (KP), pH 6,3, v prítomnosti 3 M GdnHCl pri teplote 50 °C za stáleho miešania (Vernaglia a kol., 2004). Tvorba amyloidných fibríl bola sledovaná prostredníctvom viazania ThT alebo CR alebo elektrónovou mikroskopiou.

Viazanie ThT - ThT bol dodaný ku proteínovému roztoku tak, aby jeho konečná koncentrácia bola 20 μM . Viazanie ThT do amyloidných fibríl je sprevádzané nárastom intenzity fluorescence v emisnom spektre, ktorá bola meraná spektrofluorofotometrom RF-5000 Shimadzu. ThT bol excitovaný pri 440 nm so šírkou štrbiny 1,5 nm a emisia bola meraná pri 485 nm so šírkou štrbiny 3 nm.

Viazanie CR – CR bolo pridané do roztoku proteínu v pomere 1:2. Tvorba lyzozýmových fibríl bola určená posunom absorpčného píku CR z 495 nm na 503 nm pomocou absorpčného spektrofotometra (Specord S100, Analytik Jena).

Identifikácia inhibítorov lyzozýmovej amyloidnej agregácie pomocou viazania ThT – Inhibičné a disagregačné schopnosti akridínových derivátov boli detekované prostredníctvom viazania ThT. V prípade merania inhibičných schopností akridínov bol do 20 mM tlmivého roztoku fosfátu draselného (pH 6,3) pridaný 10 μM lyzozým a 3 M GdnHCl a derivát akridínu v koncentrácii 200 μM . Roztok bol za stáleho miešania 2 h inkubovaný pri 50 °C. Pre meranie disagregačných vlastností akridínov bol k 10 μM lyzozýmových fibrilám pridaný 200 μM akridínový derivát a vzorky boli inkubované cez noc pri teplote 37 °C. Kontrolné meranie fluorescence akridínových derivátov bolo uskutočnené meraním roztoku kde proteín bol nahradený vodou. Po inkubácii s akridínmi bola po pridaní ThT (výsledná koncentrácia 20 μM) zmeraná fluorescenčná intenzita. Pre deriváty s vysokou inhibičnou a disagregačnou aktivitou detekovanou pre 200 μM koncentráciu bola sledovaná ich aktivita aj pre koncentrácie akridínov v rozmedzí od 100 pM do 1 mM. Na základe týchto meraní sme určili hodnotu IC_{50} (koncentrácia akridínu, pre ktorú bola pozorovaná 50% inhibícia tvorby amyloidných fibríl) a DC_{50} (koncentrácia akridínu, pre ktorú bola pozorovaná 50% deštrukcia amyloidných fibríl). Všetky merania boli uskutočnené minimálne trikrát.

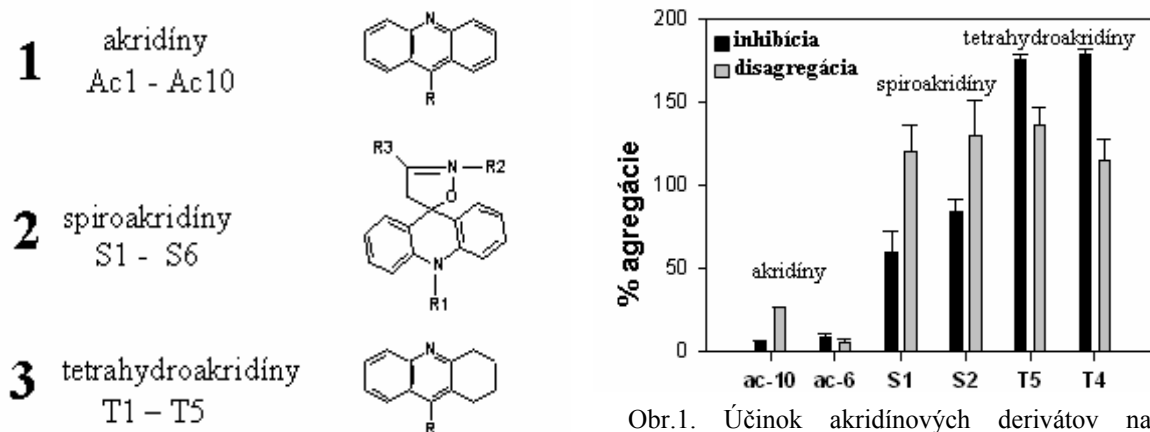
Transmisná elektrónová mikroskopia – roztok obsahujúci 100 μM lyzozým alebo lyzozýmové fibrily pred alebo po inkubácii s akridínmi bol nanosený na formvarom potiahnuté medené mriežky (1 min) a negatívne zafarbený s 2% uranyl acetátom (45s).

Spektrofotometrická titrácia akridínov s DNA – viazanie akridínových derivátov bolo sledované prostredníctvom absorpčných spektrálnych zmien pri 5 μM akridínu po prídavkoch DNA z teľacieho týmusu (10 mM fosfátový pufer, pH 7,4). Viazanie akridínových derivátov bolo vyhodnotené pomocou McGhee-von Hippel rovnice pre hodnoty Scatchardovho grafu v regióne od 30% (dolná hranica) do 90% (horná hranica). Koncentrácia DNA bola určená spektrofotometricky pomocou extinkčného koeficientu $\epsilon_{258\text{nm}} = 13\,600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zabránenie tvorby amyloidných proteínových depozitov, prípadne ich deštrukcia vedie k zmierneniu symptómov, ktoré sú pozorované pri amyloidných ochoreniach. Študovali sme preto účinok akridínových derivátov na formovanie amyloidných fibríl z lyzozýmu *in vitro*. Vytvorenie lyzozýmových fibríl bolo detekované pomocou viazania ThT a Konžskej červenej. Tieto zistenia boli potvrdené elektrónovou transmisnou mikroskopiou. Predmetom nášho záujmu bolo zistiť, ako ovplyvňuje štruktúra akridínových derivátov ich disagregačné schopnosti. Vybrali sme akridínové deriváty, ktoré sme podľa ich chemickej štruktúry rozdelili do troch skupín – akridíny, spiroakridíny a tetrahydroakridíny (Tab.1). Sledovali sme ich vplyv na tvorbu lyzozýmových amyloidných fibríl ako aj na ich depolymerizáciu. Inhibičná a disagregačná aktivita študovaných akridínov bola rôzna, pričom bola výrazne ovplyvnená ich štruktúrou (Obr.1). Pre väčšinu akridínov z prvej skupiny (Ac1-Ac10) bola zistená vysoká schopnosť potlačiť tvorbu lyzozýmových fibríl ako ich aj rozbiť. Na rozdiel od nich akridíny patriace do druhej a tretej skupiny nemali skoro žiadny inhibičný a disagregačný efekt. Dokonca pre niektoré tetrahydroakridíny (T4 a T5) sme pozorovali, že urýchlňovali rast fibríl. Výsledky pre vybrané akridínové deriváty zo sledovaných troch štruktúrnych skupín sú uvedené na obr.1. Disagregačná aktivita bola pozorovaná aj pomocou elektrónovej mikroskopie. Videli sme podstatne menší počet fibríl, ako aj ich rozbitie po pôsobení efektívneho akridínového derivátu. Pre akridínové deriváty z prvej skupiny sme pomocou fluorescence ThT sledovali ich účinnosť v závislosti od koncentrácie (Obr.2). Na základe týchto meraní sme určili hodnoty IC_{50} a DC_{50} , ktoré sú uvedené v tab.2. Tieto hodnoty sa pre najviac účinné akridínové deriváty pohybovali v rozmedzí od 5-100 μM , čo umožňuje ich potenciálne využitie ako liečiv.

Akridínové deriváty môžu interagovať s DNA, čo by mohlo negatívne ovplyvniť fyziologické procesy v jadre. Spektrofotometrickou titráciou akridínov s DNA sme preto určili väzobnú konštantu (K) a počet väzobných miest (n) sledovaných akridínov na DNA. Získané údaje pre

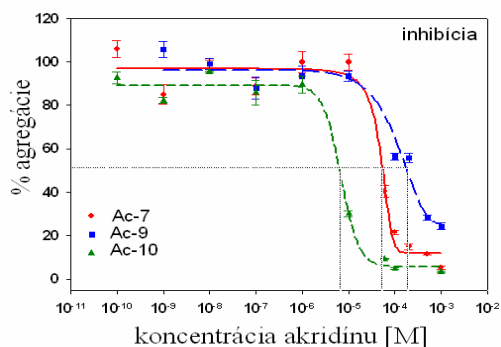


Obr.1. Účinok akridínových derivátov na inhibíciu tvorby lyzozýmových fibríl a disagregáciu vytvorených fibríl monitorované pomocou fluorescence ThT.

Tab.1. Štruktúra akridínových derivátov

akridíny prvej skupiny sú uvedené v Tab.2. Väzobná aktivita akridínových derivátov bola u niektorých akridínov veľmi vysoká (Ac-2, Ac-3), u niektorých sme nepozorovali žiadne viazanie (Ac-4, Ac-10).

Na základe získaných výsledkov sme zistili, že antiagregačná aktivita akridínových derivátov je výrazne ovplyvnená štruktúrou bočného reťazca a planaritou molekuly akridínu. Podarilo sa nám identifikovať akridíny s vysokou inhibičnou a/alebo antiagregačnou aktivitou avšak s



Obr.2. Množstvo agregovaného lyzozýmu (v %) v závislosti od koncentrácie akridínu (inhibičné merania) a odpovedajúce IC₅₀ hodnoty.

akridín	DC50	IC50	Kx10 ⁶	n
	mM		M-1	
Ac-1	21,0	89,1	41,2	1,1
Ac-2	184,1	57,8	0,3	3,6
Ac-3	84,9	75,6	2	3,5
Ac-4	xx	xx	nb	nb
Ac-5	nb	nb	5,9	2,6
Ac-6	33,5	10,0	0,47	12
Ac-7	17,1	48,6	0,7	7,1
Ac-8	xx	xx	7,9	3,1
Ac-9	56,0	182,8	4,4	5,1
Ac-10	5,3	6,5	nb	nb

Tab.2. Získané hodnoty pre 1. skupinu akridínov - IC₅₀, DC₅₀, K (väzobná konštanta do DNA), n (počet väzobných miest). xx – neurčené kvôli vysokej fluorescencii akridínu); nb – nepozorované viazanie do DNA.

minimálnou špecificitou ku DNA. Spomedzi študovaných akridínových derivátov akridíny Ac-6, Ac-7 a Ac-10 najviac spĺňajú požadované vlastnosti – nízke hodnoty IC₅₀ a DC₅₀ koncentrácií ako aj malé hodnoty väzobnej konštanty. Tieto zlúčeniny poskytujú základ pre cielelý vývoj liečiv amyloidných chorôb na báze akridínov.

POĎAKOVANIE

Výsledky práce boli čiastočne financované z prostriedkov VEGA grantov 7055, 6167 a VVGS grantu PF8/2007/CH.

Ďakujem RNDr. Zuzane Gažovej, CSc. a prof. Mariánovi Antalíkovi, DrSc. za odbornú pomoc a vedenie v mojom doktorandskom štúdiu. Ďakujem tiež prof. P. Kristianovi a doc. J. Imrichovi za poskytnutie akridínových derivátov. A ďakujem doc. RNDr. Zuzane Daxnerovej, CSc. za pomoc pri elektrónovom mikroskope.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Vernaglia BAV, Huang J, Clark ED. Guanidine Hydrochloride Can Induce Fibril Formation from Hen Egg-White Lysozyme. *Biomacromolecules* 2004; 5: 1362-1370.
- Korth C, May BC, Cohen FE, Prusiner SB. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 17: 9836-9841.
- Mason JM., Kokkoni N., Scott K., Doig AJ. Design strategies for anti-amyloid agents. *Curr Opin Struct Biol.* 2003; 4: 526-32.
- Pickhardt M, Gazova Z, von Bergen M, Khlistunova I, Wang Y, Hascher A, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E. Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments in vitro and in cells. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 3628-3635.
- Sipe JD. *Amyloid Proteins.* WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim 2005.
- Sunde M, and C. C. F. Blake CCF. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv. Protein Chem.* 1997; 50: 123-159.

ÚČINKY DEOXYNIVALENOLU A ZEARALENÓNU NA FAGOCYTÁRNU AKTIVITU V KRVI A ANTIOXIDAČNÝ STATUS BROJLEROV

Bořutová R.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom pokusu bolo skúmať účinky diét umelo kontaminovaných rôznymi koncentraciami kombinácie fuzáriových mykotoxínov deoxynivalenolu (DON) a zearalenónu (ZEA) na fagocytárnu aktivitu leukocytov, aktivitu glutatión peroxidázy (GPx) v krvi a tkanivách, aktivitu tioredoxín reduktázy (TRx) v tkanive pečene, superoxid dismutázy (SOD) v erytrocytoch, hladiny γ -glutamyltransferázy (GGT) v plazme a koncentrácie malondialdehydu (MDA) v tkanivách. Brojlery plemena Ross boli od prvého dňa života rozdelené do troch pokusných skupín, ktoré sa líšili v koncentráciách deoxynivalenolu a zearalenónu. Prvá pokusná skupina vtákov bola kŕmená diétou s nižším obsahom mykotoxínov ($3,4 \text{ mg.kg}^{-1}$), zatiaľ čo druhá pokusná skupina dostávala diétu s vyšším obsahom DON ($8,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) a ZEA ($8,3 \text{ mg.kg}^{-1}$). Výsledky poukázali na signifikantne zníženú fagocytárnu aktivitu leukocytov vtákov, ktoré dostávali diétu s vyšším obsahom mykotoxínov, na druhej strane aktivita GPx v krvi a GGT aktivita v plazme boli touto diétou signifikantne zvýšené. Aktivita GPx v pečevom tkanive bola signifikantne znížená, zatiaľ čo koncentrácie MDA tu boli signifikantne zvýšené. SOD aktivita v erytrocytoch ani hladiny MDA a koncentrácie GPx v tkanive črevnej sliznice neboli rôznymi koncentraciami mykotoxínov ovplyvnené. Kontaminované diéty nemali negatívny vplyv na aktivitu TRx v pečevom tkanive. Získané výsledky poukazujú na to, že kombinácia deoxynivalenolu a zearalenónu v diétach zvýšila oxidačný stres a mala poškodzujúci účinok na imunitnú odpoveď polymorfonukleárných buniek v krvi brojlerov.

ÚVOD

Deoxynivalenol (DON) a zearalenón (ZEA) patria do skupiny trichotecénových mykotoxínov produkovaných viacerými druhmi plesne *Fuzárium*. DON je známym inhibítorom proteosyntézy, viaže sa na peptidyl transferázu (Feinberg a McLaughlin, 1989), alebo priamo na ribozóm, čím inhibuje proteosyntézu, syntézu DNA a RNA. ZEA aj napriek tomu, že nemá steroidnú štruktúru, má účinky steroidných hormónov estrogénov. DON po absorpcii v gastrointestinálnom trakte podstupuje de-epoxidáciu a glukuronidáciu, čo vedie ku vzniku relatívne menej toxického metabolitu DOM-1 (Beasley a kol., 1986). ZEA sa dostáva portálnou krvou priamo do pečene, kde je metabolizovaný za vzniku derivátu alfa-zearalenónu (alpha-ZOL), ktorý je niekoľko krát aktívnejší ako samotný ZEA (Malakinejad a kol., 2004).

Cieľom experimentu bolo zistiť, či môžu koncentrácie od 3 mg.kg^{-1} do 8 mg.kg^{-1} deoxynivalenolu v kombinácii so zearalenónom spôsobiť zvýšený oxidačný a imunitný stres organizmu hydiny, ktorá je voči účinkom samotného deoxynivalenolu málo citlivá.

MATERIÁL A METODIKA

Brojlery hybridu Ross 308 boli od prvého dňa života rozdelené do troch pokusných skupín po 20 zvierat. Vtáky všetkých skupín boli kŕmené základnou diétou počas dvoch týždňov. V nasledujúcich dvoch až štyroch týždňoch dostávali brojlery v pokusných skupinách experimentálne diéty s rôznymi koncentraciami kombinácie DON a ZEA. Kontrolná skupina bola aj naďalej kŕmená základnou diétou s obsahom $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ deoxynivalenolu a $0,07 \text{ mg.kg}^{-1}$ zearalenónu. Prvá pokusná skupina bola kŕmená diétou s obsahom $3,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ DON a ZEA. Druhá pokusná skupina dostávala diétu s vyšším obsahom DON $8,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ a ZEA $8,4 \text{ mg.kg}^{-1}$. Brojlery boli vo veku 4 týždňov anestetizované zmesou ketamínu (Narkamon

5%) a xylazínu (Rometar 2%) pre odber krvi intrakardiálnou punkciou. Vzorky pečene, obličky a črevnej sliznice boli odobraté po eutanázii. Aktivita GPx (EC 1.11.1.9) bola stanovená metódou podľa Paglia a Valentine (1967) použitím Ransel kitu (Randox, VB). Koncentrácie MDA v tkanivách pečene, obličky a črevnej sliznice boli stanovené podľa Jo a Ahn (1998). Aktivita GGT bola stanovená použitím kitu Randox, VB metódou podľa Szasza (1969), na spektrofotometrické stanovenie aktivity TRx metódou podľa Holmgren a Bjornstend (1995) bol použitý Assay kit (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO). Obsah hemoglobínu a aktivita SOD (EC 1.15.1.1) v erythrocytoch boli analyzované metódou podľa Arthur a Boyne (1985) s použitím kitov (Randox, VB). Koncentrácia bielkovín v tkanivách bola stanovená podľa Bradforda (1976). Fagocytárna aktivita bola meraná priamym počítaním polymorfonukleárných buniek za použitia MSHP častíc (microspheric hydrophylic particles) metódou podľa Vetvičku a kol., (1982). Štatistická analýza výsledkov bola urobená jednocestnou ANOVOU s post hoc Tukey testom. Výsledky sú udávané ako priemer \pm SEM.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Koncentrácia MDA v pečňovom tkanive bola signifikantne zvýšená v obidvoch skupinách brojlerov, ktoré dostávali diéty kontaminované mykotoxínmi, na druhej strane aktivita GPx v pečeni bola signifikantne znížená. Aktivita TRx v pečeni nebola kontaminovanými diétami ovplyvnená (Tab.1).

Tab 1. Koncentrácia malondialdehydu (MDA), aktivita glutatión peroxidázy (GPx) a tioredoxín reduktázy (TRx) v tkanivách brojlerov kŕmených diétami kontaminovanými nižšími koncentraciami deoxynivalenolu a zearalenónu ($3,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a vyššími koncentraciami deoxynivalenolu $8,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a zearalenónu $8,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Hodnoty sú \pm SEM. n=6

Parameter	Kontrola	Nízky mykotoxín DON+ZEA	Vysoký mykotoxín DON+ZEA
Črevná sliznica			
MDA ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ bielkovín)	41,4 \pm 8,9	51,9 \pm 8,4	35,5 \pm 3,8
GPx ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ bielkovín)	5,4 \pm 1,5	8,4 \pm 1,3	5,6 \pm 1,5
Pečeň			
MDA ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ bielkovín)	137,3 \pm 23,6 ^a	397,3 \pm 54,7 ^b	319,7 \pm 32,4 ^b
GPx ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ bielkovín)	13,8 \pm 1,7 ^a	7,9 \pm 1,3 ^b	8,3 \pm 1,0 ^b
TRx ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ bielkovín)	26,5 \pm 5,6	24,9 \pm 8,7	30,3 \pm 6,3
Oblička			
MDA ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ bielkovín)	56,1 \pm 7,0 ^a	93,2 \pm 6,8 ^b	65,8 \pm 8,0 ^a
GPx ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ bielkovín)	15,4 \pm 3,5	13,9 \pm 1,5	13,0 \pm 3,8

DON = deoxynivalenol; ZEA = zearalenón

a, b: Rozdielne horné indexy v rámci riadku označujú signifikantné rozdiely medzi skupinami ($P < 0,05$)

Prídavok vyššej koncentrácie mykotoxínov do diéty spôsobil signifikantné zvýšenie aktivity GPx v krvi a aktivity GGT v plazme brojlerov (Tab.2). Aktivita SOD v erythrocytoch (Tab.2) ani hladiny MDA a aktivity GPx v tkanive črevnej sliznice neboli skrmovaním diét kontaminovaných rôznymi koncentraciami fuzáriových mykotoxínov ovplyvnené (Tab.1). Fagocytárna aktivita polymorfonukleárných buniek v krvi brojlerov bola signifikantne znížená v skupine vtákov kŕmených vyššími koncentraciami kombinácie deoxynivalenolu a zearalenónu (Tab.3).

Tab 2. Aktivita glutatión peroxidázy (GPx) v krvi, superoxid dismutázy (SOD) v erythrocytoch, aktivita γ -glutamyltransferázy (GGT) v plazme brojlerov kŕmených diétami kontaminovanými nižšími koncentraciami deoxynivalenolu a zearalenónu ($3,4 \text{ mg.kg}^{-1}$) a vyššími koncentraciami deoxynivalenolu $8,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ a zearalenónu $8,3 \text{ mg.kg}^{-1}$. Hodnoty sú \pm SEM. n=6

Parameter	Kontrola	Nízky mykotoxín DON+ZEA	Vysoký mykotoxín DON+ZEA
GPx v krvi ($\text{U.g}^{-1} \text{ Hb}$)	38,1 \pm 3,3 ^a	37,7 \pm 4,1 ^a	70,1 \pm 10,3 ^b
SOD v erythrocytoch ($\text{U.g}^{-1} \text{ Hb}$)	1566 \pm 113,0	1447 \pm 40,7	1572 \pm 52,6
GGT v plazme (U.L^{-1})	34,1 \pm 2,7 ^a	42,5 \pm 6,8 ^a	64,9 \pm 7,8 ^b

DON = deoxynivalenol; ZEA = zearalenón

a, b: Rozdielne horné indexy v rámci riadku označujú signifikantné rozdiely medzi skupinami ($P < 0,05$)

Tab 3. Účinky diét kontaminovaných nižšími koncentraciami deoxynivalenolu a zearalenónu ($3,4 \text{ mg.kg}^{-1}$) a vyššími koncentraciami deoxynivalenolu $8,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ a zearalenónu $8,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ na fagocytárnu aktivitu a index fagocytárnej aktivity v krvi brojlerov. Hodnoty sú \pm SEM. n=6

Parameter	Kontrola	Nízky mycotoxín DON+ZEA	Vysoký mycotoxín DON+ZEA
Fagocytárna aktivita (%)	33,0 \pm 1,4 ^a	25,2 \pm 1,8 ^{ab}	18,6 \pm 1,9 ^b
Index fagocytárnej aktivity	1,6 \pm 0,2	1,0 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1

DON = deoxynivalenol; ZEA = zearalenón

a, b: Rozdielne horné indexy v rámci riadku označujú signifikantné rozdiely medzi skupinami ($P < 0,05$)

Naše výsledky poukázali na mohutnú produkciu MDA v pečeni brojlerov, ktorým sa skrmovali kontaminované diéty a následný pokles aktivity GPx v tomto orgáne. Pečeň je hlavným miestom metabolizácie obidvoch mykotoxínov, ktoré sa do nej dostávajú priamo z duodéna portálnou krvou. Mnohé štúdie potvrdili fakt, že deoxynivalenolom kontaminované diéty zvýšili produkciu TBARS (reaktívne substancie kyseliny tiobarbiturovej) v pečeni potkanov a myší (Rizzo a kol., 1994). Balogh a kol. (2004) udávajú, že zvýšená koncentrácia MDA je doprevádzaná zníženou aktivitou GPx v tom ktorom tkanive, čo môžeme potvrdiť na základe našich výsledkov. Znížená aktivita GPx v pečenovom tkanive poukazuje na silne poškodzujúci účinok kombinácie DON a ZEA v koncentraciách od 3 do 8 mg.kg^{-1} . Tento fakt je potvrdený aj signifikantným zvýšením GGT v plazme, kde sérová GGT je hlavným ukazovateľom pečenej dysfunkcie (Reynaud a kol., 2000). Najnovšie štúdie poukazujú na to, že zvýšené hladiny GGT v plazme môžu byť považované za skorý ukazovateľ oxidačného stresu (Lim a kol., 2004). Aktivita GPx v krvi bola opačne ako v pečeni signifikantne zvýšená, toto protichodné správanie sa GPx je pravdepodobne spôsobené prítomnosťou derivátu ZEA tzv. alpha ZOL, ktorý vzniká v pečeni odkiaľ sa dostáva do systémovej cirkulácie. Tu mení hladiny serového progesterónu a estrádiolu (Gajecky, 2002) a tie následne zvyšujú aktivity GPx v krvi (Flohe a Brigelius-Flohe, 2001). Redukovaná fagocytárna aktivita leukocytov po konzumácii deoxynivalenolu a zearalenónu môže byť dôsledkom poškodenia dôležitých medzibunkových komunikácií, čo vedie k deregulácii imunitného systému a spôsobuje imunosupresiu. Leukocyty sú kôli vysokej hladine polynenasýtených mastných kyselín v membránach ideálnym terčom voľných radikálov. Hlavná funkcia polymorfonukleárov ako je pohlcovanie cudzorodých častíc, deštrukcia bakteriálnych, nádorových a mŕtvych buniek, ako aj sekrécia prostaglandínov a cytokínov je poškodená.

Naše výsledky sa zhodujú so Ayaralom a kol. (1992), ktorý zistil, že DON spôsobuje zníženie fagocytózy, antimikrobiálnej funkcie a fagozóm-lyzozómovej funkcie leukocytov *in vitro*. Výsledky tejto práce poukázali na to, že DON a ZEA pôsobia v metabolickej a toxikologickej synergii. Skrmovanie diét kontaminovaných týmito Fuzáriovými mykotoxínmi spôsobilo poškodenie antioxidantného a imunitného statusu brojlerov a to prostredníctvom zvýšenej lipidovej peroxidácie prevažne v pečeni, ktorá je hlavným orgánom detoxifikácie týchto mykotoxínov ako aj cez poškodenie imunitných reakcií polymorfonukleárných buniek.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná agentúrou na podporu vedy a techniky na základe zmluvy č. APVT-51-004804, grantom VEGA 2/61 73/6 a Agentúrou na podporu výskumu a vývoja č: LPP-0213-06

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Arthur JR, Boyne R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and cooper deficient cattle. *Life Sci.* 1985; 36:1569-1575
- Ayral AM, Dubech N, Le Bars J, Escoula L. *In vitro* effects of diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol on microbicidal activity of murine peritoneal macrophages. *Mycopathologia.* 1992; 120: 121-127
- Balogh K, Weber M, Erdélyi M, Mézes M. Effects of excess selenium supplementation on the glutathione redox system in broiler chicken. *Acta Vet. Hung.* 2004; 52: 403-414
- Beasley VR, Swanson SP, Corley RA, BuckWB, Koritz GD, Burmeister HR. Pharmacokinetics of trichothecene mycotoxin, T-2 toxin in swine and cattle. *Toxicon.* 1986; 24(1):13-23
- Bradford M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248-254
- Feinberg B, McLaughlin CS. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. In: Beasley, V.R. (Ed.) *Trichothecene Mycotoxin pathophysiologic Effects.* 1989; 1:27-35
- Flohe L and Brigelius-Flohe R. Selenoproteins of glutathione system. In: *Selenium. Its Molecular Biology and Role in Human Health* (Hatfield DL., Ed.) Kluwer Academic Publishers, Boston-Dordrecht-London. 2001; 157-178
- Gajecki M. Zearalenone-undesirable substances in feed. *Pol. J. Vet. Sci.* 2002; 5: 117-122
- Holmgren A, Bjornstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Meth. Enzymol.*, 1995; 252:199-208.
- Jo C, Ahn DU. Fluorimetric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. *Poult. Sci.* 1998; 77:457-480
- Lim JS, Yang JH, Chung BY, Kam S, Jacobs Jr. DR, Lee DH. Is serum γ -glutamyltransferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress? *Free Radical Bio. Med.* 2004; 37 (7): 1018-1023
- Malekinejad H, Maas-Bakker RF, Fink-Gremmels JF. Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. PhD Thesis Utrecht University. *Vet. Res.* 2005; 36 (5-6): 799-810
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967; 70:158-169
- Reynaud M, Schellenberg F, Loiseux-Meunier MN, Schwan R, Maradeix B, Planche F, et al. Objective diagnosis of alcohol abuse : compared values of carbohydrate-deficient transferrin (CDT), gamma-glutamyl transferase (GGT), and mean corpuscular volume (MCV). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2000; 24: 1414-9
- Rizzo AF, Atroshi F, Ahotupa M, Sankari S, Elovaara E. Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. *J.Vet.Med. A.* 1994; 41: 81-90
- Szasz G. A kinetic photometric method for serum γ -glutamyl transpeptidase. *Clin. Chem.* 1969; 15:124-136
- Vetvicka V, Fornousek L, Kopecek J, Kaminkova J, Kasperek L, Vranova M. Phagocytosis of human blood leukocytes, a simple micro-method. *Immunol. Lett.* 5, 1982; 97-100.

VPLYV ROZMARÍNOVÉHO ESENCIÁLNEHO OLEJA NA PRIEBEH TNBS-INDUKOVANEJ KOLITÍDY U MYŠÍ

Bukovská A

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Bolo preukázané, že mnoho aromatických rastlín a ich produktov má zdraviu prospešné vlastnosti. Po stáročia sú známe ich antimikrobiálne, protizápalové a antioxidačné vlastnosti. V ostatných rokoch sa prejavil zvýšený záujem o širšie využitie rastlinných extraktov ako sú aj esenciálne oleje a to jednak z dôvodu náhrady krmných antibiotík neantibiotickými biologicky aktívnymi látkami s protizápalovým a antimikrobiálnym účinkom ako aj kvôli ich schopnosti celkovo pozitívne vplyvať na gastrointestinálny trakt a zaujímavému potenciálu modulovať zápalové ochorenia bez alebo s menším množstvom vedľajších účinkov ako v doteraz používaných terapiách. Jednou z možností, ako by mohli rastlinné extrakty modulovať zápalovú reakciu, je vplyvanie na produkciu a/alebo pôsobenie cytokínov.

ÚVOD

Zápalové črevné ochorenia predstavujú vážny problém v ľudskej ako aj vo veterinárnej medicíne. Etiológia týchto ochorení je pravdepodobne multifaktoriálna a základné molekulárne mechanizmy sú málo známe (Panés 2001).

V súčasnosti sa pri liečbe zápalových črevných ochorení používajú nesteroidné protizápalové lieky, kortikosteroidy, antibiotiká a imunosupresanty, ale aplikácia týchto liekov je často limitovaná ich toxicitou a nežiaducimi vedľajšími účinkami (Kho a kol., 2001). Preto sa zvyšuje záujem o alternatívnu liečbu s menším množstvom vedľajších účinkov. Jednou z možností je použitie prírodných rastlinných produktov, ktorých úloha v rôznych fyziologických procesoch bola preukázaná vo viacerých experimentálnych modeloch aj na našom pracovisku (Domaracký a kol., 2006; Fabian a kol., 2006; Faix a kol., 2006; Horosová a kol., 2006; Lauková a kol., 2006; Simonová a kol., 2006; Bukovská a kol., 2007; Juhás a kol., submitted;). Ich použitie poskytuje atraktívnu a relatívne netoxickú alternatívu aj na kontrolovanie zápalových ochorení (Deguchi a kol. 2006).

ZÁPALOVÉ ČREVNÉ OCHORENIA

V humánnej medicíne je termín zápalové črevné ochorenia (IBD) používaný pre dve odlišné chronické ochorenia gastrointestinálneho traktu ľudí a to ulceratívnu kolitídu (UC) a Crohnovu chorobu (CD). Ulceratívna kolitída je doprevádzaná zvýšenou hladinou (IL-1, IL-5, IL-6, IL-8) a naopak zníženou hladinou (IL-2, TNF- α a IFN- γ). Vzhľadom na zvýšené koncentrácie IL-2 v zapálenej mukóze u pacientov s Crohnovou chorobou a znížené hodnoty u pacientov s ulceratívnou colitídou sa predpokladá, že CD je ochorenie sprostredkované Th1 bunkami. Naopak koncentrácia IL-5 ako produktu Th2 podskupiny Th buniek je zvýšený u pacientov s UC. To predpokladá, že ulceratívna kolitída je Th2 sprostredkovaným ochorením. Výskum zápalových črevných ochorení sa robí v klinických podmienkach, v in vitro experimentoch, ako aj v in vivo štúdiách s použitím vhodného zvieracieho modelu. Jedným z najbežnejšie používaných modelov je aj kolitída indukovaná kyselinou trinitrobenzoovou (TNBS). TNBS kolitída myší je dobre charakterizovaný model a napodobňuje zápalové črevné ochorenie ľudí (Crohnovu chorobu) (Hibi a kol., 2002).

IBD môžu vznikáť ako abnormálna reakcia hostiteľského imunitného systému. Aj keď existuje málo priamych dôkazov podporujúcich túto teóriu u ľudí, je mnoho údajov v experimentálnych zvieracích modeloch a fenotypoch zvierat deficientných v špecifických génoch, na základe ktorých je možné predpokladať, že imunitný systém hrá kľúčovú úlohu buď v iniciácii alebo v udržiavaní ochorenia a že abnormálna imunitná reakcia organizmu je

základným znakom slizničných ochorení (Williams 2001). Táto teória imunologickej dysregulácie sa zakladá na dysbalancii medzi (Th1 a Th2) lymfocytmi a ich produkciou prozápalových a protizápalových cytokínov IFN- γ , TGF- β , IL-4, IL-10, IL-12 (Strober a kol., 1997).

V zapálenej črevnej mukóze ľudí a v rôznych zvieracích modeloch (Rogler a Andus 1998; Bertevello a kol., 2005; Raddatz a kol., 2005) ako aj u hospodárskych zvierat (Alzuherri a kol., 1996; Fournout a kol., 2000) bola nájdená zvýšená hladina prozápalových cytokínov (IL-1, IL-6, IL-8, TNF alpha, IL-12, IFN gamma).

VPLYV RASTLINNÝCH PRODUKTOV NA EXPRESIU CYTOKÍNOV V ZÁPALOVÝCH ČREVNÝCH OCHORENIACH

Existuje mnoho dôkazov podporujúcich užitočnosť orálneho podania rozličných rastlinných extraktov v terapii zápalových črevných ochorení. Na základe experimentálnych údajov získaných v zvieracích modeloch kolitídy je možné predpokladať, že prospešné účinky rastlinných extraktov by mohli byť sprostredkované prostredníctvom ich vplyvov na produkciu a/alebo pôsobenie cytokínov v sliznici (Hong a kol., 2002; Sugimoto a kol., 2002; Maity a kol., 2003; Ukil a kol., 2003). V dôsledku vplyvu rôznych rastlinných extraktov dochádza k zníženiu zvýšenej koncentrácie týchto prozápalových cytokínov. Napríklad prírodný rastlinný produkt kurkumín potláča expresiu mRNA prozápalových cytokínov IL-6, IL-12, TNF- α a IFN- γ (Sugimoto a kol., 2002, Ukil a kol., 2003). Taktiež preventívne podávanie thearubigínu, hlavného polyfenolu z čierneho čaju, má za následok zreteľné potlačenie mRNA hladiny IFN- γ a IL-12 (Maity a kol., 2003). Expresia prozápalových cytokínov IL-1 β , IL-6, GM-CSF a TNF α bola znížená po aj podaní kombinácie tymiánového a pamajoránového esenciálneho oleja (Bukovská a kol., 2007) a podávanie extraktu z rastliny Ginko biloba inhibuje expresiu IL-6 a TNF- α (Zhou a kol., 2006). Aj orálne podanie výťažku z koreňa rastliny Polygala tenuifolia Willdenow signifikantne znižuje produkciu IFN- γ a navyše zvyšuje produkciu protizápalového cytokínu IL-4 (Hong a kol., 2002). Ďalšou látkou s protizápalovým účinkom je bioflavonoid morín, ktorý inhibuje produkciu IL-1 β v čreve (Gálvez a kol., 2001).

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu vedy a techniky na základe Zmluvy č. APVT-51-015404

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alzuherri HM, Woodall CJ, Clarke CJ. Increased intestinal TNF- α , IL-1 β , and IL-6 expression in ovine paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996;49:331-45.
- Bertevello PL, Logullo AF, Nonogaki S, Campos FM, Chiferi V, Alves CC, Torrinhas RS, Gama-Rodrigues JJ, Waitzberg DL. Immunohistochemical assessment of mucosal cytokine profile in acetic experimental colitis. 2005; *Clinics* 60:277-86.
- Bukovská A, Čikoš Š, Juhás Š, Il'ková G, Reháč P, Koppel J. Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on cytokine expression in TNBS-induced colitis in mice. *Mediators of Inflammation.* 2007; v tlači.
- Domaracký M, Reháč P, Juhás Š, Koppel J. Effects of selected plant essential oils on the growth and development of mouse preimplantation embryos in vivo. *Physiol Res.* 2006; 56: 97-104.
- Fabian D, Sabol M, Domaracká K, Bujňáková D. Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicol In Vitro* 2006; 20:1435-45.
- Faix Š, Juhás Š, Faixova Z. The effect of essential oils intake on changes of plasma antioxidant status in mice. In *Acta veterinaria* (zaslané do redakcie).
- Fournout S, Dozois CM, Odin M, Desautels C, Peres S, Heralut F, Daigle F, Segafredo C, Laffitte J, Oswald E, Fairbrother JM, Oswald IP.: Lack of a role of cytotoxic necrotizing factor 1 toxin from

- Escherichia coli* in bacterial pathogenicity and host cytokine response in infected germfree piglets. *Infect Immun.* 2000; 68:839-47.
- Gálvez J, Coelho G, Crespo ME, Cruz T, Rodríguez-Cabezas ME, Concha A, Gonzalez M, Zarzuelo A. Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001;15:2027-39.
- Hibi T, Ogata H, Sakuraba A. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2002; 37:409-417.
- Hong T, Jin GB, Yoshino G, Miura M, Maeda Y, Cho S, Cyong JCh. Protective effects of Polygalae root in experimental TNBS-induced colitis in mice. *J Ethnopharmacol* 2002; 79:341-46.
- Horosová K, Bujňáková D, Kmeť V. Effect of oregano essential oil on chicken lactobacilli and *E.coli*. *Folia Microbiol.* 2006; 51: 278-280.
- Juhás Š, Čikoš Š, Czikková S, Veselá J, Il'ková G, Hájek T, Domaracká K, Domaracký M, Bujňáková D, Reháč P, Koppel J. Effects of borneol and thymoquinone on TNBS induced colitis in mice. *Folia Biologica*, submitted.
- Kho YH, Oudkerk Pool M, Jansman FGA, Harting JW. Pharmacotherapeutic options in inflammatory bowel disease: an update. *Pharm World Sci.* 2001; 23:17-21.
- Lauková A, Simonová M, Stropfová V, Marciňáková M, Haviarová M, Líšková A. In vitro inhibitory effect of chamomile essential oil against different clinical, intestinal, human and animal bacteria. Program and Abstract Book of the I. International Symposium on Chamomile Research, Development and Production. 2006; 121.
- Maity S, Ukil A, Karmakar S, Datta N, Chaudhuri T, Vedasiromoni JR, Ganguly DK, Das PK. Thearubigin, the major polyphenol of black tea, ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Eur J Pharmacol.* 2003; 470:103-12.
- Panés J. Inflammatory bowel disease: pathogenesis and targets for therapeutic interventions. *Acta Physiol Scand.* 2001; 173:15-65.
- Raddatz D, Bockemuhl M, Ramadori G. Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 17:547-57.
- Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg.* 1998; 22:382-89.
- Simonová M, Stropfová V, Marciňáková M, Haviarová M, Faix Š, Vasilková Z, Lauková A, Šalomon I. Experimental application of chamomile essential oil in rabbits. Program and Abstract Book of the I. International Symposium on Chamomile Research, Development and Production. 2006; 122.
- Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M. Reciprocal IFN- γ and TGF- β responses regulate occurrence of mucosal inflammation. *Trends Immunology Today.* 1997; 18:61-64.
- Sugimoto K, Hanai H, Tozawa K, Aoshi T, Uchijima M, Nagata T, Koide Y. Curcumin prevents and ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Gastroenterology* 2002; 123:1912-22.
- Ukil A, Maity S, Karmakar S, Datta N, Chaudhuri T, Vedasiromoni JR, Das PK. Curcumin, the major component of food flavour turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Br J Pharmacol.* 2003; 139:209-18.
- Williams DA. Inflammatory cytokines and mucosal injury. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001; 29:26-30.
- Zhou YH, Yu JP, Liu YF, Teng XJ, Ming M, Lv P, An P, Liu SQ, Yu HG. Effects of Ginkgo biloba extract on inflammatory mediators (SOD, MDA, TNF-alpha, NF-kappaBp65, IL-6) in TNBS-induced colitis in rats. *Mediators Inflamm.* 2006;92642.

VPLYV IONIZUJÚCEHO ŽIARENIA A CHLORIDU ZINOČNATÉHO NA ZMENY KONCENTRÁCIE GLUKOZY A ALANÍNAMINOTRANSFERÁZY V SÉRE KURČIAT

Daňová, D.

Ústav rádiobiológie, UVL, Košice

ABSTRAKT

Sledovanie vplyvu ionizujúceho žiarenia u experimentálnych zvierat je neustále stredobodom pozornosti predovšetkým s ohľadom na eliminovanie aj jeho niektorých negatívnych účinkov. V práci sme sledovali vplyv nízkych dávok ionizujúceho žiarenia na organizmus kura domáceho. Sledovali sme zmeny koncentrácie glukózy a zmeny aktivity alanínaminotransferázy v časovom odstupe 3, 7, 14, 21 a 30 dní po jednorázovom celotelovom ožiarení dávkou 3 Gy gama lúčov. Aktivita ALT bola štatisticky významne zvýšená na 3. deň u ožiarených skupín kurčiat v kombinácii s chloridom zinočnatým a oproti skupine samotne ožiarených skupín kurčiat bola aktivita ALT štatisticky významne znížená na 3. deň. Pri použitej dávke žiarenia koncentrácia glukózy v sére v porovnaní s kontrolnou skupinou bola štatisticky nevýznamná. Aplikácia chloridu zinočnatého i ožiarenia významne znížila jej koncentráciu na 7., 14. a 21. deň. Štatisticky významne znížená koncentrácia glukózy bola u skupín kurčiat v kombinácii s prídavkom chloridu zinočnatého oproti kontrole aj oproti u ožiarených skupín kurčiat.

ÚVOD

Rozvoj ľudskej spoločnosti so sebou prináša riziká, ku ktorým patrí aj riziko z využitia ionizujúceho žiarenia v rôznych odvetviach ľudskej činnosti. Používanie ionizujúceho žiarenia v medicíne a technike zvyšuje toto vystavenie o žiarenie zo zdrojov, ktoré sa stali súčasťou výrobných základov i nášho života. To poukazuje i v mierovom živote na neklesajúci význam štúdií škodlivých účinkov ionizujúceho žiarenia nielen na cicavce (Beňová, 2002), ale aj na iné druhy živočíchov: na vtáky (Sesztáková a kol., 1996), na ryby (Beňová a kol., 2006) a na bezstavovce (Dvořák, 2002).

Skúmaním účinkov týchto nepriaznivých vplyvov na živočíšny organizmus je možné lepšie pochopiť mechanizmus ich pôsobenia a následne vypracovať teoretické a praktické postupy pre zmiernenie a elimináciu negatívneho pôsobenia ionizujúceho žiarenia (Falis a kol., 2002). Práve preto sme sa v práci zamerali na sledovanie základných metabolických ukazovateľov po účinku ionizujúceho žiarenia.

Cieľom nášho experimentu bolo zistiť účinok nízkej dávky žiarenia na organizmus kurčiat. Sledovali sme zmeny koncentrácie alanínaminotransferázy a glukózy v časovom odstupe 3, 7, 14, 21 a 30 dní po celotelovom ožiarení dávkou 3 Gy gama lúčov a aj po aplikácii roztoku chloridu zinočnatého.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente sme použili kurčatá brojlerového typu vo veku 28 dní na začiatku experimentu v celkovej počte 60 ks.

Zvieratá boli chované v experimentálnych priestoroch po predchádzajúcej dezinfekcii (Kočišová, 2005, Kubíček a kol., 2000). Voda a krmivo im boli podávané ad libitum (Toropila a kol., 1996). Bola im skrmovaná krmná zmes pre kurčatá BR I a BR II. Ožarovanie zvierat sme vykonali na PF UPJŠ v Košiciach na prístroji CHISOSTAT.

Zvieratá sme ožarovali v plexitových klietkach.

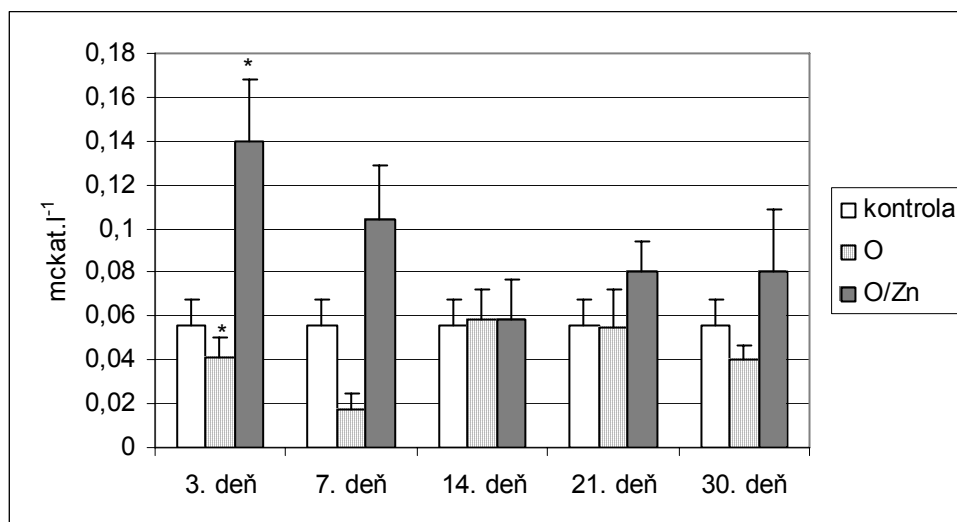
V pokuse sme použili jednorázovú celotelovú dávku 3,0 Gy gama lúčov s príkonom $0,0196774 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$. 3., 7., 14., 21. a 30. deň po ožiarení sme vykonali analýzy. Zvieratá sme

usmrtili v súlade s požiadavkami etickej komisie. Krv sme zachytili do Petriho misiek umiestnených na ľade a po centrifugácii sme získané sérum použili na analýzy.

Výsledky získané z jednotlivých experimentov sme štatisticky vyhodnotili anovo-testom porovnaním ožiarených, kontrolných skupín a skupín ožiarených kurčiat, ktorým bol aplikovaný roztok $ZnCl_2$. V každej skupine sme analyzovali 6 zvierat.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Aktivita ALT (graf č.1) u pokusných zvierat sa s výnimkou 3. dňa po ožiarení v kombinácii ožiarenia a chloridu zinočnatého štatisticky významne nemenila. V kombinácii ožiarených skupín kurčiat s prídavkom roztoku chloridu zinočnatého oproti kontrole bola aktivita ALT štatisticky významne zvýšená na 3. deň a oproti skupine samotne ožiarených skupín kurčiat bola aktivita ALT štatisticky významne znížená na 3. deň.



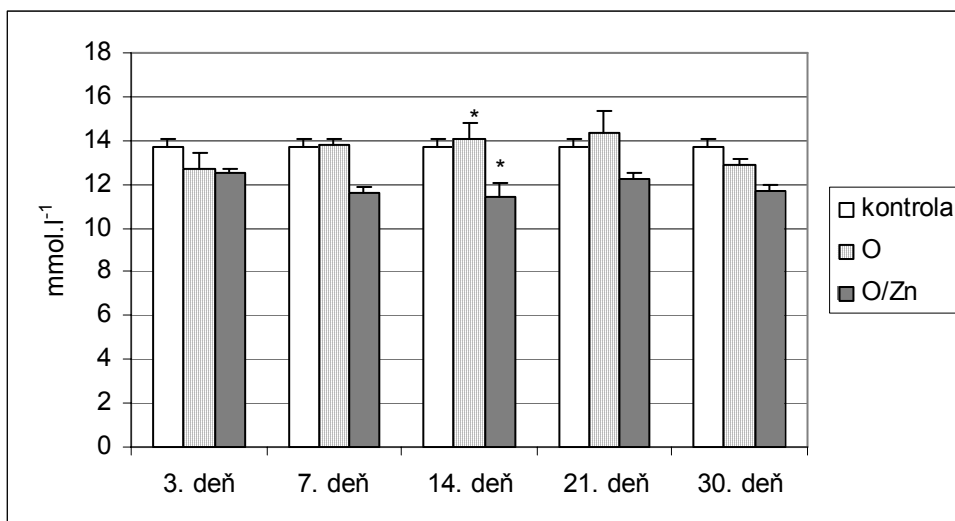
Graf č.1: Zmeny koncentrácie alanínaminotransferázy v sére kontrolných, ožiarených skupín zvierat a skupín ožiarených zvierat s aplikáciou chloridu zinočnatého v časovom odstupe 3., 7., 14., 21. a 30. dní

* $p < 0,05$ – štatistická významnosť

Ožiarenie organizmu subletálnymi a letálnymi dávkami zvyšuje aktivitu transamináz (Toropila a kol., 1996). Zvýšenie aktivity adaptívnych enzýmov poukazuje na prevládajúce katabolické procesy v ožiarenom organizme súvisiace nielen so zmenami bunkovej priepustnosti a rozvojom ťažkých histologických zmien hepatocytov vo včasnom období po ožiarení, ale aj stimuláciou syntézy de novo enzýmov transaminácie vyvolanou zvýšenou sekréciou kôry nadobličiek po ožiarení (Beňová a kol., 2006), čo by mohlo súvisieť aj so zvýšenou glukoneogenezou.

Z grafu č.2 vyplýva, že pri použitej dávke žiarenia koncentrácia glukózy v sére v porovnaní s kontrolnou skupinou bola štatisticky nevýznamná. Aplikácia chloridu zinočnatého i ožiarenia významne znížila jej koncentráciu na 7., 14. a 21. deň.

Štatisticky významne znížená koncentrácia glukózy bola u skupín kurčiat v kombinácii s prídavkom chloridu zinočnatého oproti kontrole aj oproti u ožiarených skupín kurčiat.



Graf č. 2: Zmeny koncentrácie glukózy v sére kontrolných, ožiarených skupín zvierat a skupiny ožiarených zvierat s aplikáciou chloridu zinočnatého v časovom odstupe 3., 7., 14., 21. a 30. dní

* $p < 0,05$ – štatistická významnosť

Organizmus hydiny reaguje citlivo vzhľadom na zvýšenú rádiorezistenciu aj pri nízkej dávke ionizujúceho žiarenia.

POĎAKOVANIE

Experiment bol vykonaný v rámci plnenia grantového projektu VEGA 1/2378/05.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Beňová, K., Falis, M., Toropila, M., Sehnalková, H., Pastvová, L. Influence of a Single γ -Irradiation on Rat Microflora, *Folia Microbiologia*, Košice 2002, 47, 4, 461-462.
- Beňová, K., Cigánková, V., Falis, M., Šmajda, B. Clinical Symptoms and Histological Changes in *Poecilia reticulata* following Gamma-Rays Irradiation, *Acta Veterinaria*, Brno 2006, 75:557-560.
- Dvořák, P., Beňová, K. The investigation of interactions of low doses of ionizing radiation and risk factors by means of *Artemia salina* biotest. *Folia Veterinaria*, 2002, 46, 4:195-197.
- Falis, M., Beňová, K., Toropila, M., Sesztáková, E., Vargová, M. Metabolic changes in broiler chickens after irradiation. *Folia Veterinaria*, 46, 2, Supplementum, 2002: 57-58.
- Kočišová, A. Dezinfekcia prostredia – súčasť preventívnych opatrení pri infekčných chorobách a parazitózach v chove zvierat, *Dezinfekce, dezinfekce, deratizace*, 2005, 4, 14, 149-153.
- Kubíček, K., Novák, P., Kočišová, A., Rodl, P. Dezinfekce, dezinfekce, deratizace ve vehematech, tabulkách a obrazech, VFU Brno 2000, 100.
- Sesztáková, E., Toropila, M., Beňová, K. Post-irradiation changes in the peripheral blood of chickens, *Folia Veterinaria*, Košice 1996, 40, 3-4: 87-90.
- Toropila, M. Praktické cvičenia z rádiobiológie, Magnus, Košice 1996, ISBN 80-855569-18-3, 75.

OXID DUSNATÝ V MIECHE PO POŠKODENÍ PERIFÉRNEHO NERVU

Dávidová A.¹, Schreiberová A.², Lacková M.², Kolesár D.², Maršala J.², Lukáčová N.²

¹Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky, SAV, Bratislava

²Neurobiologický ústav, SAV, Košice

ABSTRAKT

Periférne nervy predstavujú základné spojenia medzi centrálnou nervovou sústavou a svalmi, autonómnymi štruktúrami a senzorickými orgánmi, a na rozdiel od mozgu a miechy nie sú chránené kosťou ani hematoencefalickou bariérou; to zvyšuje ich citlivosť na toxíny a mechanické poranenia. Poškodenie periférnych nervov predstavuje vážny klinický problém spojený so stratou motorickej a senzitivnej funkcie. Táto štúdia sa sústreďuje na objasnenie úlohy oxidu dusnatého (NO) v patogenéze preseknutia periférneho nervu, so špeciálnym dôrazom na zmeny v hladine proteínu neurónovej syntázy oxidu dusnatého (nNOS) v segmentoch dolnej lumbálnej miechy (L4-L5) a v príslušných spinálnych gangliách u králikov po transekcii femorálneho nervu s 11 dňovým prežívaním zvierat. V kombinácii s imunocytochemickým zobrazením nNOS imunoreaktivity (nNOS-IR) sme sa pokúsili získať informácie, potrebné pre posúdenie zmien, ktoré ovplyvňujú NO neurotransmisiu. Naše výsledky ukazujú, že transekcia femorálneho nervu spôsobuje v mieche motorickú a senzitivnú reorganizáciu a je zrejme, že NO pri tom zohráva veľmi dôležitú úlohu.

ÚVOD

Femorálny nerv je najsilnejším nervom lumbálneho plexu. Nachádza sa na prednej ploche stehna, kde zabezpečuje inerváciu štvorhlavého svalu stehna, extenzorov predkolenia, kožu prednej strany stehna a predkolenia. Jeho poškodenie môže vyústiť až do straty hybnosti kolena, ako aj porúch v senzitivnej inervácii kože v strednej oblasti nohy a chodidla.

V poslednom období vzrastá záujem o pochopenie úlohy NO v mieche po poškodení periférnych nervov. NO je vysoko reaktívna radikálová molekula s krátkym biologickým polčasom rozpadu, ktorá je syntetizovaná enzýmom NOS. Z toho dôvodu väčšina experimentálnych štúdií, ktoré sa zaoberajú úlohou NO v mieche je založená na sledovaní aktivity a/alebo expresie NOS (Bredt a kol., 1991). Kým NO za fyziologických podmienok pôsobí ako signálna molekula, za patologických podmienok, kedy dochádza k jeho nadmernej produkcii, alebo naopak pri veľmi nízkych koncentráciách, sa NO javí ako neurotoxín, ktorý výrazne prispieva k poškodeniu neurónov. Cieľom našej práce bolo sledovať zmeny v hladine nNOS proteínu v regiónoch dolnej lumbálnej (L4-L5) miechy, ktoré zabezpečujú motorickú a senzitivnú inerváciu femorálneho nervu, ako aj v príslušných spinálnych gangliách po transekcii femorálneho nervu.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente boli použité dospelé králiky kmeňa Činčila, o hmotnosti 2,5 – 3,5 kg. Po premedikácii ketamínom (100 mg/kg) a xylazínom (15 mg/kg, i.m) boli experimentálne zvieratá počas operácie udržiavané v hlbokoj anestéze, navodenej 1-2% halotanom pomocou dýchacej masky. Femorálny nerv bol vypreparovaný na vnútornej strane pravého stehna, ligovaný na proximálnej a distálnej strane v rozsahu 0,5 cm a preseknutý. Experimentálne zvieratá prežívali 11 dní. Kontrolné zvieratá a zvieratá podrobené transekcii boli na konci prežívacieho času znovu premedikované a uvedené do hlbokoj thiopentálovej anestézy (20 mg/kg, i.v.). Ich chrbtové kosti boli presekuté na úrovni segmentov L4 a L5 a segmenty miechy (L4-L5) spolu s príslušnými spinálnymi gangliami z oboch strán boli opatrne uvoľnené z miechového kanála.

Na biochemické analýzy boli segmenty miechy rozdelené na platni chladenej tekutým dusíkom na štyri časti: pravú (ipsilaterálnu) a ľavú (kontralaterálnu) stranu a následne na ich

zadnú a prednú časť. Takto pripravené vzorky spolu so spinálnymi gangliami z pravej a ľavej strany boli uskladnené v tekutom dusíku. Bielkoviny boli stanovené metódou podľa Bradfordovej (1976). Proteíny boli oddelené podľa veľkosti pomocou SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) a následne transformované na nitrocelulózovú membránu (Semi-dry Western Blotting). nNOS proteín bol identifikovaný primárnou myšacou protilátkou a sekundárnou protilátkou proti myšacej primárnej protilátke a zviditeľnený pomocou chemiluminiscencie. Následne boli imunoblotty skenované a nNOS bandy boli kvantifikované použitím programu PC BAS 2.0. Získané výsledky boli vyjadrené ako aritmetický priemer \pm SEM a štatisticky vyhodnotené pomocou ANOVA testu.

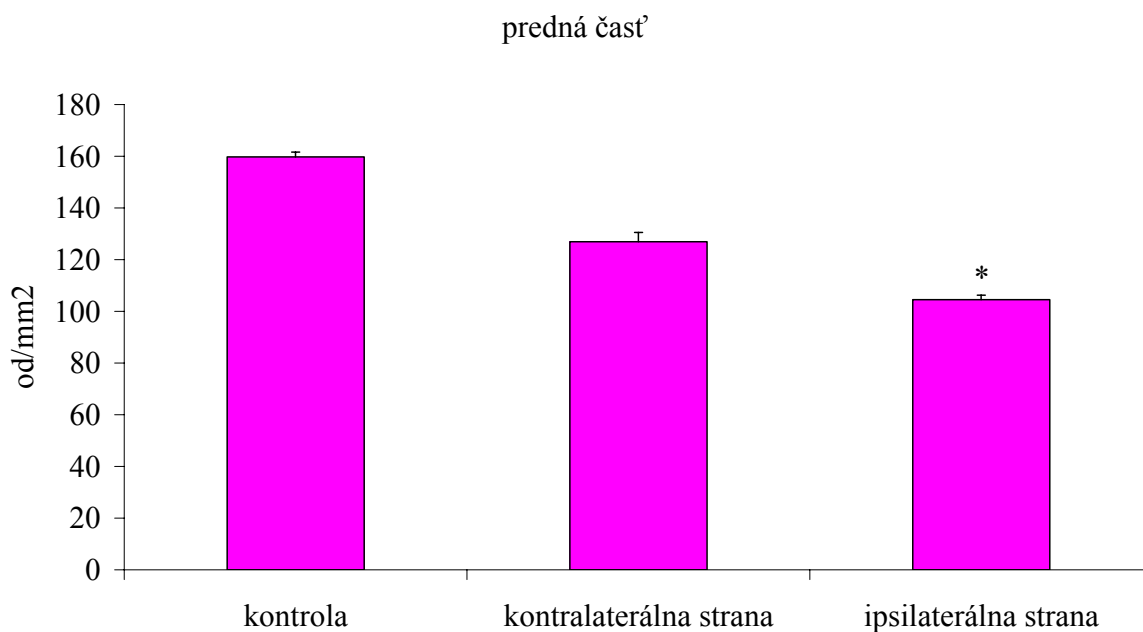
Na imunohistochemické analýzy boli segmenty miechy a spinálne gangliá hneď po odobratí fixované v 4% roztoku paraformaldehydu a v roztoku 30% sacharózy a následne nakrájané na 40 μ m rezy na kryostate (Leica). Rezy boli spracované imunohistochemicky za použitia vyššie uvedených nNOS protilátok, pričom nNOS-IR neuróny boli kvantifikované denzitometricky.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

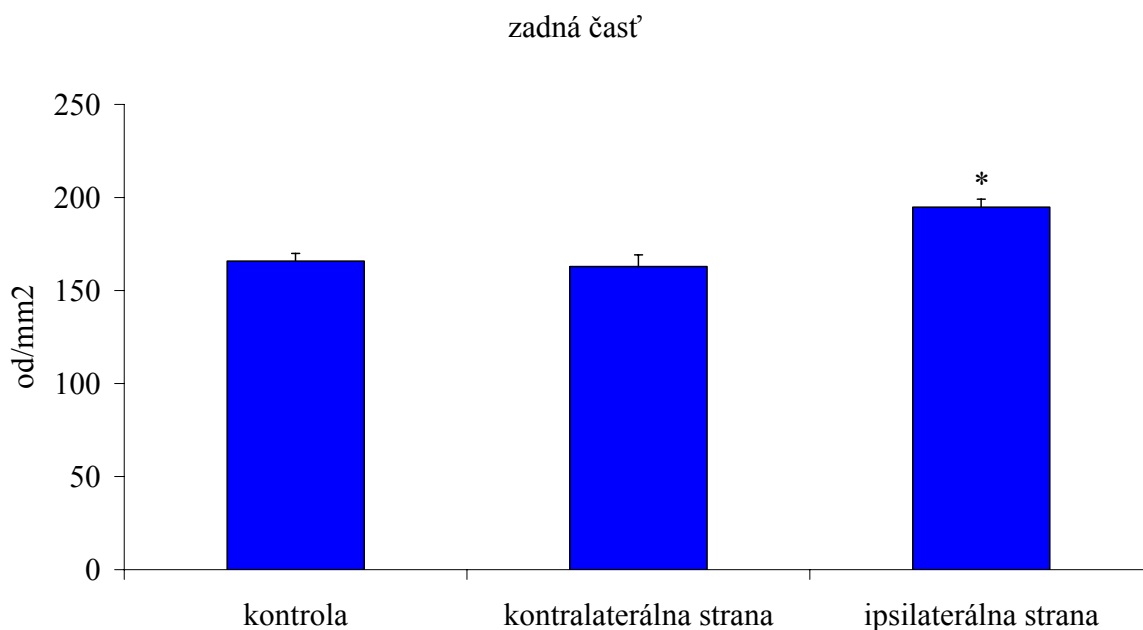
V snahe pochopiť úlohu NO v mieche po poškodení periférnych nervov, sme sledovali, aké zmeny spôsobuje transekcia femorálneho nervu v expresii nNOS proteínu v regiónoch senzitivnej a motorickej inervácie n. femoralis v mieche, ako aj v príslušných spinálnych gangliách. Porovnanie hladiny nNOS proteínu v prednej (motorickej) a zadnej (senzitivnej) časti dolnej lumbálnej miechy (L4-L5) ako aj príslušných spinálnych gangliách na ipsilaterálnej a kontralaterálnej strane poukázalo na značné kvantitatívne rozdiely.

Jednostranná transekcia femorálneho nervu navodená po dobu 11 dní spôsobuje významné zníženie hladiny nNOS proteínu v prednej časti dolných lumbálnych segmentov miechy na ipsilaterálnej strane periférneho poškodenia v porovnaní s kontrolou, ako aj v porovnaní s hladinou nNOS proteínu na strane kontralaterálnej (Obr. 1). Tieto biochemické výsledky sú v zhode s imunohistochemickými analýzami, ktoré ukazujú, že transekcia femorálneho nervu spôsobuje zvýšenie intenzity nNOS-IR sfarbenia iba v neurónoch a interneurónoch, lokalizovaných v dorzomediálnej časti predného rohu a v okolí centrálného kanála, ktoré projektujú do predĺženej miechy a talamu (Hamilton a kol., 1995). Motoneuróny, ktoré sú lokalizované v predných rohoch miechy, zvlášť v laminách VIII a IX (Saito a kol., 1994) prejavujú len nepatrnú imunohistochemickú reakciu. Je pravdepodobné, že zníženie hladiny nNOS proteínu v prednej časti L4-L5 segmentov miechy na pravej strane periférnej axotómie je spôsobené stratou neurotrofických faktorov, ktoré sú produkované komponentmi periférnych nervov, vrátane Schwanových buniek.

V zadnej časti dolných lumbálnych segmentov bola hladina nNOS proteínu vyššia na ipsilaterálnej ako na kontralaterálnej strane (Obr. 2). Zaujímavé bolo aj zistenie, že hladina nNOS proteínu v spinálnych gangliách u kontrolných zvierat nebola detegovateľná, ale po transekcii femorálneho nervu sa na oboch stranách zvýšila, pričom výraznejšie zvýšenie sme pozorovali na ipsilaterálnej strane. Viaceré štúdie naznačujú, že periférna axotómia vedie k zvýšeniu nNOS-IR hlavne u malých a stredne veľkých neurónov spinálnych ganglií (Shi a kol., 1998; Gonzales-Hernandez a Rustioni, 1999). Hoci úloha zvýšenej hladiny NO v dôsledku zvýšenej regulácie NOS nebola doteraz jasne definovaná, poškodením indukovaná produkcia NO v regiónoch senzitivnej inervácie po transekcii femorálneho nervu je považovaná za neuroprotektívny efekt tejto molekuly na poškodené neuróny (Thippeswamy a Morris, 1997; Thippeswamy a kol., 2001) a taktiež je spájaná so schopnosťou regenerability neurónov (Cristino a kol., 2000).



Obr. 1 Hladina nNOS proteínu v prednej časti lumbálnej miechy (L4-L5) po transekcii femorálneho nervu. Experimentálne zvieratá preživali 11 dní. Grafické hodnoty znázorňujú aritmetický priemer \pm SEM (n = 3); štatistická významnosť: *p < 0,05 v porovnaní s kontrolou.



Obr. 2 Hladina nNOS proteínu v zadnej časti lumbálnej miechy (L4-L5) po transekcii femorálneho nervu s 11 dňovým prežívaním zvierat. Grafické hodnoty znázorňujú aritmetický priemer \pm SEM (n = 3); štatistická významnosť: *p < 0,05 v porovnaní s kontralaterálnou stranou.

POĎAKOVANIE

Táto experimentálna práca bola podporená VEGA Grantom 2/5134/25 z SAS a APVV 0314-06.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron.* 1991; 7:615-24.
- Cristino L, Pica A, Della Corte F, Bentivoglio M. Coinduction of nitric oxide synthase, BCL-2 and growth-associated protein-43 in spinal motoneurons during axon regeneration in the lizard tail. *Neuroscience* 2000; 101:451-8.
- Gonzalez-Hernandez T, Rustioni A. Expression of three forms of nitric oxide synthase in peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Res.* 1999; 55:198-207.
- Hamilton MO, Papka RE, O'Donoghue DL, Vaidya AM, Williams S, Poff CR, McNeill DM. Spinal projection neurons to the laterodorsal pontine tegmental nucleus: relationship to preganglionic neurons and nitric oxide synthase. *J Comp Neurol.* 1995; 353: 1-8.
- Saito S, Kidd GJ, Trapp BD, Dawson TM, Bredt DS, Wilson DA, Traystman RJ, Snyder SH, Hanley DF. Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase. *Neuroscience* 1994; 59:447-56.
- Shi TJ, Holmberg K, Xu ZQ, Steinbusch H, de Vente J, Hokfelt T. Effect of peripheral nerve injury on cGMP and nitric oxide synthase levels in rat dorsal root ganglia: time course and coexistence. *Pain.* 1998; 78:171-80.
- Thippeswamy T, MsKey JS, Morris R. Pax and caspases are inhibited by endogenous nitric oxide in dorsal root ganglion neurons in vitro. *Eru J Neurosci.* 2001; 14:1229-36.
- Thippeswamy T, Morris R. Cyclic guanosine 3'5'-monophosphate-mediated neuroprotection by nitric oxide in dissociated cultures of rat dorsal root ganglion neurones. *Brain Res.* 1997; 774:116-22.

POROVNANIE VPLYVU RÔZNYCH FORIEM GLYCEROLU NA VYBRANÉ METABOLICKÉ UKAZOVATELE U DOJNÍC

Farkašová Z., Reichel P., Kováč G.

II. Interná klinika, UVL, Košice

ABSTRAKT

Cieľom nášho experimentu bolo posúdenie vplyvu dlhodobého podávania prípravku na báze glycerolu na zdravotný a produkčný stav vysokoúžitkových dojníc s cieľom prevencie lipomobilizačného syndrómu u dojníc v prechodnom období a zároveň posúdenie rozdielov pri podávaní tekutej a práškovej formy prípravku.

Experimenty s rôznymi formami prípravku boli uskutočnené v dvoch stádach dojníc v rovnakom období reprodukčného cyklu.

Posudzovali sme vplyv glycerolu na vybrané ukazovatele vnútorného prostredia predovšetkým bachora, energetického metabolizmu, vplyv na mliečnu produkciu a žravosť u dojníc v pokusných skupinách v porovnaní s kontrolou.

Prípravok v tekutej forme bol nalievajú na krmivo priamo v krmnom žľabe, kým prášková forma bola primiešavaná do jadrového krmiva už počas jeho prípravy.

V oboch experimentoch výsledky poukázali na antilipolytický, hepatoprotektívny a glukoplastický efekt glycerolu v porovnaní s kontrolnou skupinou. Aplikácia glycerolu do krmnej dávky priaznivo ovplyvnila aj kvantitatívne a kvalitatívne ukazovatele dojivosti, došlo k zvýšeniu žravosti, zlepšeniu celkového zdravotného stavu dojníc a úprave negatívnej energetickej bilancie.

ÚVOD

Počas prechodného obdobia, ktoré je definované ako obdobie posledných 3 týždňov pred pôrodom do 3 týždňov po pôrode (*Grummer, 1995*), sú dojnice menej odolné a je zvýšené riziko porúch zdravotného stavu vo forme rôznych metabolických a infekčných chorôb.

V tomto období vzniká u dojníc negatívna energetická bilancia, dochádza k lipidovej mobilizácii z tukového tkaniva a následne vzostupu koncentrácie NEMK (neesterifikované mastné kyseliny) v krvi a tiež stúpa ukladanie NEMK v pečeni. Extrémna tuková mobilizácia prekračuje metabolickú kapacitu pečene, dochádza k zvýšenej kumulácii triglyceridov a tvorbe ketónových látok (*Herd, 1988*).

Vysokoprodukčné dojnice sa v tomto období nezaobídu bez potrebných aditívnych látok, ako sú napríklad pufrý kvasiniek, obdukované aminokyseliny, niektoré vitamíny a glukoplastické látky.

Glukoplastické látky sú substancie podávané alebo skrmované hovädziemu dobytku, ktoré sú po absorpcii konvertované v pečeni na glukózu, za účelom zvýšenia dostupnosti glukózy u kráv. Toto zvýšenie glukózy u kráv môže podporiť sekréciu inzulínu, ktorá by mala späťne znížiť uvoľňovanie NEMK z tukového tkaniva (*Grummer, 1993; Overton a Waldron, 2004*).

Tieto látky ako prekursor glukózy podporujú glukoneogézu, minimalizujú tukovú mobilizáciu a redukujú ukladanie tuku v pečeni po pôrode (*Stokes a Goff, 2001b*).

Glycerol je glukoplastická látka a zúčastňuje sa metabolizmu glukózy. Je to prírodná látka, ktorá sa nachádza vo všetkých rastlinných a živočíšnych tukoch a jeho začlenenie do glycidového metabolizmu je pohotovejšie než u chemicky vyrábaných glukoplastických látok ako je propylénglykol.

Glycerol prijímaný v krmive je z veľkej časti vstrebávaný v bachore, prípadne je bakteriálnou mikroflórou metabolizovaný na kyselinu propiónovú. Podľa (*Schröder a Südekum, 1999*) glycerol znižuje pomer acetátu k propionátu. Takisto efektívne znižuje obsah NEMK v plazme a zvyšuje hladinu glukózy v krvi (*DeFrain a kol, 2004*).

MATERIÁL A METODIKA

V našom experimente boli použité dojnice z dvoch fariem v rovnakej fáze reprodukčného cyklu. Experimenty boli uskutočnené nezávisle od seba v rôznom časovom období, pričom však boli zachované rovnaké podmienky vonkajšieho prostredia a bola skrmovaná rovnaká krmná dávka.

Experiment I. – počas 40 dní bol glycerol v prípravku v tekutej forme nalievajú priamo na krmivo v krmnom žľabe (300 ml, 2x denne)

P (n = 12) počas 40 dní

K (n = 12) počas 40 dní bez prídavku glycerolu

Experiment II. - počas 40 dní (3 týždne pred a 3 týždne po otelení) do krmnej dávky (TMR) pridávaný glycerol viazaný na práškový nosič (320 g / ks / deň)

P1 (n = 6), P2 (n = 6), podľa dĺžky príjmu glycerolu pred a po otelení (P1 – 30 dní a. p. a 10 dní p. p.; P2 – 7 dní a. p. a 33 dní p. p.)

K (n = 6) KD bez prídavku glycerolu

Odber biologického materiálu (krv, moč, bachorový obsah, mlieko) bol realizovaný 3 krát a to: I. – 3 týždne a. p., II. – 7 – 10 dní p. p., III. – na konci experimentu.

Vo vzorkách boli analyzované ukazovatele bachorového (pH, UMK, C2, C3, C4, pomer C2 : C3), energetického (glukóza, TL, TG, TCH, NEMK, BHB), hepatálneho (CBi, AST, ALT, GGT, LDH) a mliekového profilu (dojivosť, tuk, bielkoviny, močovina).

K analýzám boli použité štandardné laboratórne metodiky (Izotachoforéza, ALIZE).

Na štatistické vyhodnotenie boli použité v I. experimente Studentov t–test, v II. experimente jednocestná ANOVA. Hodnoty $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ boli považované za signifikantné.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Glycerol je popisovaný ako tekutina sladkej chuti, trojuhlíková molekula, predstavujúca vstupnú bránu pre glukoneogézu a môže byť použitý na suplementáciu glukoneogézy. Dávka glycerolu pre dojniciu predstavuje asi 1,0 až 1,5 l (*Stokes a Goff, 2001b*).

Pre svoju sladkú chuť je pre zvieratá obľúbenou potravou, čo ho predurčuje ako vhodný prostriedok na prevenciu a liečbu ketózy. V porovnaní s monopropylénglykolom má vyššiu energetickú hodnotu, je výživovým ekoproduktom, čo nie je zanedbateľné pri súčasnej snahe odbúravania syntetických preparátov vo výžive zvierat (*Bobuš, 2004*).

V našom experimente I. po krátkom adaptačnom období (2 – 3 dni) v skupine pokusných dojníc postupne došlo k návyku prejavujúcemu sa „reflexom“ očakávania aplikácie prípravku polievaním KD. Chuťovo atraktívne doplnkové krmivo zvýšilo príjem a celkovú žravosť u dojníc v pokusnej skupine, čo objektívne bolo možné posúdiť so zvýšenej spotreby predloženej KD. V klinickom a zdravotnom stave sa táto skutočnosť prejavila zvýšeným apetítom, vyšším príjmom tekutín, vzostupom frekvencie a kvality ruminácie a bachorových rotácií.

Viacerí autori popisujú dôležitosť vplyvu rôznych faktorov počas podávania glycerolu, prevažne spôsobu a dĺžky aplikácie a jeho následný pozitívny vplyv v profylaxii ketózy (*Goff a Horst, 2001; Kaiser a kol., 2002*).

Rakúski autori *Schröder a Südekum (1999)* skrmovali ovciam 48; 78; 131 a 185 g/kus/deň glycerolu, pričom študovali vplyv na fermentačné pochody v bachore a uvádzajú, že skrmovanie glycerolu znižuje pomer C2 : C3 a stimuluje k vyššiemu príjmu vody.

Dlhodobé podávanie prípravku na báze glycerolu viazaného na práškový nosič (KETOGLYC Powder) po zapracovaní do TMR v experimente II. sa takisto prejavilo zvýšeným apetítom a príjmom vody bez výrazných klinicky manifestných porúch zdravia u dojníc. Kvalita trusu v oboch skupinách nepreukázala zmyslove kvalitatívne odchýlky.

Z analýzy jednotlivých UMK v experimente I. vyplýva, že priemerné hodnoty kyseliny octovej boli v pokusnej skupine nižšie v porovnaní s kontrolou napriek ich postupnému miernemu vzostupu pri jednotlivých odberoch. Naopak, priemerné hodnoty kyseliny propiónovej preukázali vyššie zastúpenie v jednotlivých odberoch u pokusnej skupiny, kým v kontrolnej boli pomerne vyrovnané za celé sledované obdobie, čo výrazne pozitívne ovplyvnilo vzájomný pomer kyselín octovej a propiónovej (C2 : C3) v prospech pokusnej skupiny. V experimente II. možno konštatovať, že porovnanie výsledkov medzi kontrolnou a pokusnými skupinami P1 (dlhšie obdobie skrmovania prípravku pred pôrodom a kratšie po pôrode) a P2 (kratšie obdobie pred pôrodom a dlhšie po pôrode) preukázalo priaznivejšie výsledky v pokusnej skupine P2. Dynamika zmien v bachorovom profile v skupine P2 v porovnaní so skupinami P1 a K bola charakterizovaná znížením aktuálnej acidity, zvýšením sumy UMK, znížením molárneho percenta kyseliny octovej ($p < 0,05$), zvýšením kyseliny propiónovej ($p < 0,01$) a priaznivejším pomerom C2 : C3 ($p < 0,01$).

Reichel a kol. (2006) uvádzajú vplyv tekutého prípravku na báze glycerolu na stabilizáciu pH bachorovej tekutiny, zníženie koncentrácie kyseliny octovej, zvýšenie koncentrácie kyseliny propiónovej a zníženie pomeru C2:C3 po dlhodobom podávaní (21 dní a. p. a 100 dní p. p.).

Najvýraznejší vplyv doplnkového energetického krmiva KETOZAN (tekutá forma) sa prejavil v priemerných hodnotách neesterifikovaných mastných kyselín (NEMK), ktoré v priebehu jednotlivých odberov zaznamenali preukazný postupný pokles v pokusnej skupine ($p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou i východzími hodnotami. Priemerné hodnoty betahydroxybutyrátu (BHB) počas celého sledovaného obdobia preukázali pomerne vyrovnané hodnoty, aj keď v III. a IV. odbere boli mierne nižšie oproti východším hodnotám a nižšie v kontrolnej skupine, napriek tomu štatisticky nevýznamne kolísali v rozpätí referenčného rozpätia. Pri práškovej forme koncentrácie glukózy, TCH, TG, TL v krvnom sére dojnic v skupine P2 dosiahli štatisticky nevýznamne vyššie hodnoty počas sledovaného obdobia, kým NEMK dosahovali štatisticky významne nižšie hodnoty ($p < 0,01$) a BHB taktiež významné zníženie ($p < 0,001$) v porovnaní s kontrolnou a pokusnou skupinou P1.

V hepatálnom profile bola zisťovaná počas celého sledovaného obdobia nižšia enzymatická aktivita ako aj koncentrácia celkového bilirubínu v krvnom sére dojnic v P2 v porovnaní s ostatnými skupinami.

Viacerí autori skúmali aj vplyv aplikácie glycerolu na mliečnu úžitkovosť, najmä čo do množstva a % obsahu mliečného tuku, pričom uvádzajú rozdielne stanoviská (*Khalili a kol., 1997; Remond a kol., 1993*).

V sledovanom popôrodoznom období boli vzorky mlieka analyzované 3 krát približne v 5 – 10 dňových intervaloch.

Pri posudzovaní mliečnej produkcie v experimente I. bolo zaznamenané významné zvýšenie dojivosti ($p < 0,05$; $p < 0,01$) v pokusnej skupine. Priemerné hodnoty tukovosti mlieka v oboch skupinách preukázali vzostupnú tendenciu, avšak v pokusnej skupine na konci experimentu boli významne vyššie ($p < 0,05$).

Koncentrácia močoviny v mlieku zaznamenala opačnú tendenciu a najmä v pokusnej skupine došlo k jej zníženiu a štatisticky významný rozdiel ($p < ,05$) medzi skupinami bol v 3. odbere, kedy boli koncentrácie štatisticky významne zmenené aj voči počiatočným odberom ($p < 0,01$). V koncentrácii bielkovín počas celej doby experimentu neboli zaznamenané významné rozdiely.

Pehrson a kol. (1992) popisujú signifikantné zvýšenie sérovej hladiny glukózy po podaní kombinovaného prípravku s obsahom glycerolu a propionátu sódného jaloviciam a zaznamenali tendenciu postupného znižovania koncentrácie močoviny v mlieku po podávaní prípravku.

V experimente II. priemerná dojivosť v oboch pokusných skupinách bola vyššia v porovnaní s kontrolnou skupinou, kým kvalitatívne ukazovatele v mlieku mali rozdielny trend.

Percentuálny obsah bielkovín v kontrolnej skupine postupne klesal, kým v pokusných skupinách sa zvyšoval. Obsah tuku v mlieku v kontrolnej skupine a v skupine P1 spočiatku stúpil, neskôr klesol, kým v skupine P2 zaznamenal v II. odbere pokles ($p < 0,05$) a neskôr vzostup ($p < 0,05$) hodnôt. Koncentrácia močoviny preukázala vo všetkých skupinách vzostupný trend, pričom v kontrolnej skupine bol výraznejší v porovnaní s pokusnými skupinami.

Tab. 1 Porovnanie zmien vybraných ukazovateľov v jednotlivých experimentoch po aplikácii dvoch rôznych foriem glycerolu.

Parameter	KETozAN	KETOGLYC POWDER
pH	ns	ns ↓ P2
Suma UMK	ns	ns ↑ P2
Kys. octová (C2)	ns ↓ P	↓ P2 ($p < 0,05$)
Kys. propiónová (C3)	ns ↑ P	↑ P2 ($p < 0,01$)
Pomer C2 : C3	ns ↓ P	↓ P2 ($p < 0,01$)
NEMK	↓ P ($p < 0,05$)	↓ P2 ($p < 0,01$)
BHB	ns	↓ P2 ($p < 0,001$)
Enzymatická aktivita	ns	ns ↓ P2
CBi	ns	ns ↓ P2
Dojivosť	↑ P ($p < 0,05$; $p < 0,01$)	ns ↑ P1
Tuk - mlieko	↑ P ($p < 0,05$)	P2 ↓ ($p < 0,05$) → ↑ ($p < 0,05$)
Bielkoviny - mlieko	ns	↓ K ↑ P1
Močovina - mlieko	↓ P ($p < 0,01$; $p < 0,05$)	↑ K

Čo sa týka praktického porovnania oboch foriem, javí sa prášková forma glycerolu ako vhodnejšia a výhodnejšia z hľadiska lepšej a ľahšej manipulácie, požiadaviek na menšie skladovacie priestory, jednoduchšiu prípravu a aplikáciu prípravku priamo s TMR. Používa sa nižšia dávka glycerolu a veľkou výhodou práškovej formy sú pozitívne účinky ostatných komponentov prípravku, napr. pufrčná schopnosť zeolitu.

Čo sa týka tekutého glycerolu veľkou výhodou je jeho sladká chuť čím je vysoko chuťovo atraktívny pre zvieratá.

Na základe výsledkov nášho experimentu môžeme konštatovať, že ako vhodnejšia sa javí prášková forma glycerolu, a to ako z praktického hľadiska, tak aj na základe výsledkov zmien ukazovateľov vnútorného prostredia. V rámci experimentu z práškovou formou glycerolu, sme preukazne lepšie výsledky zaznamenali v skupine P2, kde bol glycerol dojniciam skrmovaný kratšiu dobu pred a dlhšiu po pôrode. Na základe tohto môžeme konštatovať, že suplementácia glycerolu pred pôrodom počas dlhého obdobia, nemá výrazný pozitívny účinok, preto je vhodnejšie skrmovať glycerol dlhšiu dobu po pôrode až do vrcholu laktácie.

POĎAKOVANIE

Chcem sa poďakovať predovšetkým môjmu školiteľovi Prof. MVDr. P. Reichelovi, CSc., Prof. MVDr. G. Kováčovi, DrSc. a celému kolektívu II. Internej kliniky za cenné rady a pomoc nielen pri tomto experimente, ale počas celého doktorandského štúdia.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bobuš, A.: Nové alternatívy riešenia ketóz dojnic. Slovenský chov, 9, 2004 (2): 40.
 DeFrain, J. M., Hippen, A. R., Kalscheur, K. F., Jardon, P. W.: Feeding glycerol to transition dairy cows: Effects on blood metabolites and lactation performance. J. Dairy Sci. 87, 2004 (12): 4195 – 4206.

- Goff, J. P., Horst, R. L.: Oral glycerol as an aid in the treatment of ketosis/fatty liver complex. *J. Dairy Sci.* 84, 2001: 153.
- Grummer, R. R.: Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 1993: 3882-3896.
- Grummer, R.R.: Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Sci.* 73, 1995: 2820 – 2833.
- Herdt, T. H.: Fatty liver in dairy cows, *Vet. Clin. N.A.*: *Food Anim Pract.* 1988, 4: 269-287.
- Kaiser, C. A., Chen, E. J., Losko, S.: *Methods Enzymol.* 2002, 351: 325-338.
- Khalili, H., Varvikko, T., Toivonen, V., Hissa, K., Suvitie, M.: The effects of added glycerol or unprotected free fatty acids or a combination of the two on silage intake milk production, rumen fermentation and diet digestibility in cows given grass silage based diets. *Ag. Food Sci. Finland*, 6, 1997: 349 – 362.
- Overton, T. R., Waldron, M. R.: Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *J. Dairy Sci.* 87, 2004: 105-119. Pehrson B, Plym Forshell K, Carlsson J.: The effect of additional feeding on the fertility of high-yielding dairy cows. *Zentralbl Veterinarmed A.* 39, 1992 (3): 187 – 192.
- Reichel, P., Hybský, Š., Kováč, G., Zavadová, Z., Húska, M., Paulíková, I.: Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on rumen fluid, blood metabolites and lactation performance. In supplement 10: 7th Middle European Buiatric Congress, Slovenia. 2006, 137 – 139.
- Remond, B., Souday, E., Jouany, J.P.: In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 41, 1993: 121 – 132.
- Schröder, A., and Südekum. K. H.: Glycerol as a by – product of biodiesel production in diets for ruminants. In *New Horizons for an Old Proc.* 1999, 10th Int. Rapeseed Congr. Canberra, Australia, september 26 – 29, Paper No. 241 N. wratten and P. A. Salisbury, ed.
- Stokes, S. R., Goff, J. P.: Oral Drenching: Boosting the Fresh Cow. *Western Dairy News.* 1, 2001b (4): 99 – 112.

ŠTANDARDIZÁCIA DETEKcie MUTÁCIÍ V PRP GÉNE OVIEC V PRÍSTROJI DNALYSER

Hreško S., Tkáčiková L.

Ústav mikrobiológie a imunológie, UVL, Košice

ABSTRAKT

DNALyser spája technológiu PCR a DGGE do jedného prístroja. Práca bola zameraná na štandardizáciu DNALysera (Ingeny International BV, Holandsko), ktorý chceme v blízkej budúcnosti použiť na identifikáciu polymorfizmov v PrP géne hovädzieho dobytku. Za týmto účelom sme na štandardizáciu tohto prístroja použili DNA vzorky oviec so známym polymorfizmom v ich PrP géne a PCR a DGGE metódy, ktoré štandardne používame na analýzu polymorfizmov v ovčom PrP géne (Tkáčiková a kol., 2006). Z predbežných výsledkov vyplýva, že táto nová technológia, po dokončení štandardizácie, nám umožní efektívnejšie a časovo úspornejšie analyzovať polymorfizmy v PrP géne prežúvavcov..

ÚVOD

Polymorfizmus v PrP géne oviec je spájaný so zvýšenou vnímavosťou voči scrapie, transmisívnej encefalopátií oviec. Infekčným agensom tohto ochorenia sú molekuly proteínovej povahy, označované ako priony (Prusiner 1982). Tieto infekčné formy (PrP^{Sc}) vznikajú konformačnou zmenou molekúl telu vlastných (PrP^C), ktoré sú kódované PrP génom. Zámena jedného nukleotidu (SNP - single nucleotide polymorphism) v kodónoch 136, 154 a 171 ovplyvňuje aminokyselinové zloženie expresovanej molekuly a tým aj mieru odolnosti voči konformačnému vplyvu infekčných foriem PrP^{Sc}. Alely kódujúce v kodóne 136 alanín, v kodónoch 154 a 171 arginín (ARR), sú spájané so zvýšenou rezistenciou voči scrapie. Valínové (V), histidínové (H) a glutamínové (Q) variácie korelujú so zvýšenou vnímavosťou voči scrapie (Belt a kol. 1995). Podľa toho môžu byť jedinci zaradení do piatich rizikových skupín, kde v prvej sú jedinci najviac rezistentní a v piatej najviac vnímaví voči scrapie (Tab.1.). V súčasnosti prebieha stály monitoring genotypov plemenných baranov v súvislosti s ich pozitívnou selekciou v plemenitbe.

Na detekciu polymorfizmov v PrP géne sa môžu použiť rôzne metódy vychádzajúce z prvotnej amplifikácie PrP génu a následného použitia niektorej z metód na stanovenia prítomnosti mutácií v analyzovanom fragmente DNA. V našom laboratóriu na tento účel používame DGGE metódu (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Reprezentatívne vzorky z jednotlivých DGGE profilov sú analyzované pomocou DNA sekvenovania (Tkáčiková a kol., 2006).

Tab. 1. Rozdelenie genotypov do rizikových skupín

- | |
|-------------------------------------------------------------------|
| I. skupina ARR/ARR |
| II. skupina ARR/ARQ, ARR/ARH, ARR/AHQ |
| III. skupina ARQ/ARQ, AHQ/AHQ, ARH/ARH, ARH/ARQ, AHQ/ARH, AHQ/ARQ |
| IV. skupina ARR/VRQ |
| V. skupina ARQ/VRQ, ARH/VRQ, AHQ/VRQ, VRQ/VRQ |

MATERIÁL A METODIKA

DNA vzorky: Na štandardizáciu prístroja DNALyser boli použité vzorky genomickej DNA oviec získaných z krvných leukocytov. DNA bola izolovaná pomocou metódy opísanej Sambrookom a kol. (1989).

Nested PCR reakcia: Vzorky genomickej DNA boli použité na nested PCR pozostávajúcej z dvoch na seba nadväzujúcich PCR reakcií. Na PCR reakciu boli použité nami navrhnuté

primery uvedené v Tab.1. Na amplifikáciu bola použitá Smart Taq Hot Thermostable DNA polymeráza (Naxo Ltd., Estónsko). V 1. PCR reakcii boli použité externé primery (PrP420-F a PrP420-R, Tab. 2.) amplifikujúce 420 bp dlhú časť PrP génu oviec. Podmienky 1. PCR reakcie boli nasledovné: iniciálna denaturácia (15 min., 95°C), 30 cyklov vlastnej amplifikácie (Tab.2.) a finálna extenzia (10 min., 74°C).

Produkt z 1.PCR bol použitý ako templát pre 2. PCR amplifikáciu 222 bp dlhej časti PrP génu oviec. Na túto amplifikáciu boli použité primery pTK-F1 a pTK-R1, z ktorých jeden mal GC-clamp. Samotnú PCR reakciu sme vykonali v štandardnom termocykléry (Techne) za použitia nasledovných podmienok: iniciálna denaturácia (15 min., 95°C), 30 cyklov vlastnej amplifikácie (Tab.2.) a finálna extenzia (10 min., 74°C).

Produkt z 1. PCR bol použitý ako templát pre 2.PCR reakciu, ktorú sme vykonali v kapilárach naplnených 0-80% gradientným géлом urey a formamidu v prístroji DNalyser. Podmienky na túto PCR reakciu boli nasledovné: iniciálna denaturácia (15 min., 95°C), 30 cyklov amplifikácie (30 sek., 95°C; 1 min., 59°C; 1 min., 59°C → 95°C) a finálna extenzia (1 min., 95°C; 10 sek., 95°C → 63°C; 1 min, 63°C; 10 sek., 63°C → 72°C; 30 min, 72°C)

Tab.2. Oligonukleotidové primery použité na PCR

Primer	Nukleotidová sekvencia 5'-3'	Produkt	Podmienky PCR
PrP420-F	AAG CCC AGT AAG CCA AAA ACC AAC	420 bp	30x: 95°C, 1min.; 59°C, 1min.; 74°C, 1min.;
PrP420-R	CAC AGG AGG GGA AGA AAA GAG GAT		
pTK-F1	GGC CTT GGT GGC TAC ATG CTG	222 bp	30x: 95°C, 1min.; 59°C, 1min.; 74°C, 1min.;
pTK-R1	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC GTT TTT TAT GTT GAC ACA GTC ATG CAC		

Detekcia amplifikovanej DNA: PCR produkty boli analyzované v 1 % agarózovom gély v TAE tlmivom roztoku. Gél bol po ofarbení etídium bromidom vizualizovaný pod UV lampou. Ako štandard molekulovej hmotnosti bol použitý 100 bp ladder.

DGGE analýza: PCR produkty z 2.PCR boli použité na DGGE analýzu v 9 % polyakrylamidovom gély obsahujúcom 20 - 60 % gradient urey a formamidu. Elektroforéza bola robená pri 75 V po dobu 18 hod. v 0,5x koncentrovanom TAE tlmivom roztoku v štandardnom systéme INGENYphorU-2. Gél bol po ukončení elektroforézy ofarbený striebrom.

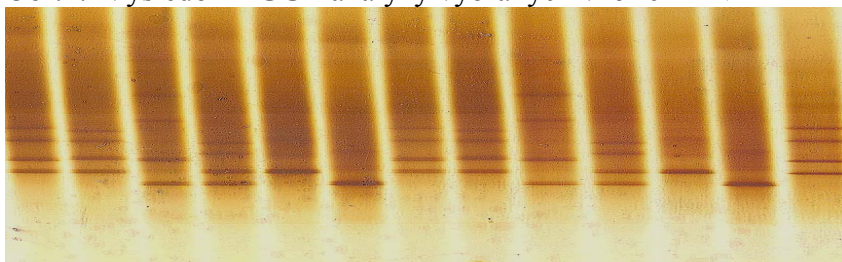
Príprava kapilár: Kapiláry boli naplnené s 9 % polyakrylamidovom gély obsahujúcom 20 - 60 % gradient urey a formamidu. Kapiláry boli vložené do DNalyser prístroja podľa pokynov výrobcu (Ingeny International BV, Holandsko).

Analýza v prístroji DNalyser: Vzorky boli nanosené do kapilár a analyzované pomocou elektroforézy pri 50 V po dobu 3 hod. v 0,5x koncentrovanom TAE tlmivom roztoku s etídium bromidom (0,4mg/l.) podľa pokynov výrobcu (Ingeny International BV, Holandsko).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

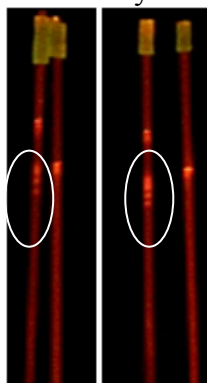
Pred prístupím k štandardizácii prístroja DNalyser bolo potrebné určiť genotypové profily vzoriek DNA metódou DGGE na štandardnom systéme INGENYphorU-2. Po ich vyhodnotení (Obr.1.) boli vybrané vhodné vzorky na štandardizáciu. Ako najvhodnejšie vzorky sa javili vzorky heterozygotov.

Obr.1. Výsledok DGGE analýzy vybraných vzoriek DNA



V prístroji DNalyser prebieha komplexná analýza DNA vzoriek v kapilárach, kde postupne dochádza k PCR amplifikácii, separácii analyzovaných vlákien DNA, farbeniu a zdokumentovanie výsledkov bez akejkoľvek vonkajšej manipulácie. Reakčná zmes so vzorkou je naložená do kapiláry, obsahujúcej gradientný gél. Kapiláry sú umiestnené v špeciálnom držiaku a takto dané do prístroja. DNalyser cyklicky strieda teploty, podobne ako je to v termocykléry pri PCR. Následne sa po PCR spustí elektroforetický systém, počas ktorého je produkt reakcie separovaný v akrylamidovom gradientnom gély a zároveň farbený etídium-bromidom. Výsledok separácie je zaznamenaný pod UV svetlom kamerou so špeciálnym filtrom v každej kapiláre zvlášť. Obrázky zaznamenané kamerou sú vyhodnotené počítačom. Pri štandardizácii prístroja DNalyser bolo potrebné samostatne určiť podmienky pre PCR a DGGE. Reakčná zmes, obsahujúca produkt 1.PCR a primery pre internú PCR, bola umiestnená v kapilárach s géloom. Pri priamom kontakte denaturujúcich zložiek urey a formamidu obsiahnutých v géle dochádza k narušeniu priebehu PCR. Na zabránenie tohto vplyvu boli pripravené kapiláry s géloom, ktorý obsahoval vrstvu bez denaturujúcich zložiek, oddelujúcu priestor pre reakčnú zmes od gradientnej časti. Pre štandardizáciu kapilárnej DGGE boli použité vzorky so známymi profilmi heterozygotov. Kombináciou správnych parametrov, teploty, napätia a času sa dosiahla separácia vzoriek v gradientnom géle (Obr. 2.). Na detekciu polymorfizmu v PrP géne oviec je možné použiť viacero metód. Gombojav a kol. (2004) použili PCR amplifikáciu a následné sekvenovanie na analýzu PrP génu oviec mongolských plemien, podobne ako Tranulis a kol. (1999) u oviec v Nórsku. Hunter a kol. (1993) skúmali PrP gén pomocou analýzy dĺžky reštrikčných fragmentov (RLFP – Restriction length fragment polymorphism). De Bosschere a kol. (2004) porovnávali metódu reverznej hybridizácie s metódou DGGE a RT-PCR (Real Time – PCR). Každou metódou boli dosiahnuté porovnateľné výsledky analýzy polymorfizmu PrP génu oviec. Reverzná hybridizácia a RT-PCR sú v porovnaní s DGGE časovo menej náročné. V rámci jedného procesu je možné pomocou RT-PCR vyšetriť 20 vzoriek, pomocou hybridizácie 24 vzoriek. DNalyser umožňuje analyzovať naraz 96 vzoriek v niekoľkonásobne kratšom čase v porovnaní so štandardnými metódami PCR a DGGE. V našom prípade analýzy PrP génu oviec boli vzorky analyzované na prístroji DNalyser v priebehu približne piatich hodín. Pri použití štandardnej metódy PCR, kontroly produktov na agarózovom gély, analýzy vzoriek na DGGE a farbení gélu mohli byť vzorky vyhodnotené po viac ako 24 hodinách. Analýza polymorfizmov pomocou DNalysera ešte stále nie je úplne štandardizovaná, ale dosiahnuté výsledky poukazujú na to, že tento prístroj nám umožní rýchlu, úspornu a efektívnu analýzu vzoriek PrP génu prežúvavcov, resp. v budúcnosti ho môžeme použiť aj na detekciu mutácií v akomkoľvek inom úseku DNA.

Obr. 4. Výsledok analýzy 2 vzoriek DNA pomocou DNAlysera.



POĎAKOVANIE

Za pomoc a vypracovanie tejto práce ďakujem Doc. L. Tkáčikovej, PhD. a spoločnosti Ingeny International BV, Holandsko za poskytnutie prístrojov.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Belt PB, Muileman IH, Schreuder BE, Bos-de Ruijter J, Gielkens AL, Smits MA.

Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol.* 1995 Mar;76 (Pt 3):509-17

De Bosschere H, Roels S, Renard C, Briers T, De Sloovere J, Vanopdenbosch E. Evaluation of a new test for genotyping codons 136-154-171 of the ovine prion protein (PRNP) gene through reverse hybridization. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.* 2004; 73, 325-330

Gombojav A, Ishiguro N, Horiuchi M, Serjmyadag D, Byambaa B, Shinagawa M. Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *J Vet Med Sci.* 2003 Jan;65(1):75-81

Gombojav A, Ishiguro N, Horiuchi M, Shinagawa M. Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds. *J Vet Med Sci.* 2004 Oct;66(10):1293-5

Hunter N, Goldmann W, Benson G, Foster JD, Hope J. Swaledale sheep affected by natural scrapie differ significantly in PrP genotype frequencies from healthy sheep and those selected for reduced incidence of scrapie. *J Gen Virol.* 1993 Jun;74 (Pt 6):1025-31

<http://www.ingeny.com/>

Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* 1982 Apr 9;216(4542):136-44

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989, 9.16.

Tkacikova L, Rolkova G, Bires J, Novak P, Kontsekova E, Imrichova D, Bhide M, Hanusovska E, Mikula I, Novak M. PrP gene polymorphism in sheep breeds in Slovakia and susceptibility to scrapie. *Acta Virol.* 2006;50(4):257-61

Tranulis MA, Osland A, Bratberg B, Ulvund MJ. Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *J Gen Virol.* 1999 Apr;80 (Pt 4):1073-7.

INTERAKCIE MEDZI NIEKTORÝMI BIOMETRICKÝMI A HORMONÁLNYMI PARAMETRAMI FOLIKULOV VAJEČNÍKOV OVIEC PO INDUKOVANOM ESTRE

Jankurová J.¹, Vlčková R.¹, Kostecká Z.²

¹Ústav fyziológie, Katedra normálnej anatómie, histológie a fyziológie, UVL, Košice

²Ústav chémie, biochémie a biofyziky, Katedra chémie, biológie, a biochémie, UVL, Košice

ABSTRAKT

V práci sme študovali morfológické zmeny na vaječníkoch a zmeny hladín pohlavných hormónov progesterónu (P_4), 17β -estradiolu (E_2) a inzulínu podobného rastového faktora I (IGF-I) v krvnom sére oviec pri rôznych biotechnologických spôsoboch ošetrovania oviec počas anestríckej sezóny. Cieľom bolo zistiť a porovnať biometrické parametre folikulov vaječníkov a koncentrácie P_4 , E_2 a IGF-I po aplikácii superanalógu GnRH (LHRH) a určiť prípadný rozdiel kombinácie s analógom $PGF_{2\alpha}$ a po priradení barana do stáda („ram“ efekt). Skupine oviec ($n = 10$) sme odobrali vzorky krvi na stanovenie P_4 , E_2 a IGF-I. Následne boli ovce indukované k estru prípravkom Supergestran ($0,5 \text{ ml.ks}^{-1}/2x$). Po 5-tich dňoch bola polovica zvierat ($n = 5$) ošetrovaných Oestrophanom ($0,5 \text{ ml.ks}^{-1}$) a k druhej polovici zvierat ($n = 5$) bol priradený baran. Po 48 hodinách sme opäť odobrali krv na stanovenie P_4 , E_2 , a IGF-I. Po ovariektómii sme vaječníky čiastočne biometricky spracovali a fixovali v 10% formalíne do ďalšieho spracovania. Vaječníky sme spracovali bežným histologickým postupom. Zhotovené 5 – 7 μm hrubé rezy sme ofarbili hematoxylín-eozínom a hodnotili kvantitatívne a kvalitatívne. Koncentrácie P_4 a E_2 sme stanovili v krvnom sére RIA metódou, IGF-I sme stanovili metódou ELISA. Získané výsledky sme štatisticky vyhodnotili Studentovým t-testom, testom ANOVA a spracovali vzájomné korelácie. Zmeny hladín P_4 , E_2 a IGF-I ani biometrické parametre nevykazovali štatisticky významný rozdiel medzi skupinami. Naše čiastkové výsledky však poukazujú na skutočnosť, že feromóny barana môžu pozitívne ovplyvniť folikulogézu a navodiť ovuláciu u oviec počas anestríckej sezóny.

ÚVOD

Biotechnologické metódy synchronizácie/indukcie estru sú významným faktorom pri zintenzívnení a efektívnejšom využívaní reprodukčného potenciálu zvierat. K ovplyvneniu pohlavného cyklu oviec v chovnej sezóne či mimo nej sa používajú rôzne princípy. Pri prirodzenej ceste sa dosiahne pozitívny zásah do priebehu cyklu vplyvom prostredia, najčastejšie tzv. „ram“ efekt (feromóny barana) (Evans a kol., 1987; Ungerfeld a kol., 2002). Účinok syntetických farmakologických prípravkov na báze progestagénov (Godfrey a kol., 1999; Bari a kol., 2001) alebo prostaglandínov (Henderson a Robinson, 2000; Maraček a kol., 2002;) sa uplatňuje pri využití farmakologickej cesty. Obe cesty v konečnom dôsledku sledujú cieľ vytvoriť čo najvhodnejšie podmienky pre realizáciu plánovaného harmonogramu riadenej reprodukcie, zvýšenie natality a výskyt viacplodia. Pretože stúpa záujem o mimosezónny zásah s tým istým cieľom, zámerom našej práce bolo určenie morfológických zmien na vaječníkoch počas folikulogézy a stanovenie koncentrácií pohlavných hormónov P_4 , E_2 a IGF-I v krvnom sére oviec počas anestríckej sezóny. Cieľom bolo zistiť interakcie medzi hodnotenými biometrickými parametrami folikulov vaječníkov a koncentraciami ovariálnych steroidných hormónov P_4 , E_2 , a IGF-I. Na základe ich vzájomných korelácií určiť prípadný rozdiel po GnRH a následnom podaní $PGF_{2\alpha}$ a pri kombinácii GnRH s „ram“ efektom.

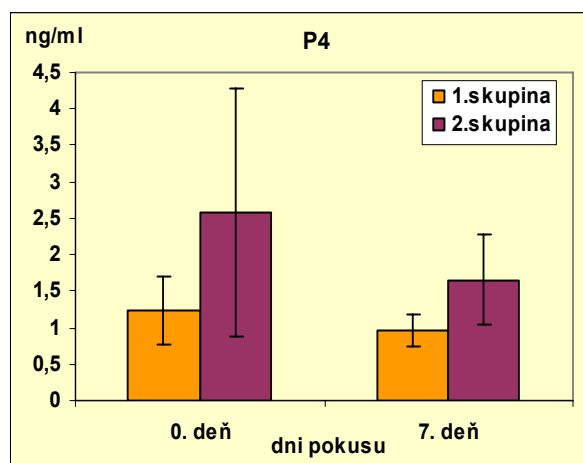
MATERIÁL A METODIKA

Experimenty boli vykonané počas anestríckej sezóny (jún) v poľnohospodárskom družstve podhorskej oblasti Nízkyh Tatier, kde boli použité vyradené bahnice ($n = 10$) plemena

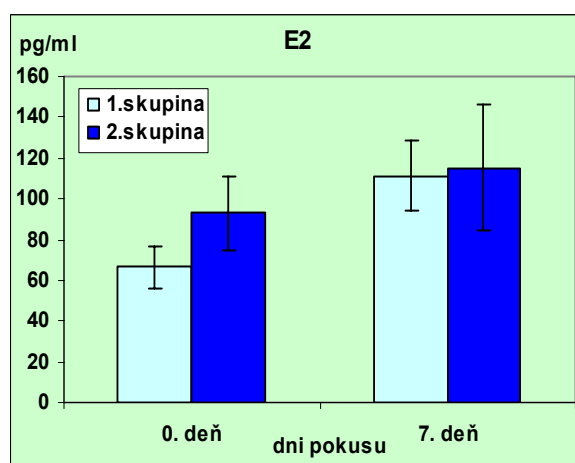
zošľachtená valaška. Zvieratá boli vo veku 4 – 10 rokov, vážili 45 – 50 kg. Rozdelené boli do dvoch skupín (n = 5) a pred vykonanými zásahmi im bola odobratá krv na stanovenie ováriálnych hormónov (P_4 , E_2) a IGF-I. Po odbere krvi bola vykonaná indukcia estru oviec (0. deň pokusu) prípravkom Supergestran (Ferring-Léčiva a.s., Česká republika) v dávke $0,5 \text{ ml.ks}^{-1}$ i.m. ráno a s.c. poobede. Po 5-tich dňoch bola 1. skupina synchronizovaná prípravkom Oestrophan (Bioveta a.s., Ivanovice na Hané, Česká republika) $0,5 \text{ ml.ks}^{-1}$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ i.m., ku 2. skupine bol priradený baran (1-2/10 oviec). Po 48 hodinách (7. deň pokusu) im bola opäť odobratá krv na stanovenie P_4 , E_2 a IGF-I. Následne u zvierat bola vykonaná anestézia, laparotómia a ovariektómia. Po ovariektómii sme vaječníky čiastočne biometricky spracovali a fixovali v 10% formalíne do ďalšieho spracovania. Vaječníky sme v laboratóriu spracovali bežným histologickým postupom podľa Vacek-a (1990). Zhotovené 5 – 7 μm hrubé rezy sme ofarbili hematoxyln- eoziénom a hodnotili kvantitatívne (počet folikulov) a kvalitatívne (typ a kategória folikulu). Koncentrácie P_4 a E_2 sme stanovili v krvnom sére RIA metódou, IGF-I sme stanovili metódou ELISA. Histologické rezy (každý dvadsiaty rez) sme prezerali a vyhodnocovali mikroskopom ZEISS Axiolab (Nemecko). Mikrofotografie sme získali prostredníctvom programu pre analýzu obrazu LUCIA G Verzia 4,60 – System for Image Processing, prepojením svetelného mikroskopu s PC pomocou kamery PAL GKB CCD camera CC-8603. Získané výsledky biometrických aj hormonálnych parametrov sme štatisticky spracovali Studentovým t-testom, testom ANOVA. Graficky znázornené výsledky sú v podobe hodnoty aritmetického priemeru a jej štandardnej chyby priemeru (S.E.M., Standard Error of Mean).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Porovnaním koncentrácií ováriálnych hormónov v krvnom sére oviec v oboch pokusných skupinách sme zistili, že 7. deň po aplikácii GnRH a 48 hodín od podania $\text{PGF}_{2\alpha}$, rovnako ako po aplikácii GnRH a 48 hodín po priradení barana došlo k poklesu P_4 (Graf 1) a vzostupu E_2 (Graf 2), tieto zmeny však boli nesignifikantné.



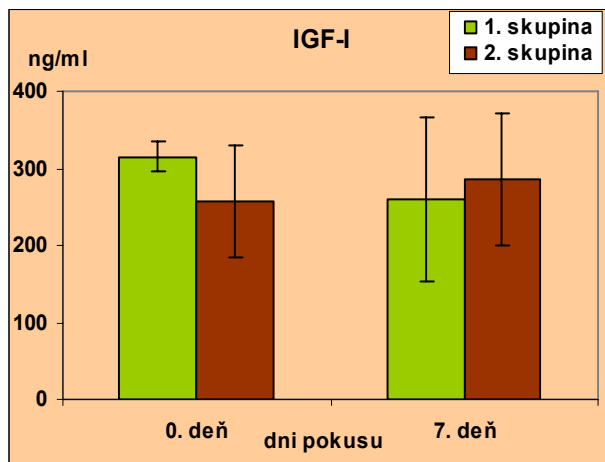
Graf 1 Hladiny progesterónu po ošetrení oviec kombináciou GnRH a $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1. sk) a GnRH a priradením barana (2. sk).



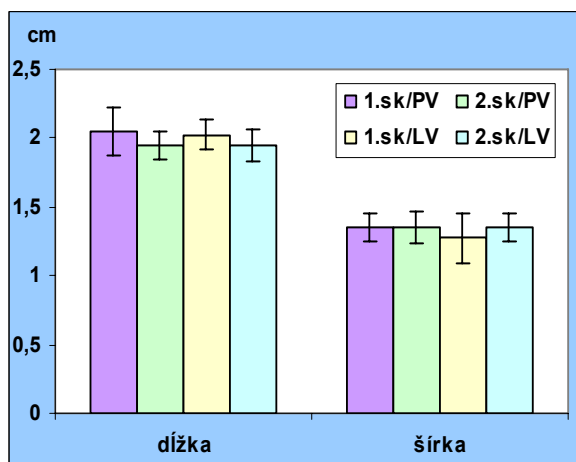
Graf 2 Hladiny estradiolu po ošetrení oviec kombináciou GnRH a $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1. sk) a GnRH a priradením barana (2. sk).

Analýza výsledkov prvej pokusnej skupiny nám ukázala, že došlo k nesignifikantnému poklesu koncentrácie IGF-I v krvnom sére oviec na 7. deň od podania GnRH a 48 hodín po aplikácii $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Graf 3). U druhej skupiny ošetrenej kombináciou GnRH a „ram“ efektu sme zaznamenali v rovnakom časovom intervale nesignifikantný vzostup hladín IGF-I.(Graf 3).

Biometrické parametre (dĺžku a šírku vaječníkov) sme odmerali posuvným meradlom a udávame ju v cm. Ani v tomto prípade sme nezaznamenali signifikantný rozdiel medzi 1. a 2.

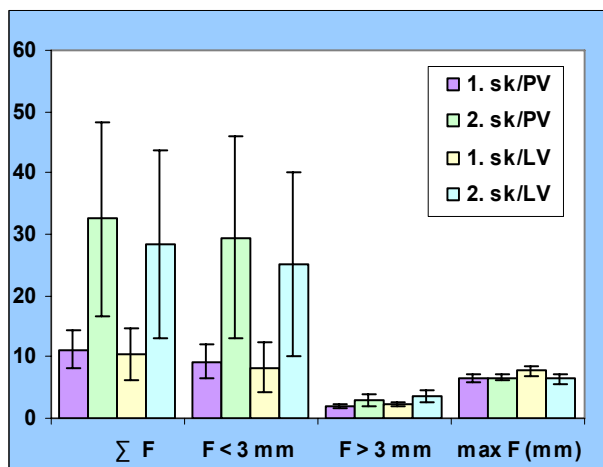


Graf 3 Hladiny IGF-I po ošetrení oviec kombináciou GnRH a PGF_{2α} (1. sk) a GnRH a priradením barana (2. sk).

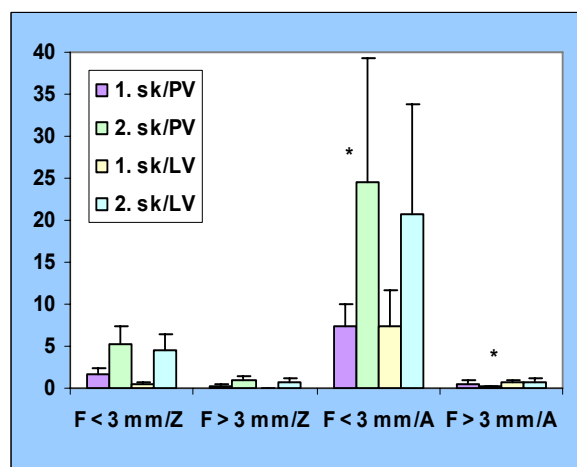


Graf 4 Biometrické parametre (dĺžka, šírka) vaječníkov oviec 1. a 2. pokusnej skupiny.

pokusnou skupinou (Graf 4). U 2. skupiny sme pri porovnaní celkového počtu folikulov/vaječník pozorovali nárast počtu folikulov/vaječník, v oboch sledovaných kategóriách (< 3 mm, > 3 mm), ktorý však nebol štatisticky významný (Graf 5). Podobný stav sme zistili aj pri zastúpení „zdravých“ (rastúcich a vyvíjajúcich sa) a atretických folikulov. Signifikantný rozdiel sme zistili pri porovnaní zastúpenia populácie atretických folikulov medzi kategóriami < 3 mm a > 3 mm (Graf 6).



Graf 5 Priemerné počty folikulov/vaječník 1. a 2. pokusnej skupiny
PV- pravý vaječník, LV – ľavý vaječník
max F – diameter najväčšieho folikulu



Graf 6 Priemerné počty folikulov/vaječník 1. a 2. pokusnej skupiny
PV- pravý vaječník, LV – ľavý vaječník
A – atretický folikul, Z - zdravý folikul
*P < 0,05

Štúdie viacerých autorov poukazujú na možnosť použitia farmakologických prípravkov na báze GnRH v kombinácii s baranom alebo s PGF_{2α} (Henderson, Robinson, 2000; Ungerfeld a kol., 2002), prípadne aj podľa protokolu OvSynch (GnRH, PGF_{2α}, GnRH) ako uvádzajú Deligianis a kol. (2005). Aplikácia takejto kombinácie ovciam v anestríckej sezóne môže navodiť luteinizáciu veľkých terciárnych folikulov, ktoré modulačným účinkom cez sekréciu P₄ ovplyvňujú rostrálne štruktúry hypotalamu a vytvárajú optimálne podmienky pre vplyv feromónov barana. To vedie k stimulácii selekcie terciárnych folikulov v štádiu náboru, ako aj podpore sekrécie GnRH a tým aj nástupu ruje a ovulácie anestríckej ovce (Goodman, 1994; Goodman a kol., 2002). Podľa dostupných literárnych údajov koncentrácie E₂ rastú krátko pred ovuláciou. Detekciu estrogénov je možné využiť ako cenný indikátor stimulácie veľkých terciárnych folikulov a ich selekcie. Pokles P₄ stimuluje sekréciu E₂ a rast folikulov. IGF-I je možným parametrom autokrinnej a parakrinnej kontroly/stimulácie ovariálnej steroidogenézy, proliferácie a diferenciácie. Dokázaný bol jeho stimulačný účinok na biosyntézu a sekréciu P₄ v kultúrach folikulových buniek HD, ošípaných a oviec, taktiež na produkciu E₂ v kultúrach ovariálnych buniek u ošípanej, potkana a človeka (Makarevich a kol., 2000). Naše čiastkové výsledky, v zhode s literárnymi údajmi, poukazujú na skutočnosť, že feromóny cez podporu sekrécie GnRH pozitívne pôsobia aj na zvýšenie počtu folikulov v štádiu náboru, čím dávajú viacerým folikulom väčšiu možnosť stať sa ovulačnými. Experimenty s využitím metódy na báze kombinácie GnRH a PGF_{2α} priradením barana poukazujú na možnosť využitia pri plemenách chovaných na Slovensku.

POĎAKOVANIE

Práca bola vypracovaná v rámci riešenia projektu AV 4/0113/06. Za odborné konzultácie a za pomoc pri jej realizácii ďakujem školiteľovi prof. MVDr. I. Maračkovi, DrSc., vedúcemu Ústavu fyziológie doc. MVDr. J. Halaganovi, PhD. a MVDr. R. Vlčkovej.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bari F, Khalid M, Olf B, Haresign W, Murray A, Merrel B. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*. 2001; 56 (1):147-155.
- Deligiannis C, Valasi I, Rekkas CA, Goulas P, Theodolios E, Lainas T, Amiridis GS. Synchronization of ovulation and fixed time intrauterine inseminations in ewes. *Reprod. Dom. Anim.* 2005; 40: 6-10.
- Evans G, Maxwell WMC. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney: Butterworth. 1987.
- Godfrey RW, Collins JR, Hansley EL, Wheaton JE. Estrus synchronization and artificial insemination of hair ewes in the tropics. *Theriogenology*. 1999; 51:985-997.
- Goodman RL. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: *The Physiology of Reproduction*. (Editors: E. Knobil a J. D. Neill), 2nd edition, Raven Press, New York, 1994; 660-693.
- Goodman RL, Anderson GM, Hardy SL, Connors JM, Valent M, Lehman MN. Neural circuitry responsible for the inhibition of reproductive function in seasonally anestrous ewes. In: *Proceeding Book, XVIII. The International Conference on Reproduction of Farm Animals*, 2002; 9-15.
- Henderson DC, Robinson JJ. The reproductive cycle and its manipulation. In: Martin W.B., Aitken I.D.: *Diseases of sheep*, Oxford: Blackwell Scient. Publ., 2000.
- Makarevich AV a kol.. The role of IGF-I, cAMP, protein kinase A and MAP-kinase in the control of steroid secretion nucleotide production, granulosa cell proliferation and preimplantation embryo development in rabbits. *J. Steroid. Biochem. & Molecul. Biol.* 2000; 73: 123-133.

- Maraček I., Krajničáková M., Kostecký M., Gréserová G., Valocký I. Tertiary follicular growth wave dynamics after oestrus synchronization and superovulation in ewes and goats. *Acta Vet. Brno*, 2002, 71:481-486.
- Ungerfeld R, Pinczak A, Forsberg M, Rubianes. Ovarian and endocrine responses of Corriedale ewes to “ram effect” in the non-breeding season. *Can. J. Anim. Sci.* 2002; 82:599-602.
- Vacek Z. *Histológia a histologická technika*. Osveta Martin, 1990.

STANOVENIE A IDENTIFIKÁCIA REZÍDUÍ SULFADIMIDÍNU V TKANIVÁCH KRÁLIKOV MIKROBIOLOGICKÝMI SCREENINGOVÝMI METÓDAMI

Janošová J., Kožárová I., Máté D.

Katedra hygieny a technológie potravín, UVL, Košice

ABSTRAKT

Na stanovenie rezíduí sulfadimidínu (SMZ) v tkanivách králikov počas 15-dňovej ochrannej lehoty (OL) sme použili mikrobiologickú metódu štvorplatňovú (FPT), screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov (STAR) a Premi[®]Test. Premi[®]Test detegoval reziduá SMZ vo svalovine a v srdci do 9. dňa OL, v pečeni, v pľúcach a v obličkách do 10. dňa OL. Pri porovnaní výsledku so štandardom SMZ, táto hodnota zodpovedá koncentrácii SMZ 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. STAR preukázala citlivosť k reziduám SMZ v orgánoch králikov do 8. dňa OL. Vzorky obličiek boli pozitívne do 5. dňa OL, vzorky pečene do 4. dňa OL a vzorky pľúc do 3. dňa OL. Pri porovnaní výsledkov so štandardom SMZ boli reziduá SMZ v koncentrácii $> 1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. STAR nebola dostatočne citlivá na stanovenie rezíduí SMZ vo svalovine a v srdci, dostatočnú citlivosť preukázala až po vyextrahovaní rezíduí SMZ extrakciou rozpúšťadlom. V extrakte boli reziduá SMZ detegované do 10. dňa OL, pričom svalovina bola pozitívna do 6. dňa OL (koncentrácia SMZ $> 1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Najmenej citlivá bola FPT, ktorá nezachytila reziduá SMZ ani v jednom z testovaných tkanív. Vyššia detekčná citlivosť bola aj pri tejto metóde pozorovaná až pri testovaní extraktu zo svaloviny. Reziduá SMZ v extrakte boli detegované do 8. dňa OL, pričom svalovina bola pozitívna do 3. dňa OL (koncentrácia SMZ 0,4 – 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Reziduá SMZ v tkanivách králikov boli predbežne identifikované kyselinou p-aminobenzoovou (kyselina PAB) s koncentráciou 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, ktorá potlačila antibakteriálny účinok rezíduí SMZ vo vyšetrovaných matriciach.

ÚVOD

Sulfónamidy (SA) patria medzi širokospektrálne antimikrobiálne látky, ktoré inhibujú baktérie, chlamýdie, toxoplazmu a iné protozoárne agens, hlavne kokcidie kurčiat, králikov a všetkých ekonomicky významných druhov zvierat (7). Vzhľadom na skutočnosť, že reziduá SA predstavujú riziká pre zdravie ľudí a môžu vážne poškodzovať zdravie konzumentov, boli zaradené medzi látky, pre ktoré je určený záväzný limit pre ich maximálne rezíduum (MRL). Súčasná legislatíva (6) stanovuje pre všetky látky zo skupiny SA v živočíšnych produktoch MRL 0,1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Stanovené MRL majú význam, len ak sú založené na kvalitných programoch kontroly rezíduí. STAR a FPT sú založené na princípe agarovej difúzie a vyhodnocujú sa na základe veľkosti inhibičných zón (IZ), ktoré sa porovnávajú s veľkosťou zón vytvorených štandardným roztokom SMZ. Pri FPT (1) sa pre stanovenie rezíduí SA využíva testovací kmeň *Bacillus subtilis* BGA naočkovaný do agarového média upraveného na hodnotou pH 7,2 s prídavkom trimetoprimu (TMP) v koncentrácii 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ agaru. Vzorky mäsa a orgánov sú považované za pozitívne, ak je zóna inhibície ≥ 2 mm.

STAR (3) je vylepšenou FPT, z piatich testovacích kmeňov je na detekciu rezíduí SA určený testovací kmeň *Bacillus stearothermophilus* naočkovaný do agaru upraveného na hodnotu pH 7,4 s prídavkom TMP v agare v koncentrácii 0,005 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vzorky mäsa a orgánov sú považované za pozitívne, ak je zóna inhibície ≥ 4 mm. Premi[®]Test (DSM, Holandsko) (2) s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* je test rýchly, citlivý, ľahko použiteľný a širokospektrálny, založený na inhibícii rastu testovacieho kmeňa, avšak nie tvorbou IZ, ale zmenou zafarbenia agarového média. Poskytuje spoľahlivé výsledky už po 3 hod. inkubácie s detekčným limitom (LOD) odpovedajúcim stanovenému MRL pre SA

Prítomnosť rezíduí SA v potenciálne pozitívnych vzorkách, musí byť neskôr potvrdená viac špecifickými konfirmačnými metódami. Vzhľadom na možnosť potvrdiť prítomnosť rezíduí SA už v prvom kroku screeningu bola testovaná kyselina PAB, ako látka s antagonistickým

účinkom na SA. V prítomnosti kyseliny PAB strácajú SA antibakteriálnu aktivitu, čo sa prejaví absenciou IZ pri diskových difúzných metódach alebo zmenou farby agaru z fialovej na žltú pri Premi[®]Teste (5, 9).

Cieľom práce bolo stanoviť najcitlivejšiu metódu z FPT, STAR a Premi[®]Test na detekciu rezíduí SMZ v tkanivách králikov porovnaním LOD týchto metód pre SMZ a zároveň overiť možnosť využitia kyseliny PAB ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) na predbežnú identifikáciu rezíduí SMZ v tkanivách králikov mikrobiologickými metódami. Výsledky boli porovnávané s výsledkami testovania štandardných roztokov SA, získanými autormi v predchádzajúcich štúdiách, z ktorých vychádzala aj voľba koncentrácie kyseliny PAB.

MATERIÁL A METODIKA

Príprava inaktivovaných vzoriek svaloviny a orgánov králikov liečených SMZ

V experimente bolo použitých 16 kusov 16-týždňových králikov plemena HY + (Hylapa s.r.o., Prešov, Slovenská republika) s hmotnosťou od 2,60 kg do 2,90 kg. Králikom bol 3 dni podávaný SMZ (Sulfadimidin PG plv. sol. a. u. v. Pharmagal, Nitra, Slovenská republika) v pitnej vode v dávke 20 g lieku na 10 litrov pitnej vody. Po ukončení podávania liečiva boli králiky počas stanovenej 15-dňovej OL postupne zabíjané. Prítomnosť rezíduí SMZ sme stanovovali vo svalovine, v srdci, v pľúcach, v pečeni a v obličkách. Pomocou sterilného korkovrtu s \varnothing 8 mm sme získali valčeky, ktoré sme po inaktivácii vo vodnom kúpeli pri teplote $+71^\circ\text{C}$ po dobu 20 min. narezali na disky s hrúbkou 2 mm. Negatívnou kontrolou boli inaktivované tkanivá králika, ktorému SMZ nebol podávaný.

Príprava vzoriek zo svaloviny králikov liečených SMZ extrakciou rozpúšťadlom

K 10 g zhomogenizovanej svaloviny králikov bolo pridaných 25 ml zmesi rozpúšťadla acetonitril/acetón (70:30, v/v) (Acetonitrile HPLC, Labscan, Írsko; Aceton p.a., Lach-Ners, Česká republika). Vzorky s rozpúšťadlom boli 30 min. miešané na mechanickej trepačke (LT2, Sklárný Kavalier, Votice, Česká republika) a následne preliate do centrifugačných skúmaviek. Obsah skúmaviek bol odstredovaný v centrifúge (Jouan BR 41, Francúzsko) pri 4500 ot./min. a teplote $+4^\circ\text{C}$ po dobu 10 min. Po centrifugácii bol supernatant zliaty do odparovacích skúmaviek (Turbo-Vap tubes, Zymarck, Nemecko) a odparovaný na odparke (Turbo-Vap LV Evaporator, Zymarck, Nemecko) pod prúdom dusíka pri teplote $+50^\circ\text{C}$ približne 3 hod. Odparok bol resuspendovaný pridaním 1 ml živného bujónu č. 1 /pH 6,8/ (Imuna, Slovenská republika). Negatívnou kontrolou bol extrakt zo svaloviny králika, ktorému SMZ nebol podávaný.

Príprava štandardných roztokov a použité metódy

Kontrolné roztoky SMZ s koncentráciou $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pre FPT a $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pre STAR, a roztoky TMP s koncentráciou $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pre FPT a $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pre STAR a testovacie agarové platne boli pripravené pri FPT podľa úradnej metódy laboratórnej diagnostiky potravín a krmív CH 12. 16 (Vestník MP SR, ročník XXXVI, čiastka 1, 2004), a pri STAR a Premi[®]Test podľa doplnku č. 1/2006 k úradným metódam laboratórnej diagnostiky potravín a krmív CH 12. 19 a CH 12. 18 (Vestník MP SR, XXXVIII, čiastka 13, 2006). Zásobný konfirmačný roztok kyseliny PAB ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) bol pripravený rozpustením 10 mg štandardu kyseliny PAB (p-aminobenzoic acid, Sigma A 9878) v 10 ml destilovanej vody.

Konfirmácia rezíduí SMZ kyselinou PAB

FPT, STAR – platne boli pripravené podľa vyššie uvedených metód. Na predbežnú identifikáciu rezíduí SMZ bol do 100 ml agaru pridaný 1 ml zásobného roztoku kyseliny PAB na finálnu koncentrácia kyseliny PAB v agare $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Premi[®]Test – do ampuliek bolo aplikovaných 100 μl zásobného roztoku kyseliny PAB. Po 20 minútovej difúzii roztoku kyseliny PAB do média pri izbovej teplote bolo do ampuliek pridaných 100 μl tekutiny z inaktivovaných tkanív králikov. Po 20 minútovej preinkubácii pri izbovej teplote boli vzorky vypláchnuté sterilnou destilovanou vodou a inkubované podľa stanovených podmienok.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

FPT, STAR – priemerné veľkosti IZ produkované rezíduami SMZ prítomnými v inaktivovaných vzorkách tkanív králikov a v extrakte zo svaloviny králikov počas 15-dňovej OL a ich smerodajné odchýlky (SD) (A) a súčasná identifikácia rezíduí SMZ kyselinou PAB (B) sú zaznamenané v tabuľke 1 a 2. FPT – nebola dostatočne citlivá pre stanovenie rezíduí SMZ v tkanivách králikov, čo sa prejavilo absenciou IZ okolo vzoriek svaloviny a orgánov (Tab. 1 /A/). Po extrakcii rozpúšťadlom zachytávala metóda rezíduá SMZ v extrakte zo svaloviny do 8. dňa OL, pričom za pozitívne môžeme považovať vzorky svaloviny do 3. dňa OL, kde priemerná veľkosť IZ bola 2,83 mm. Pri porovnaní so štandardom SMZ táto hodnota približne zodpovedá koncentrácii SMZ 0,4 – 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Koncentrácia kyseliny PAB 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kompletne inhibovala (absencia IZ) antibakteriálny účinok rezíduí SMZ prítomných v extrakte zo svaloviny králikov od 1. do 8. dňa OL (Tab. 1 /B/), čím testované rezíduum identifikovala. STAR – nezachytila rezíduá SMZ v inaktivovanej kostrovej a srdcovej svalovine. V pľúcach, v pečeni a v obličkách detegovala prítomnosť SMZ do 8. dňa OL, pričom za pozitívne môžeme považovať vzorky pečene do 4. dňa OL, kde priemerná veľkosť IZ bola 4,21 mm, vzorky pľúc do 3. dňa OL, kde priemerná veľkosť IZ bola 4,01 mm a vzorky obličiek do 5. dňa OL, kde priemerná veľkosť IZ bola 4,35 mm (Tab. 2 /A/). Pri porovnaní so štandardom SMZ, uvedené hodnoty približne zodpovedajú reziduálnej koncentrácii SMZ $>1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. V extrakte zo svaloviny králikov STAR detegovala prítomnosť rezíduí SMZ do 10. dňa OL, pričom môžeme svalovinu považovať za pozitívnu do 6. dňa OL, kde priemerná veľkosť IZ bola 4,32 mm. Pri porovnaní so štandardom táto hodnota približne zodpovedá koncentrácii SMZ $>1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Koncentrácia kyseliny PAB 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kompletne inhibovala antibakteriálny účinok rezíduí SMZ prítomných v inaktivovaných tkanivách králikov a v extrakte zo svaloviny králikov (Tab. 2 /B/). Premi[®]Test – tabuľka 3 prezentuje detekciu rezíduí SMZ v šťave získanej z inaktivovaných tkanív králikov (A) a predbežnú identifikáciu, resp. konfirmáciu SMZ prídavkom kyseliny PAB (B). Negatívny výsledok v riadku A prejavujúci sa odfarbením agarového média predstavuje neprítomnosť liečiva, resp. jeho prítomnosť pod úrovňou LOD metódy. Pozitívny výsledok v riadku A prejavujúci sa zachovaním fialovej farby agaru predstavuje prítomnosť liečiva na, resp. nad úrovňou LOD metódy. Premi[®]Testom boli rezíduá SMZ v kostrovej a v srdcovej svalovine detegované do 9. dňa OL, v pečeni, v pľúcach a v obličkách do 10. dňa OL. Podľa štandardu SMZ môžeme predpokladať, že koncentrácia SMZ v testovaných tkanivách do 9. a 10. dňa OL klesla na hodnotu 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Kyselina PAB (10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) predbežne identifikovala rezíduá SMZ vo vzorkách (Tab. 3. /B/) potlačením ich antibakteriálneho účinku, čo sa prejavilo odfarbením agarového média na žltu.

Fuselier a kol. (4) testovali vylepšenú STAR na stanovenie rezíduí antibiotík a SA. Podali intramuskulárne sulfadimetoxín v dávke 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ hmotnosti ošípaným plemena Landrace. Z piatich testovacích platní preukázala najvyššiu citlivosť k rezíduám sulfadimetoxínu platňa s testovacím kmeňom *B. stearothermophilus* ATCC 10149 s prídavkom TMP v testovacom agare s koncentráciou 0,005 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kde veľkosť inhibičnej zóny okolo vzorky svaloviny bola 8,34 mm. Autori odporučili metódu STAR ako vhodnú metódu na stanovenie rezíduí antibiotík a sulfónamidov v produktoch živočíšneho pôvodu.

Reybroeck (8) podával SMZ v dávke 0,3 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ brojlerovým kurčatám v pitnej vode počas jedného dňa. Po ukončení podávania liečiva boli kurčatá zabíjané po 1 hod., po 3 hod., po 6 hod. a po 24 hod., čím boli dosiahnuté rozdielne koncentrácie prítomných rezíduí SMZ. V mäsovej šťave zo svaloviny brojlerov stanovil Premi[®]Testom LOD pre SMZ 0,012 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, čo je hlboko pod úrovňou MRL.

Stead a kol. (9) zhodnotili využitie extrakcie rozpúšťadlom pri stanovení rezíduí SMZ vo fortifikovanej svalovine hydiny a rýb, v bravčových obličkách, vo vajciach, v mede a v mlieku Premi[®]Testom. V uvedených maticiach dosiahli LOD pre SMZ v rozpätí 0,025 –

0,075 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Na post-screeningovú identifikáciu rezíduí SMZ autori použili 50 μl kyseliny PAB (5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) pridanú do extraktu, ktorá potlačila antimikrobiálny účinok SMZ.

Tab. 1. FPT (TMP 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) – Detekcia rezíduí SMZ (A - priemerné veľkosti IZ /mm/) a ich identifikácia (B - absencia IZ) po prídavku kyseliny PAB do agaru

Deň OL		IZ \pm SD (mm)					
		sval	extrakt zo svaloviny	srdce	pečeň	pľúca	obličky
neg		0	0	0	0	0	0
1.	A	0	8,04 \pm 1,07	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
2.	A	0	4,79 \pm 0,35	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
3.	A	0	2,83 \pm 0,13	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
4.	A	0	1,73 \pm 0,26	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
5.	A	0	1,72 \pm 0,15	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
6.	A	0	1,64 \pm 0,12	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
7.	A	0	1,46 \pm 0,23	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
8.	A	0	0,75 \pm 0,60	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
9. - 15	A	0	0	0	0	0	0

Legenda: ■ pozitívne výsledky

Tab. 2. STAR (TMP 0,005 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) – Detekcia rezíduí SMZ (A - priemerné veľkosti IZ /mm/) a ich identifikácia (B - absencia IZ) po prídavku kyseliny PAB do agaru

Deň OL		IZ \pm SD (mm)					
		sval	extrakt zo svaloviny	srdce	pečeň	pľúca	obličky
neg		0	0	0	0	0	0
1.	A	0	9,91 \pm 0,55	0	8,12 \pm 1,78	5,85 \pm 0,67	8,75 \pm 0,39
	B	0	0	0	0	0	0
2.	A	0	8,16 \pm 1,04	0	5,39 \pm 0,67	4,17 \pm 0,63	6,53 \pm 0,20
	B	0	0	0	0	0	0
3.	A	0	7,93 \pm 1,01	0	4,46 \pm 0,53	4,01 \pm 0,48	5,59 \pm 1,30
	B	0	0	0	0	0	0
4.	A	0	6,65 \pm 1,39	0	4,21 \pm 0,08	2,42 \pm 0,49	4,45 \pm 0,71
	B	0	0	0	0	0	0
5.	A	0	5,01 \pm 0,57	0	2,54 \pm 0,66	1,28 \pm 0,25	4,35 \pm 0,25
	B	0	0	0	0	0	0
6.	A	0	4,32 \pm 0,19	0	2,01 \pm 0,51	1,08 \pm 0,23	3,05 \pm 2,05
	B	0	0	0	0	0	0
7.	A	0	2,36 \pm 0,38	0	1,66 \pm 0,13	0,71 \pm 0,84	2,53 \pm 0,19
	B	0	0	0	0	0	0
8.	A	0	2,31 \pm 0,28	0	1,57 \pm 1,08	0,63 \pm 0,76	1,95 \pm 0,27
	B	0	0	0	0	0	0
9.	A	0	2,26 \pm 0,90	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
10.	A	0	1,29 \pm 0,51	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
11. - 15	A	0	0	0	0	0	0

Legenda: ■ ■ ■ ■ pozitívne výsledky

Tab. 3. Premi[®]Test – Stanovenie rezíduí SMZ v šŕave získanej z inaktivovaných tkanív králikov počas 15-dňovej OL

Deň OL		svaľ	srdce	pečeň	pľúca	obličky
neg		–	–	–	–	–
1.	A	+	+	+	+	+
	B	–	–	–	–	–
2.	A	+	+	+	+	+
	B	–	–	–	–	–
3.	A	+	+	+	+	+
	B	–	–	–	–	–
4.	A	+	+	+	+	+
	B	–	–	–	–	–
5.	A	+	+	+	+	+
	B	–	–	–	–	–
6.	A	+	+	+	+	+
	B	–	–	–	–	–
7.	A	+	+	+	+	+
	B	–	–	–	–	–
8.	A	+	+	+	+	+
	B	–	–	–	–	–
9.	A	+	+	+	+	+
	B	–	–	–	–	–
10.	A	–	–	+	+	+
	B	–	–	–	–	–
11. - 15		–	–	–	–	–

Legenda: – negatívny výsledok, + pozitívny výsledok

++ pozitívne výsledky posledný deň stanovenia prítomnosti SD

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantom VEGA MŠ SR č. 1/3491/06.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- CH 12.16: Mikrobiologická metóda štvorplatňová (Bogaerst a Wolf, 1980). Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív. Vestník MP SR, ročník XXXVI, čiastka 1, 2004, 277-284. (1)
- CH 12.18: Stanovenie rezíduí inhibičných látok v mäse metódou Premi[®]Test. Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív, Doplnok č. 1/2006. Vestník MP SR, ročník XXXVIII, čiastka 13, 20.7. 2006, 64–67. (2)
- CH 12.19: Screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov (STAR). Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív, Doplnok č. 1/2006. Vestník MP SR, ročník XXXVIII, čiastka 13, 20.7. 2006, 68-81. (3)
- Fuselier, R., Cadieu, N., Maris, P: S.T.A.R.: Screening test for antibiotic residues in muscle results of a european collaborative study. Proceedings of “The Euroresidue IV Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food“, Veldhoven, Holandsko, 8.-10.5. 2000, 1077-1080. (4)
- Gudding, R.: An improved bacteriological method for the detection of sulfonamide residues in food. Acta Vet. Scan. 1976, 17, 458-464. (5)
- Nariadenie Rady (EHS) č. 2377/90 z 26. júna 1990 určujúce postup Spoločenstva pri stanovovaní maximálnych hladín rezíduí veterinárnych medicínskych prípravkov v potravinách živočíšneho pôvodu. Úradný vestník L 224, 18. 8. 1990, 1-8. (6)
- Prescott J. F., Baggot J. D.: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 2nd Edition. Ames, Iowa State University Press, 1993, 564-565. (7)
- Reybroeck, W.: Performance of the Premi[®]Test using naturally contaminated meat. Proceedings of “The Euroresidue IV Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food“, Veldhoven, Holandsko, 8.-10.5. 2000, 157-163. (8)
- Stead S., Sharman J. A., Tarbin J. A., Gibson E., Richmond S., Stark J.: Meeting maximum residue limits: an improved screening technique for rapid detection of antimicrobial residues in animal food products. Food Addit. Contam. 2004, 21, 216-221. (9)

ISCHEMICKO-REPERFÚZNE POŠKODENIE DNA V KRVNÝCH LYMFOCYTOCH

Kravčuková P., Gottlieb M., Matiašová M., Burda J.

Neurobiologický ústav, SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo sledovať dopad ischémie/reperfúzie na rozsah poškodenia DNA v krvných lymfocytoch. Na simuláciu ischémie u zvierat sme použili model štvorcievnej oklúzie. Po 10 min. ischémii bol prietok krvi obnovený. Vzorky krvi boli odoberané 20, 40, 60, 90, 120 min a 24 hod po obnovení prekrvenia. Poškodenie DNA (jedno a dvojlákové) sme stanovili jednobunkovou gélovou elektroforézou. Sto buniek z každého merania sme rozdelili do 5 tried poškodenia. Zistili sme, že ku poškodeniu DNA dochádza už 40 min po ukončení ischémie. Poškodenie lymfocytov sa zvýšilo až o 68%, pričom väčšina buniek patrí do triedy poškodenia 3 (34,1-60% DNA in tail). Zvýšenie poškodenia je možné pripísať najmä prudkému nárastu voľných radikálov v mozgu a krvnom sére, ale aj iným skorým postischemickým vplyvom. Po 60-90 min reperfúzie rozsah poškodenia klesá a po 24 hod sú hodnoty na úrovni kontroly, čo môže súvisieť so zvýšením aktivity antioxidantných enzýmov, reparačných enzýmov a pravdepodobne aj s obnovou buniek imunitného systému.

ÚVOD

Až 83% mozgových príhod tvoria poruchy v krvnom zásobovaní mozgu, tzv. ischemické stavy. Ischémia mozgu teda znamená zníženie alebo úplne zastavenie prívodu krvi do tkaniva, spôsobuje narušenie rovnováhy mnohých hemodynamických faktorov a vedie ku kaskáde metabolických a biochemických zmien, ktoré končia smrťou bunky. Základom ischemických zmien je nedostatok kyslíka a glukózy s bezprostredným zastavením oxidatívnej fosforylácie a prudkým poklesom ATP. Nedostatok kyslíka bunka kompenzuje anaeróbnym metabolizmom, čím zvyšuje koncentráciu kyseliny mliečnej a acidózu tkaniva (Siesjö, 1984). Po obnove prietoku krvi sa postupne obnovuje aj energetický metabolizmus a iónová homeostáza, čo môže paradoxne ešte viac zhoršiť situáciu. Do tkaniva, ktoré obsahuje produkty anaeróbného metabolizmu, sa v prvých fázach reperfúzie dostáva neúmerne vysoké množstvo krvi a kyslíka, ktorý ischémiou poškodené bunky nie sú schopné metabolizovať (Hossmann a kol., 1976). Tento stav vytvára v postihnutom tkanive s vysokým obsahom kyseliny mliečnej a iónov železa podmienky na prudký nárast vzniku voľných kyslíkových radikálov (Ying a kol., 1999), ktoré antioxidantné enzýmy nie sú schopné eliminovať. Dôsledkom toho je narušenie prakticky všetkých bunkových komponentov (Small a kol., 1999). V dôsledku ischémie sa, okrem iného, znižuje kapacita vychytávania extracelulárneho glutamátu, toxického voči nervovým bunkám (Iadecola, 1999). Výsledkom ischémie/reperfúzie je nie len poškodenie buniek nervového tkaniva, ale aj hematoencefalickej bariéry (BBB) (Tasdemioglu a kol., 1994), ktorej narušenie má v patofyziológii ischemicko reperfúzneho poškodenia veľmi dôležité postavenie (Dobbin a kol., 1989).

Cieľom našej práce je študovať ako ischémia/ reperfúzia a s tým súvisiace poškodenie hematoencefalickej bariéry ovplyvní rozsah poškodenia buniek imunitného systému. Na tento účel sme použili neutrálnu a alkalickú verziu jednobunkovej gélovej elektroforézy (Comet assay), ktorou sme sledovali dopad na rozsah jedno a dvojlákových zlomov DNA krvných lymfocytov.

MATERIÁL A METODIKA

Zvieratá

Experimenty boli vykonané v súlade s platnou legislatívou na ochranu zvierat a s povolením Etickej komisie pre prácu s experimentálnymi zvieratami NbÚ SAV. V experimente boli

použité samce kmeňa WISTAR (n=12) o hmotnosti 220-300 g s voľným prístupom ku potrave a vode. Zvieratám bola štvorcievnu oklúziou mozgu (Pulsinelli a Brierley, 1979) navodená 10 min ischémia, s následnou 20, 40, 60, 90, 120 min a 24 hod reperfúziou.

Odber krvi a izolácia lymfocytov

Krv sme odoberali z *v. jugularis interna* zavedením silikónovej kanuly. Kontrolný odber bol vykonaný pred navodením ischémie (sham kontrola), ostatné odbery sme robili v časoch 20, 40, 60, 90, 120 min a 24 hod po obnovení prietoku krvi. Lymfocyty z celkovej krvi (120 μ l) boli izolované na gradiente Ficollu (2500 rpm, 4 °C, 5 min) a premyté v PBS (pH 7,4).

Comet assay

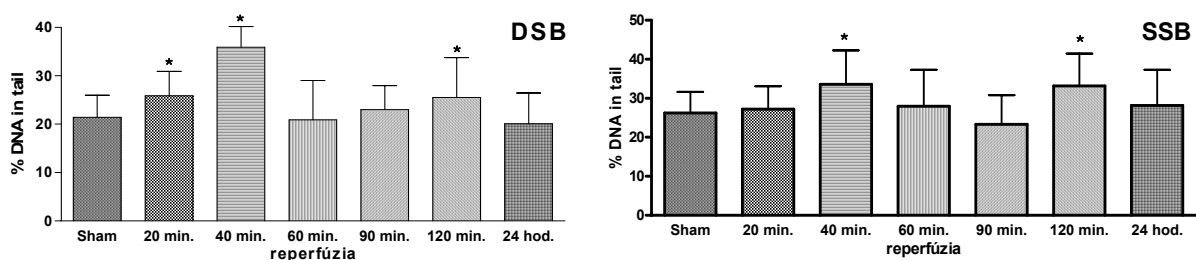
Ischémiou indukované jedno a dvojláknové zlomy molekuly DNA v krvných lymfocytoch sme sledovali alkalickou a neutrálnou verziou metódy *Comet Assay* (Singh a kol., 1988, Klaude a kol., 1996). 50 μ l suspenzie lymfocytov a 1% agarózy s nízkym bodom topenia sme naniesli na podložné sklíčko potiahnuté tenkou vrstvou 1% agarózy a prekryli krycím sklíčkom. Po stuhnutí gélov boli krycie sklíčka odstránené a vzorky inkubované v lyzujúcom roztoku (pH 10, 1 hod, 4 °C). Vzorky určené na sledovanie jednovláknových zlomov (SSB) boli inkubované 45 min v elektroforetickom roztoku (5M NaOH, 0.2M Na₂EDTA, pH 12,1, 4 °C). Elektroforéza prebiehala v rovnakom roztoku pri 25 V (300 mA) 25 min. Po ukončení elektroforézy sme gél neutralizovali v 0,4 M roztoku TRIS (15 min). Vzorky určené na sledovanie dvojláknových zlomov (DSB) boli inkubované 30 min pri 4 °C a elektroforézu sme robili pri 25 V, 30 mA počas 25 min v TAE pufráčnom roztoku (40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, pH 9). Po vysušení gélov sme vzorky farbili fluorescenčne pomocou SYBR^R Green (SIGMA) a hodnotené pod fluorescenčným mikroskopom Olympus BX51. Poškodenie DNA sme určovali v 100 náhodne vybraných lymfocytoch a vyhodnocovali počítačovým programom CometScoreTM 1,5 (TriTrek Corp., USA). Dáta sme vyjadrili ako % DNA in tail.

Štatistická analýza

Dáta boli štatisticky vyhodnotené testami One Way ANOVA (Dunnett's Multiple Comparison Test), resp. Two Way ANOVA (Bonferroni posttests). Hodnoty $p < 0,05$ sú považované za štatisticky významné.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

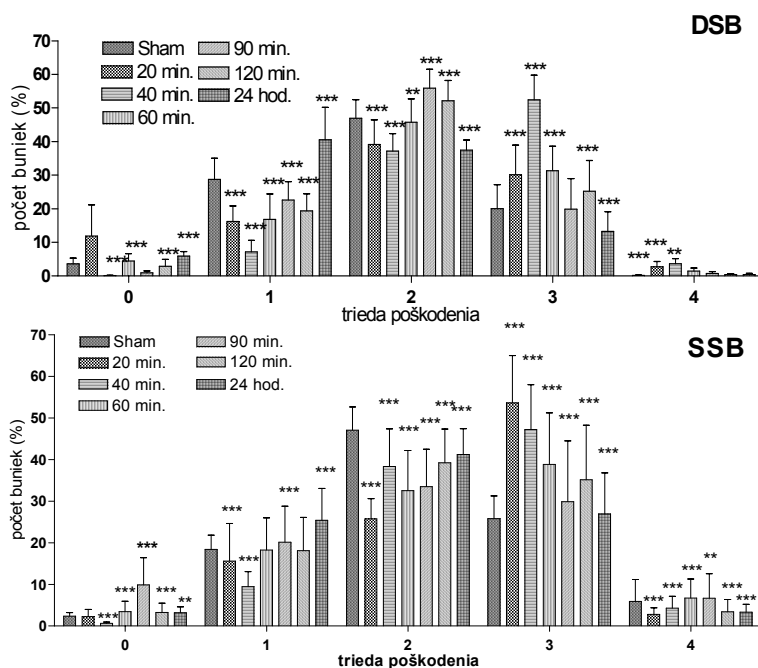
Priebeh postischemického poškodenia lymfocytárnej DNA sme sledovali v časových intervaloch 20, 40, 60, 90, 120 min a 24 hodín po obnovení krvného prietoku (obr. 1). Lymfocyty sme podľa stupňa poškodenia v danom časovom intervale zaradili do 5 tried (obr. 2).



Obr. 1: Priebeh poškodenia DNA (vyjadrené ako % DNA in tail) po 10 min ischémii a 20, 40, 60, 90, 120 min a 24 hod reperfúzií. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD. $p < 0.01$ (*) v porovnaní so sham kontrolou.

Analýza jednovláknových (SSB) a dvojláknových zlomov (DSB), zobrazená na obr. 1 nevykazuje výrazné rozdiely v 20 min, avšak poškodenie DNA u oboch typov zlomov je signifikantne zvýšené v intervale 40 minútovej recirkulácie, 28% (SSB), 67% (DSB).

Obr. 2 demonštruje, že najviac buniek tejto skupiny je zaradených do triedy 3, 82,97% (SSB), resp. 161,3% (DSB), (u sham trieda 2). Ďalší nárast poškodených lymfocytov sme zaznamenali pri 120. min reperfúzie (graf 1). Toto zvýšenie pravdepodobne súvisí s metabolickými a biochemickými zmenami poškodeného tkaniva a zvýšením selektívnej priepustnosti BBB. Campanella a kol. (2002) popisujú nárast počtu lymfocytov v mozgu po ischémii, čo naznačuje, že poškodenie DNA môže byť spôsobené priamo toxickými vplyvmi v postihnutom tkanive. Poškodenie BBB pravdepodobne súvisí so zvýšením koncentrácie glutamátu v krvi, ktorý v mozgu pôsobí toxicky na nervové bunky (Iadecola, 1999) a je možné predpokladať, že rovnaký efekt by mohol mať aj na cirkulujúce lymfocyty. Ďalšou príčinou zvýšenia poškodenia DNA môžu byť voľné radikály. Negatívny vplyv zvýšenej koncentrácie voľných radikálov na DNA je dobre preštudovaný. Sú považované za hlavnú príčinu smrti neurónov po ischémii a vo zvýšenej koncentrácii boli namerané nie len v tkanive, ale aj v krvnom sére (Wei a kol., 2005).



Obr. 2: Zaradenie lymfocytov do tried poškodenia po 20, 40, 60, 90, 120 min a 24 hod reperfúzie. Triedy poškodenia: 0 (0-6 % DNA in tail), 1 (6,1-17%), 2 (17,1-34%), 3 (34,1-60 %), 4 (60,1-100%). Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm S.E.M.. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) v porovnaní so sham kontrolou.

Šesťdesiat minút po obnovení prietoku krvi tkanivom hodnoty poškodenia klesajú na úroveň kontroly (obr. 1). Výrazné zníženie poškodenia DNA v čase od 60 min a zároveň aj

pribúdanie buniek do tried 0 a 1 (obr. 2) naznačuje opravu DNA, alebo náhradu poškodených buniek. Machalinski a kol. (2006) u pacientov po ischemickej príhode popisali zvýšený počet lymfocytov a CD34 pozitívnych progenitorových buniek (progenitory lymfocytovej rady) a pripisuje im významnú úlohu pri regenerácii ischemiou poškodeného tkaniva. Opätovný nárast poškodenia DNA pri 120 minúte je možné vysvetliť sekundárnym poškodením novovytvorených lymfocytov vyššie popísanými procesmi. Jednodňová recirkulácia už udržiava úroveň poškodenia lymfocytov na kontrolných hodnotách. Tento jav pravdepodobne súvisí s aktiváciou antioxidantných mechanizmov, ktoré znižujú koncentráciu voľných radikálov. Najvyššia aktivita enzýmov v tkanive bola nameraná až po 5 hod reperfúzie. Bolo dokázané, že priamo v mozgovom tkanive sa *de novo* syntetizujú enzýmy SOD a CAT už v priebehu 1. hod po ischémii (Danielisová a kol., 2005). Doposiaľ neexistuje veľa prác sledujúcich aktivitu antioxidantných enzýmov v krvi po ischemickom poškodení nervového tkaniva. Aktivita enzýmov SOD a glutatión reductázy v červených krvinkách je aj po 2 hod reperfúzie znížená (El-Abhar a kol., 2002). Wei a kol. (2005) popisujú, výrazne nižšiu antioxidantnú schopnosť séra po jednodňovej reperfúzie.

Na záver môžeme konštatovať, že k najvýraznejšiemu poškodeniu DNA v krvných lymfocytoch dochádza v 40 min postischemickej recirkulácie a je pravdepodobne spôsobené

voľnými radikálmi a excitotoxickými aminokyselinami vyplavenými z poškodeného mozgového tkaniva.

POĎAKOVANIE

Práca bola realizovaná za podpory grantov VEGA 2/6211/26, VEGA 2/6210/26 a APVT 51-021904.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Campanella M, Sciorati C, Tarozzo G, Beltramo M. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke*. 2002; 33: 586–592.
- Danielisová V. Némethová M. Gottlieb M. Burda J. Changes of endogenous antioxidant enzymes during ischemic tolerance acquisition. *Neurochem Res*. 2005; 30: 559-565.
- Dobbin, J., Crockard, H.A., Ross-Russell, R. Transient blood–brain barrier permeability following profound temporary global ischemia: an experimental study using ¹⁴C-AIB. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1989; 9: 71–78.
- El-Abhar H.S. Shaalan M. Barakat M. El-Denshary E.S. Effect of melatonin and nifedipine on some antioxidant enzymes and different energy fuels in the blood and brain of global ischemic rats. *J Pineal Res*. 2002; 33:87–94
- Hossmann K.A. , Sakaki S., Kimoto K. Cerebral uptake of glucose and oxygen in the cat brain after prolonged ischemia. *Stroke*. 1976; 7: 301-305.
- Hossmann K.A. Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathol*. 1994; 4: 23-36.
- Iadecola C. Mechanisms of cerebral ischemic damage. In: *Cerebral Ischemia: Molecular and cellular Pathophysiology*. Walz W. (ed.) Humana Press, Totowa, NJ. 1999: 233-249.
- Klaude M., Ericsson S., Nygren J., Ahnstrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res*. 1996; 363: 89-96.
- Machalinski B. Paczkowska E. Koziarska D. Ratajczak M.Z. Mobilization of human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34+ cells into peripheral blood during stress related to ischemic stroke. *F Histochem*. 2002; 42: 97-101.
- Pulsinelli W.A., Brierley J.B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*. 1979; 10: 267-272.
- Siesjö B.K. Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg*. 1984; 60: 883-908.
- Singh N.P., McCoy T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; 175: 184-192.
- Small D.L. Morley P. Buchan A.M. Biology of ischemic cerebral cell death. *Prog Cardiovasc Dis*. 1999; 42: 185-207.
- Tasdemioglu E, Christenberry PD, Ardell JL, Chronister RB, Taylor AE Effects of antioxidants on the blood-brain barrier and postischemic hyperemia. *Acta Neurochir (Wien)*. 1994; 131: 302-309.
- Wei X. Liu H. Sun X. Fu F. Zhang X. Wang J. An J. Ding H. Hydroxysafflor yellow A protects rat brains against ischemia-reperfusion injury by antioxidant action. *Neurosci Lett*. 2005; 386:58-62.
- Yamamoto M, Shima T, Uozumi T et al. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of a-tocopherol administration. *Stroke*. 1983; 14:977–982.
- Ying W. Han S.K. Miller J.W. Swanson R.A. Acidosis potentiates oxidative neuronal death by multiple mechanisms. *J Neurochem*. 1999; 73: 1549-56.

VÝSKYT REZIDUÍ WARFARÍNU PRI APLIKÁCIÍ NA RASTLINNÉ KULTÚRY

Kudríková D.¹, Hromada R.¹, Ondrašovičová S.², Ondrašovič M.¹, Sasáková N.¹

¹Ústav hygieny zvierat, Katedra životného prostredia, UVL, Košice

²Štátny veterinárny a potravinový ústav, Košice

ABSTRAKT

Práca je zameraná na sledovanie výskytu rezíduí rodenticídneho prípravku KUMATOX Z s účinnou látkou warfarín, ktorý sa aplikuje na kultúry obilnín pri premnožení Hraboša poľného. Výsledky poukázali na skutočnosť, že po aplikácii sa v obilninách a pôde nachádzali rezíduá warfarínu. Ich nález v pôde bol zaznamenaný aj po 3 rokoch.

ÚVOD

V poľných kultúrach hlavne s obilovinami môže dochádzať k premnoženiu škodlivých hlodavcov. Najčastejšie sa jedná o Hraboša poľného (*Microtus arvalis*), Chrčka roľného (*Cricetus cricetus*). Za účelom obmedzenia škôd, ktoré tieto hlodavce spôsobujú na porastoch sa pristupuje k ich ničeniu za použitia rodenticídnych prípravkov. Okrem akútnych rodenticídov, ku ktorým patria rodenticídne nástrahy s obsahom fosfidu zinku, resp. scillirozidu sa na ničenie používajú aj chronické rodenticídy, ktoré spôsobujú poruchy zrážania krvi, t.j. antikoagulanciu. Po požití týchto rodenticídnych nástrah dochádza k úhynom až za niekoľko dní. Odborná literatúra zaoberajúca sa priebehom otráv u cicavcov, resp. ich liečbou v prípade zasiahnutia necielených druhov je rozsiahla, avšak problematika ekologických dopadov súvisiaca s rezíduami používaných rodenticídov je skromná. Cieľom predkladanej práce je kvantitatívne vyšetrenie pôdy a obilnín na rezíduá warfarínu, ktorý bol aplikovaný v komerčnom prípravku KUMATOX Z na konci vegetačného obdobia, ako aj na rezíduá v tejto pôde po uplynutí troch rokov.

MATERIÁL A METODIKA

Prípravok KUMATOX Z patrí do skupiny antikoagulačných rodenticídov 1. generácie (William a Douglas, 2002, 2004). Jedná sa o morené pšeničné zrná modrého sfarbenia, ktoré obsahujú 0,025 % warfarínu.

Prípravok bol aplikovaný na pôdu začiatkom marca pri výseve obilnín (jačmeň a pšenica) v množstve 100g/m² a 500g/m², čo v prepočte na obsah účinnej látky v nástrahе predstavovalo jednotlivo 2,5g/m² a 12,5g/m² warfarínu v pôde. Prípravok bol aplikovaný do debničiek s pôdou o rozmeroch 1x1x 0,5 m za rovnakých podmienok boli pestované aj kontrolné vzorky. Počas vegetačného obdobia už neboli vykonané žiadne iné agrotechnické zásahy. Na začiatku augusta v období zberu boli odobraté vzorky obilnín celých klasov a pôdy. Zároveň boli odobraté vzorky z neošetrenej pôdy, ktoré slúžili ako kontrola. Odber vzoriek na stanovenie obsahu warfarínu z testov pôdy bol vykonaný aj s odstupom 3 rokov.

Stanovenie rezíduí warfarínu

Vyšetrované vzorky v množstve 10 g po homogenizácii boli vylúhované po dobu 15 minút v 25 ml zmesi chloroformu a acetónu v rovnakom diele. Rozpúšťadlo sa dekantovalo cez filtračný papier. Extrakcia bola vykonaná dvakrát.

Spojené extrakty boli odparené na rotačnom vákuovom odparovači pri teplote 40°C. Zbytok po odparení sa rozpustil v 1 ml methanolu a pridal sa 1 ml mobilnej fázy za účelom odstránenia koextrahovaných bielkovín.

Získaný roztok bol prenesený do centrifúgačnej skúmavky s obsahom n-hexanu. Roztok sa následne centrifuguje po dobu 10 minút pri 3500 ot.min.⁻¹. Získaný vyčistený spodný roztok po prefiltrovaní sa využije na HPLC chromatografickú analýzu.

Vlastná chromatografická analýza sa vykonáva na kolóne LiChrospher^R 100 RP-18 (5 μ m) pri použití mobilnej fázy acetonitril (A) a acetátového pufru, pH 4,6, (B) (50+50) pre warfarín pri prietoku 1 ml.min⁻¹, s nástrekom 10 μ l. UV detekcia sa vykonáva pri 265 a 310 nm.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vzorky pôdy a nadzemných častí jačmeňa a pšenice boli odobraté v čase žatvy v zbernej zrelosti, t.j. na začiatku augusta. Celkový porast obilovín pri jednotlivých aplikáciách slúžil ako jedna vzorka. Vzorka jačmeňa č. 1 bola odobratá z porastu, na ktorom obsah aplikovaného rodenticídu bol 100 g.m⁻² a vo vzorke č. 2 bola 500 g.m⁻². Podobne aj zo pšenice boli odobraté 2 vzorky s obsahom 100 g.m⁻² a 500 g.m⁻² rodenticídu (tab. 1).

Tab. 1 Rezíduá warfarínu v sledovaných porastoch

Číslo vzorky	Aplikovaný KUMATOX Z (g.m ⁻²)	Plodina	Množstvo (ppm)
1	100	Jačmeň	0,016
2	500	Jačmeň	0,036
3	100	Pšenica	0,037
4	500	Pšenica	0,065

Pri každej expozícii boli zaradené kontrolné výsevy bez aplikácie rodenticídov, z ktorých boli odobraté vzorky pre porovnanie nálezu.

Z pôdy boli celkovo na konci vegetačného obdobia odobraté 2 vzorky, kde vzorka č. 1 bola spracovaná ako zmesná vzorka z pôdy, ktorá obsahovala 100 g.m⁻² KUMATOXU Z a podobne vzorka č. 2, ktorá bola exponovaná dávkou 500 g.m⁻² (tab. 2).

Tab.2 Rezíduá warfarínu v pôde

Číslo vzorky	Aplikovaný KUMATOX Z (g.m ⁻²)	Materiál	Množstvo (ppm)
1	100	pôda	0,020
2	500	pôda	0,074
3	po 3 rokoch 500	pôda	0,072

Vzorka pôdy ošetrenej rodenticídom v dávke 500 g.m⁻² bola odobratá aj po uplynutí 3 rokov a označená je č. 3 rovnako ako aj kontrolná vzorka pôdy.

V súlade s aplikovaným množstvom rodenticídu boli nižšie hodnoty rezíduí warfarínu zistené u vzorky č. 1, t.j. jačmeňa a to 0,016 ppm a vo vzorke č. 3 pšenice 0,037 ppm. Odobraté vzorky pôdy ošetrenej rodenticídom v dávke 100 g.m⁻² boli vyšetrené ako zmesná vzorka č. 1, kde rezíduá rodenticídu dosahovali hodnotu 0,020 ppm.

Pri dávke 500 g.m⁻² pôdy boli vo vzorke jačmeňa č. 2 zistené rezíduá rodenticídu 0,036 ppm a vo vzorke pšenice č. 4 v množstve 0,065 ppm. Odobraté vzorky pôdy ošetrenej rodenticídom v dávke 500 g.m⁻² boli vyšetované ako zmesná vzorka č. 2, kde hodnota reziduálneho zbytku rodenticídu bola 0,074 ppm.

U vzoriek pôdy ošetrenej dávkou 500 g.m⁻² rodenticídu, ktoré boli odobraté po 3 rokoch, boli taktiež zistené rezíduá rodenticídu, ktoré dosahovali hodnotu 0,072 ppm.

Hospodárske škody, ktoré spôsobujú škodlivé hlodavce na poľných kultúrach, dosahujú miliónové hodnoty. Stenseth a kol. (2003) napríklad uvádza, že v Číne škodlivými hlodavcami skonzumované krmivo počas 1 roka predstavuje množstvo, ktoré by postačilo pre obživu 200 miliónov ľudí a napríklad v Indonézii spôsobuje priemerne 15 %-nú stratu na produkcii ryže.

Premnoženie hraboša poľného v našich podmienkach sa periodicky opakuje každých 3–5 rokov, ale dávané je do súvisu hlavne s teplotou a snehovou pokrývkou počas zím. Za premnoženie hrabošov je považované, ak ich množstvo na 1 ha dosahuje 3 000 kusov.

Podľa zoznamu registrovaných prípravkov na ochranu rastlín a iných prípravkov – 2006 vydaného MP SR je možné na voľných priestoroch použiť rodenticídne prípravky BROMADIC H na báze brodifacoumu, COMMANDO, RODENTIC BLESK, STUTOX na báze fosfidu zinočnatého a REDENTIN 75 na báze chlorofacinonu (OHS DATABASE, 1994). V predchádzajúcom období sa na ničenie škodlivých hlodavcov využíval aj warfarín, čo bolo dôvodom jeho hodnotenia.

Z akútnych rodenticídov sa prednostne používajú na ničenie hraboša poľného nástrahy s obsahom fosfidu zinku, ako napr. komerčný prípravok STUTOX. Jedná sa o nástrahu s obsahom 4 % fosfidu zinku, ktorá je farebne upravená tak, aby nebola atraktívna pre vtáctvo je žltozeleného sfarbenia. Ako uvádza Staples a kol. (2003), nástrahy s obsahom fosfidu zinku sú všeobecne dobre požierané hlodavcami, sú relatívne bezpečné z hľadiska vzniku sekundárnych otráv pre prirodzených predátorov a nevytvárajú významné rezíduá v obilninách, pôde, vode a atmosfére.

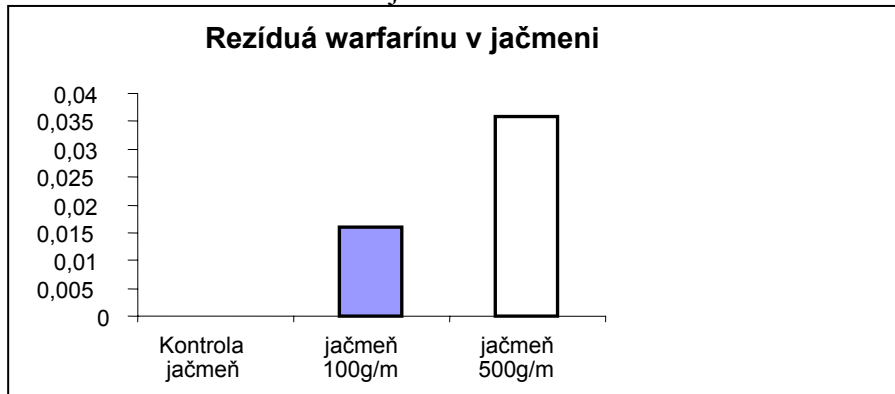
Na ničenie hrabošov sa využívajú aj antikoagulačné rodenticídy. V súčasnosti používané antikoagulačné rodenticídy sa delia do 3 generácií na základe obsahu účinnej látky v nástrahе, ale aj množstva nástrahy potrebného na dosiahnutie letálneho účinku (William a Douglas, 2002, 2004).

Všeobecne rodenticídna účinnosť antikoagulačných prostriedkov je dobrá (Saxna a kol., 1992). Avšak aktuálne sú otázky rezíduí, ktoré ako ukazujú doterajšie výsledky, zanechávajú v životnom prostredí. Na túto problematiku r. 1990 poukazujú aj Smith a Cox, ale aj Eason a Spurr (1995) a ďalší autori.

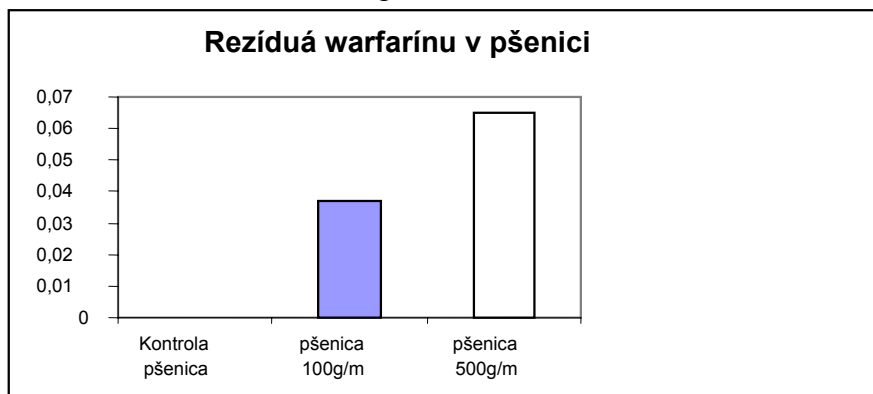
V našej práci sme sa zamerali na zisťovanie rezíduí warfarínu, ktorý je zaradený do 1. generácie a obsah v nástrahе sa uvádza 0,05 %. Testovaný prípravok KUMATOX Z obsahoval 0,025 % warfarínu. Warfarín je syntetický derivát kumarínu, ktorý bol v rokoch 1947-1948 ako rodenticíd zaregistrovaný v USA roku 1952 (Thomson, 1991). Neskôr sa začal využívať aj v humánnej medicíne pri profylaxii tromboembolických ochorení. Kumarín sa prirodzene nachádza v mnohých rastlinách, hlavne v Lipkavci marinkovitom (*Galium odoratum*) a v malých množstvách v rastline Levanduľa lekárska (*Lavandula officinalis*), Komonici bielej a lekárskej (*Melilotus albus* a *officinalis*) a pod..

Výsledky vyšetrení obilnín a pôdy jednoznačne poukazujú na tvorbu rezíduí. Nález rezíduí z porastu jačmeňa bol nižší ako z porastu pšenice, avšak korelovalo jeho množstvo s aplikovanou dávkou KUMATOXU Z na pôdu (graf 1 a 2). Uvedená závislosť na aplikovanom množstve rodenticídu je evidentná aj u vzoriek vyšetrovanej pôdy. Za závažný možno považovať výsledok, keď vyšetrená vzorka odobratej pôdy, ktorá bola ošetrená KUMATOXOM Z, vykazovala nález rezíduí aj s odstupom 3 rokov. Rozdiel s trojročným odstupom v náleze rezíduí bol minimálny, keď obsah po skončení vegetačného obdobia bol 0,074 ppm a po troch rokoch 0,072 ppm (tab. 2 a graf 3)

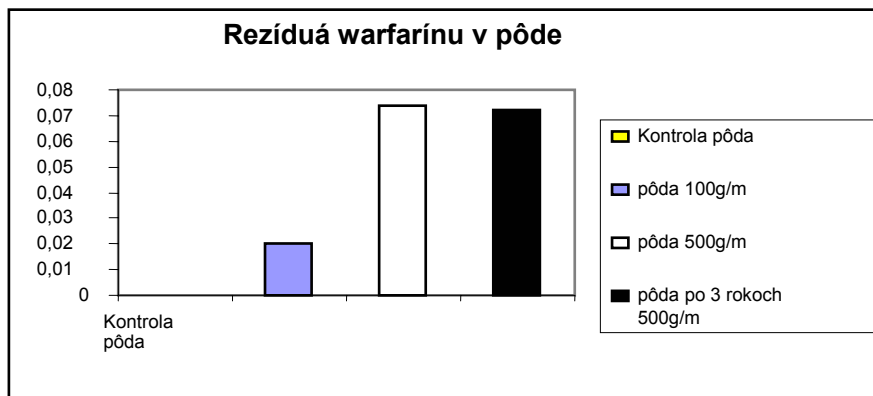
Graf 1 Rezíduá warfarínu v jačmeni



Graf 2 Rezíduá warfarínu v pšenici



Graf 3 Rezíduá warfarínu v pôde



V chemickej charakteristike warfarínu sa uvádza jeho nerozpustnosť vo vode (Saxna a kol., 1992; William a Douglas, 2002) bod topenia 159 – 165 °C (6) čo je 318 – 322 F° (OHS DATABASE 1994) a jeho rozpustnosť v acetóne, chloroforme a dioxanoch (Montgomery 1993, Hayes 1963). Na základe vyššie uvedených vlastností je možné dedukovať, že v pôde sa jeho rezíduá udržiavajú dlhý čas a pri znečistení pôdy warfarínom je jeho likvidácia obtiažná.

Kunc (1974) v mikrobiologickej štúdií uvádza, že celkovo 39 kmeňov, ktoré rozkladajú kumarín izoloval z pôdy, z ktorých 25 patrí k rodu *Pseudomonas*, 7 k rodu *Cellulomonas* a 7 k rodu *Achromobacteria*.

Koncentráty rodenticídov sú podľa súčasnej platnej legislatívy zaradené medzi zvlášť nebezpečné jedy, čo však už neplatí o hotových rodenticídnych nástrahách. Z hľadiska ich vysokej toxicity pre živočíchy sa v súčasnosti sleduje ich vplyv na necieľové druhy živočíchov. Booth a kol. (2001) popísal akútnu toxicitu brodifacoumu na bezstavovce ako sú

slimáky a suchozemské druhy krabov. Eason a kol. (2001) sledovali rezíduá brodifacoumu u otrávených divo žijúcich prasiat a kôz. Booth a kol. v roku 2003 zistili toxické pôsobenie brodifacoumu na dážďovky, čo všetko poukazuje na potrebu sledovania a hodnotenia antikoagulačných prípravkov na bezstavovce, ale aj vznik rezíduí v rastlinách pri ich aplikácii vo voľnej prírode.

POĎAKOVANIE

Práca bola vykonaná v rámci Národného referenčného laboratória UVL v Košiciach a projektov VEGA č.1/2397/05 a 1/3485/06.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Booth, L.H., Eason C.T., Spurr, E.B; Literature review of the acute toxicity and persistence of brodifacoum to invertebrates, *Science for Conservation* 177, 2001
- Booth, L.H., Fisher P., Heppelthwaite V., Eason C.T.; Toxicity and residues of brodifacoum in snails and earthworms, *DOC Science Internal series* 143, 5 – 14, 2003
- Eason, C., T., Spurr, E., B.: Review of the toxicity and impacts of brodifacoum on nontarget wildlife in New Zealand. *New Zealand J. Zoology* 22, 1995, p. 371-379
- Eason, C.T., Wright, G.R.G. , Milne, L.M., Morriss, G.A.; Laboratory and field studies of brodifacoum residues in relation to risk of exposure to wildlife and people, *Science for Conservation* 177, 11 – 23. 2001
- Farm Chemicals Handbook. 1994. Meister Publishing Co. Willoughby, OH.
- Hayes, W. J., Jr. 1963. *Clinical Handbook on Economic Poisons: Emergency Information for Treating Poisoning*. US Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Communicable Disease Center, Toxicology Section. Atlanta, Georgia.
- Kunc, F., Microbial decomposition of coumarin in soil, *Folia Microbiol (Praha)*. 1974;19(3):209-17.
- Montgomery, J. H. 1993. *Agrochemicals Desk Reference: Environmental Data*. Lewis Publishers. Chelsea, MI.
- OHS Database. 1994. Occupational Health Services, Inc. 1994 (June) MSDS for Warfarin. OHS Inc., Secaucus, NJ.
- Saxna, Y., Kumar, D., Blandari, T., Bhasin, H.: Laboratory and field evaluation of difethialone, a new antikoagulant rodenticide. *Pest. Conf. Proc. Vertebr. Pest. Conf., Lincoln*, 1992, p. 175-177
- Smith, R., H., Cox, P., R.: *Rodenticide Ecotoxicology: Systems Analysis and Simulation*. *Pest. Conf. Proc. Vertebr. Pest. Conf., Lincoln*, 1992, p. 47-54
- Staples, L., Smith, M., Pontin, K.: Use of zinc phosphide to overcome rodent infestations. *Proc. Austral. Postharvest Techn. Confer. Canberra*, 2003, p. 110-115
- Stenseth, C., N. a kol.: Mice and rats: the dynamics and bioeconomics of agricultural rodents pests. *Ecol. Environ* 7, 2003
- Thomson, W.T. 1991. *Agricultural Chemicals. Book III: Rodenticides*. Thomson Publications, Fresno, CA.
- Vestník Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky z 20. marca 2006 – čiastka 6. 25. Zoznam registrovaných prípravkov na ochranu rastlín a iných prípravkov
- William, E., Douglas, U.: *Potential Risks of Nine Rodenticides to Birds and Nontarget Mamals: a Comparative Approach*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, 2002, pp. 202
- William, E., Douglas, U.: *Potential Risks of Nine Rodenticides to Birds and Nontarget Mamals: a Comparative Approach*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, 2004, pp.230
- Dvořák, Petr- Kunčová, Veronika- Beňová, Katarína-Ohera, Marcel: Radiocesium in mushrooms from selected locations in the Czech Republic and the Slovak Republic. *Radiat Environ Biophys* (2006) DOI 10.1007/s00411-006-0044-5
- Dvořák, Petr- Kunčová, Veronika- Beňová, Katarína: Exponential drop of radiocesium activity in mushrooms due to the effect of acetic acid. *Eur Food Res Technol* (2006) 222: 139-143
- Sasáková, N., Vargová, M., Ondrašovičová, O., Ondrašovič, M., Kottferová, J., Skalická, M., Environmental pollution and health risk related to metals in the solid fraction and effluent from waste water treatment, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2006, 76; 671 -676
- Windholz, M. (ed.) 1983. *The Merck Index*. Tenth edition. Rahway, NJ. Merck and Company.

CHROMOZÓMOVÉ ABERÁCIE V LYMFOCYTOCH HOVÄDZIEHO DOBYTKA EXPONOVANÝCH FUNGICÍDOM EUPAREN MULTI (TOLYLFLUANID)

Lakatošová M., Holečková B.

Ústav genetiky, UVL, Košice

ABSTRAKT

Tolylfluánid patrí do triedy fenyľsulamidových fungicídov. Je intenzívne používaný v poľnohospodárstve na kontrolu širokého spektra hubami spôsobovaných ochorení. V práci sme detekovali stabilné a nestabilné chromozómové aberácie (CA) po pôsobení tolylfluánidu v periférnych lymfocytoch hovädzieho dobytká metódou konvečnej chromozómovej analýzy a fluorescenčnej *in situ* hybridizácie. Tolylfluánid bol ku kultúram lymfocytov, dvoch zdravých donorov, pridaný v koncentráciách 1,7; 3,5; 8,75 a 17,5 µg/ml na posledných 24 hodín kultivácie. V porovnaní s kontrolou bolo zistené mierne zvýšenie chromozómových aberácií po expozícii dávkam 8,75 a 17,5 µg/ml, ale bez štatistickej významnosti. Najvyššia koncentrácia (17,5 µg/ml) spôsobovala inhibíciu mitotickej aktivity a zníženie celkového počtu buniek. Taktiež sme pozorovali zvýšenie počtu polyploidných buniek.

ÚVOD

Pesticídy (insekticídy, fungicídy, herbicídy, rodenticídy a i.) sú jediné toxické chemikálie, v hojnom množstve **úmyselne** zavádzané do životného prostredia (Kovalkovičová a kol., 2005). Ako pesticídy je v súčasnosti klasifikovaných približne 1000 rôznych chemikálií (Šutiaková a kol., 2006). Ich aplikácia je ešte stále považovaná za najefektívnejšiu a najakceptovateľnejšiu prostriedok na ochranu rastlín pred škodcami a rôznymi chorobami. Účinok pesticídov závisí predovšetkým od účinnej látky, resp. od ich metabolickej degradácie v cieľovom organizme (Anwar, 1997).

Najproblematickejšou skupinou sú **fungicídy**, keďže okolo 90% z nich, v súčasnosti i minulosti používaných, bolo stanovených ako nebezpečné (karcinogénne) pre experimentálne zvieratá (Saunders a Harper, 1994).

Tolylfluánid, 1,1-dichloro-N-[(dimetyl-amino)-sulfonyl]-1-fluoro-N-(4-metyľfenyl)metánsulfamid, je kontaktne pôsobiaci fungicíd intenzívne používaný v poľnohospodárstve na kontrolu širokého spektra hubami spôsobovaných ochorení, ako sú chrastavitosť, múčnatka a botrytída napádajúca kvety u jabloní, peronospóra, botrytída (pleseň sivá) a biela hniloba viniča, botrytída (sivá hniloba) a biela škvrnitosť listov u jahôd. Je jedným z najčastejšie detekovaných pesticídov v ovocí a zelenine (Nowacka, 2002).

Tolylfluánid je bezfarebný, vo vode dispergovateľný granulát. Je veľmi rýchlo degradovaný v pôde a vode. Kvôli pevnej absorpcii pôdnymi časticami nemá potenciál migrovať do jej hlbších vrstiev (EPA, 2002).

U hospodárskych zvierat je tolylfluánid rýchlo a takmer kompletne absorbovaný v rámci 48 h. Najvyššie koncentrácie boli nájdené v pečeni, obličkách a štítnej žľaze. Tolylfluánid je u zvierat metabolizovaný na DMST (dimatylaminosulfotoluidin), ďalej na 4-(dimetylaminosulfonylamino) benzoovú kyselinu, ktorá môže byť neskôr demetylovaná (EFSA, 2005).

V predkladanej práci bol konvenčnou metódou a metódou FISH sledovaný účinok tolylfluánidu na bovinné chromozómy po 24h *in vitro* expozícii periférnych lymfocytov hovädzieho dobytká.

MATERIÁL A METÓDY

V experimente bola použitá krv dvoch klinicky zdravých 6 až 7 mesačných, 200 ± 50 kg, donorov (jalovice) slovenského strakatého dobytká. Plná krv, sterilne odobratá z veny jugularis, bola kultivovaná 72h pri 38 °C v 5 ml média RPMI 1640 s obsahom L-glutamínu a

15 $\mu\text{mol/l}$ HEPES (Sigma, St. Louis, MO, USA). Kultivačné médium bolo doplnené fetálnym bovinným sérom (15%) (BOFES, Sigma, USA), antibiotikami (penicilín 250 U/ml a streptomycín 250 $\mu\text{g/ml}$) a fytohemaglutinínom (PHA, 180 $\mu\text{g/ml}$, Wellcome, Darford, UK). Tolylfluanid (Euparen Multi, Bayer AG, Germany s obsahom 50% tolylfluanidu) bol rozpustený v dimetyl sulfoxide (DMSO, Sigma, St. Louis, MO, USA) a aplikovaný 24 h pred ukončením kultivácie lymfocytov ku všetkým experimentálnym kultúram v koncentráciách 1,7; 3,5; 8,75 a 17,5 $\mu\text{g/ml}$. Finálna koncentrácia DMSO bola v prípade experimentálnych aj kontrolných kultúr 0,1%. Ako pozitívny kontrolný agens bol použitý etylmetánsulfonát (EMS, Sigma, St. Louis, MO, USA) o koncentrácii 250 $\mu\text{g/ml}$.

Do média bol 1 h pred koncom inkubácie pridaný kolchicín (5 $\mu\text{g/ml}$). Na kultúry sa pôsobilo 0,075 M hypotonickým roztokom KCl 22 minút a následne čerstvo pripraveným fixačným roztokom (metanol : kyselina octová / 3:1). Suspenzia buniek bola kvapkaná na čisté a odmastené podložné sklíčka, vopred vychladené v mrazničke. Preparáty sa nechali voľne usušiť na vzduchu a farbili sa v 3% roztoku farbiva Giemsa vo fosfátovom tlmivom roztoku (pH 6,9; 8min).

Preparáty na FISH boli pripravené konvenčnou cytogenetickou metódou. DNA chromozómov bola denaturovaná pri 72 °C počas dvoch minút (70% formamid/2xSSC, pH=7,0) a dehydratovaná vo vzostupnom rade alkoholov (70%, 80%, 96% etanol). Na vizualizáciu aberácií bola použitá celochromozómová fluorescenčne značená sonda pre bovinné chromozómy 1 (BOS 1-SG) a 5 (BOS 5-SO) (Výskumný Ústav Veterinárneho Lékařství, Brno, Česká republika). Po denaturovaní sondy v hybridizačnej zmesi pri 72 °C počas 10 minút nasledovala predhybridizácia pri 37 °C (90 min). In situ hybridizácia so sondou bola robená pri 37 °C počas noci (približne 18 h). Preparáty boli farbené DAPI/Antifade (4', 6'-diamino-2-fenolindol, Q-BIOgene, UK). Výsledky hybridizácie boli vyhodnocované pod fluorescenčným mikroskopom Nikon (Labophot 2A/2) pomocou duálnych filtrov DAPI/FITC a FITC/TRITC (Nikon). Aberácie chromozómov boli vyhodnocované pomocou PAINT systému (Tucker a kol., 1995). Na štatistické spracovanie výsledkov bol použitý χ^2 test. Mitotický index bol stanovený z 1000 buniek pre každú koncentráciu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky vyhodnotenia účinkov tolylfluanidu po 24 h *in vitro* expozícii sú uvedené v tabuľke č.1.

Konvenčnou cytogenetickou metódou nebol preukázaný klastogénny efekt fungicídu tolylfluanid (Euparen M). Najčastejšie detekované aberácie boli chromatídového typu. Bolo pozorovaných niekoľko chromatídových výmen a zvýšenie počtu polyploidných buniek. Najvyššia testovaná koncentrácia (17,5 $\mu\text{g/ml}$) spôsobovala inhibíciu mitotickej aktivity a zníženie celkového počtu buniek, ale bez štatistickej významnosti (χ^2 test).

V posledných rokoch vzrástol záujem o problematiku toxicity pesticídov vzhľadom na stúpajúci počet správ o ich karcinogénnych, mutagénnych a teratogénnych účinkoch (Hrelia a kol., 1996). Intenzívne používanie týchto chemických látok spôsobuje množstvo problémov hlavne kvôli ovplyvňovaniu aj tzv. necieľových organizmov a perzistencii v životnom prostredí. Údaje týkajúce sa klastogénneho účinku tolylfluanidu na hospodárske zvieratá sú nedostatočné. Šutiaková a kol. (2006) vo svojej práci zistili signifikantné zvýšenie počtu aberantných buniek a buniek s mikrojadrami po subchronickej expozícii oviec technickým tolylfluanidom. Autori došli k záveru, že nimi testovaný pesticíd s obsahom tolylfluanidu mal genotoxické účinky. V *in vitro* testoch na bunkách cicavcov bolo dokázané štatisticky významné zvýšenie počtu chromozómových aberácií (klastogénne účinky) po pôsobení uvedeného fungicídu (EPA, 2002), ako aj jeho cytotoxické vlastnosti po expozícii buniek koncentráciou 10 $\mu\text{g/ml}$.

Metódou FISH je na rozdiel od cytogenetickej analýzy Giemsovým farbením chromozómov umožnená vizualizácia aj tzv. stabilných chromozómových prestavieb, ktoré sú vo svojej podstate kompatibilné s bunkovým delením, a ako také môžu byť prenášané z jednej generácie do druhej (Stronati a kol., 2004). V našom experimente neboli po použití dvoch celochromozómových bovinných sond pre chromozómy 1 a 5 detegované žiadne translokácie, inzercie, alebo chromatidové fragmenty.

Tabuľka č.1 Frekvencia CA v periférnych lymfocytoch HD exponovaných 24 h štyrom koncentráciám tolylfluanidu.

Dávka	Počet metafáz	G	Typy CA				% zlomov (± SD)	% MI
			CB	IB	CE	IE		
Donor 1								
Kontrola (DMSO)	100	3	2	-	-	-	2.0±0.14	3.2
Koncentrácia (µg/ml)								
1,7	100	3	3	-	-	-	3.0±0.17 ^a	3.2 ^a
3,5	100	4	4	1	-	-	5.0±0.218 ^a	2.8 ^a
8,75	100	6	6	-	-	-	6.0±0.24 ^a	2.2 ^a
17,5	100	8	3	2	-	-	5.0±0.218 ^a	2.0 ^a
250 µg/ml, EMS	100	14	12	-	5	2	26.0 ± 0.64 ^{***}	1.0 ^{***}
Donor 2								
Kontrola (DMSO)	100	2	2	-	-	-	2.0±0.14	3.0
Koncentrácia (µg/ml)								
1,7	100	4	3	-	-	-	3.0±0.17 ^a	2.8 ^a
3,5	100	5	3	-	-	-	3.0±0.17 ^a	2.6 ^a
8,75	100			-	-	-	5.0±0.218 ^a	2.1 ^a
17,5	100	4	5	-	-	-	5.0±0.218 ^a	1.7 ^a
250 µg/ml, EMS	100	11	14	2	9	1	36.0±0.97 ^{***}	0.8 ^{***}

***, štatistická významnosť ($P < 0,001$) – χ^2 , a – štatisticky nevýznamné údaje

CB, IB –chromatidové, chromozómové zlomy, CE, IE - chromatidové, chromozómové výmeny, EMS –etylmetánsulfonát

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantmi VEGA MŠ SR č. 1/4322/07, č. 1/4394/07 a Národným referenčným laboratóriom pre pesticídy, UVL v Košiciach.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Anwar, W.A. 1997. Biomarkers of human exposure to pesticides. Environmental Health Perspectives, 105, 801-806.
- EFSA 2005. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tolylfluanid. EFSA Scientific Report 29, 1-76.
- EPA (Environmental Protection Agency) 2002. Pesticide Fact Sheet, Tolyfluanid, 1-18.
- Kovalkovičová, N., Šutiaková, I., Legáth, J., Pistl, J., Šutiak, V. 2005. Biotransformácia xenobiotík a ich zásah do bunkového cyklu. Slovenský veterinársky časopis, 3, 165-167.
- Nowacka A. 2002. Residues of most frequently applied fungicide in vegetables and fruit (1997-2001). Progress in Plant Protection, 42, 118-130.

- Saunders, D. S., Harper, C. 1994. Pesticides. Principles and methods of toxicology, 3. ed., edited by a. W. Hayes, Raven press Ltd., New York, 389-415.
- Šutiaková I., Kovalkovičová N., Pisl J., Novotný J., Legáth J., Kováč G., Hlinčíková S., Šutiak V. 2006. Chromosomal aberrations and frequency of micronuclei in sheep subchronically exposed to the fungicide Euparen Multi (tolylfluanid). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64, 312-320.
- Tucker, J.D., Morgan, W.F., Awa, A.A., Bauchinger, M., Blakey, D., Cornforth, M.N., Littlefield, L.G., Natarajan, A.T., Shasserre, C. 1995. A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 68, 211-221.

ÚČINOK TERAPEUTICKEJ AFERÉZY AKO FORMY IMUNOTERAPIE U PSOV S NÁDOROVÝM OCHORENÍM

Ledecká K¹, Ogilvie G.K.², Howel M.D.³, Hajurka J.¹

¹*Klinika chirurgie, ortopédie a röntgenológie, UVL, Košice*

²*California Veterinary Specialists, Angel Care Cancer Center, Carlsbad, California, USA*

³*Cytologic, Laboratory Research Center, Fort Collins, Colorado, USA*

ABSTRAKT

V ostatnom období snahou špecializovaných onkologických kliník a výskumných centier je nájsť spôsob terapie nádorov, ktorý by mohol doplniť, ba dokonca, aj nahradiť chemoterapeutickú alebo radiačnú liečbu. V našej práci pracovnou hypotézou bolo overiť, či terapeutická aferéza redukujúca solubilné receptory faktora nádorovej nekrózy (sTNF-R) je vhodný spôsob terapie onkologických pacientov. V experimente sme použili troch psov s klinicky diagnostikovaným nádorommerateľným tumorom. Formou aferézy sa filtrovala krvná plazma psov špeciálnym filtrom na zachytenie sTNF-R a takto ošetrená krv sa vrátila pacientovi späť do krvného obehu. Počas experimentu sa sledovali životne dôležité funkcie psov (frekvencia dychu, srdcová frekvencia, tlak krvi a, pulz), efektívnosť a potenciálnu toxicita terapie. Efektívnosť terapie spočívala v hodnotení morfológických údajov tumoru a histologického nálezu. U všetkých pacientov sme pozorovali vedľajší nepriaznivý účinok citrátu sodného, ktorý spôsoboval hypokalciemi. Klinicky u psa č. 1 a č. 3 došlo ku hemoragickej nekróze tumoru a jeho zmenšeniu. U psa č. 2 a č. 3 sme zaznamenali zastavenie progresie nádorového ochorenia, dlhšie prežívanie v porovnaní s priemernou dobou prežívania psov s rovnakou diagnózou, dokonca ústup príznakov osteoartritídy. Konštatujeme, že pri vhodnej premedikácii pacientov na zabránenie vedľajších nežiadúcich účinkov, filtrovaním krvnej plazmy aferézou s odstránením určitého množstva sTNF-R je možná stimulácia imunitného systému organizmu voči nádorovým bunkám. V budúcnosti bude potrebné vykonať ešte ďalšie kontrolné a porovnávacie štúdie na presnejšie vypracovanie protokolu so štandardným postupom.

ÚVOD

Aferéza je všeobecný termín pre opis procesu, pomocou ktorého sú krvné komponenty z cirkulačného systému pacienta oddelené a vyberané do mimotelového systému špeciálnym automatizovaným prístrojom. Separácia krvných elementov sa môže uskutočniť formou filtrácie, centrifugácie, alebo ich vzájomnou kombináciou (Burgstaler, 2003). Tieto komponenty, buď cirkulujú v krvnom riečisti v nadmerných množstvách, a / alebo zohrávajú určitú patologickú úlohu v organizme (Pineda a Vamvakas, 1997). Ostatné zložky krvi sú znehodnotené, alebo vrátené do krvného obehu donora. Existuje niekoľko špecifických typov terapeutickú aferézy, ktorých názov je odvodený podľa vyňatej zložky krvi. Vyznačujú sa konkrétnou charakteristikou a indikáciou na ich použitie: 1. Plazmaferéza; 2. Cytaferéza - a) Leukaferéza; b) Aferéza krvných doštičiek; 3. Erythrocytaferéza; 4. Fotoferéza; 5. Aferéza lipidov s nízkou denzitou (cholesterol); 6. Mímotelová imunoabsorbpcia. Zvyčajne patologické komponenty krvi, ktoré podliehajú terapii aferézou zahŕňajú protilátky, vlastné protilátky, imúnne komplexy, metabolity cirkulujúce v krvi v nadmerných množstvách, exogénne alebo endogénne toxíny, cytokíny, kryoglobulíny, cholesterol obsahujúce lipoproteíny a mediátory ochorenia neznámeho pôvodu (Bartges, 1997). Terapeutická aferéza a jej subtypy sa na vysoko špecializovaných pracoviskách v Spojených Štátoch Amerických používajú u ľudí na terapiu autoimunitných, reumatoidných, hemotologických, onkologických, metabolických, neurologických a obličkových ochorení. Klinická aplikácia tejto formy imunoterapie preukázala pozitívny efekt aj pri experimentálnej terapii niektorých ochorení vyskytujúcich sa u psov (Matus a kol., 1983; Matus a kol., 1985; Matus a kol., 1987; Bellomo a kol., 2000).

Dnes už je preukázané, že imunitný systém zohráva významnú úlohu v obrane organizmu nielen voči infekčným agensom, ale aj voči nádorovým bunkám. Pred viac než štyridsiatimi rokmi boli identifikované rozpustné imunosupresívne faktory, objavené v krvi, v krvnom sére, v ascitickej a pleurálnej tekutine ľudí a iných druhov s rakovinou. Bolo preukázané, že sú taktiež produkované samotnými nádormi (Lentz, 1999). Obranná funkcia imunitného systému spočíva v prezápalových alebo protizápalových aktivitách určitých cytokínov, ktorých zvýšené hladiny boli zaznamenané u onkologických pacientov (Dunlop a Campbell, 2000). Jedným z významných cytokínov, súvisiaci aj s onkologickým ochorením je faktor nádorovej nekrózy (TNF), ktorý bol pôvodne izolovaný z krvného séra myši s indukovaným sarkoidným nádorom, liečených bakteriálnym endotoxínom, u ktorých navodil hemoragickú nekrózu nádorového tkaniva (Carswell a kol., 1975). TNF je dôležitý mediátor bunkovej imunity s rôznymi biologickými aktivitami v in vitro a aj in vivo podmienkach, prvotne produkovaný makrofágmi (Chouaib a kol., 1992). Zdrojom tohto proteínu sú aj gliové bunky mozgu, Kupfferove bunky pečene, keratinocyty kože, NK bunky, B a T lymfocyty a v malom množstve tiež fibroblasty, bunky hladkej svaloviny a nádory (Aggarwal, 2003). Obidva typy, TNF- alpha a TNF- beta, zohrávajú dôležitú úlohu v rezistencii organizmu voči vírusom, baktériám, hubám i nádorovým bunkám a kompetetívne adherujú na špeciálne bunkové receptory (sTNF-RI a sTNF-RII) (Vilcek a Lee, 1991). TNF pôsobí cytotoxicky na mnoho malígných nádorových buniek v in vitro aj in vivo prostredí. Aj keď tento mechanizmus ešte nie je úplne objasnený, je známe, že TNF pôsobí priamo na bunky nádoru a nepriamo na nádorovú vaskulatúru, kým zdravé bunky sú voči tomuto efektu rezistentné. Okrem extravazácie erytrocytov a lymfocytov, ktorá vedie k hemoragickej nekróze nádorového tkaniva, toxický účinok TNF na nádorovú vaskulatúru spočíva v navodení zvýšenej permeability ciev a ich deštrukcii (Van Horseen, 2006). Lentz (1999) popísal výskyt zvýšených hladín rozpustných receptorov (sTNF-R) v krvi u žien počas tehotenstva a ľudí s mnohými malignitami. Obidva typy receptorov majú schopnosť naviazať sa na TNF a tak inhibovať jeho toxický účinok na nádorové bunky, teda pôsobia ako regulátory TNF aktivity. V tejto experimentálnej klinickej štúdií sme pracovali s hypotézou, či redukcia, alebo odstránenie sTNF-RI a sTNF-RII z krvného obehu u psov so solitárnymi nádormi umožní navodiť endogénnu imunitnú protinádorovú odpoveď organizmu. Ďalej sme chceli overiť, či takouto stimuláciou môže dôjsť k zastaveniu progresie malígneho procesu nádorového ochorenia, k jeho regresii, alebo dokonca úplnej eliminácii.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente sme testovali účinnosť špeciálne vyrobeného filtra určeného na imunoterapiu psov s nádorovým ochorením, za účelom vyňať určité množstvo sTNF-R z krvnej plazmy pacienta a tak navodiť imunitnú odpoveď psa na nádorové ochorenie.

Na klinickú štúdiu sme použili troch dospelých psov, rôzneho plemena a pohlavia s telesnou hmotnosťou nad 20 kg. Podmienkou pre zaradenie psa do experimentu bolo, aby mal merateľný typ nádoru, predpokladanú dobu prežitia viac než tri mesiace a nesmel byť v chemoterapeutickej liečbe najmenej tridsať dní pred započatím experimentu. Krátko pred zahájením experimentálnej časti bol každý pes podrobený klinickému vyšetreniu, laboratórnemu testovaniu krvi a analýze moča. Týždeň pred experimentom bol psom počas celkovej anestézie chirurgicky zavedený intravenózný katéter s dvoma lúmenmi do *v. jugularis*. Imunoterapia formou aferézy u každého pacienta bola uskutočnená tri krát do týždňa, dĺžka trvania jednej procedúry bola kalkulovaná podľa celkového objemu krvnej plazmy zvieraťa a rýchlosti prietoku krvnej plazmy cez filter (2 – 3 hodiny). Pol hodiny pred každou terapiou bol psom intravenózne podaný bolus fyziologického roztoku v objeme 500 ml/hod. na zabezpečenie hydratácie a taktiež sme aplikovali subkutánne 10 mg metoklopramidu a 75 m.j./kg heparínu na zamedzenie výskytu potencionálne nežiadúcich

účinkov (zvracanie, zrážanie krvi). Následne sa pacientovi odobrala krv na biochemické i hematologické vyšetrenie a analýzu acidobázickej rovnováhy. Samotná imunoterapia spočívala v napojení ľudského dializačného prístroja COBE SPECTRA na krvný systém psa pomocou intravenózneho katétra. Automatizovaný prístroj tak postupne odoberal krv z tela psa do mimotelového obehu, separoval krv na krvné komponenty a krvnú plazmu centrifugáciou, filtroval plazmu s cieľom zachytiť vo filtri sTNF-RI a sTNF-RII a následne ošetrovanú krv vrátil do krvného systému pacienta. Na začiatku, v priebehu a na konci celého tohto procesu boli životné funkcie každého psa presne monitorované. Každých 15 minút sa zaznamenávali hodnoty telesnej teploty, dýchania, činnosti srdca, krvného tlaku, pulzu a boli odoberané vzorky krvi na vyšetrenie vnútorného prostredia psa. Vyšetrované krvné parametre pozostávali z hematologického profilu, počtu trombocytov a biochemického profilu. Protrombínový čas (PT) a aktivovaný čiastočný tromboplastínový čas (APTT) boli tiež pravidelne merané na detekciu vzniku potencionálnych prokoagulačných alebo koagulačných nežiadúcich reakcií. Na začiatku a počas imunoterapie v 15 minútových intervaloch sme odoberali vzorky plazmy pred aj po filtrácii vysoko špecifickým filtrom, ktoré sme následne uskladnili do mrazničky na teplotu $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po ukončení každého procesu sme jugulárny katéter psa od automatizovaného systému odpojili, prepláchli heparínom, aby sme zabránili prípadnej koagulácii v jeho lúmene a asepticky vyčistili miesto kontaktu s kožou, aby nedošlo k neželanej infekcii miesta zavedenia katétra. Po 1 a 2 hodinách od skončenia terapie sme dodatočne psom odobrali vzorky krvi a získanú krvnú plazmu po centrifugácii zamrazili s ostatnými vzorkami na teplotu $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Počas celého obdobia experimentu medzi jednotlivými terapiami psov sme makroskopicky sledovali eventuálne zmeny na samotnom nádore, ale aj zmeny životne dôležitých funkcií a prípadne výskyt pravdepodobných nežiadúcich účinkov. Táto experimentálna štúdia bola zameraná na testovanie účinnosti špecifického filtra a jeho schopnosť zachytiť receptory TNF, ktorý bol vyrobený len na výskumné účely aferézou. Hlavným cieľom bolo predovšetkým zistenie, či takáto forma terapie u psov so solitárnym nádorom je bezpečná a efektívna.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pacient č. 1 – suka, kríženec dobermana, 9 ročná, “AZULA”, malígný melanóm ústnej dutiny, vľavo na tvrdom podnebí s metastázou do ipsilaterálnej lymfatickej uzliny, prítomný 2 mesiace pred započatím imunoterapie. U tohto psa bolo uskutočnených 14 procedúr imunoterapie za použitia celkovej anestézie. S imunoterapiou bol súbežne podávaný CaCl $1,2\text{g}/150\text{ ml}$ NaCl i.v. infúziou s prietokom $34\text{ ml}/\text{hod}$. na zabránenie nožnej koagulácie krvi spôsobenej použitým citrátom sodným. Klinický priebeh jednotlivých postupov u tohto psa bol prevažne bez komplikácií. Na začiatku terapií sme pozorovali mierne zvýšenie hladiny laktátu, ktorá sa v krátkej dobe od spustenia aferézy upravila do fyziologických hodnôt. Počas terapií sme zaznamenali zníženie pH krvi, počtu erytrocytov, hematokritu, obsahu hemoglobínu, ionizovaného vápnika (iCa) a zvýšenie hladiny glukózy i draslíka. Po tretej terapii sme zistili, že pôvodne diagnostikovaná masa sa znižuje a po piatej terapii úplne zanikla. Po deviatej terapii sme spozorovali zväčšenie ľavej mandle, z ktorej sme odobrali vzorku na histologické vyšetrenie. Zároveň sme urobili röntgenografické vyšetrenie hrudníkovej dutiny na zistenie prítomnosti metastáz, ktoré bolo bez patologického nálezu. Pôvodná masa v ústnej dutine na tvrdom podnebí bola stále vymiznutá. Po jedenástej terapii sme stále pozorovali prominujúcu pravú tonzilu s povrchovou ulceráciou a nekrózou. Histologicky bola potvrdená prítomnosť metastatických buniek malígneho melanómu v nej. Počas štrnástej terapie sa pes v celkovej anestézii dostal do metabolickej a respiračnej acidózy, došlo ku zástave dýchania, zlyhaniu srdca a celkovému kolapsu. Po niekoľkých minútovom oživovaní sa nám podarilo psa prebrať a predčasne imunoterapiu ukončiť. Pre život ohrozujúci stav pacienta a progresívny charakter nádorového ochorenia psa

sme sa rozhodli klinickú štúdiu u tohto psa úplne ukončiť. Do jedného mesiaca po ukončení imunoterapie došlo u psa k evidentnému zväčšeniu pravej tonzily, ľavej submandibulárnej lymfatickej uzliny a opätovnému nárastu masy na tvrdom podnebí. Pes od začiatku terapie po jej ukončení rapídne schudol z 29,5 kg na 24,9 kg. Pre nepriaznivý stav pacienta a prognózu sa majiteľ rozhodol psa utradiť.

Pacient č. 2 – pes, border kólia, 10 ročný, “MAX”, malígy melanóm nízkeho stupňa, vyrastajúci z mäkkého tkaniva v ústnej dutine, päť krát chirurgicky odstránený s následnou rekurenciou. Röntgenografické vyšetrenie hrudníka bez prítomnosti metastáz. Max absolvoval spolu 28 imunoterapií, bez použitia celkovej anestézie. Spočiatku počas prvej terapie sme psovi aplikovali CaCl v objeme 1,2mg/150ml NaCl rýchlosťou 15ml/hod., no u psa sa v druhej polovici procedúry objavili príznaky citrátovej toxicity sprevádzané letargiou, evidentným znížením iCa v krvi, zvracaním a miernou tetaniou. Postupným zvyšovaním objemu podávaného CaCl počas niekoľkých terapií sme dospeli ku konštantnej dávke 700mg/hod. so súbežne podávanou infúziou roztoku Normosolu. Tým sme dosiahli relatívne stabilné hladiny iCa v krvi a zamedzili tak výskytu klinických príznakov hypokalcémie. Okrem znížených hladín iCa sme v krvi pacienta počas imunoterapie pozorovali aj znížené hladiny hematokritu, hemoglobínu a predĺžený APTT (zrážanlivosť krvi). Klinicky sme pozorovali zvýšenie telesnej teploty v rozpätí 15 az 45 minút od začiatku procedúry a následne jej pokles k pôvodnej hodnote od začiatku terapie. Po dvadsiatej terapii sme pozorovali hyperémiu gingívy a hemoragické ložiská s krvácaním tumoru v ústnej dutine, ktorého veľkosť bola stabilná (2cm/2cm/0,5cm). Po 25-tej imunoterapii, tumor mal zmenený tvar a veľkosť (1,2cm/2cm/0,5cm). Na konci klinickej štúdie sme vykonali excíziu biopsiu tumoru a histologické vyšetrenie potvrdilo hemoragickú nekrózu tkaniva.

Pes jednotlivé terapie znášal prevažne veľmi dobre, bez menších komplikácií. Pred začatím imunoterapie mal taktiež problémy s osteoartrítidou a inkontinenciou moča, ktoré počas experimentu zanikli a po jeho ukončení sa opäť obnovili. Maxov tumor je v štádiu progresie, zápal s hemorágiami ako forma imunitnej odpovede ustúpil a jeho kvalita života sa podstatne zhoršila.

Pacient č.3 – pes, zlatý labrador, 2 ročný “OTIS”, osteosarkóm s metastázami v pľúcach, proximálne na tibií a v podkoží laterálne na pravej strane krku. V minulosti bola u tohto psa vykonaná amputácia ľavej panvovej končatiny s primárnym nádorom na kosti a chemoterapia (Karboplatina) ako adjuvantná forma terapie. Otis absolvoval celkom 28 terapií aferézou, pri plnom vedomí, ktoré znášal bez akýchkoľvek život ohrozujúcich ťažkostí. Na zamedzenie hypokalcémie sme psovi aplikovali CaCl v dávke 500mg/hod. súbežne s infúznym roztokom Normosolu. U tohto psa nastalo niekoľko komplikácií s jugulárnym katétrom, ktorý bol 4 krát vymieňaný a to 2 krát z dôvodu vytrhnutia psom a 2 krát kvôli nepriechodnosti a upchatiu lúmena koagulom. V priebehu jednotlivých procedúr sme aj u tohto pacienta pozorovali znížené hladiny iCa krvi, hematokritu a hemoglobínu pod fyziologickú normu. Tiež sme zaznamenali zvýšenie telesnej teploty v rozpätí od 30-75 minút, ktorá postupne koncom terapie poklesla. Majiteľ pacienta zaznamenal viditeľnú zmenu správania sa psa, došlo k zvýšenej aktivite a zlepšeniu apetítu psa. Pozorované príznaky osteoartritídy počas klinickej štúdie zanikli a po jej ukončení sa opäť objavili. Porovnaním výsledkov CT vyšetrenia metastáz v pľúcach a na tibií v 5 mesačnom intervale sme zistili, že ochorenie je stabilné, bez známok progresie, ba dokonca meraním masy v pľúcach sme zistili jej zmenšenie zo 4,5 cm na 4,1 cm. Po ukončení imunoterapie sa zdravotný stav psa začal zhoršovať, nastali ťažkosti pri dýchaní, kašeľ a pôvodné príznaky osteoartritídy. Pacient má zhoršenú kvalitu života a nepriaznivú prognózu.

Touto štúdiou sme dospeli k záveru, že terapeutická aferéza by mohla nájsť svoje uplatnenie v terapii niektorých typov nádorov u psov, keďže u všetkých troch pacientov sme pozorovali zmeny na samotných nádoroch. U dvoch psov došlo dokonca k stabilizácii ochorenia, najmä na mikroskopickej úrovni. V prípade pacienta č.2 sme spomalili proces metastázovania primárneho tumoru do regionálnych lymfatických uzlín a spôsobili čiastočnú hemoragickú nekrózu masy. U pacienta č.3 tiež bol nádorový proces pozastavený a tým aj evidentne predĺžená prežívateľnosť psa. Podľa niektorých štúdií priemerná doba prežívania psov po odstránení primárneho osteosarkómu bez prítomnosti metastáz je približne 120 dní a psy s mnohopočetnými metastázami prežívajú len niekoľko týždňov alebo mesiacov. Náš pacient prežíva deviaty mesiac od započatia imunoterapie. Aj napriek riziku vzniku hypokalcémie v dôsledku podávania citrátu sodného a možným komplikáciám s jugulárnym katétrom, ktorým sa je možné vyhnúť, terapeutická aferéza nepreukázala toxický vplyv na pacienta, ba dokonca sa potvrdila jej efektívnosť.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Burgstaler EA. Current instrumentation for apheresis. In: Apheresis: Principles and Practice, 2nd edn., BC McLeod, TH Price, R Weinstein, eds, Bethesda, MD: AABB Press, 2003: 95-130.
- Pineda AA, Vamvakas EC. Applications of therapeutic apheresis in patients with malignant disease. *Oncologist* 1997; 2:94-103.
- Bartges JW. Therapeutic plasmapheresis. *Semin Vet Med Surg Small Anim* 1997;12:170-177.
- Matus RE, Gordon BR, Leifer CE, et al. Plasmapheresis in five dogs with systemic immune-mediated disease. *J Am Vet Med Assoc* 1985;187:595-599.
- Matus RE, Leifer CE, Hurvitz AI. Use of plasmapheresis and chemotherapy for treatment of monoclonal gammopathy associated with Ehrlichia canis infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1987;190:1302-1304.
- Bellomo R, Kellum JA, Gandhi ChR, et al. The effect of intensive plasma water exchange by hemofiltration on hemodynamics and soluble mediators in canine endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;16:1429-1436.
- Lentz MR. The role of therapeutic apheresis in the treatment of cancer. *Ther Apher* 1999; 3:40-49.
- Dunlop RJ, Campbell CW. Cytokines and advanced cancer. *J Pain Symptom manage* 2000; 20(3): 214-32.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72: 3666-3670.
- Chouaib S, Robinet E, Ziad A, Branellec D. Tumor necrosis factor: pleiotropic cytokine. *Bull Cancer*.1992; 79(10): 935-49.
- Aggarwal BB. Signaling pathways of the TNF superfamily: a double edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 745-56.
- Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem*. 1991; 266(12): 7313-3.
- Van Horseen R, Ten Hagen TLM, Eggermont AMM. TNF- α in cancer treatment: Molecular insights, antitumor effects and clinical utility. *Oncologist* 2006, 11: 397- 408.

PARAMETRE A ŠTANDARDY PRE STANOVENIE WELFARE NA FARMÁCH HOVÄDZIEHO DOBYTKA

Mareková J., Kottferová J., Ondrašovičová O., Ondrašovič M.

Katedra životného prostredia, UVL, Košice

ABSTRAKT

Vedecký výskum a poznatky čerpajúce z etológie jednoznačne dokazujú, že je potrebné zmeniť súčasné priemyselné podmienky chovu hospodárskych zvierat. Ideou je, že je obsolentné a nemorálne hodnotiť životné podmienky zvierat iba z pohľadu ich úžitkovosti a okamžitého ekonomického zisku. Je však možné kvantifikovať pohodu – welfare zvierat? Príspevok odpovedá na otázku, či sú pre stanovenie welfare dôležitejšie environmentálne alebo tzv. “animal – based“ parametre. Zároveň sú popísané štandardy, ktoré boli vypracované za účelom stanovenia welfare v niektorých krajinách EÚ.

ÚVOD

Ako rozoznáme „dobrý“ a „zlý“ welfare? Zhoršené fyzické zdravie, spôsobené chorobami, zraneniami alebo deformitami sú relatívne jednoznačné indikátory, ktoré vieme kvantifikovať. Z iných disciplín boli nedávno importované iné, menej očividné ukazovatele zhoršeného zdravia ako napríklad zníženie imunity (IRWIN, 1999), zmeny v pomere pohlaví u potomstva, znížený príjem potravy (DALLMAN, 2001). Na to, aby sme preskúmali mentálny zdravotný stav zvierat, môžeme použiť aj fyziológiu a správanie (DAWKINS, 2006). Vďaka rôznorodosti kritérií welfare sa zdá, že niektoré si odporujú. Jednou stratégiou môže byť zosumarizovanie čo najviac behaviorálnych, zdravotných, fyziologických kritérií (WHAY *et al.*, 2003b) a z nich vyvodiť záver, čo predstavuje dobrú úroveň welfare.

ENVIROMENTÁLNE PARAMETRE

Enviromentálne parametre odrážajú kvalitu prostredia a manažmentu. Ich príkladom môžu byť napríklad rozmery ustajňovacích priestorov, dostupnosť a kvalita kŕmnych a nájacích zariadení, kvalita podstielky, prístup na pastvu a pod. Enviromentálne parametre sú pomerne ľahko a rýchlo merateľné a vo väčšine prípadov môžu byť hodnotenia bez problémov opakovateľné. Je nesporné, že ustajnenie a spôsob manažmentu nevyhnutne determinuje welfare zvierat (JOHNSEN *et al.*, 2001). Sú však dostatočne validné? Ak je cieľom vydať osvedčenie, že ustajňovacie podmienky sú akceptovateľné z pohľadu welfare, je postačujúce zhodnotenie enviromentálnych parametrov. Ak je však cieľom identifikácia welfare problémov a ich riešenie - je nevyhnutné vyhodnotiť aj animal-based parametre (JOHNSEN *et al.*, 2001).

ANIMAL BASED PARAMETRE

V chovoch s podobnými enviromentálnymi parametrami môžeme zistiť obrovské rozdiely v úrovni welfare (SANDOE *et al.*, 1997). Preto parametre založené na pozorovaní zvierat v ich špecifickom prostredí (animal-based parametre) musíme považovať za esenciálne pre stanovenie úrovne welfare. Do tejto kategórie spadá množstvo ukazovateľov týkajúcich sa správania, zdravia a fyziológie zvierat. Tieto parametre sú presnejšími ukazovateľmi welfare, pretože reflektujú na aktuálny stav zvierat. To by malo zdanlivo viesť k ich uprednostňovaniu. Avšak tieto parametre sú náročné na zaznamenávanie, je tu horšia porovnateľnosť a nezanedbateľné sú aj ťažkosti pri interpretácii týchto sledovaní. Tieto nevýhody sa týkajú fyziologických a predovšetkým behaviorálnych parametrov. Naproti tomu metódy na stanovenie zdravotných parametrov sú praktickejšie. Databáza relevantných údajov je obvykle dostupná.

FYZIOLOGICKÉ PARAMETRE

Doteraz používané fyziologické kritériá welfare boli autonómne odpovede ako napríklad zrýchlená pulzová frekvencia a zvýšená hladina kortikoidov (tzv. „stresové hormóny“) (BROOM, 2001; KORTE, 2001). Napriek ich objektívite ťažko vieme tieto kritériá aplikovať pri stanovení welfare, pretože väčšina týchto zmien sú súčasťou adaptácie zvierat na prostredie. Aktivity ako napríklad párenie alebo lov môžu viesť k rovnakým zmenám fyziologických ukazovateľov ako napríklad evidentne nepríjemný útek pred predátorom (RUSHEN, 1991). Dokonca aj u ľudí je ťažké rozlíšiť na základe ich autonómnych odpovedí emócie ako hnev, strach či vzrušenie (OATLEY and JENKINS, 1996).

BEHAVIORÁLNE PARAMETRE

FRASER (1990) považuje za prejav pohody prítomnosť nasledovných šiestich okruhov správania sa: komfortné správanie, odpočinok, ochotu k združovaniu, hru, exploračné a teritoriálne právanie. Príznakmi nepohody sú znepokojenie, depresia, anorexia, znížená aktivita, apatia a etopatie. Prvky správania sprevádzajúce nepohodu, utrpenie alebo bolesť sú schúlený postoj, nepokoj, príliš voľné alebo strnulo vystreté končatiny, zvlíjanie sa, nezvyčajná poloha alebo pohyb, náhradné pohyby, splašenie sa, samozraňujúce údery a nadmerná vokalizácia. V intenzívnych chovateľských podmienkach sa vyskytujú tzv. stereotypie. Môžeme ich definovať ako relatívne nemenné, pravidelne sa opakujúce správanie bez zjavnej funkcie (Kiley-Worthington, 1977; ÖDBERG, 1978). Bolo zistené, že vykonávanie stereotypii znižuje fyziologickú odpoveď na vyvolávajúci faktor. REDBO *et al.* (1996) uvádza, že napriek umiestneniu v rovnakých podmienkach, vždy sa vyskytnú jedince, ktoré neodpovedajú stereotypiami. Dôvodom je zrejme rozdielne vnímanie faktorov prostredia individuálnymi jedincami nielen na základe predchádzajúcich skúseností ale aj vďaka genetickej predispozícii.

ŠTANDARDY PRE STANOVENIE WELFARE

Na stanovenie vplyvu rôznych systémov chovu na welfare je potrebné nájsť vhodný spôsob na stanovenie požadovaných štandardov welfare, ktorý by mohol byť aplikovaný v rôznych podmienkach.

V Rakúsku bol na tento účel vyvíjaný „Animal Need Index“ – ANI („Tiergerechtheitsindex“ – TGI) od roku 1985 (BARTUSSEK, 1999). V Nemecku vznikol podobný systém s rovnakým názvom (SUDRUM *et al.*, 1994). ANI bol vyvinutý na stanovenie welfare u hovädzieho dobytku, ošípaných a nosníc so zreteľom najmä na organické poľnohospodárstvo. Oba systémy stanovujú dopad ustajňovacích priestorov na welfare zvierat. Väčšina sledovaných parametrov sú environmentálne ukazovatele. Animal-based parametrov je stanovovaných len niekoľko. Hodnotenie stavu welfare na farme sa robí na základe jednorazovej návštevy, po ktorej nasleduje vyhodnotenie zozbieraných dát. ANI je veľmi praktický a ľahko opakovateľný.

Dánsky projekt „Development of Ethical Account for Animal Husbandry“ bol prototypom stanovenia welfare pre dojnice a ošípané (SORENSEN *et al.*, 1998). Cieľom bolo poskytnúť farmárom podrobnú analýzu stavu welfare v ich chove a zároveň poukázať na možné spôsoby prípadnej nápravy. Stanovenie welfare sa v tomto prípade opieralo o štyri zdroje: ustajnenie, manažment, záznamy správania sa zvierat (vrátane interakcie človek – zviera) a zdravotné parametre. V tomto prípade boli sledovania viac krát opakované.

Vo Švajčiarsku vláda poskytuje finančnú podporu chovateľom dojníc, ktorých chovy sú považované za „welfare-friendly“. Pre vyhodnotenie efektivity a vplyvu na welfare zvierat

tohto programu bola Švajčiarskym federálnym veterinárnym úradom metóda stanovenia welfare, ktorá je založená na opise ustajnenia, dotazníku pre farmárov, behaviorálnych sledovaniach (správanie sa počas líhania a vstávania a reakcia na manipuláciu) a klinických vyšetreniach dojníc (výskyt poranení, kvalita paznechtov, kondícia zvierat). Až polovica zaznamenaných parametrov bola „animal-based“. Vedci zhromažďovali údaje počas štyroch návštev v priebehu dvoch rokov (JOHNSEN *et al.*, 2001).

Vo Francúzsku vyvinutá metóda využíva multidimenzionálne diagnostické prostriedky pre stanovenie welfare na farme (CAPDEVILLE and VEISSER, 2001). Za definíciu welfare je považovaných Päť slobôd. Na ich základe bolo stanovených 42 „animal-based“ parametrov, ako napríklad pohyb, zranenia alebo interakcie s ostatnými zvieratami. Týchto 42 parametrov je ďalej rozdelených na stupne. Výsledkom je šablóna so 104 možnosťami. Napríklad líhanie sa môže vyskytovať v týchto modalitách: 1. normálne, 2. náznakové (intentional) alebo 3. prerušované (interrupted). Cieľom stanovenia welfare na úrovni stáda je 1. stanovenie úrovne welfare na individuálnych farmách ako aj 2. pre skupiny fariem, 3. zhodnotenie ustajnenia, 4. diagnostika problémov v oblasti welfare a 5. poradenstvo ohľadom možných riešení.

V Anglicku bolo zhodnotených 53 fariem. Stanovenie je taktiež založené na filozofii „Piatich slobôd“ (WHAY *et al.*, 2003a). Jednotlivé pozorované „animal-based“ parametre zahŕňajú: BSC (body score condition) pre kondíciu zvieratá (EDMONSON *et al.*, 1989; BURKHOLDER, 2000), identifikáciu a ohodnotenie krívania (WHAY *et al.*, 2002), ohodnotenie karpálnych lézií (WECHSLER *et al.*, 2000) a stanovenie temperamentu zvierat – útekovej vzdialenosti (PURCELL *et al.*, 1988, FISHER *et al.*, 2000).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bartussek, H. A review of the animal needs index (ANI) for the assessment of animals “well-being” in the housing systems for Austrian proprietary products and legislation. *Livestock Production Sci.* 1999; 61:179-192.
- Broom, D. M., ed. *Coping with Challenge. Welfare in Animals including Humans.* Dahlem University Press. 2001.
- Burkholder, W. J. Use of bodycondition scores in clinical assessment of the provision of optimal nutrition. *J of the Amer Veter Medic Assoc.* 2000; 217:650-654.
- Capdeville, J., Veissier, I. A method of assessing welfare in loose housed dairy cows at farm level, focusing on animal observation. *Acta Agriculturae Scandinavica - Section A : Animal Science.* 2001; 30:62-68.
- Dallman, M. F. Stress and sickness decrease food intake and body weight: How does it happen? When does this adaptive response progress to pain and suffering?. In *Coping with Challenge. Welfare in Animals including Humans* (Broom, D. M., ed.), Dahlem University Press. 2001; p. 301-316.
- Dawkins, M. S. A user's guide to animal welfare science. *Trends in Ecology and Evolution.* 2006; 21 (2):77-82.
- Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T., Webster, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J of Dairy Sci.* 1989; 72:68-78.
- Fisher, A. D., Morris, C. A., Matthews, L. R. Cattle behaviour: comparison of measures of temperament in beef cattle. *Procc of the New Zealand Soc of Anim Production.* 2000; 60:214-217.
- Fraser, A. F., Broom, D. M. *Farm animal behaviour and welfare.* 3rd edn Bailliere Tindall, London. 1990; pp 437.
- Irwin, M. The immune correlates of depression. *Adv Exp Med Biol,* 1999, 461, 1-24.

- Johnsen, P. F., Johannesson, T., Sandoe, P. Assessment of farm animal welfare at herd level: Many goals, many methods. *Acta Agriculturae Scandinavica - Section A: Animal Science*. 2001; 30:26-33.
- Kiley-Worthington, M. Behavioural problems of farm animals. Oriel Press, Stocksfield. 1977; pp 134.
- Korte, S. M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. In *Neuroscience and Behavioral Reviews*. 2001; 25:117-142.
- Oatley, K., Jenkins, J. M. *Understanding Emotions*, Blackwells. 1996.
- Ödberg, F. O.: Animal behaviours (stereotypes). In: 1st World-Congress on Ethology Applied Zootechnics. 1978, Madrid, Spain. Industrias Gráficas Espana, Madrid. 1978; 475-480.
- Purcell, D., Arave, C. W., Walters, J. L. Relationship of three measures of behaviour to milk production. *Appl Anim Behav Sci*. 1988; 21:307-313.
- Redbo, I., Emanuelsson, M., Lundberg, K., Oredsson, N. Feeding level and oral stereotypes in dairy cows. *Anim Sci*. 1996; 62:199-206.
- Rushen, J. Problems associated with the interpretation of physiological data in the assessment of animal welfare. *Appl Anim Behav Sci*. 1991; 28:381-386.
- Sandoe, P., Munksgaard, L., Badsgaard, N. P., Jensen, K. H. How to manage the management factor – assessing animal welfare at farm level. In *Livestock Farming Systems, More than food production*. 1997, edited by Jan Tind Sorensen, EAAP Publication No 89, 221-230.
- Sorensen, J. T., Sandoe, P., Halberg, N. *Etisc Regnskab for Husdyrbrug*, DSR forlag, 1998; 216 pp.
- Sundrum, A., Andersson, R., Postler, G. *Tiergerechtheitsindex – 200*. Institut für Organischen Landbau, Bonn, 1994.
- Wechsler, B., Schaub, J., Friedly, K., Hauser, R. Behaviour and leg injuries in dairy cows kept in cubicle systems with straw bedding or soft lying mats. *Appl Anim Behav Sci*. 2000; 69:189-197.
- Whay, H. R., Main, D. C. J., Green, L. E., Webster, A. J. F. Assessment of the welfare of dairy cattle using animal-based measurements: direct observations and investigation of farm records. *The Veterinary Record*. 2003a; 153-197-202.
- Whay, H. R., Main, D. C. J., Green, L. E., Webster, A. J. F. Farmer perception of lameness prevalence. *Procc of the 12th international symposium on lameness in ruminants*, Orlando, USA. 2002; 355-358.
- Whay, H.R. et al. Animal-based measures for the assessment of welfare state of diary cattle, pigs and laying hens: Consensus of expert opinion. *Animal Welfare*. 2003b; 12 (2):205-217.

ANTIBIOTICKÁ REZISTENCIA KMEŇOV STAFYLOKOKOV IZOLOVANÝCH Z MECHANICKY SEPAROVANÉHO HYDINOVÉHO MÄSA

Mártonová M., Pipová M., Jevinová P.

Katedra hygieny a technológie potravín, UVL, Košice

ABSTRAKT

Antibiotická rezistencia je vážnym a stále narastajúcim verejným zdravotným problémom. 63 koagulázo-pozitívnych kmeňov stafylokokov izolovaných z mechanicky separovaného hydínového mäsa bolo podrobených testovaniu ich citlivosti voči 10 antibiotikám pomocou diskovej difúznej metódy. Z výsledkov vyplýva, že stafylokokové kmene najčastejšie vykazovali rezistenciu voči penicilínu a ampicilínu. Väčšina kmeňov zaznamenala polyrezistenciu voči 2 antibiotikám súčasne, avšak až 36,1% netypických koagulázo-pozitívnych kmeňov bolo citlivých voči všetkým antibiotikám. Najčastejšie sa vyskytujúcou dvojkombináciou antibiotík bola kombinácia P₁₀-AMP₁₀, z trojkombinácií to boli P₁₀-AMP₁₀-VAN₃₀ vo všetkých koagulázo-pozitívnych stafylokokových kmeňoch, P₁₀-AMP₁₀-TE₃₀ u typických koagulázo-pozitívnych kmeňov a P₁₀-AMP₁₀-E₁₅ u netypických koagulázo-pozitívnych kmeňov stafylokokov. Najúčinnějšími antibiotikami boli u typických koagulázo-pozitívnych kmeňov streptomycín a metilicín a u netypických koagulázo-pozitívnych kmeňov to bol tetracyklín.

ÚVOD

Vývoj antimikrobiálnej rezistencie v posledných štyroch desaťročiach viedol k zintenzívneniu diskusie o používaní antimikrobiálnych látok, najmä v oblasti veterinárnej medicíny, výživy a poľnohospodárstva (Caprioli a kol., 2000). Táto nepriaznivá situácia vedie ku globálnej snahe riešiť problém antibiotikorezistencie vo svetovom poľnohospodársko-potravinárskom komplexe, nakoľko potraviny a suroviny živočíšneho pôvodu predstavujú trvalý donor génov rezistencie do humánnej mikróflóry cestou potravinového reťazca (Pipová a kol., 2003). Stafylokoky patria medzi najbežnejšie príčiny infekcií vtákov. Sú často detekované v hydínových výrobkoch určených pre ľudskú konzumáciu (Mead a Dodd, 1990; Rosec a kol., 1997; Manie a kol., 1998) a cez potravinový reťazec sa tak dostávajú až k človeku. *Staphylococcus aureus* ako hlavný zástupca koagulázo-pozitívnych stafylokokov je dôležitým patogénom v súvislosti s jeho produkciou enterotoxínov, invazívnosťou a antibiotickou rezistenciou (Le Loir a kol., 2003).

MATERIÁL A METODIKA

V roku 2006 bolo mikrobiologickému vyšetreniu podrobených 13 vzoriek mechanicky separovaného hydínového mäsa produkovaného v závode HYDINA ZK a.s., Košice na zariadení typu Protecon MRS 30 E.

V zmysle pokynov STN EN 6888-1 sa na izoláciu vhodných kmeňov stafylokokov použila arbitrážna selektívno-diagnostická pôda podľa Baird-Parkera (HI-MEDIA, India). 93 takto získaných izolátov stafylokokov sa po pomnožení v bujóne s mozgovo-srdcovou infúziou (BHI bujón, OXOID, Veľká Británia) podrobilo plazmokoagulázovej skúške (STAFYLO PK, IMUNA, Šarišské Michalany). Za pozitívnu reakciu sa považovalo vytvorenie koagulátu počas 1, 2, 3, 6 alebo 24 hodín.

Citlivosť izolovaných kmeňov stafylokokov voči vybraným antibiotikám sa zisťovala mikrobiologickou diskovou difúznou metódou (CLSI, 2005). 0,1 ml inokula testovaných stafylokokových izolátov z BHI-bujónu sa po 24-hodinovej inkubácii pri teplote 37°C rozterom vyočkovalo na povrch agaru podľa Mueller-Hintona (HI-MEDIA, India). Koncentrácia inokula podľa McFarlandovho zákalového štandardu zodpovedala stupňu 0,5 (t.j. 1×10^8 buniek.ml⁻¹). Na povrch agaru sa potom sterilnou injekčnou ihlou aplikovali

komerčne vyrábané štandardné disky so známymi koncentráciami antibiotík (OXOID, Veľká Británia): penicilín 10 μ g (P₁₀); ampicilín 10 μ g (AMP₁₀); meticilín 5 μ g (MET₅); oxacilín 1 μ g (OX₁); erytromycín 15 μ g (E₁₅); streptomycín 10 μ g (S₁₀); tetracyklín 30 μ g (TE₃₀); novobiocín 30 μ g (NV₃₀); vankomycín 30 μ g (VAN₃₀) a gentamicín 10 μ g (CN₁₀). Po 24-hodinovej inkubácii pri teplote 37°C sa odmerali veľkosti priemerov zón inhibície okolo diskov s vyššie uvedenými koncentráciami antibiotík. Rezistencia, intermediárna citlivosť alebo citlivosť vyšetrovaných izolátov voči danému antibiotiku sa vyhodnotila podľa interpretačných kritérií CLSI (2005) pre diskový difúzny test.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

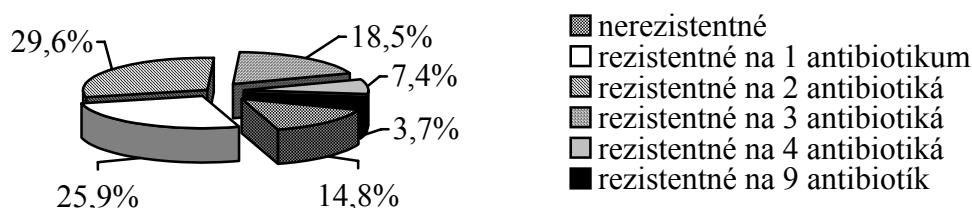
Po vyhodnotení plazmokoagulázového testu sa zistilo, že z 93 vybraných izolátov stafylokokov rastúcich na povrchu média podľa Baird-Parkera vo forme typických a netypických kolónií bolo 63 koagulázo-pozitívnych (67,7 %) a 30 koagulázo-negatívnych (32,3 %). Koagulázo-pozitívne kmene stafylokokov sa podrobili testovaniu ich citlivosti voči vybraným antibiotikám diskovou difúznou metódou.

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že podľa kritérií CLSI (2005) sa u 27 (42,7%) typických koagulázo-pozitívnych kmeňov stafylokokov najčastejšie vyskytovala rezistencia voči P₁₀ (15 izolátov = 55,6%). Menej ako polovica stafylokokových izolátov (11 kmeňov = 40,7%) bola rezistentná voči AMP₁₀ a takmer tretina stafylokokových kmeňov voči E₁₅ (8 kmeňov = 29,6%). Takmer 1/5 stafylokokových kmeňov (5 izolátov = 18,5%) vykazovala rezistenciu voči TE₃₀ a rovnaký stupeň rezistencie bol zistený aj voči VAN₃₀ a CN₁₀. 11,1%-ná rezistencia (3 izoláty) sa zistila voči OX₁ a iba 2 izoláty (7,4%) neboli vôbec citlivé na NV₃₀. Najmenej často sa prejavila rezistencia voči MET₅ a S₁₀ (1 izolát = 3,7%).

Podľa CLSI (2005) sa zistila nasledovná intermediárna citlivosť typických koagulázo-pozitívnych stafylokokových kmeňov voči trom testovaným antibiotikám: E₁₅ (9 izolátov = 33,3%), S₁₀ (6 izolátov = 22,2%) a TE₃₀ (1 izolát = 3,7%).

Až 85,1% typických koagulázo-pozitívnych stafylokokových izolátov bolo rezistentných aspoň na jeden druh antibiotika (Graf 1) – najčastejšie sa jednalo o rezistenciu voči dvom antibiotikám (50,0% voči P₁₀-AMP₁₀) a monorezistenciu (42,9% voči CN₁₀). Polyrezistencia voči trom antibiotikám sa vyskytovala už menej často (18,5%), z toho až 75,0% pripadalo na trojicu P₁₀-AMP₁₀-VAN₃₀. U jedného kmeňa sa vyskytla polyrezistencia až voči deviatim z desiatich testovaných antibiotík (okrem E₁₅).

Graf 1 Percentuálne zastúpenie polyrezistencie u typických koagulázo-pozitívnych kmeňov stafylokokov



Najčastejšie sa vyskytujúcou dvojkombináciou antibiotík, voči ktorým bolo súčasne rezistentných najviac typických koagulázo-pozitívnych stafylokokov (40,7%) bola kombinácia P₁₀-AMP₁₀. Takmer trojnásobne menší výskyt rezistencií (14,8%) sa zaznamenal voči dvojkombináciám VAN₃₀ s P₁₀ a AMP₁₀. Viac ako desatina (11,1%) kmeňov vykazovala rezistencie voči ďalším dvojkombináciám penicilínu s oxacilínom, erytromycínom a tetracyklínom a tetracyklínu s erytromycínom a ampicilínom, ktoré sa zamenali v troch stafylokokových izolátoch. Z hľadiska trojkombinácií, prevládali rezistencie voči

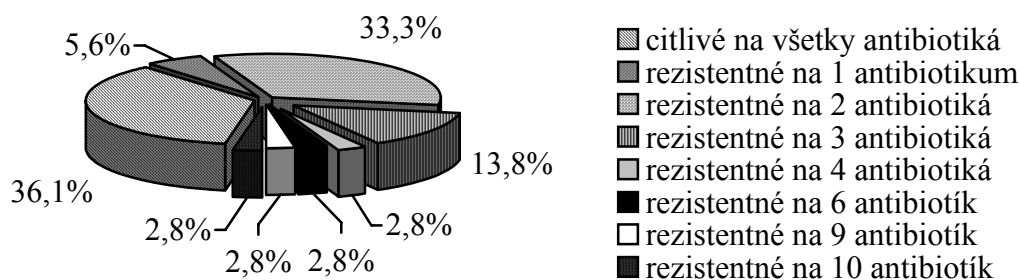
antibiotikám v kombinácii s dvojicou P₁₀-AMP₁₀: 14,8% izolátov bolo rezistentných voči P₁₀-AMP₁₀-VAN₃₀ a rovnako aj voči P₁₀-AMP₁₀-TE₃₀.

Pri testovaní 36 (57,1%) netypických koagulázo-pozitívnych stafylokokových izolátov sa zistilo, že až 20 z nich (55,6%) nebolo citlivých voči P₁₀, viac ako polovica (52,8%) voči AMP₁₀ a takmer 1/5 kmeňov (19,5%) vykazovala rezistenciu voči E₁₅. Podobne ako u typických koagulázo-pozitívnych stafylokokov bolo až 5 kmeňov (13,9%) rezistentných voči CN₁₀. Viac ako desatina kmeňov (11,1%) zaznamenala rezistenciu voči VAN₃₀ a rovnako aj voči S₁₀. Rovnaký stupeň rezistencie (8,3%) vykazovali stafylokokové kmene voči MET₅, OX₁ a NV₃₀ a najmenej často sa prejavila rezistencia voči TE₃₀ (2 izoláty = 5,6%).

Podľa CLSI (2005) sa za intermediárne citlivé netypické koagulázo-pozitívne kmene stafylokokov považovalo 5 izolátov (13,9%) voči E₁₅, 3 izoláty (8,3 %) voči S₁₀, 2 izoláty voči NV₃₀ (5,6%) a 1 izolát (2,8%) voči TE₃₀.

Väčšina netypických koagulázo-pozitívnych stafylokokov (63,9%) bola rezistentná aspoň na 1 druh antibiotika, z toho najčastejšie (33,3%) sa vyskytovala rezistencia voči 2 antibiotikám (91,7% voči P₁₀-AMP₁₀) rovnako ako pri typických koagulázo-pozitívnych stafylokokoch (Graf 2). Najviac kmeňov (36,1%) však bolo citlivých voči každému z testovaných antibiotík. Polyrezistencia voči trom antibiotikám sa vyskytovala len u 13,8% kmeňov, ale zaznamenala sa aj polyrezistencia voči všetkým z testovaných antibiotík. (1 izolát = 2,8%).

Graf 2 Percentuálne zastúpenie polyrezistencie u netypických koagulázo-pozitívnych kmeňov stafylokokov



Z hľadiska kombinácií antibiotík, 52,8% netypických koagulázo-pozitívnych stafylokokových kmeňov nebolo citlivých voči P₁₀ a súčasne AMP₁₀. Takmer štvornásobne (13,9%) menej kmeňov vykazovalo rezistenciu voči P₁₀-E₁₅. Rovnaký stupeň výskytu (11,1%) zaznamenali ďalšie dvojkombinácie antibiotík: P₁₀-VAN₃₀, AMP₁₀-VAN₃₀, AMP₁₀-E₁₅, S₁₀-E₁₅. Čo sa týka trojkombinácií, jednoznačne prevládali kombinácie antibiotík s dvojicou P₁₀-AMP₁₀: 11,1% stafylokokových kmeňov bolo súčasne rezistentných voči P₁₀-AMP₁₀-VAN₃₀ a P₁₀-AMP₁₀-E₁₅ a 8,3%-ný výskyt zaznamenali kombinácie P₁₀-AMP₁₀-CN₁₀ a P₁₀-AMP₁₀-NV₃₀.

Všeobecne uznávaným faktom je, že nárast rezistencie mikrobov je pri niektorých antibiotikách explozívny a alarmujúci. Podľa Saeeda a kol. (2000) boli stafylokokové kmene izolované z hydiny citlivé na ampicilín, penicilín a ciprofloxacín a rezistentné voči streptomycínu, tetracyklínu, erytromycínu, linkomycínu a azitromycínu.

Prenos antibiotikorezistencie medzi stafylokokovými kmeňmi bol sledovaný najmä na ľudských izolátoch, štúdie transferu rezistencie medzi živočíšnou a ľudskou populáciou sa vyskytujú zriedkavejšie (Lacey, 1980; Muhammad a kol., 1993). Najmenej dostupné sú informácie o mechanizme prenosu medzi aviárnymi a ľudskými kmeňmi stafylokokov (Saeed a kol.,2000).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Caprioli A, Busani L, Martel JL and Helmuth R. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2000; 14:295-301.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - 15th Informational Supplement Approved Standard, M100-S15. 2005; Vol.25.
- Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, and Cerniglia CE. Transfer of erythromycin resistance from poultry to human clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:1832-1838.
- Lacey RW. Rarity of gene transfer between animal and human isolates of *Staphylococcus aureus* in vitro. *J. Gen. Microbiol.* 1980; 119:437-442.
- Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2003; 2(1):63-76.
- Manie T, Khan S, Brozel VS, Veith WJ, Gouws PA. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South Africa. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998; 26:253-8.
- Mead GC, Dodd CE. Incidence, origin and significance of staphylococci on processed poultry. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 1990; 19:81-91.
- Muhammad G, Hoblet KH, Jackwood DJ, Nielsen SB and Smith KL. Interspecific conjugal transfer of antibiotic resistance among staphylococci isolated from the bovine mammary gland. *Am. J. Vet. Res.* 1993; 54:1432-1440.
- Pipová M, Nagy J, Kožárová I, Laciaková A, Plachá I. Citlivosť koagulázo-negatívnych kmeňov stafylokokov z hlbokomrazených kurčiat voči vybraným antibiotikám. Zborník „Hygiena Alimentorum XXIV“, Štrbské Pleso, Vysoké Tatry, 4.- 6.6.2003: 219-222.
- Rosec JP, Guiraud JP, Dalet C and Richard N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int. J. Food Microbiol.* 1997; 35:213-221.
- STN EN ISO 6888-1. Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda stanovenia počtu koagulázopozitívnych stafylokokov. Časť 1: Metóda s použitím Baird-Parkerovho agarového média. SÚTN Bratislava, 2001.

MULTIPLEX PCR –METÓDA NA DETEKCIU ENTEROTOXIGÉNNYCH KMEŇOV *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Mašlanková J., Tkáčiková L.

Ústav mikrobiológie a imunológie, UVL, Košice

ABSTRAKT

Multiplex PCR metóda umožňuje rýchlu jedнокrokovú identifikáciu génov, ktoré kódujú stafylokokové enterotoxíny (*sea, seb, sec, sed, see*). Cieľom tejto práce bolo stanoviť prítomnosť génov pre tieto enterotoxíny v 199 koagulázo-pozitívnych izolátoch *S.aureus* získaných z tepelne neopracovaných potravín (surové kravské, kozie a ovčie mlieko, ovčí syr, bryndza, n = 106) a z humánných klinických materiálov (n = 93). Zo 106 potravinových izolátov *S. aureus* sme v 44 izolátoch (42 %) detekovali aspoň jeden gén pre stafylokokový enterotoxín. Najčastejšie sa vyskytoval gén pre enterotoxín C (*sec*), ktorý sme detegovali v 19 (18 %) potravinových izolátoch. V humánných izolátoch *S. aureus* sme v 48 vzorkách (52 %) detekovali prítomnosť enterotoxínových génov, pričom aj v týchto vzorkách bol najčastejší výskyt génu pre enterotoxín C (*sec*), ktorý sme detegovali v 23 vzorkách (25 %). V humánných vzorkách sme na rozdiel od potravinových vzoriek zistili výskyt všetkých 5 sledovaných enterotoxínových génov, zatiaľčo žiaden potravinový izolát nemal gén pre enterotoxín E (*see*).

ÚVOD

Stafylokokové enterotoxíny (SE) sú druhou najčastejšiou príčinou otráv z potravín (spôsobujú takmer 2/3 týchto ochorení)(Balaban a kol., 2000). SE odolávajú pôsobeniu proteolytických enzýmom GITu a sú odolné voči varu po dobu 30 minút. V súčasnej dobe je opísaných 19 stafylokokových enterotoxínov: SEA-SEE, SEG-SER, SEU a SEV (Thomas a kol., 2006). Po konzumácii tepelne neopracovaných alebo nesprávne skladovaných potravín, ktoré boli kontaminované enterotoxigénnymi kmeňmi *S. aureus*, vzniká alimentárna otrava, enterotoxikóza. Na účinky SE je najnámavejší človek, u ktorého sa príznaky intoxikácie objavujú po dávke asi 0,4 µg/kg telesnej hmotnosti.

Cieľom tejto práce je porovnať prítomnosť génov pre enterotoxín A (*sea*), B (*seb*), C (*sec*), D (*sed*) a E (*see*) vo vzorkách *S. aureus* izolovaných z tepelne neopracovaných potravín a humánných klinických izolátov *S. aureus*.

MATERIÁL A METODIKA

Bakteriálne kmene: *S. aureus* bol izolovaný štandardnými bakteriologickými postupmi zo surového kravského (n = 2), ovčieho (n = 73) a kozieho (n = 1) mlieka; z ovčieho syra (n = 24) a z bryndze (n = 6); ako aj z humánných klinických materiálov (n = 93). Izoláty *S. aureus* boli uskladnené vo forme glycerínovej konzervy pri -20 °C.

Izolácia DNA: DNA bola izolovaná z bujónovej kultúry *S.aureus* podľa postupu opísanom Heinom a kol. (2005).

Oligonukleotidové primery: Na PCR reakciu boli použité oligonukleotidové primery publikované Sharmom a kol. (2000).

PCR amplifikácia: Na PCR reakciu boli použité primery, ktoré sú uvedené v Tab.1. Podmienky PCR reakcií sú uvedené v Tab.1., pričom vždy bolo použitých 30 amplifikačných cyklov.V každej PCR reakcii bola použitá iniciálna denaturácia (8 min., 95°C), po ktorej nasledovalo 30 cyklov vlastnej amplifikácie a finálna extenzia (7 min., 72°C).

Detekcia amplifikovanej DNA: PCR produkty boli analyzované v 1,5 % agarózovom gély v TAE tlmivom roztoku. Gél bol po ofarbení etídium bromidom vizualizovaný pod UV lampou. Ako štandard molekulevej hmotnosti bol použitý 100 bp ladder.

Tab.č.1. Oligonukleotidové primery použité na PCR (Sharma a kol., 2000)

PRIMER	Nukleotidová sekvencia 5'-3'	Produkt (bp)	Podmienky PCR
Sa-U (F)	TGT ATG TAT GGA GGT GTA AC	-	94°C 5 min,
SA-A	ATT AAC CGA AGG TTC TGT	270	30x 94°C 30s,
SA-B	ATA GTG ACG AGT TAG GTA	165	50°C 30s,
SA-C	AAG TAC ATT TTG TAA GTT CC	102	72°C 30s,
SA-D	TTC GGG AAA ATC ACC CTT AA	306	72°C 7 min
SA-E	GCC AAA GCT GTC TGA G	213	

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkovo sme vyšetrili 198 vzoriek *S.aureus* izolovaných z potravín (mlieka, ovčieho syra a bryndze) a humánných klinických vzoriek. Výhodou multiplex-PCR, ktorú sme použili na stanovenie prítomnosti jednotlivých enterotoxínových génov je použitie setu primerov pozostávajúcich z jedného univerzálneho *forward* primeru a piatich *reverse* primerov, z ktorých každý je špecifický pre iný enterotoxínový gén (Tab.1.). Prítomnosť jednotlivých enterotoxínových génov bola potvrdená na základe prítomnosti PCR produktu o známej veľkosti (Tab.1.).

V potravinových izolátoch *S. aureus* sme iba v 45 (42 %) vzorkách zaznamenali prítomnosť aspoň jedného génu pre enterotoxín (Tab. 2.), pričom sme najčastejšie zaznamenali výskyt enterotoxigénnych kmeňov *S. aureus* vo vzorkách z ovčieho mlieka a syra. Izoláty *S. aureus* pochádzajúce zo surového kravského mlieka ako aj z bryndze nemali žiaden enterotoxínový gén. Vo vzorkách zo surového ovčieho mlieka sa najčastejšie vyskytovali izoláty so *sec* (18 %), *seb* (12 %), *sed* (7 %) a *sea* (4 %) génmi, zatiaľčo vo vzorkách z ovčieho syra sa najčastejšie vyskytovali izoláty so *sec* (21 %) a *seb* (4 %) génmi. Vo vzorkách z ovčieho mlieka sme detekovali prítomnosť génov pre dva enterotoxíny *seb+sec* (5 %), *sea+seb* (1 %) a *seb+sed* (1 %), zatiaľčo v 2 vzorkách (8 %) ovčieho syra sme detekovali prítomnosť génov pre enterotoxíny *sec+sed*. Jeden izolát zo surového kozieho mlieka bol pozitívny pre *sec* gén. Gén pre enterotoxín E (*see*) sme nedetekovali v žiadnom potravinovom izoláte *S. aureus* (Tab.2.).

K podobným výsledkom dospeli aj Morandi a kol. (2007), ktorí identifikovali gény pre enterotoxíny u *S. aureus* izolovaných z kravského, ovčieho a kozieho mlieka a ich produktov. Títo autori zaznamenali vyššiu prevalenciu enterotoxigénnych kmeňov, pretože až v 67 % izolátov *S.aureus* detegovali aspoň jeden gén pre enterotoxín. V bovinných izolátoch boli detegované najčastejšie *sea* a *sed* gény, zatiaľ čo v izolátoch z ovčieho a kozieho mlieka *sec* gén, čo sme aj my zistili v našich izolátoch pochádzajúcich z ovčieho mlieka a syra a kozieho mlieka.

Boerema a kol. (2006) sa venovali porovnaniu prítomnosti stafylokových enterotoxínových génov v ovčích, bovinných a humánných izolátoch *S. aureus*. Aj títo autori zistili vyššiu prevalenciu (67,7 %) izolátov pozitívnych pre jeden alebo viac enterotoxínových génov. Prevalencia enterotoxínových génov bola vyššia v humánných izolátoch (80,7 %), zatiaľ čo ich prevalencia v ovčích izolátoch bola 63 % a v bovinných izolátoch 61,9 %.

V 93 humánných izolátoch *S. aureus* z klinického materiálu sme v 48 vzorkách (52 %) detekovali 1 a viac génov pre enterotoxíny: *sec* gén bol v 23 (25 %), *sea* gén v 10 (11 %), *sed* gén v 8 (9 %), *see* gén v 2 (2 %) a *seb* gén iba v jednej vzorke (1 %). V 4 humánných izolátoch sme detekovali súčasne gény pre 2 enterotoxíny a to kombináciu *sec+sed* génov v 3 izolátoch a *sea+sec* génov v 1 izoláte. Gén *see* sme detekovali v 2 humánných izolátoch *S. aureus* (Tab.2).

Naffa a kol. (2006) vytvorili zbierku humánných klinických izolátov *S. aureus* a detegovali prítomnosť génov pre enterotoxíny, pričom 23 % izolátov bolo pozitívnych aspoň pre jeden

enterotoxínový gén, čo je nižšia prevalencia enterotoxigénnych kmeňov než sme to pozorovali v našom súbore humánných vzoriek *S. aureus*. Na rozdiel od našich výsledkov, títo autori v žiadnom z ich izolátov nedetegovali prítomnosť *sed*, *seb* alebo *see* génov. Mehrotra a kol. (2000) zistili, že zo 107 izolátov *S.aureus* získaných od zdravých ľudí bolo 19,6 % izolátov pozitívnych pre *sea* gén. Tieto zistenia poukazujú na to, že mnoho zdravých ľudí je nosičom enterotoxigénnych kmeňov *S.aureus*.

V našom súbore 199 izolátov živočíšneho (potravinového) a humánneho pôvodu sme zaznamenali pomerne vysokú 47 % prevalenciu enterotoxigénnych izolátov *S. aureus*. Iba v humánných vzorkách sme zistili prítomnosť všetkých piatich enterotoxínových génov (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* a *see*), pričom najvyššiu prevalenciu mali tak humánne ako aj živočíšne izoláty nesúce *sec* gén (18 %). V živočíšnych vzorkách sme vôbec nezaznamenali prítomnosť *see* génu. Z tohto hľadiska sú tepelne neopracované mlieko a výrobky z neho kontaminované enterotoxigénnymi izolátmi humánneho pôvodu potenciálnym zdrojom stafylokokových enterotoxikóz.

Tab.č.2. Porovnanie prítomnosti génov pre enterotoxíny v izolátoch *S. aureus* z rôznych zdrojov.

Gén	POTRAVINOVÉ IZOLÁTY (n = 106)										Humánne izoláty (n = 92)	
	Mlieko						Ovčí syr		Bryndza			
	kravské		ovčie		kozie		n = 24	%	n = 6	%	n = 93	%
	n = 2	%	n = 73	%	n = 1	%						
<i>sea</i>	0	0	3	4	0	0	0	0	0	0	10	11
<i>seb</i>	0	0	9	12	0	0	1	4	0	0	1	1
<i>sec</i>	0	0	13	18	1	100	5	21	0	0	23	25
<i>sed</i>	0	0	5	7	0	0	0	0	0	0	8	9
<i>see</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
<i>sec+sed</i>	0	0	0	0	0	0	2	8	0	0	3	3
<i>sea+sec</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>sea+seb</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>seb+sec</i>	0	0	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>seb+sed</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Spolu ¹	0	0	36	49	1	100	8	33	0	0	48	52
Spolu ²	2	100	37	51	0	0	16	67	6	100	45	48

Legenda: 1 – všetky izoláty s aspoň jedným enterotoxínovým génom

2 – všetky izoláty bez enterotoxínového génu

POUŽITÁ LITERATÚRA

Balaban N, Rasooly A., Staphylococcal enterotoxins. Int. J. Food Microbiol. 2000; 61(1):1-10.

Boerema, J. A., Clemens, R., Brightwell, G., Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Food. Microbiol. 2006; 107 (2):192-201.

Hein, I., Jorgensen, H. J., Loncarevic, S., Wagner, M.: Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by real-time PCR. Res.microbiol. 2005; 156(4): 554-63.

- Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W. M., Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J.Clin.Microbiol.* 2000; 38(3):1032-5.
- Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in Staphylococcus aureus from milk and dairy products., *Vet.Microbiol.* 2007; (Epub ahead of print).
- Naffa, R. G., Bdour, S. M., Migdadi, H. M., Shehabi, A. A., Enterotoxicity and genetic variation among clinical Staphylococcus aureus, *J.Med.Microbiol.* 2006; 55(Pt2):183-7.
- Sharma, N. K., Rees, C. E., Dodd, C. E.,: Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for Staphylococcus aureus strains. *Appl Environ Microbiol.* 2000, 66(4):1347-53.
- Thomas, D. Y., Jarraud, S., Lemercier, B., Cozon, G., Echasserieau, K., Etiene, J., Gougeon, M. L., Lina, G., Vandenesch, F., Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster, *Infect.Immun.*, 2006; 74(8):4724-34.

POUŽITIE POSTCONDITIONINGU PRI NEURODEGENERÁCII PO ISCHÉMII V NAJCITLIVEJŠÍCH REGIÓNOCH MOZGU POTKANA

Matiašová M., Kravčuková P., Jergová S., Burda J.

Neurobiologický ústav, SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom tejto štúdie bolo overiť úlohu postconditioningu použitého 2 dni po letálnej ischémii, kvôli ochrane selektívne vulnérabilných neurónov mozgu voči oneskorenej smrti.

8 a 10-min ischémia bola použitá ako iniciačná letálna ischémia. Prítomnosť neurodegenerácie bola sledovaná ako výskyt Fluoro-Jade B pozitívnych neurónov, kvantifikácia prežívajúcich CA1 neurónov bola sledovaná ako množstvo NeuN (špecifický neurónový marker) pozitívnych neurónov v hipokampovom CA1 regióne mozgu po ischémii s a bez retrográdnej tolerancie.

Naše výsledky potvrdili, že postconditioning použitý v správnom čase a s optimálnou intenzitou je schopný ochrániť neuróny pred procesom oneskorenej smrti. Ako postconditioning je možné použiť: krátku ischémiu, 3-nitropropiónovú kyselinu, norepinefrín, bradykinín. Použitím postconditioningu je možné predísť následkom krátkodobej letálnej ischémie na selektívne vulnérabilné neuróny CA1 hipokampu. Pre získanie tolerancie je nevyhnutná syntéza bielkovín prebiehajúca prinajmenšom v troch fázach. Prvá vlna sa objavuje 4 hodiny po krátkej ischémii, umožňuje obnovu potlačenej syntézy proteínov, ale to nepostačuje na dostatočnú ochranu. Druhá fáza objavujúca sa 2 dni po prvej ischémii sa prejavuje syntézou HSP72. Tretia vlna je provokovaná opakovaným stresom – postconditioningom. Až kombinácia týchto troch udalostí zabezpečí účinnú toleranciu. Napriek tomu, že postconditioning ochráni hipokampové CA1 neuróny pred 10-minútovou ischémiou, jeho účinok pri 15-minútovej ischémii je minimálny. 15-min ischémia reprezentuje hranicu efektívnosti postconditioningu v hipokampe.

ÚVOD

Choroby ciev patria medzi najrozšírenejšie a najzávažnejšie nielen zdravotnícke, ale aj ekonomické a sociálne problémy všetkých krajín súčasného sveta. Zapríčiňujú vysokú chorobnosť spojenú s dlhotrvajúcou práceneschopnosťou a invalidizáciou a asi polovicu úmrtí populácie, čo je dva razy viac ako druhá najčastejšia príčina úmrtnosti – onkologické choroby. Liečba a následná starostlivosť o pacientov s náhlou cievnu mozgovou príhodou (NCMP) je jednou z najdrahších.

Poškodenie mozgu ischémiou nie je uniformné, niektoré populácie neurónov sú obzvlášť citlivé, sem patrí CA1 región hipokampu. Pri kratších intervaloch ischémie bunky neodumierajú hneď, ale dochádza k apoptóze podobnej tzv. oneskorenej smrti neurónov objavujúcej sa až 3 dni po ischémii.

K najvýznamnejším metabolickým poruchám vedúcim k oneskorenej smrti neurónov patrí jednoznačne aj predĺžená inhibícia syntézy bielkovín. Ischemická tolerancia je definovaná ako prechodná obrana mozgového tkaniva vznikajúca ako reakcia na primeraný stresový podnet. Stresová odpoveď je nevyhnutná pre prežitie buniek, keďže bunky nie sú schopné vyrovať sa s náhlou akumuláciou denaturovaných bielkovín alebo s agregáciou proteínov, ktoré vznikli následkom rôznych stresov – teplotných, anoxických a oxidačných. Metabolický stres môže v organizme vyvolať širokú škálu odpovedí od žiadnej, cez indukciu tolerancie, apoptózu až po nekrozu. Hranice medzi odpoveďami nie sú jednoznačné ani v rámci jednej bunkovej populácie pričom rôzne bunkové populácie v jednom organizme sa svojou citlivosťou značne líšia.

MATERIÁL A METÓDY

V experimente boli použité samci potkanov kmeňa Wistar s hmotnosťou 250–350 g. Bol použitý model tzv. štvorcievneho upchatia (four vessel occlusion) podľa Pulsinelliho a Brierlyho (1979) v modifikácii Schmidt-Kastnera a kol., (1989). 8 alebo 10 min letálna ischemia bola po 2 dňoch nasledovaná postconditioningom, čiže opakovaným stresom (5 až 6-min ischemia, 3-nitropropiónová kyselina 20 mg/kg i.p., norepinefrín 3,1 μ mol/kg i.p., bradykinín 150 μ g/kg i.p.). Prítomnosť neurodegenerácie bola sledovaná ako výskyt Fluoro-Jade B pozitívnych neurónov, kvantifikácia prežívajúcich CA1 neurónov bola sledovaná ako množstvo NeuN (špecifický neurónový marker) pozitívnych buniek v CA1 regióne hipokampu po ischemii s a bez tolerancie.

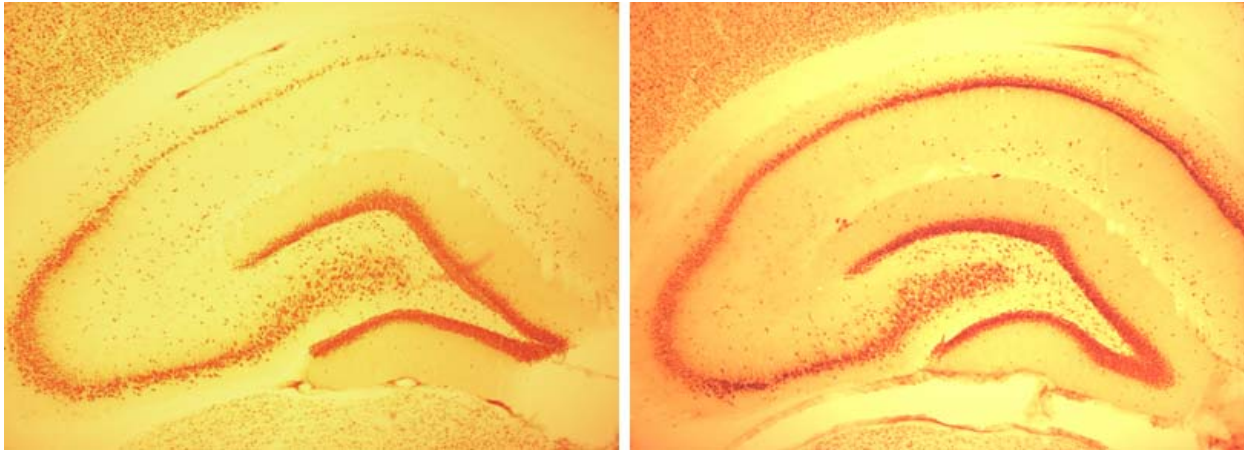
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zistili sme, že k zabráneniu postischemickej inhibície iniciácie dochádza už 4 hodiny po krátkej ischemii, samotná obnova proteosyntézy však nezabráni smrti neurónov. Rozhodujúci ochranný mechanizmus spočíva v tom, že aktivátorom koncového efektora tolerancie je opakovaný stres. Päťminútovú ischemiu a 2 dni po nej 30-min ischemiu prežilo 95% CA1 neurónov, samotná 5-min ischemia bez následnej letálnej ischemie však spôsobí degeneráciu 45% neurónov. Tento objav dokumentuje, že pre aktiváciu zásadného protektívneho mechanizmu ischemickej tolerancie je nevyhnutný druhý patofyziologický stres. Tieto zistenia nám umožnili predpokladať možnú účinnosť retrográdneho usporiadania ischemickej tolerancie použitím druhej patofyziologickej stresovej udalosti 2 dni po letálnej ischemii. Nasledujúca tabuľka sumarizuje kvantifikáciu prežívajúcich CA1 neurónov, počítaných ako množstvo NeuN (špecifický neurónový marker) pozitívnych buniek a prítomnosť neurodegenerácie, ktorá bola sledovaná ako počet Fluoro-Jade B (marker neurodegenerácie) pozitívnych neurónov v hipokampovom CA1 regióne mozgu po ischemii s a bez retrográdnej tolerancie. Ako je možné pozorovať, 7 dní po 8 min ischemii polovica CA1 pyramidových neurónov degeneruje a rovnaký počet buniek stráca aj NeuN imunoreaktivitu. Podstatne rozdielne výsledky sme získali, keď bol 2 dni po 8 min ischemickom zásahu aplikovaný postconditioning. Toto reverzné usporiadanie ischemickej tolerancie vo všetkých prípadoch (5 min ischemia, 3,1 μ mol/kg norepinefrínu, 3-NPA, bradykinín 150 μ g/kg) signifikantne redukuje množstvo degenerujúcich neurónov.

Tab. č. 1: Zmeny vo Fluoro-Jade B pozitivite a NeuN imunoreaktivite CA1 neurónov v hipokampe po ischemii bez a s aplikáciou druhej patofyziologickej udalosti

	Skupina	Neurodegenerácia Fluoro-Jade B	NeuN-imuno test
1	Sham kontrola	0	292,33 \pm 27,58
2	I 8 min R 7d	145,92 \pm 25,13	146,33 \pm 75,06 ^a
3	I 8 min R 2d/hypox 5 min R 5d	67,55 \pm 24,42 ^b	334,4 \pm 49,45 ^b
4	I 8 min R 2d/I 5 min R 5d	37,04 \pm 27,60 ^b	283,6 \pm 45,31
5	I 8 min R 2d/NE (3,1 μ M/kg) R 5d	15,67 \pm 13,33 ^b	344,5 \pm 24,91 ^b
6	I 10 min R 7d	176,5 \pm 16,18	88,37 \pm 35,58 ^a
7	I 10 min R 2d/3NPA(20 mg/kg) R 5d	65,72 \pm 49,74 ^b	291,83 \pm 69,66 ^b
8	I 10 min R 2d/NE(3,1 μ mol/kg) R 28d	-	293 \pm 15,53
9	I 10 min R 2d/I 6 min CHX (2 mg/kg) R 0h R 5d	164,33 \pm 7,67	-
10	I 10 min R 2d/I 6 min CHX (2 mg/kg) R 5h R 5d	20,78 \pm 18,06 ^b	-

Postupne sme sa dostali až k hodnotám 10-min ischemie, kde po 2-dňovej reperfúzii bola použitá ako druhý stres 5-min ischemia, výsledkom čoho bola záchrana 80% neurónov CA1 hipokampu. Z toho vyplýva, pri ischemii do 10 min. väčšinu CA1 neurónov môžeme zachrániť aktiváciou tolerancie dva dni od ischemie použitím postconditioningu. Zistili sme, že neuróny prežívajú aj po 28 dňoch, a teda nejde len o krátkodobé zlepšenie.



Obr. č. 1: NeuN imunoreakcia na prítomnosť prežívajúcich CA1 neurónov u zvierat vystavených 8 min ischemii a následnej 7-dňovej reperfúzii (vľavo) a rovnaký I/R protokol s postconditioningom ($3,1 \mu\text{mol/kg}$ NE i.p.) 2 dni po ischemickom zásahu (vpravo). Zväčšenie 40x.

Na zabránenie oneskorenej smrti neurónov je možné okrem ischemie použiť aj hypoxiu, 3-nitropropionovú kyselinu (20 mg/kg i.p.), norepinefrín ($3,1 \mu\text{mol/kg}$ i.p.) a bradykinín ($150 \mu\text{g/kg}$ i.p.). To znamená, že postconditioning správnej intenzity aplikovaný vo vhodnom čase (po 48 hodinách) môže efektívne zabrániť neurodegenerácii buniek v CA1 oblasti hipokampu, patriacim k najcitlivejším neurónom v mozgu. Pokiaľ bol 2 dni po 10 min ischemii aplikovaný inhibitor syntézy bielkovín (cykloheximid 2 mg/kg i.p.) ihneď po druhom patofyziologickom strese (5 resp. 6 min ischemia), ochranný efekt retrográdnej tolerancie sa úplne stratil, výsledkom čoho je 50% neurónov, ktoré podľahli neurodegenerácii. Zatiaľ čo podanie cykloheximidu 5 hodín po druhej ischemii (postconditioningu) nepotlačilo tento ochranný mechanizmus a viedlo k prežitiu 90% CA1 neurónov v hipokampe. Napriek tomu, že postconditioning ochráni hipokampové CA1 neuróny pred 10-minútovou ischemiou, jeho účinok pri 15 minútovej ischemii je minimálny. Akokoľvek, ochranný efekt postconditioningu u menej citlivej neurónovej populácie (cortex a striatum) je veľmi dobrý aj po 15-minútovej ischemii. 15 min ischemia reprezentuje hranicu efektívnosti postconditioningu v hipokampe. Naša štúdia tiež potvrdila, že opakovaný patofyziologický stres môže slúžiť ako spúšťač tretieho ochranného mechanizmu, ktorý je schopný zmeniť proapoptotický proces indukovaný ischemiou na antiapoptotický.

Proces oneskorenej smrti neurónov nie je ireverzibilný a v prípade kratších intervalov ischemie môže byť odvrátený až 2 dni po ischemii. Použitím postconditioningu je možné predísť následkom krátkodobej letálnej ischemie na selektívne vulnerabilné neuróny CA1 hipokampu. Dokázali sme, že pre získanie tolerancie je nevyhnutá syntéza bielkovín prebiehajúca prinajmenšom v troch fázach. Prvá vlna sa objavuje 4 hodiny po krátkej ischemii, umožňuje obnovu potlačenej syntézy proteínov, ale to nepostačuje na dostatočnú ochranu. Druhá fáza objavujúca sa 2 dni po prvej ischemii sa prejavuje syntézou HSP72.

Tretia vlna je provokovaná opakovaným stresom – postconditioningom. Až kombinácia týchto troch udalostí zabezpečí účinnú toleranciu. Prežívajúce bunky si zachovávajú aj značnú časť funkcie v zmysle schopnosti učenia a pamäte.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantmi: APVT-51-011604, APVV-51-021904, APVV-023506 a VEGA-02/6211.

Rada by som sa poďakovala svojmu školiteľovi MVDr. Jozefovi Burdovi, DrSc. za jeho všestrannú pomoc, spoluprácu, odborné vedenie, ako aj za cenné rady a hodnotné pripomienky. Za technickú spoluprácu ďakujem Vierke Ujháziovej a Danke Jurušovej.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Burda J., Matiašová M., Gottlieb M., Danielisová V., Némethová M., García L., Salinas M., Burda R.: Evidence for a role of second pathophysiological stress in prevention of delayed neuronal death in the hippocampal CA1 region. *Neurochem. Res.*, 2005; 30: 1397-1405.
- Burda J., Danielisová V., Némethová M., Gottlieb M., Matiašová M., Domoráková I., Mechírová E., Feriková M., Salinas M., Burda R.: Delayed postconditioning initiates additive mechanism necessary for survival of selectively vulnerable neurons after transient ischemia in rat brain. *Cell Mol. Neurobiol.*, 2006; 26: 1141-1151.
- Pulsinelli W.A. a Brierly J.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in unanesthetized rat. *Stroke*, 1979; 10: 256-272.
- Schmidt-Kastner R., Paschen W., Grosse O.B. a Hossmann K.A.: A modified four-vessel occlusion model for inducing incomplete forebrain ischemia in rats. *Stroke*, 1989; 20: 938-946.

VARIÁCIE ODSUPU ARTERIA VERTEBRALIS A ARTERIA THORACICA INTERNA U KRÁLIKA

Maženský D.

Ústav anatómie, UVL, Košice

ABSTRAKT

Sledovali sme morfológické variácie *arteria vertebralis dextra et sinistra* a *arteria thoracica interna dextra* u králika. Porovnávali sme morfológiu tepien na základe ich odstupu. Sledovanie sme vykonávali na 30 korozívnych preparátoch dospelých králikov oboch pohlaví. K príprave preparátov sme použili: fyziologický roztok, dentakryl, farbivá, hydroxid draselný, chirurgické nástroje a laboratórne pomôcky (Maženský a kol., 2007). Po prepláchnutí cievneho riečišťa cez ľavú komoru alebo brušnú aortu fyziologickým roztokom sme injekovali už nami vopred pripravenú nástrekovú hmotu. Vzorky sme nechali dopolymerizovať a v roztoku 2-4 % hydroxidu draselného temperovaného termostatom na teplotu 60-65°C macerovali. Macerácia mäkkých tkanív trvala 2-3 dni (Flešárová a kol., 2003). Na základe našich výsledkov sme dospeli k záveru: zdvojená *arteria vertebralis dextra* s dvomi rôznymi odstupmi sa vyskytovala v 3 % prípadov, odstup *arteria thoracica interna dextra* z *aorta thoracica* v 13 % prípadov a odstup *arteria vertebralis sinistra* z *arcus aortae* v 7 % prípadov.

ÚVOD

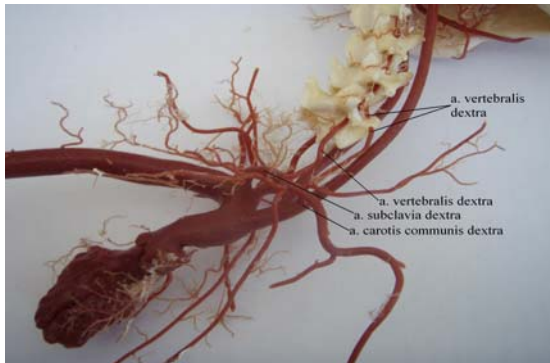
Problematika anatómie a to hlavne krvného obehu laboratórných zvierat predstavuje citelnú medzeru v odbornej angiologickej literatúre. V našej práci sme poukázali na niektoré anatomické zvláštnosti práve u týchto na medicínske výskumy intenzívne využívaných zvierat. V našej práci sme sa zamerali na variácie odstupu *arteria vertebralis dextra et sinistra* a *arteria thoracica interna dextra* v krvnom systéme králika (*Oryctolagus cuniculus* f. *domestica*).

MATERIÁL A METODIKA

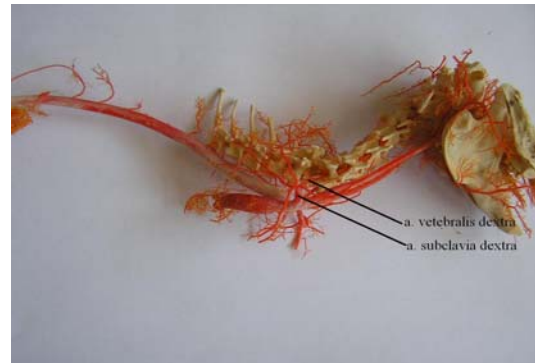
Zamerali sme sa na variácie odstupu *arteria vertebralis dextra et sinistra* a *arteria thoracica interna dextra* u 30 králikov. Eutanáziu sme vykonávali éterom. Po vypreparovaní srdca alebo brušnej aorty sme pristúpili k prepláchnutiu cievneho riečišťa. Ako perfúzne médium bol použitý fyziologický roztok NaCl. K dokonalejšiemu odstráneniu krvných reziduí sa môže pridať 0,05 % NaOH. Perfúzny tlak bol vyvolaný a udržiavaný peristaltickým čerpadlom s reguláciou tlaku perfúzneho média. Správny priebeh perfúzie spoznáme podľa vyblednutia tkaniva. Ak roztok vytekajúci z venózneho systému už nebol sfarbený na červeno, preplachovanie sme ukončili. Kanyly sme opatrili mäkkou plastovou hadičkou, naplnili perfúznym roztokom, hadičku uzavreli svorkou a zaistili ligatúrou (Barta a kol., 2000). Z komerčne vyrábaných hmôt sa nám osvedčila bezfarebná verzia Duracryl Dental[®]. Farebný odtieň sme dosiahli zmiešaním tekutého monoméru s farbou. Použili sme olejovú červeň O. Ofarbený monomér sme použili na prípravu základnej nástrekovej hmoty. Pripravili sme akrylát zmiešaním 1,5 až 2 objemových dielov práškoveho polyméru s 1 dielom tekutého monoméru. Nádobu s hmotou sme uzavreli a pokračovali v premiešavaní, čím sa zabraňuje jej adsorbcií na stenu nádoby. Po 1–2 minútach sme akrylát nasali do injekčnej striekačky a pristúpili k nástreku. Aby sme predišli prasknutiu a preplneniu ciev, nástrek sa vykonával pod kontrolou tlakomeru. Odleptanie mäkkých tkanív prebehlo v 2–4 % roztoku KOH pri teplote 60–70 °C. Všetky tkanivá musia byť v roztoku ponorené. Macerácia trvala približne 2–3 dni.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

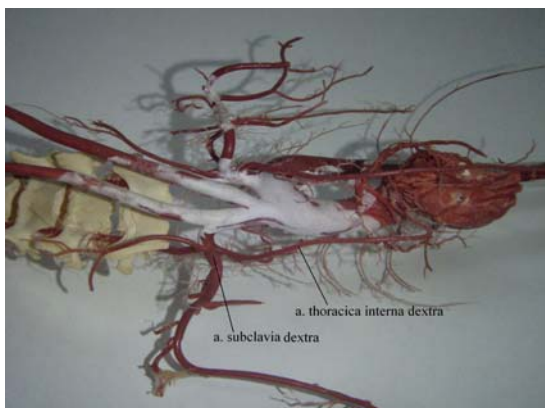
Obr. 1. Zdvojená *arteria vertebralis dextra* s dvomi rôznymi odstupmi



Obr. 2. Odstup *arteria vertebralis dextra* z *arteria subclavia dextra*



Obr. 3. Odstup *arteria thoracica interna dextra* z *arteria subclavia dextra*



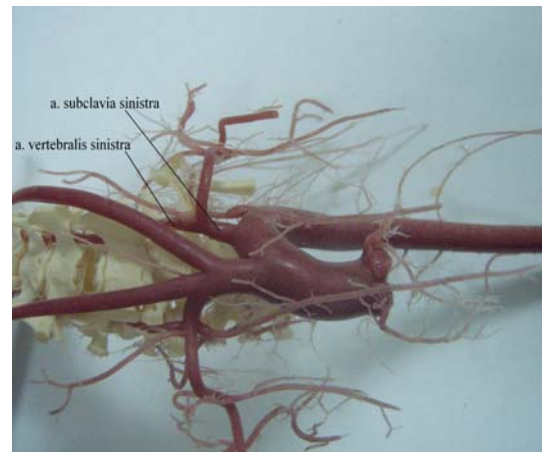
Obr. 4. Odstup *arteria thoracica interna dextra* z *aorta thoracica*



Obr. 5. Odstup *arteria vertebralis sinistra* z *arcus aortae*



Obr. 6. Odstup *arteria vertebralis sinistra* z *arteria subclavia sinistra*



Na nami pripravených korozívnych preparátoch sme zistili, že zdvojená *arteria vertebralis dextra* s dvomi rôznymi odstupmi sa vyskytovala v 3 % prípadov a jednoduchá *arteria vertebralis dextra* v 97 % prípadov s odstupom z *arteria subclavia dextra*, odstup *arteria thoracica interna dextra* z *aorta thoracica* v 13 % prípadov a v 87 % z *arteria subclavia dextra*. *Arteria vertebralis sinistra* odstupovala z *arcus aortae* v 7 % prípadov a v 93 % prípadov z *arteria subclavia sinistra*.

Zistené morfológické variácie v cievnom systéme kráľika svedčia o veľkej variabilite medzi individuami toho istého druhu. Na základe našich výsledkov a nedostatku literárnych zdrojov považujeme túto oblasť za menej skúmanú.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Barta A, Demčišák L. Technika prípravy korozívnych preparátov. proceeding of conference: Current trends in morphology, University of veterinary medicine – dep. of anatomy and histology, slovak anatomical society, Košice, 2000.

Flešárová S, Tesfaye A, Danko J, Bátor R, Dorko F, Barta A. Morphological variations of arcus aortae in rabbits. Acta veterinaria Brno, 72, S20, Supplementum 7, September 2003.

Maženský D, Vdoviaková K, Teleky J. Morfológické variácie arteria subclavia u kráľika. IX. konferencie mladých vedeckých pracovníkov s mezinárodnou účasťou, S 124, Brno, 2007.

ŠTÚDIA DEDIČNÝCH OCHORENÍ OČÍ A PLEMEN Psov NIMI POSTIHNUTÝCH

Mihalová M.

Klinika chirurgie, ortopédie a röntgenologie, UVL, Košice

ABSTRAKT

Práca sa venuje štúdiu výskytu dedičných ochorení očí u plemien psov na Slovensku v období od 1.1.2005 až 30.6.2007.

Zdrojom informácií boli oftalmologické protokoly vedené v tomto období na Klinike chirurgie, ortopédie a röntgenologie na Univerzite veterinárskeho lekárstva v Košiciach.

Zistili sme výskyt týchto dedičných ochorení očí: ektrópium, entrópium, „Caro eye“, distichiáza, trichiáza, dysplázia slzného kanálíka, keratokonjunktivitis sicca, „boxerský vred“, dystrofia epitelu rohovky u čiváv, degeneratívny pannus a plazmocytárna konjunktivitída žmurky u nemeckých ovčiakov, Vogt-Koyanagi-Harada syndróm, luxácia šošovky, katarakta, dysplázia retiny (RD) a progresívna atrofia retiny (PRA). Postihnutých bolo 79 jedincov oboch pohlaví a plemien akita inu, alpský jazvečíkovitý durič, americký kokeršpaniel, anglický buldog, anglický kokeršpaniel, vrátane jeho krížencov, bavorský farbiar, bišon, boxer, čau čau, československý vlčiak, čivava, hanoverský farbiar krátkosrstý jazvečík, jorkšírsky teriér a jeho kríženec, labradorský retríver, Lhasa apso, maltézsky psík, nemecký ovčiak, pekinský palácový psík, pudel (stredný), pudel kráľovský, rotvajler, stredný bradáč, šarpej, tibetský teriér, veľký švajčiarsky salašnícky pes, westhajlandský biely teriér a zlatý retríver. Dvoma dedičnými očnými ochoreniami bolo z celkového počtu postihnutých 17,38% jedincov.

ÚVOD

Populácie čistokrvných plemien boli vystavené silnej selekcii, ktorá vyústila do extrémnych odlišností medzi plemenami, naopak, znížila heterogenitu vrámci samotného plemena. Úzka plemenitba bola príčinou objavenia sa nových, dedičných, ochorení (Ackerman, 2005).

Genetické ochorenie je spôsobené chromozomálnou aberáciou alebo mutáciou génu. V súčasnosti je zistených 350 rôznych dedičných ochorení, typ dedičnosti je známy len u 60% z nich. Približne 75% dedičných ochorení so známou formou dedičnosti pochádza z jednoduchej recesívnej mutácie génu (Sampson, 2004).

Zvýšený záujem veterinárnych lekárov ale aj majiteľov a chovateľov, a tiež dostupnosť diagnostických metód prispeli k enormnému nárastu výskytu dedičných ochorení. V súčasnosti sa dôraz kladie skôr na prevenciu ako terapiu týchto ochorení. Mnoho krajín ako Veľká Británia, USA, Fínsko sa snažia zredukovať ich výskyt kontrolou a elimináciou pozitívnych jedincov v chovateľských programoch. Snahou je dosiahnuť čo najefektívnejšiu diagnostiku, keďže nadmerná eliminácia jedincov z chovu môže viesť opäť k zúženiu populácie plemena a následne k vzniku nových dedičných ochorení (Sampson, 2004). V súčasnosti je u niektorých ochorení známa mutácia génu zodpovedného za toto ochorenie a na jej základe sa vytvorili detekčné DNA testy. Z očných dedičných ochorení sú dostupné DNA testy pre diagnostiku progresívnej retinálnej atrofie, PRA (Peters-Jones, 2001).

Cieľom mojej práce bolo vytvoriť štúdiu hovoriacu o približnom výskyte dedičných ochorení očí u psov na Slovensku a priblížiť stav postihnutia jednotlivých plemien.

MATERIÁL A METODIKA

Do štúdie boli zaradené psy, u ktorých v čase od 1.1.2005 do 30.6.2007 bolo diagnostikované jedno, príp. viac dedičných ochorení oka. Zdrojom informácií o pacientoch boli oftalmologické protokoly Kliniky chirurgie, ortopédie a röntgenologie Univerzity veterinárskeho lekárstva, Košice z tohto časového obdobia. Údaje o plemene, počte

diagnostikovaných jedincov príslušného plemena a ich pohlaví sme zaznamenali do tabuliek. Na základe údajov o veku jedincov konkrétneho plemena sme vypočítali vekový priemer a vekové rozpätie (najnižší a najvyšší vek výskytu ochorenia v sledovanej skupine). Taktiež sme do tabuliek zaznamenali, či sa ochorenie vyskytlo obojstranne alebo len jednostranne. V prípade výskytu viacerých dedičných očných ochorení, boli zaznamenané aj tieto.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Za vybrané obdobie boli diagnostikované dedičné očné ochorenia u 79 psov rôznych plemien. Plemená s výskytom dedičných ochorení očí a počet postihnutých zvierat jednotlivých plemien bol nasledovný:

1 jedinec plemena akita inu (tj. 0,79% podiel plemena na výskyte dedičných očných ochorení v sledovanom období), 1 alpský jazvečíkovitý durič (0,79%), 20 jedincov plemena americký kokeršpaniel (15,8%), 3 plemena anglický buldog (2,37%), 5 anglických kokeršpanielov, vrátane krížencov (3,95%), 2 jedinci plemena bavorský farbiar (1,58%), 1 bišon (0,79%), 5 boxerov (3,95%), 1 čau čau (0,79%), 1 československý vlčiak (0,79%), 2 jedince plemena čivava (1,58%), 2 plemena hanoverský farbiar (1,58%), 1 krátkosrstý jazvečík (0,79%), jorkšírsky teriér a jeho kríženec (1,58%), 2 labradorské retrívre (1,58%), 1 Lhasa apso (0,79%), 1 maltézsky psík (0,79%), 9 jedincov plemena nemecký ovčiak (7,11%), 3 plemena pekinský palácový psík (2,37%), 5 plemena pudel (stredný) (3,95%), 1 pudel kráľovský (0,79%), 1 rotvajler (0,79%), 1 stredný bradáč (0,79%), 1 šarpej (0,79%), 1 tibetský teriér (0,79%), 1 veľký švajčiarsky salašnícky pes (0,79%), 1 westhajlandský biely teriér (0,79%) a 3 zlaté retrívre (2,37%).

V tabuľke č. 1 sú uvedené dedičné ochorenia postihujúce extraokulárne štruktúry, konkrétne mihalnice (palpebrae), vrátane patologického rastu rias (ciliae). Tabuľka uvádza plemená, u ktorých boli diagnostikované tieto ochorenia v sledovanom období, a u ktorých sa predpokladá dedičnosť konkrétneho ochorenia. Zaznamenáva tiež počet jedincov jednotlivých plemien, ich pohlavie, vekové rozpätie, v ktorom sa diagnostikovali jedinci nachádzali a priemerný vek jedincov v postihnutej skupine. Zároveň uvádza, či išlo o postihnutie oboch očí, alebo o postihnutie jednostranné, tiež či sa u plemena vyskytlo aj iné dedičné očné ochorenie.

Tab. č. 1 Dedičné ochorenia mihalníc a rias

Diagnóza	Plemeno	Počet jedincov	Pohlavie psy suky	Vekové rozpätie	Priemerný vek	Postihnutie bilat. unilat.	Iné dedičné očné ochorenie
Ectropium	americký kokeršpaniel	3	1 2	4 m. - 6 r.	3,4 r.	2 1	distichiasis - 1
Entropium	americký kokeršpaniel	1	0 1		5 r.	1 0	distichiasis
	anglický buldog	3	1 2	3 m. - 2 r.	1,1 r.	2 1	KCS - 1
	čau čau	1	0 1		3 m.	1 0	
	hanoverský farbiar	2	2 0	6 m. - 8 m.	7 m.	2 0	protrusio gl. palpebrae III. - 1
	šarpej	1	0 1		9 m.	1 0	
zlatý retrívr	3	1 2	4 m. - 1 r.	7,6 m.	3 0		
„Caro eye“ (ectropium/entropium)	rotvajler	1	1 0		4 m.	1 0	
Distichiasis	americký kokeršpaniel	11	3 8	1 r. - 9 r.	3,9 r.	10 1	ectropium - 1 entropium - 1 cataracta - 2 RD - 4
	anglický kokeršpaniel	1	0 1		2,5 r.	1 0	
	kríženec jorkšírského teriéra	1	0 1		5 r.	0 1	
	stredný bradáč	1	1 0		1,5 r.	0 1	
Trichiasis	maltézsky psík	1	0 1		3 r.	1 0	

Ektrópium, everzia zvyčajne dolnej mihalnice a expozícia jej sliznice, je u amerického kokeršpaniela pomerne častá, je príčinou konjunktivitídy až keratokonjunktivitídy, vo vážnom stave vyžaduje chirurgickú korekciu (Gellat, 1981). Predpokladá sa, že dedičnosť je polygénna a ovplyvňujú ju gény, ktoré sa podieľajú na determinácii celkovej stavby lebky a konformácii tváre. Zaradenie postihnutého psa do chovu je na rozhodnutí chovateľa (ACVO, 1992).

Entrópium je inverzia voľného okraja mihalnice s následkom permanentného dráždenia rohovky (Ledecký a kol., 2001). Postihuje najmä plemená s predispozičnou konfiguráciou tvárovej časti, ako je čau čau s mandľovým tvarom očí alebo šarpej s charakteristickými kožnými záhybmi. Zvyčajne sa ochorenie vyskytne v nízkom veku, do 6 mesiacov až 1 roka, a šteňa niektorých plemien môže z tohto stavu „vyrásť“ (napr. zlatý retriever, čau čau), najčastejšie však ochorenie vyžaduje chirurgický zákrok. Predpokladá sa polygénny typ dedičnosti entropia, rozhodnutie o plemennom využití zvierat'a závisí od chovateľa. Avšak v prípade, že sa chirurgická korekcia robí už v skorom veku (napr. u šarpejov), je ťažké takéhoto jedinca identifikovať a eliminovať z chovu (Rubin, 1989).

V dostupných literárnych zdrojoch nie je zmienka o dedičných ochoreniach očí u hanoverského farbiara, jeho pôvod je však v plemene Bloodhound. Ten má v štandarde hlboké zasadenie očných bulbov do orbity a ovisnutie dolných viečok spolu s kožou pyskov. Typ dedičnosti nie je známy, predpokladá sa polygénnosť. Eliminácia jedincov s takýmto tvarom dolných mihalnic je problematická, pretože to môže viesť k posúdeniu zvierat'a ako jedinca s netypickým výrazom (ACVO, 1992). Rubin (1989) uvádza u plemena spolu s ektrópiom častý výskyt protrúzie žľazy žmurky a predpokladá, že incidencia je ovplyvnená aj geneticky.

„Caro eye“ sa nazýva tvar oka, kedy vonkajšia časť dolného viečka je entropická a na druhej strane hlboko posadené malé očné gule rotvajlera sú príčinou ektrópie mediálneho očného kútika. To spôsobuje neustále dráždenie nečistotami prostredia a vznik konjunktivitídy. Problém je často riešiteľný len chirurgicky. Predpokladá sa polygénny, príp. familiárny typ dedičnosti (Rubin, 1989).

Distichiáza je abnormálny rast riasy z vývodu tarzálnej žľazy, pričom voľný koniec smeruje k rohovke (Ledecký a kol., 2001). Pokladá sa za hereditárne ochorenie, aj keď typ dedičnosti nie je doposiaľ známy, a tak je ťažké dať chovateľom odporúčenie. ACVO, 1992 odporúča zvieru neuchovniť. Vyskytuje sa u väčšiny plemien psov, vysoký výskyt je najmä u amerických kokeršpanielov, až u 75% populácie (Rubin, 1989).

Trichiáza u maltézkeho psíka je stav, kedy v mediálnom očnom kútiku z karunkulu v trsoch vyrastajú cílie, ktoré zadržiavajú slzný film a ten sfarbuje srst', môže byť tiež príčinou pigmentácie rohovky. U tohto plemena je dedičná, typ dedičnosti však nie je známy (ACVO, 1992).

V tabuľke č. 2 sú zaznamenané zistené dedičné ochorenia slzného aparátu, postihnuté plemená psov, počet postihnutých jedincov v plemene, ich pohlavie, vek, rozsah postihnutia a prípadné ďalšie dedičné očné ochorenia.

Tab. č. 2 Dedičné ochorenia slzného aparátu

Diagnóza	Plemeno	Počet jedincov	Pohlavie psy suky	Vekové rozpätie	Priemerný vek	Postihnutie bilat. unilat.	Iné dedičné očné ochorenie
Dysplasio canalicis lacrimales	pudel	1	0 1	-	5 r.	1 0	
Keratoconjunctivitis sicca (KCS)	anglický buldog	1	1 0	-	2 r.	0 1	entropium
	Lhasa apso	1	1 0	-	13 r.	1 0	
	pekínský palácový psík	1	1 0	-	10 r.	1 0	
	westhajlandský biely teriér	1	0 1	-	7 r.	1 0	

Neperforovaný otvor slzného kanálíka, dysplázia slzného kanálíka je ochorenie pomerne časté u štandardných pudlov, často bilaterálne, ak je jednostranné, tak druhý kanálik je zvyčajne

užší. Je to problém najmä kozmetický a dermatologický, terapiou je chirurgická perforácia a rozšírenie kanálik. Typ dedičnosti nie je známy, neodporúča sa plemenitba z chovu s častou incidenciou (Rubin, 1989).

Syndróm suchého oka (keratoconjunctivitis sicca, KCS) vzniká v dôsledku nedostatočnej tvorby prekorneálnej ochrany - slzného filmu, najmä jeho vodnej zložky. To ústi do poškodenia epitelu rohovky (Gellat, 1981). Anglický buldog, Lhasa apso, pekinský palácový psík a westhajlandský biely teriér sú plemená, u ktorých sa predpokladá genetická predispozícia, typ dedičnosti zatiaľ nie je známy. ACVO (1992) neodporúča rozmnožovanie jedincov z chovu s vysokou incidenciou.

Tabuľka č. 3 obsahuje diagnostikované dedičné ochorenia postihujúce rohovku, plemená a príslušný počet postihnutých jedincov, ich pohlavie, vekové rozpätie a priemerný vek skupiny pozitívnych jedincov, či ochorenie bolo bilaterálne alebo unilaterálne a tiež prítomnosť ďalšej dedičnej očnej choroby.

Tab. č. 3 Dedičné ochorenia rohovky

Diagnóza	Plemeno	Počet jedincov	Pohlavie psy suky	Vekové rozpätie	Priemerný vek	Postihnutie bilat. unilat.	Iné dedičné očné ochorenie
„Boxerský vred rohovky“	boxer	5	1 4	2 r. - 11 r.	7,4 r.	0 5	
Dystrofia epitelu rohovky	čivava	2	2 0	3 m. - 3 r.	1,6 r.	0 2	
KSPCH	nemecký ovčiak	9	5 4	2 r. - 11 r.	5,9 r.	9 0	plazmocytárna konjunktivitída žmurky - 4

Rekurentná erózia rohovky, „boxerský vred“ je ochorenie povrchové, zasahujúce epitel rohovky. U boxerov je veľmi časté, vyskytuje sa vo vyššom veku (6-8 r), má pomalý priebeh s tendenciou k návratu. Typ dedičnosti nie je známy, pre vysoký výskyt u plemena sa považuje za dedičné (Rubin, 1989).

Neobvykle vysoký výskyt korneálnej endoteliálnej dystrofie u čiváv svedčí o dedičnosti ochorenia u tohto plemena, žiadny výskum však nebol prevedený, takže typ dedičnosti nie je známy (ACVO, 1992).

Chronická povrchová keratitída nemeckých ovčiakov (keratitis superficialis chronica, KSPCH, degeneratívny pannus) je pozorovaná najmä u nemeckých ovčiakov. Ide o vaskularizáciu a následnú pigmentáciu epitelu a povrchových vrstiev strómy rohovky, pravdepodobne sa jedná o autoimunitnú reakciu voči proteínom rohovky. Rubin (1989) predpokladá recesívnu formu dedičnosti s variabilnou penetráciou a expresiou. Je často doprevádzaná ďalším dedičným ochorením, plazmocytárnou konjunktivitídou žmurky, ktorej forma dedičnosti nie je známa (Rubin, 1989).

Uveodermatologický syndróm (Vogt-Koyanagi-Harada like syndrom, VKH syndróm) bol zistený u plemena akita inu, samca, vo veku 4 roky. Je to imunitne mediované dedičné ochorenie, postihujúce kožu a dúhovku, kedy sa v týchto tkanivách zvyšujú počty melanocytov. Spôsob dedičnosti nie je známy (ACVO, 1992).

Tabuľka č. 6 obsahuje údaje o ochoreniach šošovky, ktoré sú považované u zistených plemien za dedičné. Uvádza postihnuté plemená, počet jedincov, ich pohlavie, vek, rozsah postihnutia a výskyt iného dedičného ochorenia oka.

Tab. č. 4 Dedičné ochorenia šošovky

Diagnóza	Plemeno	Počet jedincov	Pohlavie psy suky	Vekové rozpätie	Priemerný vek	Postihnutie bilat. unilat.	Iné dedičné očné ochorenie
luxatio lentis posterior	alpský jazvečíkovitý durič	1	1 0		12 r.	1 0	RD unilat.
	československý vlčiak	1	0 1		4 r.	1 0	

Luxácia šošovky do zadnej očnej komory sa u alpského jazvečíkovitého duriča zistila ako dedičná, nebol však zistený typ dedičnosti (ACVO, 1992). U československého vlčiaka ako relatívne nového plemena neboli zatiaľ zaznamenané dedičné očné ochorenia. Nemecký

ovčiak je však plemeno predisponované pre toto ochorenie, bez známeho typu dedičnosti, predpokladá sa familiárny typ (Rubin, 1989).

cataracta	americký kokeršpaniel	5	3 2	4 r. - 9 r.	7,2 r.	3 2	Distichiasis bilat. - 2
	anglický kokeršpaniel a jeho kríženci	4	3 1	10 m. - 10 r.	7 r.	0 1	PRA bilat. - 1
	bišon	1	1 0		1 r.	1 0	
	jazvečík krátkosrstý	1	0 1		1 r.	1 0	
	jorkšírsky teriér	1	0 1		7 r.	1 0	
	labradorský retriever	2	1 1	1,5 r. - 2 r.	1,75 r.	2 0	
	pekínský palácový psík	2	2 0	8 r. - 15 r.	11,5 r.	1 1	PRA unilat. - 1
	pudel	4	4 0	6 r. - 12 r.	8,75 r.	4 0	PRA bilat. - 4
	pudel kráľovský	1	0 1		1,5 r.	0 1	
	tibetský teriér	1	1 0		3 r.	0 1	
veľký švajčiarsky salašnícky pes	1	0 1		4,5 r.	0 1		

Katarakta je u amerického kokeršpaniela považovaná za autozomálne recesívne dedičné ochorenie (ACVO, 1992), u labradorského retrievera za dominantné s neúplnou penetráciou genotypu (Curtis, Barnett, 1989). Barnett a Startup (1985) uvádzajú u štandardných pudlov dva typy - kortikálnu a polárnu subkapsulárnu, autozomálne recesívne dedičné ochorenia. U ostatných uvedených plemien je katarakta považovaná za dedičnú, forma dedičnosti však nie je známa. Odporúča sa postihnutých jedincov neuchovniť (ACVO, 1992). U niektorých plemien je katarakta doprevádzaná progresívnou atrofiou retiny (Gellat, 1981).

V tabuľke č. 7 sú uvedené dedičné ochorenia sietnice, postihnuté plemená a počet jedincov, ich vek a pohlavie. Tiež je uvedené, či sa jedná o bilaterálne alebo unilaterálne postihnutie a postihnutie inou očnou dedičnou chorobou.

Tab. č. 5 Dedičné ochorenia sietnice

Diagnóza	Plemeno	Počet jedincov	Pohlavie psy suky	Vekové rozpätie	Priemerný vek	Postihnutie bilat. unilat.	Iné dedičné očné ochorenie
RD	alpský jazvečíkovitý durič	1	1 0		12 r.	1 0	
	americký kokeršpaniel	8	4 4	1 r. - 7 r.	3,25 r.	8 0	distichiasis bilat. - 4
PRA	kríženec anglického kokeršpaniela	1	1 0		8 r.	1 0	cataracta bilat.
	bavorský farbiar	2	2 0	5 r. - 9 r.	7 r.	2 0	
	pekínský palácový psík	1	1 0		15 r.	0 1	cataracta unilat.
	pudel	4	4 0	6 r. - 12 r.	8,75 r.	4 0	cataracta bilat. - 4

Retinálna dysplázia (RD) je spôsobená abnormálnou diferenciáciou a proliferáciou jej fotosenzitívnych vrstiev. U amerického a anglického kokeršpaniela je považovaná za autozomálne recesívne dedičnú (International Veterinary Ophtalmology Meeting, 2007).

Progresívna retinálna atrofia (PRA) je primárne defektom fotoreceptorov - tyčieniek a čapíkov. U pudlov sa objavuje vo vyššom veku (5- 7 rokov), je autozomálne recesívna. U anglických kokeršpanielov nastupuje vo veku 4-8 rokov, u amerických vo veku 2 - 3 roky, obe sú autozomálne recesívne. U pekínského palácového psa typ dedičnosti nebol zatiaľ zistený, predpokladá sa recesívnosť ako u iných plemien (International Veterinary Ophtalmology Meeting, 2007).

Výskyt dvoch dedičných očných ochorení sme zistili u 17,38% z celkového počtu pacientov.

POĎAKOVANIE

Moje poďakovanie patrí Doc. MVDr. Trbolovej z Kliniky chirurgie, ortopédie a röntgenológie na UVL v Košiciach za poskytnutie oftalmologických protokolov, ktoré v sledovanom období viedla.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ackerman L. Genetics Principles. 30th World Congress of the WSAVA, 2005, Mexico City ACVO (American College of Veterinary Ophthalmologists). Ocular Disorders Proven or Suspected to be Hereditary in Dogs. 1992; ISBN 0-96-35163-0-2.
- Barnett KC, Startup FG. Hereditary cataract in the standard poodle. Vet Rec. 1985; 117:15-16.
- Curtis R, Barnett KC. A survey of cataracts in Golden and Labrador retrievers. J Sm Anim Pract. 1989; 30:277.
- Sampson J. The Genetic's View on Dog Breeding. How Can Improved Health Be Achieved?. The FECAVA Symposium. 2004; 15:26 - 29
- Gellat KN. Veterinary Ophthalmology. Philadelphia, Lea&Febiger, 1981.
- Ledecký V a kol. Oftalmológia zvierat. Prešov, M&M vydavateľstvo, 2001.
- Narfstorm K. Early Onset Hereditary Retinal Disease. International Veterinary Ophthalmology Meeting, 2007, Genova.
- Narfstorm K. Late Onset Hereditary Retinal Disease. International Veterinary Ophthalmology Meeting, 2007, Genova.
- Peterson-Jones S. Current DNA-based test for hereditary eye disease. Vet Opht. 2001; 4:233-236.
- Rubin LF. Inherited Eye Diseases in Purebred Dogs. Baltimore, Williams and Wilkins, 1989.
- Sansom J, Barnett KC. Keratoconjunctivitis sicca in the dog: a review of two hundred cases. J Sm Anim Pract. 1985; 26:121 - 135.

KVALITA MÄSOVÝCH VÝROBKOV V DUCHU TRADÍCIE

Mikulášová M., Turek P., Korimová L., Pažáková J.

Katedra hygieny a technológie potravín, UVL, Košice

ABSTRAKT

V záujme spotrebiteľa je kúpiť si zdravotne neškodný mäsový výrobok, ktorý by mal spĺňať aj určité kvalitatívne očakávania. Za základ posúdenia kvality danej potraviny slúži spotrebiteľovi najmä vzhľad, konzistencia, vôňa a chuť. V dnešnej dobe je ale rozhodujúcim faktorom aj cena, resp. kúpyschopnosť obyvateľstva.

Národná legislatíva Slovenskej republiky však naproti tomu preukazuje značné nedostatky v definovaní kvalitatívnych požiadaviek mäsových výrobkov. Tie sa vyžadujú len u niektorých druhov mäsových výrobkov a sú postavené len na stanovení množstva mäsa vo výrobku (najmenej v hmot.%) a množstva tuku (najviac v hmot.%)

V predkladanej práci sme stanovovali kvalitatívne parametre nami vyrobených mäsových výrobkov (obsah vody, tuku, sušiny, dusíka a hydroxyprolínu) laboratórnymi metódami (ISO 1444, ISO 1442, ISO 937) a prepočtom stanovovali obsah celkových bielkovín, čistých svalových bielkovín a kolagénu.

Východiskom zo situácie, kde sa vytvára veľká možnosť pre výrobcov prispôbovať si zloženie mäsového výrobku na úkor kvality a v prospech ceny, je vytvorenie korektného národného legislatívneho predpisu stanovujúceho kritériá kvality mäsových výrobkov podľa kategórie a názvu výrobku - na ukazovateli čistej svalovej bielkoviny.

ÚVOD

Treba si uvedomiť, že požiadavka na kvalitný a bezpečný výsledný produkt zahŕňa celý reťazec, ktorý začína produkciou krmiva a chovom, pokračuje transportom zvierat, zabitím zvierat na bitúnku a končí produkciou, resp. obchodnou sieťou. Každý článok tohto reťazca prispieva svojím podielom.

Párok je podľa Výnosu MP SR a MZ SR z 18. augusta 2005 č. 1895/2004-100, ktorým sa vydáva hlava PK SR upravujúca mäsové výrobky, definovaný ako mäsový výrobok z jemne homogenizovaného mäsového diela alebo zo zrnitého mäsového diela o veľkosti častíc do 2 mm spravidla plneného do technologického obalu o priemere najviac 34 mm. Patrí do skupiny mäkkých mäsových výrobkov.

Požiadavky na kvalitu mäkkých mäsových výrobkov a teda aj na párky sú definované v paragrafoch druhého oddielu vyššie spomínaného legislatívneho predpisu.

V prílohe č. 1 tohto výnosu nájdeme kvalitatívne požiadavky pre niektoré druhy párkov, menovite sú to však len Spišské párky, Bratislavské párky a Jemné párky. Definované sú organoleptické požiadavky, množstvo mäsa vo výrobku (najmenej v hmot.%) a množstvo tuku (najviac v hmot.%). Pri výrobe týchto vybraných druhov mäsových výrobkov je zakázané používať mechanicky separované mäso jatočných zvierat a hydiny.

Pre ostatné druhy párkov nie sú stanovené žiadne špecifické požiadavky, musia spĺňať požiadavky na kvalitu podľa vnútorného predpisu výrobcu a podľa zásad správnej výrobných praxe. Vybrané parametre musia byť zhodné s parametrami uvádzanými v prílohe č. 1.

V paragrafe 2 výnosu nájdeme medzi definíciami aj definíciu pojmu čisté svalové bielkoviny (predstavujú rozdiel medzi množstvom celkových bielkovín a množstvom bielkovín spojivového tkaniva a pridaných nemäsových bielkovín), nenájdeme však definíciu pojmu množstvo mäsa vo výrobku a takisto ani spôsob jeho výpočtu či stanovenia. Naopak zadefinované čisté svalové bielkoviny v kvalitatívnych požiadavkách na mäsové výrobky vo výnose (príloha č. 1) nenájdete.

Takýmito nedostatočnými legislatívnymi kritériami sa vytvára veľký priestor pre výrobcov mäsových výrobkov prispôbovať si zloženie a teda receptúru párkových (a iných)

mäsových výrobkov, ktorí v snahe zefektívniť výrobu nahrádzajú kvalitné chudé mäso kožnými emulziami, sójovými, cereálnymi a inými rastlinnými či živočíšnymi bielkovinami a používaním prídavných látok, ktoré sú schopné nahradiť účinnosť svalových bielkovín. Takýto postup vedie k zmene výsledného produktu a ku spotrebiteľovi sa tak dostáva výrobok, ktorý síce nesie rovnaký názov, ale líši sa svojím zložením a samozrejme aj cenou.

MATERIÁL A METODIKA

Podľa receptúr z Technicko-hospodárskych noriem (1989) vydaných Mäsovým priemyslom GRT v Bratislave sme vyrobili Bratislavské párky, Jemné párky, Debrecínske párky a Spišské párky. Vo výrobnom mäse a v hotových výrobkoch sme stanovili kvalitatívne ukazovatele podľa zodpovedajúcich noriem. A to menovite obsah vody (ISO 1442), obsah voľného tuku (ISO 1444), obsah dusíka (ISO 937) a hydroxyprolínu. Prepočtom sme zistili obsah celkových bielkovín, svalových bielkovín a kolagénu. Výpočtom sme tiež stanovili aj kvalitatívny ukazovateľ podľa nemeckej legislatívy a to tzv. BEFFE – bindegewebseiweissfreies Fleischeiweiss.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V predkladaných tabuľkách (Tabuľka 1 až 5) sú uvádzané jednotlivé kvalitatívne ukazovatele prislúchajúce jednotlivým druhom párok, zároveň sú uvádzane aj kvalitatívne ukazovatele využívané v Nemeckej republike.

Tabuľka 1 Vyhodnotenie kvalitatívnych ukazovateľov: Spišské párky
Pokus č. 6 (03.04.2007)

Vz. č.	voda	tuk	CB	súčet	suš.	HP	kolagén	ČSB	BEFFE abs.	BEFFE relat.
A	59,831	25,040	12,800	97,671	40,169	0,370	2,960	9,84	9,840	76,875
C	65,478	15,038	16,450	96,966	34,522	0,399	3,192	13,258	13,258	80,596

A – ČSN 577134

C – receptúra podľa starých majstrov (zakladateľov výroby Spišských párok)

Tabuľka 2 Vyhodnotenie kvalitatívnych ukazovateľov: Spišské párky
Pokus č. 6x (11.06.2007)

Vz. č.	voda	tuk	CB	súčet	suš.	HP	kolagén	ČSB	BEFFE abs.	BEFFE relat.
A	57,405	24,390	13,60	95,395	42,595	0,527	4,216	9,384	9,384	69,000
B	57,444	22,462	15,350	95,256	42,556	0,199	1,592	13,758	13,758	89,629
C	59,147	26,477	12,450	98,074	40,853	0,215	1,720	10,730	10,730	86,185

A – ČSN 577134

B – norma z roku 1960

C – receptúra podľa starých majstrov (zakladateľov výroby Spišských párok)

Tabuľka 3 Vyhodnotenie kvalitatívnych ukazovateľov: Jemné (4) a Debrecínske párky (15)
Pokus č. 4,15 (23.05.2007)

Vz. č.	voda	tuk	CB	súčet	suš.	HP	kolagén	ČSB	BEFFE abs.	BEFFE relat.
4	63,578	18,777	14,850	97,205	36,422	0,613	4,904	9,946	9,946	66,976
15	45,184	40,811	10,000	95,995	54,816	0,376	3,008	6,992	6,992	69,920

Tabuľka 4 Vyhodnotenie kvalitatívnych ukazovateľov: Jemné (4x) a Debrecínske párky (15x)
 Pokus č. 4x,15x (04.06.2007)

Vz. č.	voda	tuk	CB	súčet	suš.	HP	kolagén	ČSB	BEFFE abs.	BEFFE relat.
4x	63,150	18,505	14,350	96,005	36,850	0,763	6,104	8,246	8,246	57,463
15x	49,318	36,774	11,650	97,742	50,682	0,643	5,144	6,506	6,506	55,845

Tabuľka 5 Vyhodnotenie kvalitatívnych ukazovateľov: Bratislavské párky
 Pokus č. 9 (23.05.2007)

Vz. č.	voda	tuk	CB	súčet	suš.	HP	kolagén	ČSB	BEFFE abs.	BEFFE relat.
9	53,552	28,529	15,550	97,631	46,448	0,309	2,472	13,078	13,078	84,103

CB – celkové bielkoviny

Suš. – sušina

HP – hydroxyprolín

ČSB – čistá svalová bielkovina

BEFFE abs. = celková bielkovina – bielkovina spojivového tkaniva

BEFFE relat. = BEFFE abs. x 100 / celková bielkovina

Ako už bolo v úvode spomínané, naša legislatíva nestanovuje pevne kvalitatívne ukazovatele okrem už 3 spomínaných druhov párkov, kde slúžia ako ukazovatele množstvo mäsa vo výrobku (najmenej v hmot.%) a množstvo tuku (najviac v hmot.%).

Ako príklad nám môžu poslúžiť legislatívne predpisy krajín s dlhou tradíciou mäsiarskej výroby, ktoré v podstate ovplyvňovali mäsiarsky stav aj v našej krajine.

Východiskom by mohlo byť stanovenie kritérií kvality mäsových výrobkov pre jednotlivé výrobky alebo kategórie výrobkov založené predovšetkým na ukazovateli čistej svalovej bielkoviny (ako je tomu v Nemeckej republike).

Riešenie z tejto situácie by sa malo hľadať spolu s Českou republikou, keďže súčasný problém a história je spoločná.

POĎAKOVANIE

Príspevok podporený finančnými prostriedkami projektu AV 4/0112/06 MŠ SR.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Výnos MP SR a MZ SR z 18. augusta 2005 č. 1895/2004-100 ktorým sa vydáva hlava PK SR upravujúca mäsové výrobky.

Stanovenie obsahu vody (ISO 1442).

Stanovenie obsahu voľného tuku (ISO 1444).

Stanovenie obsah dusíka (ISO 937).

KOMPARATÍVNA GENOMICKÁ ANALÝZA PLAZMIDOV TREPONÉM

Sikorová L.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Organizácia genómu nepatogénnych treponém predstavuje neprebádanú oblasť molekulárnej biológie a genetiky baktérií. Cieľom tejto práce bola charakterizácia plazmidu pKT o veľkosti 7,7 kb izolovaného z nepatogénnej bachorovej treponémy *Treponema zioleckii*. Tento plazmid sa porovnal s doteraz charakterizovanými plazmidmi treponém pTS1 a pTD1, pochádzajúcimi z *T. denticola*. Komparatívnou genomickou analýzou plazmidov sa našli podobnosti a rozdiely v ich genómovej organizácii, týkajúce sa veľkosti plazmidov, replikačných proteínov, lokalizácie priamych a obrátených opakovaní, zastúpenia G+C párov ako aj typu replikačného mechanizmu. Porovnania ukázali, že plazmid pKT z *T. zioleckii* nie je príbuzný s doteraz známymi plazmidmi treponém a pravdepodobne predstavuje nový typ plazmidu v treponémach.

ÚVOD

Treponémy patria k evolučne starým a biologicky zaujímavým baktériám vyskytujúcim sa v širokom spektre hostiteľov a prostredí. Genómová organizácia patogénnych treponém sa doposiaľ preskúmala u *T. pallidum*, baktérie zapríčiňujúcej ochorenie syfilis a u orálnej treponémy *T. denticola*, ktorá vyvoláva dlhotrvajúci zápal ďasien – parodontitídu. U oboch treponém sa zaznamenala prítomnosť plazmidovej DNA. Plazmid Tp z *T. pallidum* o približnej veľkosti $7,5 \cdot 10^6$ Da, nebol doteraz analyzovaný a charakterizovaný z dôvodu jeho neúspešnej izolácie (Norgard a kol., 1998). Plazmidy pTD1 a pTS1 orálnej treponémy *T. denticola* sú doposiaľ jedinými izolovanými a charakterizovanými plazmidmi rodu *Treponema* (Chauhan a kol., 2003; Ivic a kol., 1990).

Zatiaľ čo výskyt plazmidovej DNA v bachorových baktériách je bežný (Šprincova a kol., 2005; Ivan a kol., 2006), doposiaľ nie sú známe plazmidy bachorových treponém a o genetike nepatogénnych bachorových treponém je veľmi málo poznatkov. V našom laboratóriu sa izolovali a čiastočne charakterizovali tri kmene KT, S, T bachorových treponém, odlišujúce sa morfológiou, prítomnosťou plazmidov (Piknová a kol., 2006) a výskytom restriktívno-modifikačných systémov (Piknová a kol., 2005). Z bachorového kmeňa *Treponema* KT pochádzajúceho z nepatogénnej *T. zioleckii* sa izoloval a čiastočne charakterizoval plazmid pKT o veľkosti 7,7 kb, u ktorého sa identifikoval Rep modul pozostávajúci z *rep* génu a opakovania sekvencií dôležitých pre replikáciu plazmidu (Sikorová a kol., zaslané do tlače).

Cieľom tejto práce bola komparatívna genomická analýza plazmidov treponém, pTD1, pTS1 z *T. denticola* a pKT z nepatogénnej *T. zioleckii*, odhaľujúca podobnosti a rozdielnosti medzi jednotlivými plazmidmi treponém.

MATERIÁL A METODIKA

Komparatívna genomická analýza plazmidov treponém sa uskutočnila použitím sekvencií pTS1, pTD1 z *T. denticola* a pKT z *T. zioleckii* archivovaných v databáze Genbank (AF112856, M87856, EU054305). Na porovnanie sekvencií plazmidov sa použili programy pre analýzu sekvencií ClustalW alignment a Pairwise alignment z programového balíka BioEdit (Hall, 1999). Prítomnosť priamych a obrátených opakovaní sa analyzovala pomocou programu OligoRep (Soloviev a kol., 1985).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom tejto práce bolo porovnanie vlastností troch doteraz podrobnejšie charakterizovaných plazmidov treponém. Porovnali sme veľkosť plazmidov a ich replikačných proteínov, veľkosť

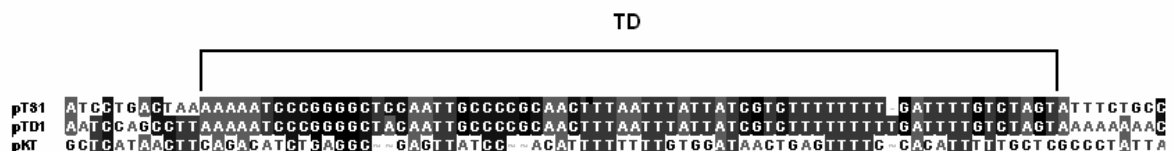
a lokalizáciu priamych a obrátených opakovaní ako aj zastúpenie G+C párov v ich genómoch a typ replikačného mechanizmu. Výsledky tohto porovnávania sú uvedené v Tab.1. Z porovnania plazmidov treponém vyplýva, že plazmid pKT z *T. zioleckii* je najväčším známym plazmidom treponém a od ostatných plazmidov sa líši aj zastúpením G+C párov a veľkosťou Rep proteínu.

Tab.1 Porovnanie plazmidov pTS1 a pTD1 z *T. denticola* a pKT z *T. zioleckii*

	pTS1	pTD1	pKT
Veľkosť(bp)	3649	2647	7700
Rep proteín(aa)	481	335	310
ORF1	<i>rep</i>	<i>rep</i>	<i>rep</i>
ORF2	<i>mob</i>	-	?
ORF3	-	?	?
ORF4	-	?	?
DR (bp)	22	10	15 - 24
IR (bp)	22	10 - 20	16
Replikácia	-	RC	nie RC
GC (%)	34.2	37	56
GenBank	AF112856	M87856	EU054305
Citácia	Chauhan a kol., 2003	MacDougall a kol., 1992	Sikorová a kol., zaslané do tlače

Komparatívna genomická analýza, zahrňujúca párové porovnanie medzi jednotlivými Rep proteínmi plazmidov treponém poukázala na ich veľmi nízku príbuznosť. Rep proteíny pTD1 a pTS1 majú 26,6 % podobnosť a 14,8 % identitu; 27,5 % podobnosť a 15 % identita je medzi Rep proteínmi pTD1 a pKT a 20,5 % podobnosť a 12,2 % identitu majú Rep proteíny pTS1 a pKT.

V plazmide pTS1 z *T. denticola* sa zistila prítomnosť vysoko konzervovanej 70 bp oblasti (TD) lokalizovanej v smere transkripcie *rep* génu ORF1, ktorej prítomnosť sa analyzovala aj v pTD1 a pKT plazmidoch treponém. Úsek sekvencie lokalizovanej v smere transkripcie *rep* génu ORF1v pTD1 plazmide preukázal 98 % identitu s TD oblasťou plazmidu pTS1. Zaujímavým faktom je, že otvorené čítacie rámce obidvoch plazmidov nemajú významnú homológiu (Chauhan a kol., 2003). Párovým porovnaním TD oblasti plazmidu pTS1 sa preukázala len 44,28 %, pravdepodobne náhodná homológia oblasti lokalizovanej v smere transkripcie *rep* génu ORF1 v plazmide pKT. Z analýzy párového porovnania plazmidov vyplýva, že TD sekvencia nie je prítomná v plazmide pKT (Obr.1).



Obr.1 Párové porovnanie TD oblasti plazmidov pTS1 a pTD1 z *T. denticola* a pKT z *T. zioleckii*

Opakovania sekvencií vytvárajú komplikované sekundárne štruktúry a zohrávajú dôležitú úlohu pri iniciácii replikácie. Prítomnosť priamych opakovaní je potrebná pri rozpoznávaní a

naviazaní Rep proteínov umožňujúcich tak iniciáciu replikácie. Obrátené opakovania, ktoré svojou komplementaritou vytvárajú štruktúry dôležité pre syntézu primérov sú väčšinou lokalizované v replikačných počiatoch (*ori*) replikónu (del Solar a kol., 1998).

Vo všetkých porovnávaných plazmidov treponém sa takéto opakovania sekvencií vyskytujú relatívne často. V plazmide pTS1 z *T. denticola*, sa našli dve priame opakovania o veľkosti 22 bp, identické s dvoma rovnako veľkými obrátenými opakovaniami navzájom sa prekrývajúcimi v 150 bp oblasti plazmidu lokalizovanej proti smeru transkripcie *rep* génu (Chauhan a kol., 2003). Viaceré opakovania sekvencií sa zistili v plazmide pTD1 z *T. denticola*. 10 bp obrátené opakovanie, dve priame a obrátené opakovania rovnakej veľkosti (10 bp), u ktorých sa dokázala 80% homológia sa lokalizovali proti smeru transkripcie *rep* génu, zatiaľ čo ďalšie tri obrátené opakovania o približnej veľkosti 20 bp sa našli v smere transkripcie *rep* génu plazmidu pTD1 (MacDougall a kol., 1992). Pravdepodobná poloha replikačného miesta (*ori*) plazmidu pKT z *T. zioleckii* sa zistila v 200 bp úseku plazmidu obsahujúcom tri priame (15 - 24 bp) a jedno obrátené opakovanie (16 bp) lokalizované v smere transkripcie *rep* génu (Sikorová a kol., zaslané do tlače).

Odlíšnosti sa našli taktiež v zastúpení G+C párov plazmidov treponém. G+C profil pKT Rep modulu pozostávajúci z *rep* génu a opakovania sekvencií, dôležitých pre replikáciu plazmidu, poukázal na výrazne znížený obsah G+C párov v oblasti opakovania sekvencií (34 %), ktoré signalizujú pravdepodobný počiatoč replikácie a zvýšený obsah G+C párov (62 %) v oblasti *rep* génu (Sikorová a kol., zaslané do tlače). Takýto znížený obsah G+C párov sa nepozoroval u plazmidov pTS1 a pTD1 z *T. denticola*. Celkové percentuálne zastúpenie G+C párov plazmidu pKT (56 %) je oveľa vyššie v porovnaní so zastúpením G+C párov u treponém (37 - 46 %) ako uvádza Canale-Parola a kol. v práci z roku 1977. Zastúpenie G+C párov u plazmidov pTS1 (37,5%; Ivic a kol., 1990) a pTD1 (34,2 %; Chauhan a kol., 2003) z *T. denticola* zodpovedá stanovenému zastúpeniu G+C párov v genóme treponém.

Genetická štruktúra plazmidov tvorená esenciálnymi oblasťami obsahujúcimi gény alebo miestami dôležitými pre ich replikáciu je rozhodujúca pri výbere replikačného mechanizmu. Jednovláknové DNA intermediáty tvoriace sa pri replikácii mechanizmom otáčavej kružnice sa experimentálne dokázali u plazmidu pTD1 z *T. denticola* (MacDougall a kol., 1992), na rozdiel od plazmidu pKT z *T. zioleckii*, ktorý sa týmto replikačným mechanizmom nereplikuje (nepublikované). Aký typ replikačného mechanizmu využíva je predmetom výskumu. Replikačný mechanizmus pTS1 plazmidu z *T. denticola* nie je doteraz preskúmaný. Komparatívna genomická analýza plazmidov treponém poukázala na podobnosti a rozdiely v genomovej organizácii plazmidov a napomohla k zisteniu, že plazmid pKT z *T. zioleckii* nie je príbuzný s plazmidmi pTS1 a pTD1 pochádzajúcimi z *T. denticola* a pravdepodobne predstavuje nový typ plazmidu v treponémach.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu vedy a techniky na základe Zmluvy č. APVT-51-007604 a Vedeckou Grantovou Agentúrou VEGA-grant č.2/5140/25.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Canale-Parola E. Physiology and evolution of spirochetes. *Bacteriol.Rew.* 1977; 41:181-204.
del Solar G., Giraldo R., Rius-Rchevariía M.J., Espinosa M., Díaz-Orejas R. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol.Rew.* 1998; 6:434-464.
Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl.Acids.Symp.* 1999; 41:95-98.
Chauhan S., Kuramitsu H.K. Sequence analysis of plasmid pTS1 isolated from oral spirochetes. *Plasmid* 2003; 51:61-65.

- Ivan J., Šprincova A., Javorský P., Pristaš P. Spreading and mutability of *Selenomonas ruminantium* plasmids. *Fol.Microbiol.* 2006, 51(4): 283-285.
- Ivic A., MacDougall J., Russell R.R.B., Penn C.W. Isolation and characterization of a plasmid from *Treponema denticola*. *FEMS Microbiol.Lett.* 1990; 78:189-194.
- MacDougall J., Margarita D.,Girons I.S. Homology of plasmid from the spirochete *Treponema denticola* with the single-stranded DNA plasmids. *J.Bacteriol.* 1992; 174:2724-2728.
- Norgard M.V., Miller J.N. Plasmid DNA in *Treponema pallidum* (Nichols): Potential for Antibiotic Resistance by Syphilis Bacteria. *Science* 1998; 213:553-555.
- Piknová M., Javorský P., Pristaš P. Multiple restriction - modification systems are present in rumen treponemes. *FEMS Microbiol.Lett.* 2005, 251:99-103.
- Piknová M., Javorský P., Guczynska W., Kasperowicz A., Michalowski T., Pristaš P. New Species of Rumen Treponemes. *Folia Microbiol.* 2006; 51:303-305.
- Soloviev V.V., Zharkikh A.A., Kolchanov N.A. *Molek.Biol.(Russ).* 1985, v.19, N.2, p.524-528.
- Šprincova A., Javorský P., Pristaš P. pSRD191, a new member of RepL replicating plasmid family from *Selenomonas ruminantium*. *Plasmid* 2005, 54: 39-47.

LUMBOSAKRÁLNY PRECHODOVÝ STAVEC U NIEKTORÝCH PLEMIEN PSOV

Skurková L., Gjengedal, H., Ledecký, V.

Klinika chirurgie, ortopédie a röntgenológie, UVL, Košice

ABSTRAKT

Medzi ortopedické ochorenia postihujúce oblasť lumbosakrálnej chrbtice u psov zaraďujeme aj diagnózu prechodový stavec. Prechodový stavec predstavuje zmenu počtu, resp. tvaru stavcov a vyskytuje sa najčastejšie na rozhraní dvoch anatomických častí chrbtice (torakolumbálnej alebo lumbosakrálnej). Lumbosakrálny prechodový stavec (LSPS) označuje zmenu na úrovni posledného bedrového alebo prvého krížového stavca.

V našej práci sme hodnotili prítomnosť LSPS u štyroch plemien psov (nemecký ovčiak, bernský salašnícky pes, rodézky ridgeback, bavorský a hannoverský farbiar), pričom hodnotenie sme uskutočnili z laterálneho röntgenogramu zhotoveného pre diagnostiku dysplázie bedrového kĺbu (DBK) u celkového počtu 1964 psov (röntgenogramy boli zhotovené počas rokov 1999 – 2000 a 2004 – 2005). Zamerali sme sa na stanovenie pohlavnej a plemennej predispozície pre vznik LSPS a porovnanie frekvencie výskytu asymetrickej a symetrickej formy LSPS. Cieľom bolo okrem toho zistiť vplyv výskytu LSPS na súčasný výskyt syndrómu *cauda equina* (SCE) a dysplázie bedrového kĺbu u psov.

Z celkového počtu 1964 psov sme zistili prítomnosť LSPS u 81 psov, z toho najvyšší výskyt bol u plemena nemecký ovčiak (78 psov z počtu 1767, t.j. 4,44 %). Pohlavnú predispozíciu sme nepotvrdili, LSPS bol diagnostikovaný u 55,55 % súk a 44,45 % psov. Z celkového počtu s LSPS malo 17, 28 % diagnostikovaných aj DBK, u 35 psov vyšetrených na diagnostiku krívania bol v roku 2005 zistený syndróm *cauda equina*, pričom 8 z nich malo aj LSPS (22,5 %).

ÚVOD

Prechodový lumbosakrálny stavec (resp. segment) predstavuje morfológickú alebo numerickú odchýlku v utváraní posledného bedrového alebo prvého krížového stavca. Morfológická odchýlka môže byť bilaterálne symetrická alebo asymetrická.

Podľa spôsobu pripojenia prechodového lumbosakrálneho stavca ku bedrovej kosti rozlišujeme tri základné typy LSPS (Flückiger *et al.*, 2006):

Typ 1 - lumbálny: bez spojenia s krížovou a bedrovou kosťou, má vzhľad fyziologicky utváraných lumbálnych priečných výbežkov (*processus transversus*), alebo je báza výbežku širšia a kratšia s deformovanou špičkou, resp. hrotom,

Typ 2 – prechodný: báza výbežku je širšia a kratšia ako pri Type 1, stavec je čiastočne pripojený ku bedrovej kosti, ale hrot výbežku je vždy voľný,

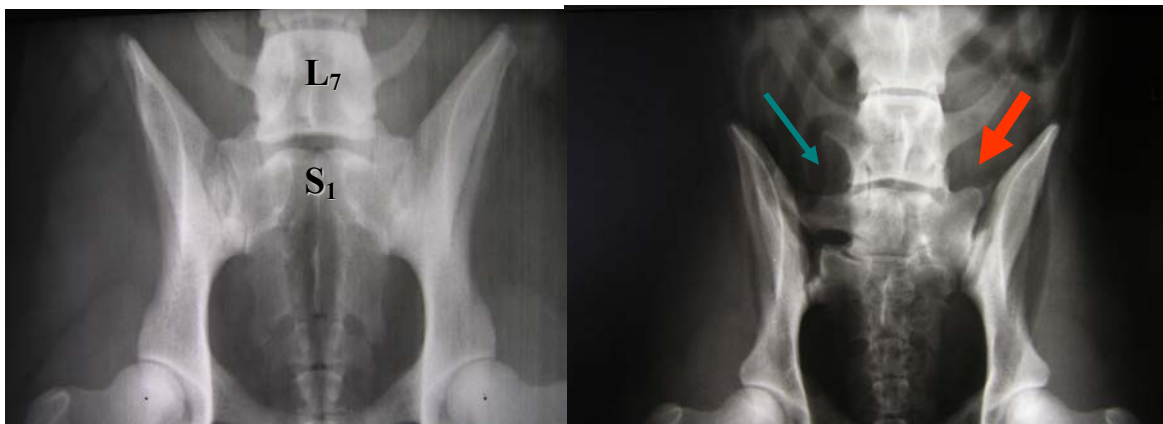
Typ 3 – sakrálny typ: je vytvorené kompletne krídlo kosti krížovej so širokým pripojením ku bedrovej kosti a často ku krížovej kosti, hrot nie je voľný (Flückiger *et al.*, 2006).

Na základe uvedeného rozdelenia (symetrická a asymetrická forma; Typ 1, 2, 3) rozlišujeme tri formy symetrického prechodového stavca (1/1, 2/2, 3/3) a šesť foriem asymetrického prechodového stavca (1/2, 1/3, 2/1, 2/3, 3/1, 3/2).

Morfológické odchýlky prechodového stavca sú dobre viditeľné a zvyčajne pomerne ľahko diagnostikovateľné na ventrodorzálnom röntgenograme, zatiaľ čo pre stanovenie numerickej odchýlky je vhodnejšie zhotoviť laterálnu projekciu lumbosakrálnej chrbtice.

Niektorí autori uvádzajú, že pri výskyte LSPS dochádza k urýchleniu vývoja degeneratívneho ochorenia medzistavcových platničiek (DMP). Ak by sa táto téza ukázala pravdivá, prítomnosť prechodového stavca a následne DMP môže viesť k rozvoju syndrómu *cauda equina* (SCE) (Morgan *et al.*, 1993). SCE predstavuje komplex neurologických príznakov spôsobených kompresiou nervových kmeňov prebiehajúcich cez lumbosakrálnu oblasť miechového kanála.

V našej štúdií sme hodnotili výskyt prechodového lumbosakrálneho stavca v populácii 4 plemien psov s cieľom zistiť možnú predispozíciu pre LSPS s ohľadom na pohlavie a plemeno, a tiež vplyv výskytu LSPS na výskyt SCE a DBK.



Obrázok 1. Ventrodorzálny röntgenogram panvy

Ľavý obr.: Bez nálezu – viditeľný posledný lumbálny stavec, krížová kosť je tvorená splynutím 3 stavcov, symetricky utvárané bedrovo-krížové spojenie bez známk morfologických deviácií

Pravý obr.: Asymetrický typ prechodového stavca (2/3): Na ľavej strane krížovej kosti (na obrázku na pravej strane) je *processus transversus* sakrálneho typu (typ 3) so širokou plochou kontaktu s bedrovou kosťou (červená širšia šípka). Na pravej strane (na obrázku vľavo) má výbežok znaky lumbálnych priečných výbežkov (modrá tenká šípka), ale stále je v určitom kontakte s *os ilii*, na základe čoho je stanovený ako typ 2 (prechodný typ)

MATERIÁL A METODIKA

V našom experimente sme výsledky získali hodnotením z röntgenogramov zhotovených za účelom preventívneho skríningu na dyspláziu bedrových kĺbov u predisponovaných plemien psov vo veku od 12 mesiacov vo ventrodorzálnej polohe s panvovými končatinami v extenzii. Hodnotenie sme uskutočnili z celkového počtu 1964 röntgenogramov, pričom sa jednalo o plemená nemecký ovčiak, rodézky ridgeback, bernský salašnícky pes, bavorský a hannoverský farbiar. Röntgenologické vyšetrenie sme uskutočnili v sedácii (schéma sedácie: atropín 0,03 mg.kg⁻¹ i.m., butorfánol 0,2 mg.kg⁻¹ i.m., xylazín 1 mg.kg⁻¹ i.m.). Hodnotili sme röntgenogramy zhotovené v rokoch 1999 – 2000 a 2004 a 2005.

Štatistické hodnotenie sme uskutočnili pomocou χ^2 testu pre nezávislosť náhodných premenných.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po vyhodnotení 1964 röntgenogramov zhotovených vo ventrodorzálnej polohe sme získali nasledovné výsledky:

Z celkového počtu hodnotených psov (1964) sme zistili u 4,21 % (t.j. 81) prítomnosť prechodového stavca. U 81 psov s LSPS sme najčastejšie diagnostikovali následnú asymetriu panvy a unilaterálne sploštenie acetabulárnej jamky s posunom hlavice femuru od dorzálneho acetabulárneho okraja smerom laterálnym.

Z hľadiska vzťahu výskytu LSPS vzhľadom k plemenu sme zistili nasledovné:

Tab. 1: Výskyt lumbosakrálneho prechodového stavca u sledovaných plemien psov

Plemeno	% prítomnosti LSPS podľa plemena
Nemecký ovčiak	4,44 (1,46 – 7,54)
Rodézsky ridgeback	2,12 (0 – 3,8)
Bernský salašnícky pes	2,77 (0 – 4,34)
Bavorský a Hannoverký farbiar	0

Pri hodnotení výskytu prechodového stavca podľa plemien sme zistili najvyšší výskyt u plemena nemecký ovčiak (4,44 %) ($p < 0,001$, štatisticky veľmi významné (**)).

Analýza pohlavnej predispozície pre výskyt LSPS ukázala, že z celkového počtu 1964 zvierat, bolo 992 súk (t.j. 50,5 %) a 972 psov (49,5 %). LSPS bol prítomný u 45 súk (55,55 %) a 36 psov (44,45 %) ($p > 0,05$, štatisticky nevýznamné – ns).

Výskyt asymetrickej a symetrickej formy u 81 psov pozitívnych na LSPS bol nasledovný: u 49 (60,49 %) bol symetrický typ LSPS, u 32 (39,5 %) psov bol asymetrický typ LSPS ($p > 0,05$, štatisticky nevýznamné – ns).

Z celkového počtu psov s LSPS (81 psov) bola dysplázia bedrového kĺbu diagnostikovaná vo veku 12 mesiacov u 14 psov, čo predstavuje zastúpenie 17, 28 %. Diagnostikovali sme DBK so stupňom B a C, podľa stupnice FCI ($p > 0,05$, ns). Prítom výskyt DBK (stupne B až E) u plemena nemecký ovčiak v rokoch 2004 a 2005 sa pohyboval na úrovni 20,3 – 21,55 % bez ohľadu na prítomnosť LSPS.

Na základe analýzy krívajúcich psov veľkých plemien uskutočnenej v roku 2005 sme stanovili diagnózu syndróm *cauda equina* u 35 psov, pričom LSPS bol zistený u 8 pacientov z tejto skupiny (t.j. zastúpenie 22,5 %). V kontrolnej skupine (1964 psov) bez príznakov SCE bol výskyt LSPS na úrovni 4,12 %.

V štúdií Damur-Djuric *et al.* (2006) bol výskyt LSPS zistený u 3,5 % z celkového počtu vyšetrených psov (hodnotenie bolo uskutočnené zo 4000 röntgenogramov zhotovených za účelom diagnostiky DBK). Naše výsledky (4,12 %) sú teda porovnateľné s výsledkami uvedenej štúdie.

Čo sa týka plemennej predispozície pre výskyt LSPS, predchádzajúce štúdie popisujú 4,3 % (Larsen *et al.*, 1977) a 5,7 % (Flückiger *et al.*, 2003) výskyt LSPS u plemena nemecký ovčiak. V našej štúdií sme zaznamenali výskyt od 1,46 – 7,54 % (priemerný výskyt za 4 roky bol 4,44 %). Naša hodnota je nižšia v porovnaní so štúdiou Morgana *et al.* (1985), ktorý hodnotil röntgenogramy vo ventrodorzálnej aj laterálnej projekcii a získal tak hodnotu 8 % výskytu LSPS u plemena nemecký ovčiak. Tento rozdiel je možné vysvetliť tým, že laterálna projekcia umožní zachytiť aj numerické odchýlky stavcov v lumbosakrálnej oblasti, ktoré nemožno zachytiť ventrodorzálnou projekciou.

V našej práci nebola potvrdená pohlavná predispozícia pre výskyt LSPS. Iné štúdie (Damur-Djuric *et al.*, 2006) poskytujú výsledky zhodné s našimi (47,8 % výskyt u psov, 52,2 % výskyt u súk), napriek tomu je nutné podotknúť, že niektorí autori popisujú mierne vyšší výskyt LSPS u psov, alebo naopak u súk (Morgan *et al.*, 1999, Ziegler *et al.*, 1989, Winkler *et al.*, 1985).

Výskyt symetrickej a asymetrickej formy v našej štúdií bol 39,5 % / 60,5 %. Predchádzajúce štúdie popisujú približne rovnakú frekvenciu výskytu oboch typov LSPS s miernou prevahou asymetrickej formy: 49 % / 51 % (Damur-Djuric *et al.*, 2006) a 44 % / 56 % (Breit *et al.*, 2003).

Niektorí autori (Lanting, 2001) uvádzajú, že u 69 % psov s DBK bol diagnostikovaný LSPS, čo je dosť vysoké zastúpenie v porovnaní s našimi výsledkami (iba 17,28 % psov s DBK-stupeň B a C malo zároveň aj LSPS). Toto môže byť dané tým, že naša štúdia bola uskutočňovaná u psov od veku 12 mesiacov, kedy nemusí byť DBK ešte diagnostikovaná, resp. vyvinie sa v neskoršom veku psa.

Mnohé štúdie podporujú tiež teóriu, že prítomnosť LSPS má vplyv na rozvoj SCE. Podľa Flückigera *et al.* (2006) bol 16,3 % výskyt LSPS u psov s SCE, výsledok našej štúdie bol o niečo vyšší (22,5 %). Aj podľa Bailey a Morgana (1992) môže byť LSPS predispozíciou pre skorú degeneráciu medzistavcových platničiek a nestabilitu stavcov s následnou kompresiou spinálnych nervov, čo vedie ku rozvoju SCE v mladšom veku u psov s LSPS (približne o 1-2 roky skôr, ako u psov bez LSPS (Flückiger *et al.*, 2006).

Na základe našich výsledkov sme dosiaľ nepotvrdili pohlavnú predispozíciu pre LSPS, ale zistili sme predispozíciu plemennú (u nemeckého ovčiaka). Zároveň sme zistili, že nie je dokázateľný vplyv LSPS na výskyt DBK, ale LSPS môže viesť k abnormálnej rotácii panvy, následkom čoho dochádza k nedostatočnému prekrytiu hlavice stehrovej kosti acetabulum (zvyčajne unilaterálne).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bailey, S, Morgan, JP. Congenital spinal malformations. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice.* 1992; 22: 985-1015
- Breit, S, Knaus, I, Künzel, W. Differentiation between lumbosacral transitional vertebrae, pseudolumbarization and lumbosacral osteophyte formation in ventrodorsal radiographs of the canine pelvis. *Vet J.* 2003; 165: 36-42
- Damur Djuric, N, Steffen, F, Hässig, M, Morgan, JP, Flückiger, MA. Lumbosacral transitional vertebrae in dogs: classification, prevalence and association with sacroiliac morphology. *Veterinary Radiology and Ultrasound.* 2006; 47: 32-38
- Flückiger, MA, Djuric, N, Hässig, M, Morgan, J, Steffen, F. A lumbosacral transitional vertebra in the dog predisposes to cauda equina syndrome. *Veterinary Radiology and Ultrasound.* 2006; 47: 39-44.
- Flückiger, MA, Djuric, N, Hässig, M, Steffen, F, Morgan, JP. Lumbosacral transitional vertebra (LTV) in the Dog: Breed Prevalence and Correlation with Cauda Equina Syndrome (CES). *International Veterinary Radiology Association Meeting, Midrad, SA.* 2003, August 19th-22nd
- Larsen, JS. Lumbosacral transitional vertebrae in the dog. *Journal of the American Veterinary radiology Society.* 1977; 18: 76-79
- Morgan, JP, Bahr, A, Franti, CE, Bailey, CS. Lumbosacral transitional vertebrae as a predisposing cause of cauda equina syndrome in German Shepherd Dogs: 161 cases (1978-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1993; 202: 1877-82
- Morgan, JP, Stevens, M. *Radiographic diagnosis and control of canine hip dysplasia.* Ames, IA: Iowa State University Press. 1985
- Morgan, JP. Transitional lumbosacral vertebrae anomaly in the dog: a radiographic study. *J Small Anim Pract.* 1999; 40: 167-172
- Winkler, W. *Lumbosakrale Übergangswirbel beim Hund.* Thesis in Veterinary Medicine. Freie Universität, Berlin. 1985
- Ziegler, G. *Assimilationsstörungen im lumbosakralen Übergangsbereich der Wirbelsäule bei Hund und Katze.* Thesis in Veterinary Medicine, Ludvig-Maximilians-Universität, München. 1989

NATURÁLNE SUBSTANCIE A CHOV KRÁLIKOV

Szabóová R.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Naturálne substancie predstavujú tzv. inováčné alternatívy v profylaxii pri odchove zvierat. Cieľom našich experimentov bolo testovanie antimikrobiálneho účinku rastlinných extraktov oregana a šalvie, komerčného prípravku Xtract ako aj bakteriocín-produkujúceho a probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* CCM4231 za *in vitro* podmienok ako aj testovanie ich účinku v chove králikov. Najvýraznejší inhibičný účinok v *in vitro* podmienkach prejavil extrakt oregana. Testovaním naturálnych substancií v *in vivo* podmienkach bola zistená v truse králikov inhibícia *E. coli* ako aj inhibícia *Clostridium*-like sp. Navyiac, pri aplikácii extraktov oregana a šalvie bola zaznamenaná i redukcia pseudomonád; vplyvom kmeňa CCM4231 a oregana došlo tiež k redukcii oocýst eimérií. Celkové prírastky boli vyššie u zvierat v experimentálnych skupinách.

ÚVOD

Chov králikov sa môže intenzívne rozvíjať vďaka biologickým vlastnostiam králika; krátky generačný interval, plodnosť, intenzívny rast ako aj viacúčelové využitie napr. vo farmakológii, či kožiarskom a potravinárskom priemysle. Mäso králika sa vyznačuje nízkym obsahom tuku a cholesterolu, vysokým zastúpením stráviteľných proteínov; považuje sa za súčasť racionálnej výživy (Simonová, 2006). Preto udržanie zdravého chovu je v záujme všetkých chovateľov, ktorí radi prijímajú nové resp. inováčné metódy pre dosiahnutie už spomínaných cieľov. Medzi takéto inováčné metódy môžeme považovať aditíva na prírodnej báze (napr. bakteriocín-produkujúce mikroorganizmy s probiotickým účinkom, prebiotiká, fytoaditíva) pre prevenciu alebo elimináciu hnačkových ochorení (klostrídiové infekcie, enterokolitídy, stafylokokózy, eimeriázy) vyskytujúcich sa v chovoch králikov hlavne v období po odstave (Szabóová a kol., 2006). Navyiac, Európska komisia pristúpila v roku 2006 (1.1.) k redukcii až zákazu používania antibiotík na prevenciu alebo ako rastových stimulátorov v chovoch zvierat (Lauková a kol., 2006). Bakteriocín-produkujúci kmeň *Enterococcus faecium* CCM4231 s probiotickým účinkom je izolát nášho laboratória (Lauková a kol., 1993). Jeho antimikrobiálny efekt bol s priaznivým výsledkom sledovaný v rôznych ekosystémoch (Lauková a kol., 1998, 1999, 2001), nie však v chove králikov. Z rastlinných extraktov sa v chove králikov síce využíva prípravok Xtract obsahujúci substanciu karvakrol z oregana, cinnamaldehyd zo škorice a kapsaicín z čili papričiek (Cymedika SK, s.r.o., Zvolen), ale účinok samotných extraktov z oregana a šalvie pri odchove králikov nie je známy. Preto cieľom nášho experimentu bolo jednak za *in vitro* podmienok testovať inhibičný efekt rastlinných extraktov šalvie, oregana a kmeňa *E. faecium* CCM4231 na široké spektrum indikátorových kmeňov z rôznych ekosystémov a jednak sledovať za *in vivo* podmienok (v chove králikov) stabilitu, kolonizáciu a antibakteriálny účinok kmeňa *E. faecium* CCM4231 a rastlinných extraktov šalvie a organa (pre porovnanie i komerčného fytoaditíva Xtract) ako aj sledovať ich vplyv na biochemické, zootechnické, imunologické parametre a výskyt oocýst eimérií.

MATERIÁL A METODIKA

Na *in vitro* testovanie t.j. v štandardných laboratórnych podmienkach (teplota a dĺžka kultivácie závisela od indikátorového kmeňa) bol použitý agar spot test (De Vuyst a kol., 1996) a nasledovné kultivačné médiá - Brain Heart agar (Becton & Dickinson, USA) pre Gram-pozitívne baktérie (G^+); Trypticase Soy agar (Becton & Dickinson) pre Gram-negatívne baktérie (G^-). Rastlinné extrakty boli použité v dávke 5 μ l. Inhibičné účinky oregana a šalvie

boli sledované na súbore 248 indikátorových izolátov pochádzajúcich z rôznych ekosystémov a izolovaných v Laboratóriu živočíšnej mikrobiológie na ÚFHZ SAV v Košiciach: *Escherichia coli* - izoláty z ovčieho mlieka (2), ovčieho syra (7), trusu kurčiat (9), céka kurčiat (9); enterokoky - izoláty z trusu koní (27), trusu rodencií (19), trusu kurčiat (8); enterokoky z mäsa králikov (34), klinické izoláty (23); *E. faecium* CCM4231 - Lauková a kol. (1993) deponovaný v Českej zbierke mikroorganizmov, *E. faecium* 9296-silážny izolát, *E. faecium* AL41; stafylokoky - izoláty z rybieho šalátu (3), mäsa králikov (26), koaguláza-negatívne stafylokoky z trusu králikov (7), koagulza-pozitívne stafylokoky z mäsa králikov(18), *E. hirae* (4); *Aeromonas* sp. - izoláty z rýb, ovčieho mlieka a syrov (35), *Pseudomonas-like* sp. - izoláty z ovčieho syra (13). Kmeň *Aeromonas hydrophila* ATTC7966 je z Americkej zbierky mikroorganizmov ATCC. Do *in vivo* experimentu (v spolupráci so Slovenským centrom poľnohospodárskeho výskumu v Nitre, farma králikov pri Ústave pre chov malých hospodárskych zvierat) bolo zaradených 144 králikov vo veku 5 týždňov, samcov plemena HyPlus rozdelených (24 zvierat v každej skupine) do 4 experimentálnych (ES1-ES4) a 2 kontrolných skupín (KS1 - s prídavkom antikokcidika robenidín v dávke 66mg/kg krmiva; KS2 - bez prídavku antikokcidika). Kmeň CCM4231 (rifampicín rezistentný variant- rif^R, 10⁹ KTJ/ml) bol podávaný prvej experimentálnej skupine (ES1) v dávke 500 µl/zviera/deň do vody; králiky druhej experimentálnej skupiny (ES2) prijímali rastlinný extrakt oregana-*Origanum vulgare* (obsahoval 55% účinnej látky karvakrol; Calendula Nová Ľubovňa) v dávke 10 µl/zviera/deň do vody; tretej experimentálnej skupine (ES3) bol aplikovaný rastlinný extrakt šalvie - *Salvia officinalis* (s obsahom účinných látok 24% tujónu, 18% borneolu a 15% cineolu; Calendula Nová Ľubovňa) v dávke 10 µl/zviera/deň do vody; štvrtá experimentálna skupina (ES4) prijímala komerčne vyrábaný prípravok Xtract (obsahoval karvakrol z oregana, cinnamaldehyd zo škorice a kapsaicín z čili papričiek; Cymedika SK, s.r.o., Zvolen) v dávke 15g/100 kg krmiva, a to počas 21 dní. Experiment trval 42 dni. Zvieratá boli kŕmené štandardnou kŕmnom zmesou Anpro.Feed (VKZ Bučany). Použitie dávkovania kmeňa a extraktov vychádzali z našich predchádzajúcich experimentov. Vzorky trusu boli odoberané v nultý resp. prvý deň (začiatok pokusu), na 7. deň (po týždni aplikácie), 21. deň (3 týždne aplikácie), 35. deň (2 týždne od ukončenia aplikácie) a 42. deň (koniec pokusu, t.j. 3 týždne od ukončenia aplikácie). Vzorky krvi boli odoberané v 0/1., 21. a 42. deň. Vzorky obsahu céka boli odoberané po odporazení 3 zvierat z každej skupiny na 21. a 42. deň experimentu. Sledované skupiny baktérií z trusu a céka boli izolované štandardnou mikrobiologickou metódou po predchádzajúcom vyriedení v Ringerovom roztoku (pH 7,0 Oxoid, Ltd., Basingstoke, Anglicko) a vysiatí na príslušné kultivačné médiá podľa ISO noriem: M-Enterococcus agar pre enterokoky, Baird-Parker agar pre koaguláza-pozitívne stafylokoky (CPS) a *Staphylococcus aureus*, Cetrimide agar pre pseudomonády, MacConkey agar pre *Escherichia coli* (Becton & Dickinson), Mannitol salt agar (Merck, Nemecko) pre koaguláza-negatívne stafylokoky (CNS) a *Clostridium difficile* agar so suplementom (SR0096E) a s obsahom 7% (v/v) defibrinovanej konskej krvi (SR0050) (Oxoid) pre *Clostridium-like* sp. pri teplote a dĺžke kultivácie typickej pre daný bakteriálny druh. Počty baktérií boli vyjadrené v KTJ/g (kolónie tvorné jednotky na 1ml a 1 g). Biochemické parametre boli stanovené použitím komerčných kitov Randox (Anglicko). Sledované boli celkové bielkoviny a lipidy (g/l), cholesterol, glukóza a vápnik (mmol/l), alanín-aminotransferáza (µkat/l), glutationperoxidáza (U/ml). Z imunologických parametrov bola sledovaná fagocytárna aktivita (FA, %) a index FA modifikovanou metódou podľa Hrubíšku (1981). Zootechnické parametre ako konverzia krmiva, celkové prírastky, mortalita boli sledované denne. V mäse králikov (*Musculus longissimus dorsi*) sa sledovalo chemické zloženie a kvalita mäsa 24 hodín *post mortem* - obsah celkovej vody, celkové bielkoviny, celkový tuk (g/100g) a energetická hodnota (KJ/100g).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Najvýraznejší inhibičný účinok v *in vitro* podmienkach prejavil extrakt oregana. Z celkového počtu 248 izolátov z rôznych ekosystémov (172 G⁺; 76 G⁻), extrakt oregana inhiboval rast 170 G⁺ baktérií (98,8%) a 76 G⁻ baktérií (100%). Rastlinný extrakt šalvie inhiboval rast 77 G⁺ baktérií (39,5%) a 23 G⁻ baktérií (30,3%). Na antibakteriálne účinky oregana a šalvie v iných ekosystémoch poukazujú viaceré vedecké štúdie (Sivropoulou a kol., 1996; Lambert a kol., 2001; Marcin, 2006). Medzi koncentráciou silíc pôsobiacou na baktérie v *in vitro* podmienkach a dávkou silíc aplikovanou v *in vivo* podmienkach sa prejavujú značné rozdiely. Napr. pri zvýšenej koncentrácii silíc v krmive sa môže prejsť ich toxicita a následne aplikácia silíc má opačný efekt ako je žiadaný (Marcin, 2006). Pri *in vivo* experimente neboli významne ovplyvnené počty sledovaných bakteriálnych skupín v obsahu céka králikov. Kmeň CCM 4231 v céku nebol zachytený, ale v truse králikov skupiny ES1 dosahoval na 7. deň počty $2,7 \pm 0,5 \log_{10}$ KTJ/g, na 21. deň $1,6 \pm 0,8 \log_{10}$ KTJ/g, na 35. deň $1,3 \pm 0,6 \log_{10}$ KTJ/g a na 42. deň $< 1,0 \log_{10}$ KTJ/g. Tento kmeň kolonizoval ekosystém králikov slabšie než kmeň *E. faecium* CCM 7420 (izolát z faeces králika), pri ktorom na 7. deň boli počty kolónií $4,32 \pm 0,34 \log_{10}$ KTJ/g; na 21. deň $4,34 \pm 0,75 \log_{10}$ KTJ/g; na 42. deň $3,30 \pm 0,30 \log_{10}$ KTJ/g (Simonová, 2006). V truse králikov experimentálnej skupiny ES1 (kmeň CCM4231) bola na 7. deň zaznamenaná redukcia CPS ($p < 0,01$) oproti KS1 a KS2 ako aj redukcia *E. coli* ($p < 0,01$) oproti KS1. Redukcia CPS ($p < 0,01$) ako aj *Clostridium*-like sp. ($p < 0,01$) oproti KS2 bola zistená v truse králikov aj na 35. deň experimentu. V skupine zvierat, ktoré prijímali oregano (ES2) došlo na 7. deň experimentu k redukcii *E. coli* (o $3,3 \log_{10}$ KTJ/g) ako aj k zníženiu počtu pseudomonád (o $2,6 \log_{10}$ KTJ/g) oproti kontrolnej skupine KS1; a na 35. deň experimentu bola zistená aj redukcia klostridií (o $1,7 \log_{10}$ KTJ/g) oproti kontrolnej skupine KS2. V skupine ES3 (v skupine so šalviou) došlo na 7. deň experimentu k redukcii *E. coli* (rozdiel $3,1 \log_{10}$ KTJ/g), pseudomonád (o $2,6 \log_{10}$ KTJ/g) v porovnaní s KS1, ako aj k redukcii CPS na 7. deň (o $1,5 \log_{10}$ KTJ/g) a na 35. deň (o $2,1 \log_{10}$ KTJ/g) oproti KS2. Na 35. deň bola zaznamenaná i redukcia *Clostridium*-like sp. (o $1,7 \log_{10}$ KTJ/g) v porovnaní s KS2. V ES4 (v skupine s Xtraktom) bola zaznamenaná redukcia *E. coli* (o $1,2 \log_{10}$ KTJ/g) na 7. deň oproti KS1 a *Clostridium*-like sp. (o $1,7 \log_{10}$ KTJ/g) na 35. deň oproti KS2. Ako vyplýva z výsledkov podávaním naturálnych substancií (kmeň CCM4231, oregano, šalvia, Xtrakt) bola zistená v truse králikov inhibícia *E. coli* na 7. deň experimentu ako aj inhibícia *Clostridium*-like sp. na 35. deň experimentu. Navyiac, pri aplikácii extraktov oregana a šalvie bola zaznamenaná na 7. deň experimentu i redukcia pseudomonád. Najvyššia redukcia oocýst *Eimeria* sp. bola v ES1 (kmeň CCM4231) na 7. deň - 83,3 ks/g, na 21. deň - 33,4 ks/g v porovnaní s KS2 (566 ks/g; 1 306,7 ks/g). V skupine ES2 (skupina s oreganom) bola redukcia v počte oocýst zaznamenaná na 21. deň - 250 ks/g, na 42. deň - 183,4 ks/g v porovnaní s KS2 (1 306,7 ks/g; 1 435,1 ks/g). V skupine zvierat, ktoré prijímali šalviu a Xtract nedošlo k redukcii oocýst eimérií. Biochemické parametre neboli vplyvom podávaných naturálnych substancií ovplyvnené. Avšak, výrazný imunostimulačný účinok bol zaznamenaný v skupine ES4 (Xtract), kde sa FA zvýšila z 13% (na 21. deň experimentu) na 17% (na 42. deň experimentu). Celkové prírastky boli vyššie u zvierat v experimentálnych skupinách oproti obidvom kontrolným skupinám (Tab 1). Marcin (2006) uvádza vyššie celkové prírastky u laboratórnych myší po príjme pamajoránovej a šalvieovej silice. Obsah celkovej vody v králičom mäse variroval vo všetkých skupinách v intervale 74,07 - 76,17 g/100g; celkových bielkovín od 21,23 - 21,80 g/100g. Najnižší obsah celkového tuku v mäse bol zaznamenaný v skupine ES1 (1,2 g/100g) oproti KS1 (2,97 g/100g) a KS2 (1,4 g/100g). Simonová (2006) uvádza taktiež najnižší obsah celkového tuku v skupine zvierat prijímajúcich kmeň *E. faecium* 2019 (CCM7420) oproti KS. Prídavok probiotík zvyšuje fermentačnú aktivitu v slepom čreve následkom čoho môže dochádzať ku kvalitatívnym zmenám v mäse králikov (Simonová, 2006). Najvyššia energetická hodnota mäsa bola

dosiahnutá v skupine zvierat, ktorým bol podávaný rastlinný extrakt šalvie (ES3), a to 491,03 KJ/100g v porovnaní s KS1 (467,57 KJ/100g) a KS2 (415,11 KJ/100g).

Tab 1 Vybrané zootechnické parametre v skupinách králikov s podávaním naturálnych substancií a v kontrolných skupinách zvierat.

	CCM4231	Oregano	Šalvia	Xtrakt	KS1 ¹	KS2 ²
Konverzia krmiva(kg)	3,97	3,92	4,04	4,31	4,26	3,83
Prírastky celkom (kg)	38,1	34,2	32,1	34,8	30,7	29,7
Mortalita (ks / %)	2 / 8,3	4 / 16,6	4 / 16,6	5 / 20,8	6 / 25,0	5 / 20,8

¹ kontrolná skupina zvierat s kokcidiostatikom, ² kontrolná skupina zvierat bez kokcidiostatika

POĎAKOVANIE

Práca vznikla za finančnej podpory vedeckej agentúry VEGA (projekt 2/5139/27). Ďakujem p. M. Bodnárovej ako aj kolegyniam Dr. Strompfovej V. PhD, Dr. M. Simonovej PhD, Dr. M. Haviarovej za vynikajúcu pomoc pri spracovaní vzoriek v laboratóriu, Dr. R. Jurčíkovi (SCPV, Nitra) za pomoc pri odbere krvi a Doc. I. Šalamonovi, Doc. J. Poráčovej (PU, Prešov) za zaobstaranie rastlinných extraktov. Srdečne ďakujem Dr. A. Laukovej CSc. za vedenie a usmerňovanie pri spracovávaní výsledkov a vytváraní tohto príspevku.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- De Vuyst L, Callewart R, Crabbe K. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiol.* 1996; 142: 817-827.
- Hrubiško M. Testovanie fagocytózy v krvi. *Hematológia a transfuziológia*. Vyd. Osveta, Martin. 1981; 19.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oils, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.* 2001; 91:453-462.
- Lauková A, Mareková M, Javorský P. Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM 4231. *Lett Appl Microbiol.* 1993; 16:257-260.
- Lauková A, Czikková S. Inhibition effect of enterocin CCM 4231 in the rumen fluid environment. *Lett Appl Microbiol.* 1998; 26:215-218.
- Lauková A, Czikková S. The use of enterocin CCM 4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol.* 1999; 87:182-186.
- Lauková A, Vlaemynck G, Czikková S. Effect of Enterocin CCM 4231 on *Listeria monocytogenes* in Saint-Paulin Cheese. *Folia Microbiol.* 2001; 46:157-160.
- Lauková A, Strompfová V, Simonová M, Skřivanová V, Volek Z, Haviarová M, Szabóová R, Jindřichová E, Marounek M, Chrástínová L, Faix Š, Rafay J. Probiotic and bacteriocinogenic microorganisms in rabbit breeding. Zborník abstraktov z Medzinárodnej konferencie Dni výživy a veterinárnej dietetiky VII. Košice, 2006; 100.
- Marcin A. Rastová schopnosť a vybrané biochemické a mikrobiologické parametre v intestinálnom trakte laboratórnych myší po perorálnom prijme rastlinných extraktov. Zborník vedeckých prác SCPV v Nitre Ústavu agroekológie v Michalovciach. 2006; 257-265.
- Simonová M. Probiotické a bakteriocín-produkujúce baktérie a ich vplyv na fyziológiu trávenia u králikov. Doktorandská dizertačná práca. ÚFHZ SAV Košice; 2006; 5-6, 90-91, 116.
- Szabóová R, Chrástínová L, Haviarová M, Simonová M, Strompfová V, Faix, Š, Vasilková Z, Plachá I, Lauková A, Rafay J, Poráčová J. Phytoaditíves in rabbits breeding. Zborník abstraktov z Medzinárodnej konferencie Dni výživy a veterinárnej dietetiky VII. Košice, 2006; 99.
- Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J Agric Food Chem.* 1996; 44: 1202-1205.

SÉROVÉ PROTEÍNY A PROTEÍNY AKÚTNEJ FÁZY U TELIAT POSTIHNUTÝCH RESPIRAČNÝM SYNDRÓMOM

Tóthová Cs., Nagy O., Kováč G.

II. interná klinika, UVL, Košice

ABSTRAKT

Zámerom práce bolo zistiť vplyv chronických ochorení respiračného aparátu u teliat na koncentráciu vybraných proteínov akútnej fázy – haptoglobínu (Hp) a sérového amyloidu A (SAA), ako aj na koncentráciu niektorých ukazovateľov bielkovinového profilu – celkových bielkovín (CB), albumínu (Alb), urey (U), kreatinínu (Kreat) a celkových imunoglobulínov (CIg) v krvnom sére. Koncentrácie uvedených parametrov u teliat postihnutých chronickými respiračnými ochoreniami sme porovnali s hodnotami zistenými u klinicky zdravých teliat. Sledovali sme 11 teliat s chronickým ochorením respiračného aparátu a 11 klinicky zdravých teliat plemena čierostrakatého a jeho krížencov vo veku 4-6 mesiacov. Hp a SAA sa stanovovali metódou enzýmovej imunoanalýzy. Stanovenie hodnôt CB, Alb, U a Kreat bolo vykonávané na automatickom biochemickom analyzátore. CIg sa analyzovali spektrofotometricky turbidimetrickou metódou zink-sulfátovým testom. U teliat s respiračným syndrómom sme zaznamenali nesignifikantne vyššiu priemernú koncentráciu Hp, U a CIg a štatisticky významne vyššiu koncentráciu CB ako u zdravých teliat. Pri hodnotení koncentrácie SAA sme v skupine teliat s postihnutím respiračného aparátu nezaznamenali významné rozdiely oproti skupine klinicky zdravých teliat. Koncentrácia Alb bola signifikantne nižšia u chorých teliat v porovnaní so zdravými. Naše výsledky poukazujú na to, že sledovanie koncentrácie proteínov akútnej fázy, spolu s ukazovateľmi bielkovinového metabolizmu, môže zohrávať dôležitú úlohu v diagnostike ochorení respiračného aparátu.

ÚVOD

Ochorenia dýchacieho aparátu patria medzi základné príčiny morbidity a mortality teliat v období od narodenia do niekoľkých mesiacov života, prevažne vo vekovej skupine 1 až 6 mesiacov (Radostitis a kol., 1994). Vo väčšine prípadov sa jedná o multifaktoriálne a polyetiologické ochorenia vyvolané patogénnymi a oportúnnymi mikroorganizmami, za spolupôsobenia nepriaznivých faktorov prostredia (nevhodná maštalná klíma, nízka úroveň ošetrovateľskej starostlivosti, nerešpektovanie základných biologických potrieb teliat, stresové faktory, dlhotrvajúce transporty, neplnohodnotná výživa) a za podmienok zníženej odolnosti organizmu. Komplex takýchto hromadných ochorení dýchacích orgánov u teliat a mladého hovädzieho dobytku sa nazýva respiračný syndróm, alebo enzootická bronchopneumónia (Slanina, 1991). V klinickej praxi diagnostika ochorení dýchacieho aparátu a následný výber vhodnej terapie sa zakladá na zhodnotení lokálnych a systémových klinických príznakov. Klinické vyšetrenie kombinované rôznymi diagnostickými testami však subklinické formy ochorení, zápalové procesy s miernejším priebehom alebo skoré štádiá ochorení nemusí vždy odhaliť (Petersen a kol., 2004). Jedným z možností monitorovania zdravotného stavu zvierat je aj sledovanie zmien koncentrácie proteínov akútnej fázy v rôznych telových tekutinách, predovšetkým v sére (Baumann a Gauldie, 1994; Gruys a kol., 1994). Cieľom práce bolo zistiť vplyv chronických ochorení respiračného aparátu u teliat na koncentráciu vybraných proteínov akútnej fázy – haptoglobínu a sérového amyloidu A, ako aj na koncentráciu niektorých ukazovateľov bielkovinového profilu v krvnom sére a porovnať koncentráciu uvedených parametrov u teliat postihnutých chronickými respiračnými ochoreniami s hodnotami zistenými u klinicky zdravých teliat.

MATERIÁL A METODIKA

Do sledovania bolo zahrnutých 11 teliat s chronickým ochorením respiračného aparátu. Za účelom porovnania koncentrácie sledovaných parametrov u chorých a zdravých teliat sme do hodnotenia zahrnuli aj 11 klinicky zdravých teliat. Teľatá boli plemena čierostrakatého a jeho krížencov vo veku 4-6 mesiacov. Zvieratá boli ustajnené voľne, kŕmené boli senom a jadrovým krmivom a vodu dostávali *ad libitum*.

Vybrané proteíny akútnej fázy – haptoglobín (Hp) a sérový amyloid A (SAA) a vybrané parametre bielkovinového profilu – celkové bielkoviny (CB), albumín (Alb), urea (U), kreatinín (Kreat) a celkové imunoglobulíny (CIg) sa hodnotili v krvnom sére. Krv sa odoberala priamou punkciou v. *jugularis*. Pred odberom krvi bolo u teliat vykonané klinické vyšetrenie so zameraním na posúdenie stavu respiračného aparátu. Klinické vyšetrenie bolo vykonané bežnými klinickými vyšetřovacími metódami (Slanina a kol., 1993).

Hp a SAA sa stanovovali metódou enzýmovej imunoanalýzy (ELISA) použitím komerčných ELISA testov firmy Tridelta Development, Ltd., Wicklow, Írsko v mikrotitračných platniach. Odčítanie hodnôt absorbančie a následné vypočítanie koncentrácií hodnotených parametrov sa vykonalo na automatickom fotometri Opsys MR firmy Dynex Technologies. Stanovenie hodnôt CB, Alb, U a Kreat bolo vykonávané komerčnými diagnostickými testami firmy Randox automatickým biochemickým analyzátorom Alizé firmy Lisabio. CIg sa analyzovali spektrofotometricky turbidimetrickou metódou zink-sulfátovým testom.

Štatistické hodnotenie získaných výsledkov bolo vykonané stanovením priemerných hodnôt (\bar{x}) a smerodajných odchýlok (sd) sledovaných parametrov v jednotlivých skupinách teliat. Významnosť rozdielov priemerných hodnôt jednotlivých ukazovateľov medzi skupinami sme hodnotili nepárovým t-testom. Štatistické hodnotenie bolo vykonané programom GraphPad InStat V2.04.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Dosiahnuté výsledky analýz Hp, SAA a sledovaných parametrov bielkovinového profilu charakterizované priemernými hodnotami, smerodajnými odchýlkami a štatistickým vyhodnotením sú zhrnuté v tabuľke 1.

Tabuľka 1 Koncentrácia Hp, SAA a sledovaných parametrov bielkovinového profilu u teliat s chronickým ochorením respiračného aparátu v porovnaní s klinicky zdravými teľatami ($\bar{x} \pm sd$)

Parameter	Skupina teliat		P
	Klinicky choré	Klinicky zdravé	
Hp ($\mu\text{g/ml}$)	693 \pm 620	436 \pm 823	n. s.
SAA ($\mu\text{g/ml}$)	31,0 \pm 15,8	33,1 \pm 28,6	n. s.
CB (g/l)	76,4 \pm 10,1	68,0 \pm 3,9	P < 0,05
Alb (g/l)	36,0 \pm 4,3	39,9 \pm 2,8	P < 0,05
U (mmol/l)	3,9 \pm 1,1	3,3 \pm 0,9	n. s.
Kreat ($\mu\text{mol/l}$)	79,7 \pm 19,7	93,5 \pm 15,1	n. s.
CIg (U ZST)	29,0 \pm 5,3	25,2 \pm 5,7	n. s.

Pri hodnotení koncentrácie Hp sme u teliat postihnutých respiračným syndrómom zistili približne o 250 $\mu\text{g/ml}$ vyššiu priemernú hodnotu v porovnaní s klinicky zdravými teľatami, tento rozdiel však nebol štatisticky významný. V obidvoch sledovaných skupinách sme zistili vyššie hodnoty smerodajnej odchýlky, čo poukazuje na širšie rozpätie individuálnych hodnôt s minimom 100 $\mu\text{g/ml}$ a maximom 2890 $\mu\text{g/ml}$. Pri hodnotení koncentrácie SAA sme v skupine teliat s postihnutím respiračného aparátu nezaznamenali významné rozdiely oproti

skupine klinicky zdravých teliat, jeho priemerná koncentrácia bola nesignifikantne vyššia u klinicky zdravých teliat.

Štatisticky významné rozdiely priemerných hodnôt medzi skupinou klinicky zdravých a chorých teliat sme zaznamenali v koncentráciách celkových bielkovín a albumínu. Priemerná koncentrácia CB u teliat s respiračnými príznakmi bola takmer o 10 g/l vyššia v porovnaní s klinicky zdravými teľatami, tento rozdiel bol aj štatisticky významný ($P < 0,05$). V koncentracii albumínu sme u teliat s respiračnými príznakmi zaznamenali signifikantne nižšiu priemernú hodnotu v porovnaní so zdravými teľatami ($P < 0,05$).

Zhodnotením koncentrácie urey sme v skupine teliat s respiračným syndrómom nezaznamenali štatisticky významné rozdiely oproti skupine zdravých teliat. Priemerná koncentrácia urey u klinicky chorých teliat bola nesignifikantne vyššia v porovnaní so skupinou zdravých teliat. Pri hodnotení koncentrácie kreatinínu v krvnom sére sme u klinicky zdravých teliat zaznamenali takmer o 15 $\mu\text{mol/l}$ vyššiu priemernú koncentráciu ako u teliat s respiračným syndrómom, tento rozdiel však nebol štatisticky významný. Priemerná koncentrácia Clg u teliat s príznakmi postihnutia respiračného aparátu bola približne o 4 U ZST vyššia ako u zdravých teliat, rozdiely priemerných hodnôt medzi sledovanými skupinami však neboli štatisticky významné.

Častý výskyt respiračného syndrómu u teliat vyžaduje neustále zdokonaľovanie včasnej a správnej diagnostiky. Uvádza sa, že sledovanie koncentrácie proteínov akútnej fázy, ako je SAA a Hp, poskytuje cenné informácie v rámci diagnostiky zápalových a infekčných ochorení u hovädzieho dobytku (Eckersall, 2000). Tvorba proteínov akútnej fázy je jednou zo skupiny reakcií, k spúšťaniu ktorých dochádza veľmi skoro po akomkoľvek poškodení tkaniva v rámci odpovede akútnej fázy zápalu (Petersen a kol., 2004). Na rôzne vonkajšie a vnútorné impulzy zareaguje organizmus aktiváciou makrofágov, ktoré uvoľňujú celý rad produktov známych ako cytokíny (Yoshioka a kol., 2002). Novšie literárne údaje poukazujú na to, že cytokíny môžu byť produkované aj inými bunkami, napr. interleukin-6 môžu syntetizovať aj bunky mukozálneho epitelu (Pritts a kol., 2002). Uvedené mediátory medzi inými funkciami podporujú produkciu rôznych proteínov v pečeni, ako sú sérový amyloid A a haptoglobín (Erdbrooke a kol., 1993).

Experimentálne štúdie poukazujú na to, že pri ochoreniach respiračného aparátu u teliat, vyvolaných BHV1 a *Mannheimia haemolytica*, existuje vzájomný vzťah medzi výskytom bakteriálnych infekcií a zvýšenými hodnotami Hp (Godson a kol., 1996), kým na vírusové infekcie reaguje organizmus slabou alebo žiadnou odpoveďou akútnej fázy zápalu (Heegaard a kol., 2000). Kaepke a kol. (2002) sledovali teľatá s ochorením respiračného aparátu a zdravé teľatá, a podobne našim výsledkom, u teliat s respiračným syndrómom zaznamenali vyššiu koncentráciu Hp ako u zdravých teliat. Nikunen a kol. (2007) taktiež sledovali teľatá s príznakmi respiračného ochorenia a zistili u nich zvýšené koncentrácie Hp, ako aj SAA. My sme zaznamenali nesignifikantne vyššiu koncentráciu SAA v skupine zdravých teliat, čo poukazuje na to, že aj klinicky zdravé teľatá môžu vykazovať vyššie hodnoty spomínaného ukazovateľa. Vyššie hodnoty proteínov akútnej fázy, aj napriek chýbaniu klinických príznakov, však môžu poukazovať na skoré štádiá zápalových ochorení, zápalové reakcie s miernejším priebehom alebo pôsobenie silného stresu. Tieto skutočnosti podporujú teóriu, že sledovanie koncentrácie proteínov akútnej fázy môže byť užitočné obzvlášť pri skorom odhaľovaní určitých zápalových ochorení v chovoch teliat. Zároveň by mohli byť využívané ako dôležitý ukazovateľ pri stanovení prognózy (Speier, 2004).

Albumín patrí do skupiny negatívnych proteínov akútnej fázy, koncentrácia ktorých sa znižuje počas odpovede organizmu na zápal (Gruys a kol., 1994). V našom sledovaní sme zaznamenali významne nižšiu priemernú koncentráciu tohto ukazovateľa u teliat s respiračným syndrómom v porovnaní so zdravými teľatami. Signifikantne vyššia koncentrácia celkových bielkovín u chorých teliat je pravdepodobne spôsobená zvýšenou

tvorbou imunoglobulínov u postihnutých jedincov, čo sme zistili aj u našich klinicky chorých teliat.

Naše výsledky naznačujú, že proteíny akútnej fázy by v budúcnosti mohli byť úspešne využívané pri sledovaní zdravotného stavu teliat a pri odhaľovaní subakútnych foriem zápalových ochorení respiračného aparátu. Včasná diagnostika môže dopomôcť pri začatí správnej a cielenej terapie a takto zvyšovať úspešnosť liečby.

POĎAKOVANIE

Práca bola riešená v rámci grantového projektu APVV-20-027905.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Baumann, H., Gauldie, J. The acute phase response. *Immunol Today*. 1994; 15: 74-80.
- Eckersall, P.D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue Méd Vét*. 2000; 151: 577-584.
- Erdbrooke, M.R., Foldi, J., Cheshire, J.K., Li, F., Faulkes, D.J., Woo, P. Constitutive and NF-kappa B-like proteins in the regulation of the serum amyloid A gene by interleukin-1. *Cytokine* 1993; 3(5): 380-388.
- Godson, D.L., Campos, M., Attah-Poku, S.K., Redmond, M.J., Cordeiro, D.M., Sethi, M.S., Harland, R.J., Babiuk, L.A. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996; 51: 277-292.
- Gruys, E., Obwolo, M.J., Toussaint, M.J.M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet Bull*. 1994; 64: 1009-1018.
- Heegaard, P.M., Godson, D.L., Toussaint, M.J., Toornhooj, K., Larsen, L.E., Viuff, B., Roonsholt, L. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000; 77: 151-159.
- Kaepke, M., Heuwieser, W., tenhagen, B.A. acute-phase-proteins in respiratory tract disease of calves. XXII World Buiatrics Congress, Hannover, 2002.
- Nikunen, S., Härtel, H., Orro, T., Neuvonen, E., Tanskanen, R., Kivelä, S.-L., Sankari, S., Aho, P., Pyörälä, S., Saloniemi, H., Soveri, T. Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007; 30(3): 143-151.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M.H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res*. 2004; 35: 163-187.
- Pritts, T., Hungnese, E., Wang, Q., Robb, P., Hershko, D., Hasselgren, P.O. Mucosal and enterocyte IL-6 production during sepsis and endotoxemia – role of transcription factors and regulation by the stress response. *Am J Surg*. 2002; 183: 372-383.
- Radostitis, O.M., Leslie, K.E., Fretow, J. *Herd Health-Food Animal Production Medicine*, 2nd Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 1994, 631pp.
- Slanina, L. *Zdravie a produkcia teliat*. Príroda, Bratislava, 1991, 387pp.
- Slanina, L., Dvořák, R. *Veterinárna klinická diagnostika vnútorných chorôb*. Príroda, Bratislava, ISBN 80-07-00536-6, 1993, 390pp.
- Speier, S. Acute phase responses in vealves monitored by sequential determination of serum amyloid A, haptoglobin and Mx protein. Inaugural-Dissertation, Zürich, 2004, 25pp.
- Yoshioka, M., Watanabe, A., Shimada, N., Murata, H., Yokomizo, Y., Nakajima, Y. Regulation of haptoglobin secretion by recombinant bovine cytokines in primary cultured bovine hepatocytes. *Domest Anim Endocrinol*. 2002; 23: 425-433.

EUBAKTERIÁLNY SYMBIONT PÔDNEHO PRVOKA *Kahliella* spp.

Tóthová T.

Ústav chemických vied, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Mikrobiálne symbionty spĺňajú rôzne úlohy v prospech hostiteľského organizmu a ich vzťahy môžu byť kategorizované ako obligátne alebo fakultatívne, mutualistické alebo parazitické a ekto- alebo endosymbiotické. Táto práca bola zameraná na štúdium symbiotických vzťahov medzi pôdnym prvokom *Kahliella* spp. a eubaktérií v *in vitro* kultúrach pod selekčným tlakom HgCl₂. Výskyt škodlivých látok v životnom prostredí pôsobí rizikovo na prirodzenú populáciu mikroorganizmov. Na sledovanie diverzity baktérií pri rôznych koncentráciách HgCl₂ bola použitá denaturačná gradientová gélová elektroforéza (DGGE) eubakteriálnej 16S rRNA génu. Výsledky DGGE poukázali na prítomnosť jedného fragmentu vo všetkých testovaných vzorkách, ktorého intenzita sa nemenila s narastajúcou koncentráciou HgCl₂. Na základe sekvenčných analýz bola uvedená baktéria priradená medzi gram-negatívne α -proteobaktérie. Kultivačné pokusy potvrdili, že sa jedná o obligátneho symbionta, ktorý je úzko spojený so svojím hostiteľom *Kahliella* spp.

ÚVOD

Štúdium vzťahov medzi prvokmi a ich bakteriálnymi symbiontmi je dôležité nielen z hľadiska ekológie, ale môže poskytnúť informácie o širokom okruhu otázok týkajúcich sa symbiotických vzťahov, ako napríklad špecificita hostiteľa. Symbióza je všeobecné označovanie pre rôzne vzťahy dvoch rozdielnych organizmov žijúcich spolu v tesnom spojení. Podľa povahy ich vzájomného pôsobenia môžeme ich vzťah nazývať mutualizmom alebo parazitizmom. Medzi týmito dvoma typmi koexistencie je ešte niekoľko prechodných spôsobov spolužitia (napr. komenzalizmus). Symbiotické vzťahy medzi určitými organizmami vystihujú termíny: ektobiotický - žijúci na povrchu iného organizmu a endobiotický - žijúci vo vnútri iného organizmu. Prvky sami o sebe predstavujú bunkové mikrobiotopy vhodné pre život iných menších organizmov. Počet prvokov žijúcich v symbiotickom vzťahu s baktériami je ďaleko vyšší, ako sa všeobecne predpokladá. Intracelulárne baktérie môžu vniknúť takmer do každého bunkového kompartmentu, bohatého na metabolity, ako napríklad, cytoplazma, karyoplazma, jadrový obal, pelikulárny priestor. Vo voľne žijúcom prvoku *Paramecium* je známych okolo 60 rôznych druhov baktérií, ktoré žijú v jeho intracelulárnych priestoroch. Baktérie rodu *Holospira* žijú paraziticky v jadre prvoka *Paramecium*. *Holospira elegans* a *Holospira undulata* infikujú mikrojadro *Paramecium caudatum* (Amann a kol., 1991). Medzi ďalšie endosymbionty *P. caudatum* zaraďujeme aj baktériu *Caedibacter caryophila* vyskytujúcu sa v makrojadre. Pre kmene *Paramecium*, v ktorých sa tento endosymbiont nevyskytuje je toxická (Springer a kol., 1993). V nedávnej minulosti bolo podrobne identifikovaných len niekoľko baktérií žijúcich symbioticky s prvokmi, ktoré boli správne fylogeneticky zaradené. Hlavným problémom bolo, že väčšina z týchto baktérií nie je schopná rásť *in vitro* samostatne a preto ich štúdium pomocou tradičných mikrobiologických metód nebolo možné.

V súčasnosti sa na štúdium protozoálnych bakteriálnych endosymbiontov používa okrem iného aj denaturačná gradientová gélová elektroforéza, umožňujúca analýzu baktérií bez kultivácie. Uvedená metóda umožňuje separáciu dsDNA fragmentov v prítomnosti chemického denaturantu a na základe ich odlišnej sekvencie umožňuje štúdium genetickej diverzity mikrobiálnych spoločenstiev. DGGE analýza bola úspešne použitá pri detekcii a klasifikácii anaeróbných bachorových ciliát (Regensbogenová a kol., 2004a) a pri ďalších analýzach rôznych mikrobiálnych ekosystémov. Archebaktérie asociované s anaeróbnymi

bachorovými ciliátmi boli analyzované na základe sekvenčných analýz 16S rRNA génov (Regensbogenová a kol. 2004b).

V našich experimentoch sme sa zamerali na štúdium vplyvu rôznych koncentrácií HgCl₂ na protozoálnu populáciu *Kahliella* spp. a tiež na dynamiku zmien mikrobiálnej komunity prítomnej v protozoálnej kultúre. V tejto práci uvádzame výsledky dosiahnuté pri identifikácii a fylogentickej analýze bakteriálnej populácie asociovanej s pôdnym prvokom *Kahliella* spp.

MATERIÁL A METODIKA

Mikroorganizmy a kultivačné podmienky prvoka

Protozoálne bunky sme získali z eluátu pôdy a kultivované staticky v sterilnom *Ochromonas* médiu (Lauhlin, 1993) pri laboratórnej teplote. Kultúry prvokov boli pravidelne krmené zmesou baktérií izolovaných z pôdy, odkiaľ pochádzali aj samotné prvoky. Vplyv ortuti na protozoálnu populáciu sme testovali pridaním HgCl₂ v koncentráciách 0,5 a 1 µg/ml. Vzorky kultúr na izoláciu DNA boli odobraté po 7, 24 a 48 hodinovom pôsobení ortuti.

Záchyt baktérií z protozoálnej kultúry

Na záchyt gram-negatívnych baktérií bol použitý MacConkey agar. Gram-pozitívne baktérie boli izolované na Todd Hewitt agarových platniach obsahujúcich fenyletanol (2,5 g.l⁻¹ média). Platne boli kultivované pri 37°C 16 hodín.

Izolácia totálnej DNA a PCR amplifikácia

Na izoláciu totálnej DNA sme použili pelet z 1,5 ml protozoálnej kultúry (10 minút, 10 000 r.p.m., 20°C), z ktorého sme vyzolovali celkovú DNA pomocou kitu BactozolTM Kit (Molecular Research Center, USA). Konzervovaná oblasť eubakteriálneho 16S rRNA génu bola amplifikovaná pomocou univerzálnych primérov fD1 rP2 (Wood a kol., 1998). Na amplifikáciu sekvencie 16S rDNA génu (~ 450 bp) pre DGGE analýzu boli použité priméry 1401R a 968F s GC svorkou (Heuer a Smalla, 1997).

DGGE analýza

DGGE analýzu sme realizovali na aparátúre DCode Universal Mutation Detection System (BioRad). PCR produkty (40 µl) boli nanosené do 8% polyakrylamidového gélu obsahujúceho denaturačný gradient v rozsahu od 35 do 60% (100% denaturant obsahuje 7 M močovinu a 40% formamid). Elektroforéza prebiehala 17 hodín pri napätí 50 V a teplote 60 °C v tlmivom roztoku 1xTAE. Po skončení elektroforézy bol gél zafarbený v roztoku etídiumbromidu (0.5 µg/ml) a dokumentovaný pomocou MiniBis UV Vis documentation system (Micro Photonics, USA).

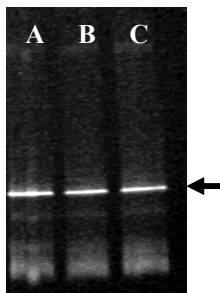
Klonovanie a sekvenčná analýza

Identifikovaný DGGE fragment bol vyrezaný z gélu a premiestnený do 50 µl TE pufru. Zmes bola 5 s intenzívne miešaná a centrifugovaná 1 minútu pri maximálnych otáčkach. Získaný supernatant bol použitý na reamplifikáciu s primérmí 1401R a 968F s GC svorkou. Získané produkty reamplifikácie ako aj PCR amplikóny 16S rRNA génu boli klonované do plazmidového vektora (pTZ57R/T) použitím klonovacieho kitu InsTAcloneTM (Fermentas). Získané rekombinanty boli sekvenčne analyzované. Kompletné sekvencie boli vyhodnotené porovnaním s GenBank databázou.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Protozoálny kmeň používaný v tejto práci bol považovaný za nálevník patriaci do rodu *Halteria* kvôli niektorým morfológickým podobnostiam a sekvenčnej analýze 18S rDNA.

Podrobné mikroskopické pozorovania a popis infraciliatúry (dáta neuvádzame) poskytli dôvod pre nové systematické zaradenie tejto ciliáty do druhu *Kahliella* sp. V našej práci sme na detekciu eubakteriálnych druhov symbioticky žijúcich s pôdnym nálevníkom *Kahliella* spp. použili metódu DGGE. 16S rRNA gén eubakteriálnych symbiontov bol amplifikovaný pomocou PCR z totálnej bakteriálnej DNA, ktorú sme získali z kultúr prvokov obsahujúcich rôzne koncentrácie HgCl₂. Pomocou špecifických primérov sme amplifikovali gén o veľkosti 450 bp, ktorý sme následne použili na DGGE analýzu v 8% polyakrylamidovom géli. Získaný DGGE profil je znázornený na obr. 1. Nepozorovali sme rozdiely v DGGE profiloch DNA s narastajúcou koncentráciou HgCl₂. Z toho môžeme usúdiť, že nedochádzalo k zmenám zloženia eubakteriálnej populácie v protozoálnych kultúrach počas krátkodobého pôsobenia ortuti (24 hod.).



Obr. 1.

DGGE analýza eubakteriálneho 16S rRNA génu amplifikovaného z totálnej DNA izolovanej z protozoálnej kultúry po 24 hodinovom pôsobení HgCl₂ v koncentráciach: A- 0 µg/ml; B-0,5 µg/ml a C-1 µg/ml HgCl₂. DGGE fragment, ktorý sa použil na ďalšie analýzy je označený šípkou.

Kvantitatívne najviac zastúpený DGGE fragment, prítomný v každej vzorke DNA, sme ďalej sekvenčne analyzovali. Fragment bol najprv vyrezaný z gélu, reamplifikovaný a klonovaný do plazmidového vektora pTZ57R/T. Tri náhodne vybrané klony boli sekvenované a získané sekvencie boli porovnané so sekvenciami v GenBank databáze. Zo sekvenčných analýz vyplýva, že endosymbiont *Kahliella* spp. patrí do α skupiny proteobaktérií a je umiestnený do rodu *Brevundimonas*, s 99% podobnosťou k *Brevundimonas diminuta* (obr. 2).

```
> emb|AJ227779.1|BDJ227779 Brevundimonas diminuta DNA for 16S ribosomal RNA, strain LMG
2337
Length=1418

Score = 737 bits (399), Expect = 0.0
Identities = 407/411 (99%), Gaps = 0/411 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 86 AACGCGAAGAACCTTACCACCTTTTGACATGCCTGGACCGCCACGGAGACGTGGCTTTTC 145
      |||
Sbjct 883 AACGCGCAGAACCTTACCACCTTTTGACATGCCTGGACCGCCACGGAGACGTGGCTTTTC 942

Query 146 CTTCGGGGACTAGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG 205
      |||
Sbjct 943 CTTCGGGGACTAGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG 1002

Query 206 GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCATTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGAAC 265
      |||
Sbjct 1003 GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCATTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGAAC 1062

Query 266 CTAATGGGACTGCCGGTGCTAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGC 325
      |||
Sbjct 1063 CTAATGGGACTGCCGGTGCTAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGC 1122

Query 326 CCTTACAGGGTGGGCTACACACGTGCTACAAATGGCTACTACAGAGGGTTAATCCTTAAAA 385
      |||
Sbjct 1123 CCTTACAGGGTGGGCTACACACGTGCTACAAATGGCAACTACAGAGGGTTAATCCTTAAAA 1182

Query 386 GTAGTCTCAGTTCGGATTGTCCTCTGCAACTCGAGGGCATGAAAGTTGGAATCGCTAGTAA 445
      |||
Sbjct 1183 GTTGTCTCAGTTCGGATTGTCCTCTGCAACTCGAGGGCATGAAAGTTGGAATCGCTAGTAA 1242

Query 446 TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCG 496
      |||
Sbjct 1243 TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGTACACACCG 1293
```

Obr. 2. Blastn analýza. Porovnanie parciálnej sekvencie 16S rRNA génu s GenBank databázou.

Na základe získaných DGGE profilov môžeme predpokladať, že baktéria reprezentovaná intenzívnym fragmentom predstavuje značnú časť bakteriálnej populácie v protozoálnej kultúre. Priama kultivácia tejto baktérie nebola úspešná. Z našich výsledkov môžeme usudzovať, že identifikovaný endosymbiont prvku *Kahliella* spp. je úzko spojený

s hostiteľskou bunkou. V symbiotickom vzťahu sa baktérie a prvoky obyčajne vzájomne dopĺňajú vo využívaní potravy a prípadných vznikajúcich metabolických produktov. Dlhodobá adaptácia bakteriálnych symbiontov na takýto spôsob života môže byť jedným z dôvodov, ktorý spôsobuje problém pri ich kultivácii pomocou tradičných metód. Fylogenetická analýza, pravdepodobne obligátneho symbionta *Kahliella* spp., poukazuje na príbuznosť k rodu *Brevundimonas*, ktorý sa často používa na testovanie priepustnosti vodných filtrov a podieľa sa tiež na degradácii niektorých herbicídov, napr. trifluralínu (Bellinaso a kol., 2003).

Pri analýze ďalších izolátov z testovanej protozoálnej kultúry sme kultiváciou na tuhých agarových médiách získali jeden gram-negatívny izolát, ktorý bol schopný rásť v prítomnosti HgCl₂. Sekvenčná analýza 16S rRNA génu ukázala, že sa jedná o bakteriálny rod *Citrobacter*.

POĎAKOVANIE

Tento projekt bol podporovaný Vedeckou Grantovou Agentúrou VEGA-grant č. 2/6175/26. Naše poďakovanie patrí aj RNDr. P. Vďačnému, Ústav zoológie, UK v Bratislave, za pomoc pri podrobnej morfolologickej analýze študovaného prvoka.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Amann R., Springer N., Ludwig W., Gortz H.-D. a Schleifer K.-H. Identification and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature*. 1991; 351:161–164.
- Bellinaso M. L., Greer CH.W., Peralba M.C., Henriques J.A.P., Gaylarde, CH.C. Biodegradation of the herbicide trifluralin by bacteria isolated from soil. *FEMS Microbiol Ecol*. 2003; 43: 191-194.
- Heuer, H. a Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In J. D. van Elsas, E. M. H. Wellington, and J. T. Trevors (ed.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 1997; 353–373.
- Laughlin T. J., Henry J. M., Phares E. F. Methods for large-scale cultivation of an *Oxytricha* (Ciliophora: Hypotrichida). *J Protozool*. 1993; 30: 63-64.
- Regensbogenova M., Pristas P., Javorsky P., Moon-van der Staay S.Y., van der Staay G.W., Hackstein J.H.P., Newbold C.J., McEwan N.R. Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. *Lett Appl Microbiol*. 2004a; 39: 144-147.
- Regensbogenova M., McEwan N. R., Javorsky P., Kišidayová S., Michalovsky T., Newbold C. J., Hackstein J. H. P., Pristas P. A re-appraisal of the diversity of the methanogens associated with the rumen ciliates. *FEMS Microbiol Lett*. 2004b; 238: 307-313.
- Springer N., Ludwig W., Amann R., Schmidt H. J., Gortz H.-D. a Schleifer K.-H. Occurrence of fragmented 16S rRNA in an obligate bacterial endosymbiont of *Paramecium caudatum*. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 9892–9895.
- Wood J., Scott K. P., Avgustin G., Newbold C. J., Flint H. J. Estimation of the relative abundance of different bacteroides and prevotella ribotypes in gut samples by restriction enzyme profiling of PCR-amplified 16S rRNA gene sequences. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64: 3683-3689.

AKÁ JE ÚROVEŇ POZNANIA SENZORICKÝCH KVALÍT?

Václavová A., Maľa P., Baranová M.

Ústav hygieny a technológie mlieka, UVL, Košice

ABSTRAKT

Cieľom našej štúdie bolo zistiť úroveň senzorických schopností v skupinách posudzovateľov – študentov klasifikovaných ako informovaní laici a ich otestovanie prostredníctvom testu spôsobilosti. Test bol vykonávaný študentmi v počte 30 osôb s rozdielnou dobou hodnotenia (ráno – skupina A, predpoludním – skupina B, popoludní – skupina C) v Špecializovanom senzorickom laboratóriu. Testovanie pozostávalo z absolvovania špeciálneho testu, založeného na princípe poznania jednotlivých senzorických kvalít a úrovní. Pri určovaní základných druhov chutí študenti najlepšie rozoznávali sladkú chuť (A – 100%, B – 91,6%, C – 75%). Pri hodnotení chuťovej a čuchovej pamäti skupina A – 66,7% a skupina C – 75% dosiahli lepšie výsledky než skupina B – 37,6%. Poradie vzoriek podľa intenzity farby určili všetky tri skupiny približne rovnako (A – 91,1%, B – 91,2%, C – 87,5%). Pri hodnotení zákalu bola úspešnosť menšia v rozmedzí 42,5 – 67,5%.

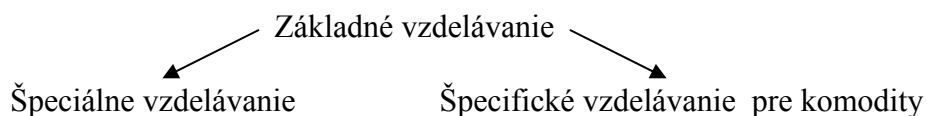
ÚVOD

Potravina má dobrú senzorickú kvalitu vtedy, keď s plnou intenzitou a harmonicky obsahuje všetky vlastnosti, ktoré vyžaduje väčšina konzumentov a nemá nežiaduce vlastnosti (Neumann a kol., 1990). Senzorická kvalita a znalosť faktorov, ktoré ju ovplyvňujú sú dôležitou informáciou o skutočnej konzumnej hodnote, ktorú možno správne určiť len našimi zmyslami (Kučerová, 2002). Na základe určitých senzorických vlastností potravín môže človek zistiť ich neznositelnosť alebo až ohrozenie svojho zdravia (Neumann a kol., 1990). Skúšajúce osoby ustanovené pre senzorické skúšanie potravín musia mať zdravé zmyslové orgány a dobrú senzorickú rozlišovaciu schopnosť. Od dobrého posudzovateľa sa okrem toho vyžaduje, aby mal odborné špecifické tovaroznalecké znalosti a praktické skúsenosti v oblasti výroby, skladovania a dopravy potravín ako aj v oblasti senzorického posudzovania výrobkov.

Na Inštitúte vzdelávania veterinárnych lekárov v Košiciach (IVVL) bolo zriadené na základe dohody medzi Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky a Univerzitou veterinárskeho lekárstva v Košiciach spoločné pracovisko Špecializované senzorické laboratórium (ŠSL).

Vnútročné zariadenie ŠSL spĺňa všetky požiadavky Smernice pre usporiadanie senzorického pracoviska STN ISO 8589. ŠSL má akreditovaný Certifikačný orgán (CO) pre oblasť personálnej certifikácie v kompatibilite s normou ISO 45 013 ako jediný orgán tohto druhu v rámci SR, v súčasnosti akreditovaný Slovenskou národnou akreditačnou službou (SNAS) podľa EN /ISO/ IEC 17024:2003 ako Certifikačný orgán pre personálnu akreditáciu osôb pre oblasť systémov zabezpečenia kontroly potravín (systémov HACCP) a oblasť senzorického posudzovania potravín.

Program ŠSL pre vzdelávanie osôb na IVVL v Košiciach v oblasti senzorického posudzovania potravín je zostavený ako trojdielny takto:



MATERIÁL A METODIKA

V štúdiu boli porovnávané 3 hodnotiteľské panely, ktoré tvorili študenti v počte 30 osôb s rozdielnou dobou hodnotenia (ráno – skupina A, predpoludním – skupina B, popoludní –

skupina C). Prvú skupinu reprezentovalo 10 študentov, druhú skupinu 10 študentov a tretiu 10 študentov III. ročníka študijného odboru Hygiena potravín UVL v Košiciach s minimálnymi znalosťami o systéme a spôsobe hodnotenia potravín. Testy boli vykonávané v ŠSL na IVVL v Košiciach. Po následnej inštrukčii v ŠSL sa podrobili vlastnému testovaniu v časovom limite do 60 min. Vykonanie praktickej skúšky spôsobilosti v oblasti senzorického posudzovania potravín prebiehalo v zmysle STN 56 0110.

Testovanie pozostávalo z absolvovania špeciálneho testu, založeného na princípe poznania jednotlivých senzorických kvalít a úrovní. Test pozostával z týchto skúšok:

1. Skúška na rozoznávanie štyroch základných druhov chutí
2. Skúška rozoznávania prahových koncentrácií chuťových látok
3. Párová skúška schopnosti určenia prahových rozdielov chuti
4. Skúška overenia chuťovej a čuchovej pamäti
5. Skúška schopnosti určenia poradia podľa intenzity vône
6. Skúška schopnosti určenia poradia podľa intenzity farby
7. Párová skúška schopnosti určenia prahových rozdielov vône
8. Skúška na určovanie charakteru vône

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky z protokolov testovaných osôb boli spracované a vyhodnotené oproti vyhodnocovacej metodike uvádzanej v Príručke kvality Certifikačného orgánu pre personálnu certifikáciu pracovníkov vykonávajúcich senzorické posudzovanie potravín na IVVL v Košiciach. Sumárne ich uvádzame v tabuľkovej forme takto:

Tab. 1 Skúška na rozoznávanie štyroch základných druhov chutí

Charakter chuti	A %	B %	C %	SPOLU %
SLADKÁ	100	91,6	75	89,3
KYSLÁ	38,9	0	37,5	26,0
HORKÁ	38,9	43,7	18,75	34,0
SLANÁ	77,7	62,5	75,0	72,0
VODNATÁ	33,3	37,5	62,5	44,0

Tab. 2 Skúška rozoznávania prahových koncentrácií chuťových látok

Charakter chuti	A %	B %	C %	SPOLU %
SLADKÁ	88,9	62,5	75,0	76,0
SLANÁ	66,6	25,0	50,0	48,0
KYSLÁ	55,5	25,0	37,5	40,0
HORKÁ	44,4	25,0	62,5	44,0
SLADKÁ	77,7	50,0	87,5	72,0
SLANÁ	33,3	25,0	50,5	36,0

Tab. 3 Párová skúška schopnosti určenia prahových rozdielov chuti

Pár č.	A %	B %	C %	SPOLU %
1	77,7	87,5	100,0	88,0
2	66,6	62,5	87,5	72,0
3	22,2	25,0	75,0	40,0
4	22,2	25,0	37,5	28,0
5	66,6	87,5	100,0	84,0
6	88,9	50,0	75,0	72,0
7	88,9	50,0	75,0	72,0

Tab. 4 Skúška overenia chuťovej a čuchovej pamäti

<i>Pár č.</i>	A %	B %	C %	SPOLU %
1	66,7	37,7	75,0	60,0
2	88,9	50,0	75,0	72,0

Tab. 5 Skúška schopnosti určenia poradia podľa intenzity vône

<i>Vzorka č.</i>	A %	B %	C %	SPOLU %
1	55,5	100,0	100,0	84,0
2	33,3	75,0	87,5	64,0
3	22,2	37,7	75,0	44,0
4	55,5	25,0	50,0	44,0
5	88,9	62,5	62,5	72,0
6	88,9	62,5	50,1	68,0

Tab. 6 Skúška schopnosti určenia poradia podľa intenzity farby

<i>Farba</i>	A %	B %	C %	SPOLU %
Červená	91,1	91,2	87,5	90,0
Oranžová	86,6	93,7	85,0	88,4
Zákal	61,1	42,5	67,5	57,2

Tab. 7 Párová skúška schopnosti určenia prahových rozdielov vône

<i>Pár č.</i>	A %	B %	C %	SPOLU %
1	77,7	62,5	75,0	72,0
2	100,0	87,5	100,0	96,0
3	100,0	87,7	100,0	96,0
4	88,9	100,0	75,0	88,0
5	88,9	87,7	100,0	92,0
6	100,0	50,0	75,0	76,0
7	100,0	75,0	87,7	88,0

Tab. 8 Skúška na určovanie charakteru vône

<i>Vzorka č.</i>	A %	B %	C %	SPOLU %
Paprika	55,5	37,5	25,0	40,0
Č. korenie	100,0	100,0	100,0	100,0
Škorica	100,0	100,0	87,5	96,0
Údivá	11,1	37,5	50,0	32,0
Klinček	88,9	100,0	87,5	92,0
Rasca	100,0	100,0	87,5	69,0
Fenykel	66,6	50,0	50,0	56,0
Majoránka	44,4	25,0	37,5	36,0
Káva	100,0	100,0	100,0	100,0
Etanol	100,0	87,5	62,5	84,0

Z výsledkov uvádzaných v tabuľke č. 1 vyplýva, že študenti najlepšie rozoznávajú sladkú chuť (100 % úspešnosť pre skupinu A, skupinu B 91,6 % a 75 % v skupine C). Kyslú, horkú a vodnatú chuť dokázala rozoznať menej než polovica študentov.

Pri rozoznávaní prahových koncentrácií (tab.2) do tolerovateľnej koncentrácie vzoriek v jednotlivých radoch študenti najlepšie registrovali sladkú chuť 88,9% skupina A a 87,5% v

skupine B. Slanú, kyslú a horkú chuť rozoznávali približne rovnako v rámci medzných noriem.

Určovanie prahových koncentrácií v párovej skúške (tab. 3) bolo najúspešnejšie v skupine C (100% v pároch 1 a 5).

Výsledky uvádzané v tabuľke č. 4 potvrdzujú, že skupina A a skupina C hodnotili vzorky približne rovnako (skupina A 66,7%, skupina C 75%) len predpoludňajšia skupina B mala oveľa menšiu úspešnosť (37,7%).

Z tabuľky č. 5 vyplýva úspešnosť poradia skúšky v jednotlivých skupinách, pričom vyššia úspešnosť bola dosiahnutá v skupine B (100%) a v skupine C (100%), ktoré správne určili vzorky s vyššou intenzitou vône. Skupina A (88,9%) lepšie určila vzorky s nižšou intenzitou vône.

Ako uvádza tabuľka 6 všetky tri skupiny určili poradie vzoriek podľa intenzity farby približne rovnako (červená farba vzoriek - 91,1% A, 91,2% B, 87,5% C). Pri hodnotení zákalu bola úspešnosť menšia v rozmedzí 42,5 - 67,5 %.

Pri určovaní prahových rozdielov vône (tab. 7) najviac úspešné boli skupiny A a C, ktoré dosiahli 100% správnych odpovedí.

V záverečnej skúške testu (tab. 8) sme zistili, že najlepšie určili charakter jednotlivých vôní vzoriek študenti zo skupiny A, ktorí hodnotili ráno a zo skupiny B, ktorí hodnotili predpoludním. Menej správne určených vôňových kvalít bolo v popoludňajšej skupine C.

Na základe dosiahnutých výsledkov testu a celkového hodnotenia môžeme konštatovať, že je potrebné neustále nielen vychovávať nových posudzovateľov, ale formou udržiavacích testov na rôznych úrovniach zdokonaľovať okrem teoretických znalostí aj fyziologicko-psychologické parametre sensorických orgánov posudzovateľov. Náležitú pozornosť je potrebné venovať aj vzdelávaniu v oblasti pojmov sensorických vlastností výrobkov, ktoré často- krát môžu skresľovať objektivitu výsledkov.

POĎAKOVANIE

Práca bola riešená v rámci projektu VEGA1/4380/07.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Kučerová, J.: Výsledky sensorického posudzovania pekárskeho výrobku, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zborník z vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou, Výživa a potraviny pre tretie tisícročie, 24. – 25. apríl 2002, Nitra, 166 – 167 s.

Neumann, R., Molnár, P., Arnold, S.: Sensorické skúmanie potravín, Bratislava, Alfa, 1990, 352 s.

MORFOLOGICKÉ VARIÁCIE TRUNCUS COSTOCERVICALIS SINISTER, ARTERIA INTERCOSTALIS SUPREMA SINISTRA, ARTERIA CERVICALIS SUPERFICIALIS DEXTRA U KRÁLIKA

Vdoviaková K.

Ústav anatómie, UVL, Košice

ABSTRAKT

Cieľom našej práce je poukázať na niektoré anatomicke zvláštnosti v cievnom systéme králika (*Oryctolagus cuniculus* f. *domestica*). V práci sme použili 30 králikov plemena novozélandsky biely králik. Králiky boli utratené inhalačnou metódou pomocou éteru. Následne sme cievny systém prepláchli fyziologickým roztokom NaCl. Takto pripravený materiál sme nastrekovali hmotou Duracryl Dental® na báze polymetylmetakrylátu (PMMA). Nástrekovú hmotu sme pripravili zmiešaním 1,5 – 2 objemových dielov polyméru s 1 dielom monoméru. Na farebné zvýraznenie sme použili farbivo olejová červeň O primiešané k tekutej zložke Duracrylu. Po premiešaní sme hmotu nasali do injekčnej striekačky a aplikovali do cievneho systému králika. Maceráciu mäkkých tkanív sme previedli v 2 – 3% roztoku KOH, pri teplote 60 – 70°C. V našej práci sme zistili, že *truncus costocervicalis sinister* odstupuje z *arcus aortae* v 18 % prípadov a z *arteria subclavia sinistra* v 82 % prípadov. *Arteria intercostalis suprema sinistra* je vetvou z *arteria subclavia sinistra* v 20 % prípadov a spoločným kmeňom s *arteria thoracica interna sinistra* v 80 % prípadov. *Arteria cervicalis superficialis dextra* odstupuje spoločným kmeňom s *arteria vertebralis dextra* z *arteria carotis communis dextra* v 7% prípadov a ako vetva od *arteria subclavia dextra* v 93 % prípadov.

ÚVOD

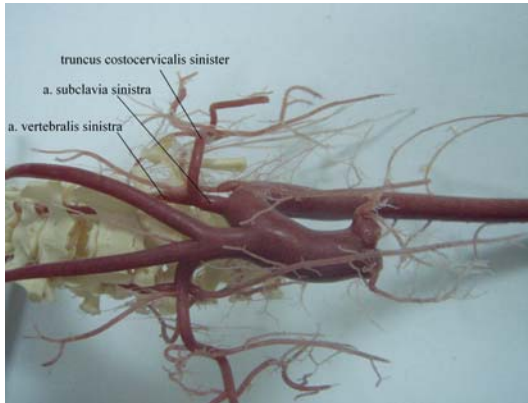
Králik (*Oryctolagus cuniculus* f. *domestica*) je jedno z najčastejšie používaných laboratórnych zvierat. Vzhľadom nato, že cievny systém tohto druhu je veľmi málo rozpracovaný, v našej práci sme sa rozhodli poukázať na jeho zvláštnosti. (Flešárová a kol., 2003).

MATERIÁL A METÓDY

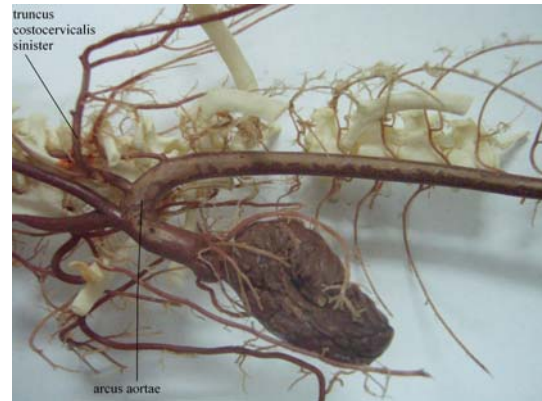
Pri výskume morfológických variácií cievneho systému sme použili 30 králikov plemena novozélandský králik. Eutanázia bola vykonaná pomocou éteru inhalačnou metódou. Ako perfúzne médium sme použili fyziologický roztok NaCl. Na vyvolanie perfúzneho tlaku sme použili peristaltické čerpadlo s reguláciou tlaku perfúzneho média. Správny priebeh perfúzie sme zistili podľa vyblednutia tkanív. Preplachovanie sme ukončili potom, ako fyziologický roztok NaCl vytekajúci z venózneho systému bol priehľadný, nie sfarbený na červeno. Perfúzne kanyly sme opatrili mäkkou plastovou hadičkou naplnenou perfúznym roztokom. Hadičku sme uzavreli svorkou a zaistili ligatúrou. Na nástreky sme použili hmotu Duracryl Dental, na báze polymetylmetakrylátu (PMMA). Dodáva sa v balení 100g práškového polyméru a 50 ml tekutého monoméru, prípadne v balení 500g a 250 ml. Základnú hmotu sme pripravili zmiešaním 1,5 až 2 objemových dielov polyméru s 1 dielom monoméru. Na prípravu farebných odtieňov preparátov sme pridali k tekutému monoméru farbivo olejová červeň O. Po 1 - 2 minútach sme zmes nasali do injekčnej striekačky a pristúpili k nástreku. Maceráciu mäkkých tkanív sme previedli v 2 - 3% roztoku KOH, pri teplote 60 - 70°C tak, aby tkaniva boli ponorené v roztoku. Macerácia trvala približne 2 – 3 dni (Barta a kol., 2002).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

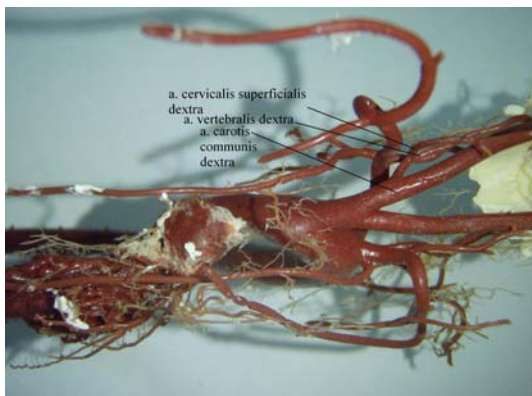
Obr.1 Odstup *truncus costocervicalis sinister* z *a. subclavia sinistra*



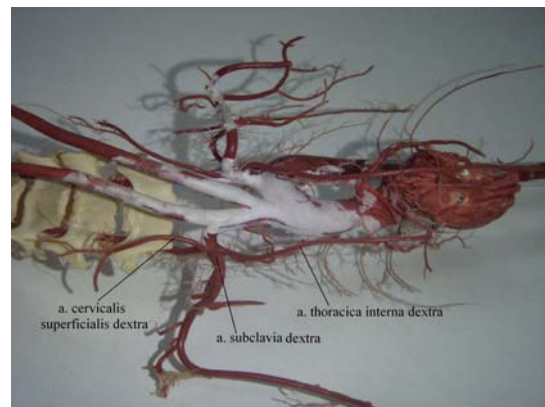
Obr. 2 Odstup *truncus costocervicalis sinister* z *arcus aortae*



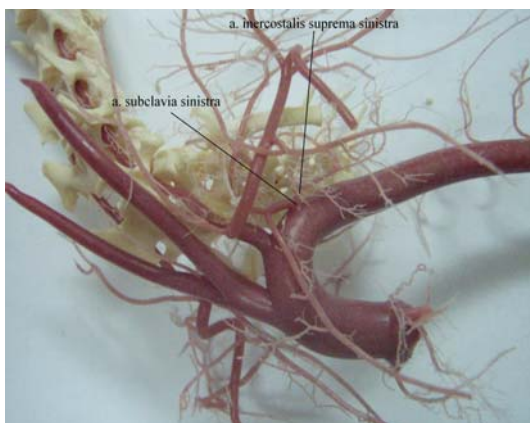
Obr. 3 Odstup *a. cervicalis superficialis dextra* spolu s *a. vertebralis dextra* z *a. carotis communis dextra*



Obr. 4 Odstup *a. cervicalis superficialis dextra* z *a. subclavia dextra*



Obr. 5 Odstup *a. intercostalis suprema sinistra* z *a. subclavia sinistra*



Obr. 6 Odstup *a. intercostalis suprema* spoločným kmeňom s *a. thoracica interna*



Na korozívnych preparátoch sme zistili, že *truncus costocervicalis sinister* odstupuje z *arcus aortae* v 18 % prípadov a z *arteria subclavia sinistra* v 82 % prípadov. *Arteria intercostalis suprema sinistra* je vetvou z *arteria subclavia sinistra* v 20 % prípadov, a spoločným kmeňom s *arteria thoracica interna sinistra* v 80 % prípadov. *Arteria cervicalis superficialis dextra* odstupuje spoločným kmeňom s *arteria vertebralis dextra* z *arteria carotis communis dextra* v 7% prípadov ako vetva od *arteria subclavia dextra* v 93 % prípadov.

POĎAKOVANIE

Úprimne ďakujem touto cestou Prof. MVDr. J. Dankovi, PhD za odborné vedenie a cenné rady ako aj MVDr. A. Bartovi za pomoc pri technickom spracovaní materiálu.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Barta A, Novák I, Danko J, Čontofalská V, Pollák V, Bátor R, Flešárová S. Použitie hydrofilných voskov pri príprave trvalých anatomických preparátov. 5. Košický morfológický deň s medzinárodnou účasťou, Zborník referátov, Košice 31. máj 2002, 167 – 168.
- Flešárová S, Tesfaye A, Danko J, Bátor R, Dorko F, Barta A. Morphological variations of the arcus aorta in rabbits. Acta Veterinaria, Brno, 72, S20, Supplementum 7, September 2003.

**Ponuka produktov a služieb
Merck spol. s r.o.
pre Vás a Vaše laboratórium:**

- Syntéza primerov pre PCR
- Syntéza primerov a značených prób pre Real Time PCR
- Ponuka hotových kitov pre diagnostiku mikroorganizmov pomocou PCR a Real Time PCR
- Komplexná ponuka PCR reagensí
- Ponuka kitov na izoláciu a purifikáciu nukleových kyselín
- Ponuka elektroforetických pufrov a gélov
- Široká ponuka laboratórných chemikálií
- Komplexná ponuka prístrojov pre vybavenie Vášho laboratória
- Ponuka kalibrácie pipiet a servisu prístrojov

Všetko pre Vás ušité na mieru.

M *l i f e*
s c i e n c e

Merck spol. s r.o.
Tuhovská 3, P.O.Box 34
830 06 Bratislava
tel.: 02 / 49 267 111
fax: 02 / 49 267 799
e-mail: objednavka@merck.sk
www.merck.sk



VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV

**Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Bod'ua
II. ročník - 2007**

Zostavil: MVDr. Dušan Fabian, PhD.

Vydal: Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4, 04001 Košice
Prvé vydanie. 126 strán.

ISBN 978-80-969788-4-7

EAN 9788096978847

ISBN 978-80-969788-4-7