



VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV

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

III. ročník - 2008



Košice, 8. september 2008

Zborník príspevkov prezentovaných na
Seminári doktorandov venovanom pamiatke akademika Boďu
8. september 2008
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 978-80-968618-2-8

OBSAH

ŠTÚDIUM PROTIAGREGAČNÉHO ÚČINKU AKRIDÍNŮV NA AMYLOIDNÉ ŠTRUKTÚRY LYZOZÝMU

Bellová A.¹, Balogová L.¹, Gažová Z.², Daxnerová Z.³, Kristian P.¹, 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

8

ANTIOXIDAČNÝ STATUS A FAGOCYTÁRNA AKTIVITA V KRVI BROJLEROV KŔMENÝCH DIÉTAMI KONTAMINOVANÝMI KOMBINÁCIOU FUZÁRIOVÝCH MYKOTOXÍNŮV A ERGOSTEROLU

Bořutová R.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

12

ANALÝZA ÚROVNE BACHOROVEJ FERMENTÁCIE SACHARIDOV U DOJNÍC

Bujňák L., Vajda V.

Ústav výživy, dietetiky a krmovinnárstva, UVL, Košice

16

EXPRESIA ADIPOKÍNŮV A ICH RECEPTOROV POČAS PREIMPLANTAČNÉHO VÝVINU MYŠÍ

Bukovská A.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

20

VPLYV MATERSKÉHO PROSTREDIA NA KVALITU BLASTOCÝST U MYŠÍ

Bystriansky J.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

24

VPLYV TEPLoty, AKTIVITY VODY A BIKARBONÁTU AMÓNNEHO NA RAST MIKROMYCÉTY *ASPERGILLUS FLAVUS*

Cicoňová P., Laciaková A., Máté D.

Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVL, Košice

27

PLAZMIDOM KÓDOVANÁ PRENOSNÁ TETRACYKLÍNŮVÁ REZISTENCIA U ENTEROBAKTÉRIÍ

Fecskeová L.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

30

VPLYV β (1,3/1,6)D – GLUKÁNU NA VYBRANÉ NEŠPECIFICKÉ A ŠPECIFICKÉ IMUNOLOGICKÉ UKAZOVATELE PSOŮV

Haladová E., Mojžišová J., Smrčo P., Hipíková V., Ondrejková A., Prokeš M.

Katedra epizootológie a parazitológie, UVL, Košice

35

ŠTÚDIUM 23 BP - A 12 BP - INDEL POLYMORFIZMU V PRNP GÉNE HOŤADZIEHO DOBYTKA

Hreško S., Tkáčiková E.

Ústav imunológie, Katedra mikrobiológie a imunológie, UVL, Košice

39

POROVNANIE VYBRANÝCH PARAMETROV KVALITY VČELIEHO MEDU Kasperová J., Nagy J., Šoltysová L. <i>Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVL, Košice</i>	43
VYHODNOTENIE PORÚCH SKUSU U PSOV Lacková M., Capík I. <i>Klinika malých zvierat, UVL, Košice</i>	48
PROBIOTICKÉ VÝŽIVOVÉ DOPLNKY A ZDRAVIE DETÍ Lovayová V. ¹ , Majorová E. ² , Rimárová K. ³ ¹ <i>Ústav hygieny a technológie mlieka, UVL, Košice</i> ² <i>II. klinika detí a dorastu, Fakultná nemocnica SNP, Košice</i> ³ <i>Ústav hygieny, Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika, Košice</i>	52
KLINICKÁ KAZUISTIKA –DIFERENCIÁLNA DIAGNOSTIKA NEUROLOGICKÉHO PACIENTA S FOKÁLNOU ENCEFALOPÁTIOU A S PRIDRUŽENÝMI EPILEPTIFORMNÝMI PAROXYZMAMI Mađari A. ¹ , Skalka J. ² ¹ <i>Klinika malých zvierat, UVL, Košice</i> ² <i>Katedra výživy, diätetiky a chovu zvierat, UVL, Košice</i>	56
URČOVANIE ANTIBIOTICKEJ REZISTENCIE KOAGULÁZO-NEGATÍVNYCH STAFYLOKOKOV IZOLOVANÝCH ZO ZAJACOV A BAŽANTOV Mártonová M., Pipová M., Jevinová P. <i>Katedra hygieny a technológie potravín, UVL, Košice</i>	61
VARIÁCIE ODSUPU ARTERIA FACIALIS, ARTERIA LINGUALIS A ARTERIA THYROIDEA CRANIALIS U KRÁLIKA (ORYCTOLAGUS FUNICULUS F. DOMESTICA) Maženský D. <i>Ústav anatómie, UVL, Košice</i>	65
NOVÉ POZNATKY O PARAZITOCH INVÁZNYCH DRUHOV RÝB VO VODÁCH VÝCHODOSLOVENSKEJ NÍŽINY Mihok T. ¹ , Košuthová L. ¹ , Košuth P. ¹ , Koščo J. ² , Jusko J. ² ¹ <i>Katedra výživy, diätetiky a chovu zvierat, Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, UVL, Košice</i> ² <i>Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied Prešovskej univerzity, Prešov</i>	68
MNOŽSTVO MÄSA AKO KVALITATÍVNY UKAZOVATEĽ MÄSOVÝCH VÝROBKOV V SLOVENSKEJ REPUBLIKE Mikulášová M., Turek P., Marcinčák S., Popelka P., Korimová Ľ., <i>Katedra hygieny a technológie potravín, UVL, Košice</i>	71
KOZIE SYRY VO VÝŽIVE ĽUDÍ A ICH KVALITA Z OBCHODNEJ SIETE V KOŠICIACH Poľáková L. <i>Ústav hygieny a technológie mlieka, UVL, Košice</i>	76

STANOVENIE STRÁVITEĽNOSTI VYBRANÝCH KRMÍV DVOJSTUPŇOVOU METÓDOU IN VITRO Šamudovská A., Demeterová M. <i>Katedra výživy, dietiky a chovu zvierat, UVL, Košice</i>	80
VÝZNAM CWB DOMÉNY PRE CIEĽOVÚ ŠPECIFICITU ENTEROLYZÍNU A Serenčová L. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice</i>	85
DGGE ANALÝZA VARIABILITY TREPONÉM Sikorová L. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice</i>	89
VČASNÁ DIAGNOSTIKA DYSPLÁZIE BEDROVÉHO KLĽBU Skurková L., Ledecký V. <i>Klinika malých zvierat, UVL, Košice</i>	93
ZMENY IMUNITNEJ REAKTIVITY PRI HERPESVÍRUSOVEJ CHOROBE PSOV IMMUNOLOGIC CHANGES DURING HERPESVIRAL INFECTION OF DOGS Smrčo P. ¹ , Mojžišová J. ¹ , Haladová E. ¹ , Hreško S. ² , Lehotská M. ² ¹ <i>Katedra epizootológie a parazitológie, UVL, Košice</i> ² <i>Katedra mikrobiológie a imunológie, UVL, Košice</i>	97
ANTIOXIDAČNÁ AKTIVITA A OBSAH POLYFENOLOV EXTRAKTOV VYBRANÝCH RASTLÍN Šoltysová L., Marcinčák S., Nagy J., Kasperová J. <i>Ústav hygieny a technológie mäsa, UVL, Košice</i> <i>Katedra hygieny a technológie potravín, UVL, Košice</i>	101
PREHĽAD STANOVENÍ KOKCIDIOSTATÍK S VYUŽITÍM KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE S RÔZNYMI TYPMI DETEKTOROV Tkáčiková S. ¹ , Kožárová I. ² , Máté D. ² ¹ <i>Štátny veterinárny a potravinový ústav, Košice</i> ² <i>Katedra hygieny a technológie potravín, UVL, Košice</i>	105
STANOVENIE CITLIVOSTI MALASSEZIA PACHYDERMATIS NA VYBRANÉ DRUHY ANTIMYKOTÍK POMOCOU METÓDY ETESTU Vantrubová, J., Čonková, E., Váczi, P. <i>Ústav farmácie a farmakológie, UVL, Košice</i>	109
VARIÁCIE V ODSUPE AA. INTERCOSTALES DORSALES U POTKANA OBYČAJNÉHO Vdoviaková K. <i>Ústav anatómie, UVL, Košice</i>	113

ŠTÚDIUM PROTIAGREGAČNÉHO ÚČINKU AKRIDÍNŮV NA AMYLOIDNÉ ŠTRUKTÚRY LYZOZÝMU

Bellová A.¹, Balogová L.¹, Gažová Z.², Daxnerová Z.³, Kristian P.¹, 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

Študovali sme účinok rôznych akridínových derivátov na tvorbu a na depolymerizáciu lyzozýmových amyloidných agregátov *in vitro*. Inhibičné a depolymerizačné vlastnosti akridínových derivátov boli sledované prostredníctvom špecifického viazania tioflavínu T (ThT) do amyloidných štruktúr lyzozýmu. Zistili sme, že na antiagregačnú aktivitu sledovaných derivátov vplyva štruktúra a dĺžka bočného reťazca molekuly akridínu. Pre skupinu akridínov, u ktorých bola pozorovaná vysoká inhibičná a depolymerizačná aktivita sme pomocou fluorescenčnej intenzity ThT určili hodnoty IC₅₀ (koncentrácia akridínu pri 50% inhibícii) a DC₅₀ (koncentrácia akridínu pri 50% depolymerizácii). Tieto hodnoty sa pre najviac účinné akridínové deriváty pohybovali v rozmedzí od 5-50 μM. Tvorba lyzozýmových agregátov a účinok akridínov boli potvrdené elektrónovou mikroskopiou.

ÚVOD

Tvorba proteínových amyloidných agregátov súvisí s mnohými ľudskými chorobami, ktoré sa označujú ako amyloidózy. Medzi tieto choroby patria neurodegeneratívne choroby (Alzheimerova, Parkinsonova, Huntingtonova, transmisné spongioformné encefalopatie) ako aj diabetes typu 2, s dialýzou spojená amyloidóza alebo rôzne systémové amyloidózy (Kelly, 2000). Aj keď sa jednotlivé amyloidné choroby prejavujú rôznymi klinickými a biochemickými znakmi, ich spoločnou vlastnosťou je prítomnosť amyloidných agregátov, ktoré sú lokalizované v rôznych častiach tela. Amyloidné depozity sú prednostne tvorené jedným prekursorovým proteínom, ktorý je charakteristický pre danú amyloidózu. Dodnes je známych viac ako 20 rôznych proteínov a peptidov (napr. Aβ -peptid, tau, alfa-synukleín, huntington, amylín, beta2-mikroglobulín, lyzozým), ktoré sú spojené s tvorbou amyloidných agregátov v ľudskom tele (Dobson, 2004).

V súčasnosti nie je možné efektívne liečiť amyloidné ochorenia, ale veľmi sľubnou stratégiou sa zdá byť blokácia agregácie proteínu, prípadne rozbitie amyloidných štruktúr pomocou rôznych látok napríklad peptidov alebo protilátok (Mason a kol., 2003). Ukázalo sa, že široké spektrum malých organických molekúl (polyfenoly, porfyríny) je tiež schopné inhibovať amyloidnú agregáciu a rozrušovať vytvorené amyloidné filamenty *in vitro* ako aj v bunkových kultúrach (Taniguchi a kol., 2005, Khlistunova a kol., 2006).

Experimentálne údaje získané v posledných rokoch poukazujú na významnú úlohu aromatických štruktúr v procese inhibície, prípadne deštrukcie amyloidných agregátov (Dolphin a kol., 2008). U akridínov je jadro tvorené trom aromatickými kruhmi. Vzhľadom na túto skutočnosť by akridínové deriváty mohli byť ideálnou látkou s anti-amyloidnými vlastnosťami. Napriek tomu, existuje len pár štúdií zaoberajúcich sa účinkom akridínov na amyloidnú agregáciu. Aitken a kol. ukázali, že akridínová oranžová zabraňuje premene ľudského amylínu na nerozpustnú amyloidnú formu (Aitken 2003). Deriváty bis-akridínov boli identifikované ako účinné inhibítory replikácie priónového proteínu PrP^{Sc} *in vitro* (Dollinger a kol., 2006) a v bunkách (May a kol. 2003). Nedávno bolo zistené, že quinakrín a quinakrínová horčicová sú schopné potlačiť Aβ a tau amyloidnú polymerizáciu (Masuda, 2006). Veľmi zaujímavým zistením je fakt, že multimerný quinakrínový konjugát je efektívnym inhibítorom tvorby Aβ- amyloidných fibril (Dolphin a kol., 2008).

Štúdium vplyvu planarity základného skeletu akridínu na tvorbu amyloidných agregátov z lyozýmu ukázalo, že planarita jadra je jednou z významných podmienok vysokej inhibičnej aktivity (Gazova a kol., 2008). V nadväznosti na túto prácu sme sledovali vplyv bočného reťazca na anti-amyloidné vlastnosti akridínových derivátov. Študovali sme *in vitro* účinok rôznych akridínových derivátov s rôznymi bočnými reťazcami na vznik a depolymerizáciu lyozýmových amyloidných fibríl, ktoré vytvárajú masívne amyloidné depozity v pečeni a obličkách u ľudí trpiacich dedičnou systémovou amyloidózou.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie - Lyozým z vaječného bielka, tioflavín T (ThT), Konžská červená (CR) a glycín boli získané od firmy Sigma. Rôzne deriváty akridínov poskytla Katedra organickej chémie, PF UPJŠ. Chlorid sodný (NaCl) bol z firmy LaChem.

Tvorba lyozýmových amyloidných fibríl – amyloidné fibrily boli pripravené 2 hodinovou inkubáciou 10 μM lyozýmu (10 μM) v 70 mM glycínovom tlmivom roztoku, pH 2,7, v prítomnosti 80 mM NaCl pri teplote 65 °C za stáleho miešania (Vieira a kol., 2006). Tvorba amyloidných fibríl bola sledovaná prostredníctvom viazania ThT a CR ako aj 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 fluorescencie v emisnom spektre, ktorá bola meraná spektrofluorimetrom 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 lyozýmových fibríl bola určená posunom absorpčného píku CR z 495 nm na 503 nm a tvorbou pleca pri 540 nm pomocou absorpčného spektrofotometra (Specord S100, Analytik Jena).

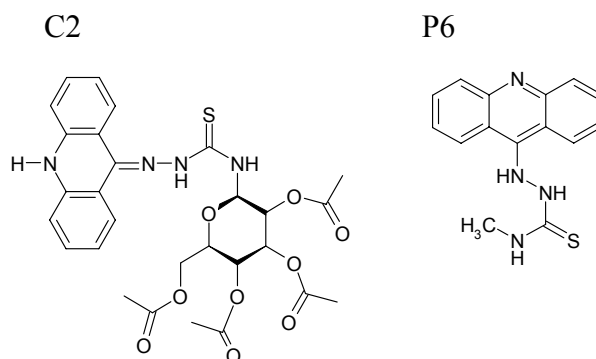
Identifikácia inhibítorov lyozýmovej amyloidnej agregácie pomocou viazania ThT – Inhibičné a depolymerizačné schopnosti akridínových derivátov boli detekované prostredníctvom viazania ThT. V prípade merania inhibičných schopností akridínov bol pridaný derivát akridínu (200 μM koncentrácia) do roztoku 10 μM lyozýmu v prítomnosti 80 mM NaCl (70 mM glycínový tlmivý roztok, pH 2,7). Roztok bol za stáleho miešania inkubovaný 2h pri teplote 65 °C. Pre meranie depolymerizačných vlastností akridínov bol pridaný 200 μM akridínový derivát k 10 μM lyozýmových fibrílám a vzorky boli inkubované cez noc pri teplote 37 °C. Kontrolné meranie fluorescencie 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 depolymerizačnou aktivitou detekovanou pre 200 μM koncentráciu bola sledovaná ich aktivita 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 10 μM lyozým alebo lyozýmové fibrily pred alebo po inkubácii s akridínmi (200 μM) bol nanesený na formvarom potiahnuté medené alebo niklové mriežky (1 min) a negatívne zafarbený s 2% uranyl acetátom (45s). Po vysušení boli vzorky analyzované na elektrónovom mikroskope Tesla BS 500 pracujúcim pri 60 kV.

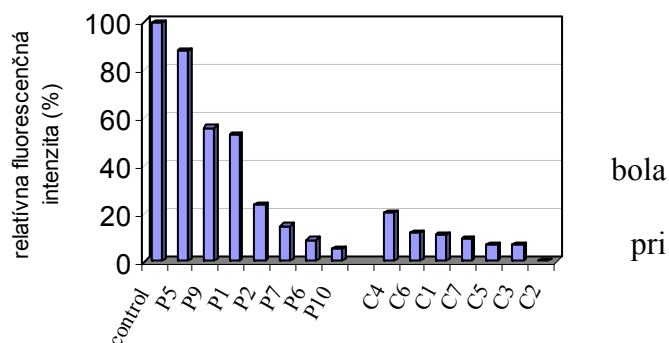
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Jednou z terapeutických alternatív pri amyloidných chorobách je zabránenie vzniku špecifického agregátu, jeho rastu, prípadne jeho deštrukcia prostredníctvom rôznych nízkomolekulárnych látok. Študovali sme účinok akridínových derivátov s rôznou štruktúrou bočného reťazca na formovanie amyloidných agregátov z lyzozýmu *in vitro*. Vytvorenie lyzozýmových amyloidných fibríl bolo potvrdené viacerými technikami (viazanie ThT a Konžskej červenej, elektrónová transmisná mikroskopia). Študované látky sme podľa ich štruktúry rozdelili do dvoch tried, 1) deriváty akridínov (P1-P10) a 2) deriváty akridínov s cukornou zložkou v terminálnej skupine (C1-C7). Všetky tieto deriváty sa vyznačujú planárnym základným skeletom a alifatickým postranným reťazcom v pozícii C9, ktorý má rôznu dĺžku a terminálnu skupinu (Obr. 1). Inhibičná aktivita akridínových derivátov bola rôzna, v prípade C1-C7 pozorovaná vysoká inhibičná aktivita (Obr.2). Podobný výsledok bol zistený sledovaní schopnosti deštruovať lyzozýmové amyloidné fibrily. Pre efektívne akridínové deriváty sme pomocou fluorescencie ThT sledovali ich účinnosť v závislosti od koncentrácie. Na základe týchto meraní sme určili hodnoty IC_{50} a DC_{50} . Tieto hodnoty sa pre viaceré deriváty

pri amyloidných chorobách je zabránenie vzniku špecifického agregátu, jeho rastu, prípadne jeho deštrukcia prostredníctvom rôznych nízkomolekulárnych látok. Študovali sme účinok akridínových derivátov s rôznou štruktúrou bočného reťazca na formovanie amyloidných agregátov z lyzozýmu *in vitro*. Vytvorenie lyzozýmových amyloidných fibríl bolo potvrdené viacerými technikami (viazanie ThT a Konžskej červenej, elektrónová transmisná mikroskopia). Študované látky sme podľa ich štruktúry rozdelili do dvoch tried, 1) deriváty akridínov (P1-P10) a 2) deriváty akridínov s cukornou zložkou v terminálnej skupine (C1-C7). Všetky tieto deriváty sa vyznačujú planárnym základným skeletom a alifatickým postranným reťazcom v pozícii C9, ktorý má rôznu dĺžku a terminálnu skupinu (Obr. 1). Inhibičná aktivita akridínových derivátov bola rôzna, v prípade C1-C7 pozorovaná vysoká inhibičná aktivita (Obr.2). Podobný výsledok bol zistený sledovaní schopnosti deštruovať lyzozýmové amyloidné fibrily. Pre efektívne akridínové deriváty sme pomocou fluorescencie ThT sledovali ich účinnosť v závislosti od koncentrácie. Na základe týchto meraní sme určili hodnoty IC_{50} a DC_{50} . Tieto hodnoty sa pre viaceré deriváty

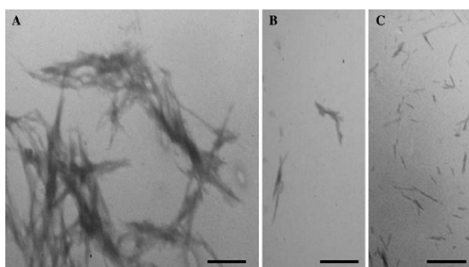


Obr. 1. Štruktúrne vzorce dihydroakridinového C2 a akridinového P6 derivátu



Obr.2. Účinok akridínových derivátov na inhibíciu tvorby lyzozýmových fibríl monitorované pomocou fluorescencie ThT. Kontrola - fluorescenčná intenzita ThT po naviazaní do lyzozýmových amyloidných fibríl bez prítomnosti akridínu (100%).

na najefektívnejších derivátov bola potvrdená aj pomocou elektrónovej mikroskopie. Po pôsobení efektívneho derivátu (P6, P10, C2) sme videli podstatne menší počet fibríl, ako aj ich rozrušenie (Obr.3).



Obr. 3. TEM obrázok lyzozýmových amyloidných fibríl bez akridínu (A) a v prítomnosti 100 μ M akridinového derivátu P6 (B) a P10 (C). Mierka: čiara predstavuje 500 nm.

Na základe získaných výsledkov sme zistili, že antiagregačná aktivita akridínových derivátov je výrazne ovplyvnená štruktúrou ich bočného reťazca. Z našich výsledkov vyplynulo, že cukornatá terminálna skupina výrazne zvyšuje ako inhibičnú tak aj depolymerizačnú aktivitu derivátov. Podarilo sa nám identifikovať látky s vysokou inhibičnou a/alebo antiagregačnou aktivitou. Spomedzi študovaných akridínových derivátov sa látky P6, P10, C2, C7 vyznačujú nízkymi hodnotami IC_{50} a DC_{50} (5-50 μ M), čo naznačuje ich prípadné použitie na terapeutické účely. Tieto zlúčeniny preto poskytujú

základ pre cieleňvý vývoj liečiv amyloidných chorôb na báze akridínov.

POĎAKOVANIE

Výsledky práce boli čiastočne financované z prostriedkov VEGA grantov 7055, 6167, 0056 a VVGS grantu PF13/2008/CH.

Ďakujem RNDr. Zuzane Gažovej, CSc. a prof. Ing. 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 ako aj doc. RNDr. Zuzane Daxnerovej, CSc. za pomoc pri elektrónovom mikroskope.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aitken RJ., Loomes KM., Konarkowska B., Cooper GJ. Suppression by polycyclic compounds of the conversion of human amylin into insoluble amyloid. *Biochem J.* 2003; 374: 779-784.
- Dobson CM. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2004; 15: 3.
- Dollinger S., Lober S., Klingenstein R., Korth C., Gmeiner P. A chimeric ligand approach leading to potent antiprion active acridine derivatives: design, synthesis, and biological investigations. *J. Med. Chem.* 2006; 49: 6591-6595.
- Dolphin GT., Chierici S., Ouberai M., Dumy P., Garcia J. A multimeric quinacrine conjugate as a potential inhibitor of Alzheimer's β -amyloid fibril formation. *ChemBioChem* 2008; 9: 952-963.
- Gazova Z., Bellova A., Daxnerova Z., Imrich J., Kristian P., Tomascikova J., Bagelova J., Fedunova D., Antalík M. Acridine derivatives inhibit lysozyme aggregation, *Eur Biophys J* 2008 (v tlači)
- Kelly JW. Mechanisms of amyloidogenesis. *Nat. Struct. Biol.* 2000; 7: 824–826.
- Khlistunova I, Biernat J, Wang YP, Pickhardt M, von Bergen M, Gazova Z, Mandelkow EM, Mandelkow E. Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J Biol Chem* 2006; 281:1205–1214.
- Mason JM., Kokkoni N., Scott K., Doig AJ. Design strategies for anti-amyloid agents. *Curr Opin Struct Biol.* 2003; 4: 526-32.
- Masuda M., Suzuki N., Taniguchi S., Oikawa T., Nonaka T., Iwatsubo T., Hisanaga S., Goedert M., Hasegawa M. Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. *Biochemistry* 2006; 45: 6085–6094.
- May BCH., Witkop J., Sherrill J., Anderson MO., Madrid PB., Zorn JA., Prusiner SB., Cohen FE. and Guy RK. Structure-activity relationship study of 9-aminoacridine compounds in scrapie-infected neuroblastoma cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006; 16: 4913-4916
- Taniguchi S., Suzuki N., Masuda M., Hisanaga SI., Iwatsubo T., Goedert M., Hasegawa, M. (2005) Inhibition of heparin induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins, *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 7614-7623.
- Vieira MNN., Figueroa-Villar JD., Meirelles MNL., Ferreira ST., De Felice FG. Small Molecule Inhibitors of Lysozyme Amyloid Aggregation. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2006; 44: 549-553

ANTIOXIDAČNÝ STATUS A FAGOCYTÁRNA AKTIVITA V KRVI BROJLEROV KŔMENÝCH DIÉTAMI KONTAMINOVANÝMI KOMBINÁCIOU FUZÁRIOVÝCH MYKOTOXÍNOV A ERGOSTEROLU

Bohutová R.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom pokusu bolo skúmať účinky diét kontaminovaných fuzáriovými mykotoxínmi deoxynivalenolom (DON) a zearalenónom (ZEA) na fagocytárnu aktivitu leukocytov, aktivitu glutatión peroxidázy (GPx) v krvi a tkanivách, superoxid dismutázy (SOD) v erythrocytoch, aktivitu γ -glutamyltransferázy (GGT) v plazme a koncentrácie malondialdehydu (MDA) v plazme a tkanivách. Brojlery hybridu Ross boli od prvého dňa života kŕmené nekontaminovanou diétou HYD-01 BR1. Vo veku 14 dní boli rozdelené do štyroch pokusných skupín. Prvá pokusná skupina (negatívna kontrola) vtákov bola naďalej kŕmená nekontaminovanou diétou HYD-01 BR1. Druhá pokusná skupina vtákov (pozitívna kontrola) dostávala nekontaminovanú diétu s prídavkom chemicky modifikovaného lignínu v koncentrácii 0,5 % kompletnej diéty. Tretia pokusná skupina brojlerov bola kŕmená kontaminovanou diétou na báze pšenice s obsahom DON ($2,95 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a ZEA ($1,59 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), zatiaľ čo štvrtá pokusná skupina dostávala diétu s takým istým obsahom mykotoxínov a súčasne bola suplementovaná lignínom v koncentrácii 0,5% kompletnej diéty. Výsledky poukázali na signifikantne zvýšenú fagocytárnu aktivitu leukocytov vtákov, ktoré dostávali diétu suplementovanú lignínom (0,5%). Skrmovanie mykotoxínmi kontaminovaných diét signifikantne zvýšilo aktivitu GPx v obličke a pečeni, GGT aktivitu v plazme a hladiny MDA v tkanive obličiek brojlerov. Na druhej strane aktivita GPx a hladiny MDA v tkanive črevnej sliznice, tak ako aj aktivity GPx v krvi a SOD v erythrocytoch neboli diétami kontaminovanými mykotoxínmi ovplyvnené. Získané výsledky poukazujú na to, že stredne vysoké hladiny deoxynivalenolu a zearalenónu v diétach zvýšili oxidačný stres, no nemali negatívny účinok na fagocytárnu aktivitu krvi. Na druhej strane prítomnosť lignínu v diéte mala pozitívny účinok na fagocytárnu aktivitu 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 β -zearalenónu (β -ZOL), ktorý je niekoľko krát aktívnejší ako samotný ZEA (Malakinejad a kol., 2005).

Lignín je jednou zo základných zložiek dietetickej vlákniny, viaže rôzne škodlivé produkty metabolizmu a má vlastnosti skavendžera voľných radikálov (Lu a kol., 1998).

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

MATERIÁL A METODIKA

Brojlery hybridu Ross 308 boli od prvého dňa života kŕmené nekontaminovanou diétou HYD-01 BR1. Vo veku 14 dní boli brojlerov rozdelené do štyroch pokusných skupín. Prvá pokusná

skupina (negatívna kontrola) vtákov bola kŕmená nekontaminovanou diétou HYD-01 BR1 na báze pšenice (40%). Druhá pokusná skupina vtákov (pozitívna kontrola) dostávala nekontaminovanú diétu s prídavkom chemicky modifikovaného lignínu v koncentrácii 0,5 % kompletnej diéty. Tretia pokusná skupina brojlerov bola kŕmená kontaminovanou diétou na báze pšenice s obsahom DON 2,95 mg.kg⁻¹, ZEA 1,59 mg.kg⁻¹ a ergosterolu 103,8 mg.kg⁻¹, zatiaľ čo štvrtá pokusná skupina dostávala diétu s takým istým obsahom mykotoxínov a ergosterolu, ale zároveň bola suplementovaná lignínom v koncentrácii 0,5 % kompletnej diéty. 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), bol použitý Assay kit (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO). Obsah hemoglobínu a aktivita SOD (EC 1.15.1.1) v erytrocytoch boli analyzované metódou podľa Arthur a Boyne (1985) s použitím kitov (Randox, VB). Koncentrácia bielkovín v tkanivách bola stanovená podľa Bradforda (1976). Koncentrácie ergosterolu v pšenici boli stanovené fluorodensitometrickou metódou podľa Bailly a kol., (1999). 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 ±SEM.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Brojlery hybridu Ross nevykazovali žiadne viditeľné klinické príznaky toxikózy počas celej doby trvania experimentu.

Aktivity GPx a hladiny MDA v tkanive obličky boli signifikantne zvýšené u brojlerov kŕmených kontaminovanou diétou, ako aj kontaminovanou diétou suplementovanou lignínom (0,5 %). Aktivita GPx v pečenej tkanive bola signifikantne zvýšená len v skupine vtákov kŕmených kontaminovanou diétou s prídavkom 0,5 % lignínu (Tab 1.)

Tab 1. Hladiny malondialdehydu (MDA) a aktivity glutatión peroxidázy (GPx) v tkanivách orgánov brojlerových kurčiat kŕmených diétou kontaminovanou DONom (2,95 mg.kg⁻¹) a ZEA (1,59 mg.kg⁻¹) suplementovanou lignínom (0,5 %). Hodnoty sú ± SEM. n=8

Parameter	Negatívna kontrola	Pozitívna kontrola Lignín (0,5 %)	DON (2,95 mg.kg ⁻¹)	DON (2,95 mg.kg ⁻¹) + Lignín (0,5 %)
<i>Duodenálna sliznica</i>				
MDA (nmol.g ⁻¹ bielkovín)	50,10±7,88	44,67±8,21	77,37±12,81	77,28±8,35
GPx (U.g ⁻¹ bielkovín)	6,37±1,18	3,67±1,23	3,46±0,87	5,68±1,44
<i>Pečeň</i>				
MDA (nmol.g ⁻¹ bielkovín)	299,9 ±50,94	282,7±33,35	275,5±29,82	359,5±30,05
GPx (U.g ⁻¹ bielkovín)	13,74±2,08 ^a	17,17 ±1,12 ^{ab}	18,81±1,79 ^{ab}	21,16±2,16 ^b
<i>Oblička</i>				
MDA (nmol.g ⁻¹ bielkovín)	133,2 ±8,43 ^a	211,8±23,45 ^{ab}	236,6±25,88 ^b	246,9±21,73 ^b
GPx (U.g ⁻¹ bielkovín)	9,78±2,65 ^a	10,13±1,07 ^a	56,27±3,68 ^b	44,78±5,70 ^b

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

DON = deoxynivalenol; ZEA = zearalenón

Aktivita GGT v plazme bola signifikantne zvýšená v oboch skupinách brojlerov, ktoré dostávali diéty kontaminované mykotoxínmi. Aktivita GPx v krvi, SOD v erytrocytoch a hladiny MDA v plazme neboli účinkami mykotoxínov, alebo lignínu signifikantne zmenené (Tab 2.)

Tab 2. Aktivita glutatión peroxidázy (GPx) v krvi, superoxid dizmutázy (SOD) v erytrocytoch, aktivita γ -glutamyl transferázy (GGT) a koncentrácia malondialdehydu (MDA) v plazme brojlerov kŕmených diétou kontaminovanou DONom (2,95 mg.kg⁻¹) a ZEA (1,59 mg.kg⁻¹) a suplementovanou lignínom (0,5 %). Hodnoty sú \pm SEM. n=8

Parameter	Negatívna kontrola	Pozitívna kontrola Lignín (0,5 %)	DON (2,95 mg.kg ⁻¹)	DON (2,95 mg.kg ⁻¹) + Lignín (0,5 %)
GPx v krvi (U.g ⁻¹ Hb)	100,5 \pm 10,50	100,6 \pm 9,52	113,4 \pm 4,61	105,4 \pm 5,38
SOD v erytrocytoch (U.g ⁻¹ Hb)	1028 \pm 66,6	1089 \pm 90,1	1028 \pm 155,8	1119 \pm 98,8
GGT v plazme (U.L ⁻¹)	47,19 \pm 3,26 ^a	48,19 \pm 3,28 ^a	64,92 \pm 2,47 ^b	50,26 \pm 4,18 ^b
MDA v plazme (nmol. ml ⁻¹)	0,28 \pm 0,04	0,35 \pm 0,05	0,44 \pm 0,04	0,52 \pm 0,10

^{a,b} Rozdielne horné indexy v rámci riadku označujú signifikantné rozdiely medzi skupinami (P<0,05)
DON = deoxynivalenol; ZEA = zearalenón

Fagocytárna aktivita v krvi brojlerov bola signifikantne zvýšená v oboch skupinách vtákov, ktoré dostávali diéty suplementované lignínom (0,5 %) (Tab.3)

Tab 3. Účinky diét kontaminovaných DONom (2,95 mg.kg⁻¹) a ZEA (1,59 mg.kg⁻¹) a suplementovaných lignínom (0,5 %) na fagocytárnu aktivitu* a index fagocytárnej aktivity[#] v krvi brojlerov. Hodnoty sú \pm SEM. n=6

Parameter	Negatívna kontrola	Pozitívna kontrola Lignín (0,5 %)	DON (2,95 mg.kg ⁻¹)	DON (2,95 mg.kg ⁻¹) + Lignín (0,5 %)
Fagocytárna aktivita (%)	40 \pm 2,21 ^a	66,38 \pm 3,68 ^b	45,38 \pm 3,04 ^a	61,5 \pm 2,29 ^b
Index fagocytárnej aktivity	1,96 \pm 0,15	2,81 \pm 0,44	2,04 \pm 0,9	2,14 \pm 0,16

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

*Počet leukocytov, ktoré obsahujú minimálne tri pohltené MSHP častice/100 leukocytov (neutrofilly, monocyty)

[#] Počet pohltených MSHP častíc/celkový počet pozorovaných neutrofilov a monocytov

DON = deoxynivalenol; ZEA = zearalenón

Naše výsledky poukazujú na zvýšenú produkciu MDA v obličke a následné zvýšenie aktivity GPx v tomto tkanive u brojlerov, ktorým bola skrmovaná diéta s obsahom fuzáriových mykotoxínov DON a ZEA. V skupine týchto vtákov bola zvýšená aj aktivita GPx v pečeni, aj keď ku signifikantnému zvýšeniu MDA v tomto orgáne nedošlo. Pečeň a oblička sú hlavným miestom metabolizácie oboch mykotoxínov, ktoré sa do nich dostávajú priamo z duodéna. U hydiny pravdepodobne existuje vysoko efektívny tzv. pečňový a obličkový first-pass efekt, ktorý odstráni toxín ešte pred tým než dosiahne systémový krvný obeh (Rotter a kol., 1996). Z našich výsledkov vyplýva, že DON v kombinácii s nízkymi koncentraciami ZEA v diéte spôsobuje zvýšenie lipidovej peroxidácie.

Tento fakt je potvrdený aj signifikantným zvýšením aktivity GGT v plazme, kde sérová GGT je hlavným ukazovateľom pečňovej dysfunkcie (Reynaud a kol., 2000). Naše zistenia môžu byť porovnateľné s výsledkami Faixova a kol. 2006, ktorí zistili, že skrmovanie diét kontaminovaných deoxynivalenolom o koncentracii 3 mg.kg⁻¹ spôsobilo signifikantné

zvýšenie aktivity pečeneového enzýmu alanínaminotransferázy v plazme brojlerov, čo taktiež pripísali poškodeniu pečene. Najnovšie štúdie poukazujú na to, že zvýšené hladiny GGT v plazme môžu byť považované za skorý ukazovateľ oxidačného stresu (Lim a kol., 2004). Pri lipidovej peroxidácii sa transformuje veľké množstvo PUFA na peroxidy (Barber a Harris, 1994). V krvi brojlerov, ktoré dostávali diéty s prídavkom lignínu sme zistili signifikantne zvýšenú fagocytárnu aktivitu. Usudzujeme, že hlavná funkcia polymorfonukleárov ako je pohlcovanie cudzorodých častíc, deštrukcia bakteriálnych, nádorových a mŕtvych buniek bola prídavkom lignínu v objeme 0,5 % kompletnej diéty pozitívne stimulovaná.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná agentúrou na podporu vedy a techniky na základe zmluvy č. APVT-51-004804 a grantom 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.
- Bailly JD, Le Bars P, Pietri A, Benard G, Le Bars J. Evaluation of a fluorodensitometric method for analysis of ergosterol as a fungal marker in compound feeds. *J Food Prot.* 1999; 62: 686-690.
- Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: A review. *American Pharmacy, NS,* 1994; 34: 26-35
- Beasley VR, Swanson SP, Corley RA, Buck WB, 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.
- Faixova Z, Faix S, Leng L, Vaczi P, Szaboova R and Makova Z. Effects of feeding diet contaminated with deoxynivalenol on plasma chemistry in growing broiler chicken and efficacy of glucomannan mycotoxins adsorbent. *Acta Vet-Beogr.* 2006; 56: 479-487
- Feinberg B, McLaughlin CS. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. In: Beasley, V.R. (Ed.) *Trichothecene Mycotoxin pathophysiological Effects.* 1989; 1:27-35.
- 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.
- Lu FJ, Chu LH, Gau RJ. Free radical-scavenging properties of lignin. *Nutr Cancer.* 1998; 30: 31-38.
- 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.
- Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J Toxicol Environ Health.* 1996; 48:1-34.
- 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.

ANALÝZA ÚROVNE BACHOROVEJ FERMENTÁCIE SACHARIDOV U DOJNÍC

Bujňák L., Vajda V.

Ústav výživy, dietetiky a krmovínarstva, UVL, Košice

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo v sledovaných chovoch u vysokého počtu zvierat vo vzájomných závislostiach analyzovať vplyv rozdielneho obsahu vláknitých a nevláknitých sacharidov v krmnej dávke na úroveň bachorového metabolizmu. Úroveň výživy bola hodnotená cez sacharidové zloženie TMR podľa produkčných fáz. Profil bachorovej fermentácie sacharidov bol sledovaný analýzou množstva a vzájomného pomeru UMK. Kvantitatívne stanovenie UMK kyseliny octovej, propiónovej a maslovej bolo vykonané metódou izotachoforézy. Objemový charakter krmných dávok so zvýšením hodnôt NDV individuálne u 60% TMR ovplyvnil charakter fermentácie s redukciou kyseliny propiónovej u 38% a zvýšením podielu kyseliny octovej u 57% dojníc v príprave na pôrod. Potvrdený nízky stupeň adaptácie bachorového metabolizmu a prechod na koncentrovaný typ TMR po pôrode má za následok posun hodnôt analyzovaných markerov bachorovej fermentácie mimo referenčné hodnoty pre túto fázu pri pH u 90%, UMK 33%, kyselina octová 50%, kyselina propiónová 42% a nevyvážený pomer C2:C3 u 60% z individuálne vyšetrených vzoriek bachorového obsahu.

ÚVOD

Profil bachorovej fermentácie sacharidov analýzou hodnôt pH, UMK, ako aj pomerného zastúpenia kyseliny octovej, propiónovej a maslovej v bachorovej tekutine dáva obraz o úrovni bachorovej fermentácie a má významnú diagnostickú hodnotu pre posúdenie úrovne energetického metabolizmu bachora (Vajda a kol., 2004). Úroveň bachorovej fermentácie sacharidov odráža reakciu mikroflóry na príjem krmnej dávky z hľadiska množstva a pomeru vláknitých a nevláknitých sacharidov, ako aj štruktúrnosti zmesnej krmnej dávky - TMR. Bachorová fermentácia je veľmi precízne biologicky a nutrične regulovaný systém spolupôsobenia mikroflóry v bachore, krmiva a hostiteľského zvierat'a. Cieľom práce bolo hodnotiť a analyzovať vplyv sacharidového zloženia krmnej dávky na úroveň bachorovej fermentácie u dojníc podľa produkčných fáz.

MATERIÁL A METODIKA

V chovateľských podmienkach v priebehu dvoch rokov na úrovni 5 chovov vysokoprodukčných dojníc v sérii 20 odberov boli analyzované žľabové vzorky - TMR (NDV, NVS) a bachorový obsah pre analýzu úrovne fermentácie (pH, UMK, C2:C3). Vzorky boli odoberané od skupiny dojníc v príprave na pôrod, t.j. 2-3 týždne pred otelením; 2-3 týždne po pôrode a pri vrchole laktácie t.j. do 70–100 dní laktácie.

Nevláknité sacharidy (NVS) boli vypočítané rovnicou podľa analyzovaného obsahu živín v krmivách - $NVS = 100\% - (\%NDV + \%NL + \%Tuk + \%Popol)$. Predtým boli vo vzorkách krmív žľabových vzoriek v sledovaných chovoch analyzované konvenčnými metódami sušina, dusíkaté látky (NL), hrubý tuk (HT), popol a neutrálne-detergentná vláknina (NDV).

Profil bachorovej fermentácie sacharidov bol sledovaný analýzou množstva a vzájomného pomeru UMK zo vzorky bachorového obsahu odobratého bachorovou sondou 4–6 hodín po kŕmení. Kvantitatívne stanovenie unikavých masných kyselín (UMK) kyseliny octovej, propiónovej a maslovej bolo vykonané metódou izotachoforézy.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V prepartálnej fáze – analyzované vzťahy sú zhrnuté v Tab.1

Tab. 1 : Analýza úrovne bachorovej fermentácie u dojníc v príprave na pôrod

		ref.hodnoty	priemer ± s	individuálne %	
				↑	↓
počet chovov	n=20				
TMR	NDV%	32-38	41,1±6,3	60	30
	NVS%	30-35	35,5±4,1	45	15
počet zvierat	n=121				
Bachor	pH	6,4-6,6	6,58±0,33	41	22
	UMK mmol/l	80-130	102,8±22,4	15	10
	KO%	60-65	66,7±3,6	57	2
	KP%	20-25	20,8±3,0	2	38
	C2:C3	2,5-3:1	3,30±0,70	53	4

Kŕmne dávky analýzou nutričného zloženia tak podľa priemerných hodnôt, ako aj pri individuálnych odchýlkach vykazujú objemový charakter TMR so zvýšenými hodnotami neutrálno-detergentnej vlákniny (NDV) v priemere $41,1 \pm 6,3\%$, aj individuálne u 60% sledovaných chovov. Množstvo nevláknitých sacharidov (NVS) nad hornou hranicou $35,5 \pm 4,1\%$, s individuálnym zvýšením u 45% chovov. Takýto charakter kŕmnych dávok u dojníc vo fáze prípravy na pôrod významne ovplyvňuje adaptáciu metabolizmu bachora na koncentrovaný typ TMR skrmovaný po pôrode.

Bachorová fermentácia s priemernou hodnotou pH $6,58 \pm 0,33$, kde až 41% zvierat vykazuje zvýšené hodnoty pH. Suma UMK v priemere na strednej úrovni $102,8 \pm 22,4$ mmol/l. Zvýšený relatívny podiel kyseliny octovej(C2) v priemere $66,7 \pm 3,6\%$ s individuálnymi zvýšenými hodnotami u 57% vyšetrených zvierat, s hodnotami kyseliny propiónovej(C3) na dolnej hranici $20,8 \pm 3,0\%$ a výskytom zvýšených hodnôt u 38% zvierat s pomerom C2:C3 ($3,3 \pm 0,7:1$), so zvýšením pomerného zastúpenia u 53% zvierat potvrdzuje charakter fermentácie odpovedajúci objemovému typu kŕmnej dávky s nízkym stupňom adaptácie bachorovej fermentácie v príprave na pôrod.

V postpartálnej fáze – analyzované vzťahy sú zhrnuté v Tab.2

Tab. 2 : Analýza úrovne bachorovej fermentácie u dojníc do 21 dní po otelení

		ref.hodnoty	priemer ± s	individuálne %	
				↑	↓
počet chovov	n=20				
TMR	NDV%	30-35	36,1±3,6	60	5
	NVS%	32-38	38,2±3,7	50	25
počet zvierat	n=121				
Bachor	pH	6,3-6,5	6,22±0,41	41	50
	UMK mmol/l	80-130	117,6±18,8	23	10
	KO%	60-65	63,0±4,5	30	20
	KP%	20-25	24,4±3,9	31	12
	C2:C3	2,5-3 : 1	2,68±0,60	37	22

Analýza ukazuje na náhly prechod na koncentrovaný typ TMR s hladinami NVS v priemere na hornej hranici $38,2 \pm 3,7\%$, individuálne zvýšenými hladinami u 50% chovov. Nízky stupeň adaptácie bachora pred pôrodom má za následok pokles bachorového pH $6,22 \pm 0,41$ v priemere pod dolnú hranicu s individuálnym výskytom acidifikácie bachora u 50% zvierat. pH v bachore je výsledkom trávenia sacharidov (produkcia kyselín), absorpcie a využitia UMK a pufráčnej kapacity (Beckman a Weiss, 2005). Beauchemin a kol. (2003) zistili, že výskyt subklinických acidóz sa zvyšuje, keď pH v bachore klesá pod 5,8.

Systém kŕmenia po pôrode je sprevádzaný vzostupom sumárnych UMK v priemere $117,6 \pm 18,8$ mmol/l. Relatívny podiel kyseliny octovej(C2) v priemere $63,0 \pm 4,5\%$ na strednej úrovni s

kolísaním individuálne zvýšených hodnôt u 30% a zníženými u 20% vyšetrených zvierat. Analyzovaný podiel kyseliny propiónovej(C3) v priemere na hornej úrovni $24,4 \pm 3,9$ % s výskytom individuálne zvýšených hodnôt u 31 % zvierat. Pomer C2:C3 ($2,68 \pm 0,60$:1) na optimálnej úrovni s individuálnymi odchýlkami u 37% resp. 22% zvierat signalizuje rozdielnu adaptáciu bachorovej fermentácie u dojníc na koncentrovaný typ TMR po pôrode.

Pri vrchole laktácie – analyzované vzťahy sú zhrnuté v Tab.3

Tab. 3 : Analýza úrovne bachorovej fermentácie u dojníc pri vrchole laktácie

		ref.hodnoty	priemer \pm s	individuálne %	
				↑	↓
počet chovov	n=20				
TMR	NDV%	28-33	33,6 \pm 5,1	40	10
	NVS%	36-42	39,8 \pm 3,6	30	35
počet zvierat	n=121				
Bachor	pH	6,0-6,4	6,26 \pm 0,40	41	29
	UMK mmol/l	80-130	116,6 \pm 22,6	23	10
	KO%	60-65	63,5 \pm 3,9	31	17
	KP%	20-25	23,6 \pm 3,1	23	9
	C2:C3	2,5-3 : 1	2,75 \pm 0,50	28	24

Pretrvávajúci stav hraničných hodnôt NDV v priemere $33,6 \pm 5,1$ % s individuálne zvýšenými hodnotami 40% TMR vystupuje, ako prejav neskorej vegetačnej fázy zberu objemových krmív. Rozdielne dávkovanie jadrových krmív ovplyvňuje úroveň obsahu nevláknitých sacharidov s analyzovanou hodnotou v priemere na strednej úrovni odporúčaných hodnôt. Individuálne zvýšený podiel bol potvrdený u 30% a znížený u 35% TMR.

Bachorová fermentácia – v produkčnej fáze potvrdzuje výraznú stabilizáciu analyzovaných priemerných hodnôt s priemernými hodnotami pH $6,26 \pm 0,4$, celkových UMK $116,6 \pm 22,6$ mmol/l, ako aj relatívnej úrovne kyseliny octovej $63,5 \pm 3,9$ % a kyseliny propiónovej $23,6 \pm 3,1$ % všetko na strednej úrovni referenčných hodnôt.

Zmena bachorového prostredia v závislosti od typu krmiva priamo ovplyvňuje mikrobiálnu populáciu, profil bachorovej fermentácie a utilizáciu živín pre zviera a bachorovú mikroflóru (Van Kessel a Russell, 1996). Množstvo a vzájomný pomer produkovaných UMK je závislý od úrovne fermentácie a zastúpenia sacharidov v krmnej dávke. Rozsah a rýchlosť bachorovej fermentácie sacharidov je závislá od zloženia krmív a živín v TMR a priamo ovplyvňuje množstvo a pomer UMK v bachorovej tekutine (Sutton a kol., 2003).

Predložená analýza úrovne bachorovej fermentácie sacharidov spracovaná z výsledkov u vysokého počtu zvierat a chovov v najkritickejších prechodných fázach a pri vrchole laktácie predstavuje možný model diagnostického hodnotenia úrovne výživy v chovoch dojníc.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená z projektu VEGA 1/0626/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, L. M. Rode. Effects of particle size of alfalfa based-dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. *J. Dairy Sci.* 2003; 86:630–643.

Beckman, J. L., W. P. Weiss. Nutrient digestibility of diets with different fiber to starch ratios when fed to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2005; 88:1015-1023.

- Sutton J.D., Dhanoa M.S., Morant S.V., France J., Napper D.J., Schuller E. Rates of production of acetate, propionate and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. *J. Dairy Sci.* 2003; 86: 3620-3633.
- Vajda V., Maskaľová I., Mitrik T. Systém hodnotenia výživy a produkčného zdravia dojníc na farme, *Slov. Vet. Časopis* 2004; XXIX 3, 24-27.
- Van Kessel J.S., J.B. Russell. The effect of amino nitrogen on the energetic of ruminal bacteria and its impact on energy spilling. *J.Dairy Sci.* 1996; 79: 1237-1243.

EXPRESIA ADIPOKÍNOV A ICH RECEPTOROV POČAS PREIMPLANTAČNÉHO VÝVINU MYŠÍ

Bukovská A

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Tukové tkanivo produkuje množstvo rozličných bioaktívnych proteínov súhrne nazývaných adipokíny. Adipokíny zohrávajú dôležitú úlohu pri regulácii celkovej telesnej rovnováhy ovplyvňovaním mnohých biologických a fyziologických procesov. Produkcia väčšiny týchto proteínov je zvýšená napr. pri obezite, pri stave inzulínovej rezistencie, pri vysokom krvnom tlaku. Avšak koncentrácia iných adipokínov môže byť v rovnakých prípadoch znížená (adiponektín, leptín). Nedávne výskumy poukazujú na potenciálnu úlohu adipokínov v reprodukcii a vývine embrya. Avšak informácií týkajúcich sa tejto problematiky je pomerne málo, preto v súčasnosti vzrastá záujem o štúdium tejto témy.

ÚVOD

Obdobie preimplantačného vývinu embrya je dôležitou periódou rozhodujúcou výraznou mierou o celkovom úspechu reprodukčného procesu. Vývin preimplantačného embrya charakterizuje intenzívna bunková proliferácia, bunková diferenciácia a sporadický výskyt apoptotickej bunkovej smrti (Huppertz a Herrler, 2005). Predchádzajúce štúdie aj na našom pracovisku preukázali, že preimplantačné embryá sú vysoko citlivé na podmienky svojho prostredia (Veselá a kol., 2003; Baran a kol., 2003; Fabian a kol., 2003, 2004, 2005, 2007a, 2007b; Il'ková a kol., 2004; Čikoš a kol., 2005, 2007; Domaracký a kol., 2007). Všetky poruchy zdravotného stavu matky a homeostatickej rovnováhy jej organizmu teda môžu byť dôležitými činiteľmi, ovplyvňujúcimi kvalitu a prežiteľnosť preimplantačných embryí. Na procesoch komunikácie embrya a matky sa podieľajú mnohé signálne dráhy. Iba nedávno bola medzi tieto faktory zaradená aj skupina cytokínov produkovaných tukovým tkanivom – adipokínov (Mitchell a kol., 2005).

ADIPOKÍNY

Adipokíny sú bioaktívne peptidy a proteíny produkované tukovým tkanivom. Predstavujú podskupinu cytokínov. Diverzita adipokínov je veľká (Frühbeck a kol., 2001; Trayhurn a Beattie, 2001). Do tejto skupiny patria: klasické cytokíny (napr.: TNF α , IL-6, IL-8), rastové faktory (napr.: TGF- β), proteíny alternatívneho komplementového systému (napr.: adiposin, proteín stimulujúci acyláciu), proteíny zahrnuté v cievnej homeostáze (napr.: PAI-1), v regulácii krvného tlaku (angiotenzín), v metabolizme tukov (napr.: retinol viažúci proteín), v homeostáze glukózy (napr.: adiponektín, eventuálne rezistín), v angiogenéze (napr.: VEGF) a proteíny zahrnuté v akútnej fáze a stresových reakciách (napr.: haptoglobín, metalotioneín) (Trauhurn a Wood, 2004). Tieto faktory produkované tukovým tkanivom zohrávajú dôležitú úlohu pri regulácii celkovej telesnej rovnováhy ovplyvňovaním mnohých biologických a fyziologických procesov vrátane príjmu potravy, regulácie energetickej rovnováhy, pôsobenia inzulínu, metabolizmu tukov a glukózy, angiogenézy a remodelácie ciev, regulácie krvného tlaku a krvnej zrážanlivosti (Guerre-Milo, 2004; Trauhurn a Wood, 2004). Nedávne výskumy dokonca poukazujú na úlohu adipokínov v reprodukcii. Známy je vplyv leptínu na samičie reprodukčné orgány a graviditu (Mitchell a kol., 2005). Yang a kol. (2005) zistili, že leptín u myši podporuje adhéziu blastocýst prostredníctvom zvýšenia expresie adhezívnych molekúl a integrínov v bunkách endometria. Taktiež bolo preukázané, že leptín zlepšuje „hatching“, diferenciáciu a bunkovú proliferáciu v myšiacích blastocystách (Herrid a kol., 2006). Avšak o potenciálnej úlohe ďalších adipokínov (ako napr. adiponektín, rezistín a iné) vo vývoji embrya je málo informácií. Adipokíny pôsobia jednak centrálnne, na úrovni

centrálneho nervového systému, a jednak periférne v tkanivách ako kostrová svalovina a pečeň (Whitehead a kol., 2006).

ADIPONEKTÍN A JEHO RECEPTORY

Adiponektín je nedávno charakterizovaný adipokín, ktorý bol identifikovaný ako kľúčový regulátor citlivosti na inzulín a tkanivového zápalu. Mediátorová RNA pre adiponektín je vysoko exprimovaná v tukových bunkách – adipocytoch a proteín vo vysokej koncentrácii cirkuluje v krvi (Hu a kol., 1996). Vo svojej základnej forme je adiponektín trimér, avšak v cirkulácii existuje vo viacerých formách zložených z homotrimérov, odlišujúcich sa molekulovou hmotnosťou (Nakano a kol., 1996). Nedávne práce svedčia o tom, že rôzne izoformy adiponektínu aktivujú rozdielne signálne dráhy a vykazujú odlišné funkcie (Trujillo a Scherer, 2005). Avšak o faktoroch regulujúcich formáciu oligomérnych komplexov adiponektínu je v súčasnosti málo informácií. Na rozdiel od väčšiny adipokínov, koncentrácia adiponektínu v sére nie je zvýšená, ale je znížená u rôznych druhov obezity (Arita a kol., 1999), u rôznych stavov inzulínovej rezistencie (Weyer a kol., 2001; Kern a kol., 2003) a ochorenia koronárnej tepny. Boli preukázané jeho anti-diabetické, anti-aterogénne a protizápalové vlastnosti (Bang a kol., 2007; Oh a kol., 2007). Adiponektín môže modulovať zápalové odpovede indukované TNF- α a to prostredníctvom redukcie sekrécie TNF- α makrofágmi (Ouchi a kol., 2000). Prostredníctvom tohto negatívneho vplyvu adiponektínu na produkciu TNF- α je možné čiastočne vysvetliť jeho protizápalové a anti-aterogénne účinky. Na druhej strane však TNF- α a IL-6 redukujú expresiu mRNA adiponektínu v adipocytoch (Bruun a kol., 2003). Navyše sekrécia adiponektínu adipocytmi je zvyšovaná tiazolidíndiónmi (ktoré taktiež pôsobia proti efektom TNF- α) (Tikkainen a kol., 2004). Adiponektín môže teda predstavovať spoločný mechanizmus, prostredníctvom ktorého TNF- α podporuje a tiazolidíndióny potláčajú inzulínovú rezistenciu a zápal.

Dva adiponektínove receptory, adipoR1 a adipoR2, boli identifikované v rôznych tkanivách. AdipoR1 je najviac exprimovaný v kostrovom svalstve a expresia adipoR2 je najvyššia v pečeni. Predpokladá sa, že tieto receptory obsahujú 7 transmembránových domén, ale zdá sa, že nie sú spojené s G-proteínom (Yamauchi a kol., 2003). Oba receptory pôsobia cez fosforyláciu AMP kinázy, ktorá je kľúčovým regulátorom mnohých signálnych dráh (Wong a kol., 2004).

Najnovšie výskumy poukazujú aj na potenciálnu úlohu adiponektínu v reprodukcií. Ategbo a kol. (2006) preukázali, že nízka koncentrácia adiponektínu v plazme u žien trpiacich tehotenskou cukrovkou signifikantne koreluje s nízkou pôrodnou váhou ich novorodencov. Taktiež je dobre známe, že adiponektín ovplyvňuje expresiu interleukínov a TNF- α , ktoré sú zahrnuté v procese implantácie embrya (Takemura a kol. 2006). Takemura a kol. (2006) ďalej zistili, že oba receptory adiponektínu sú exprimované v ľudskom endometriu, pričom ich expresia je najvyššia práve v čase implantácie embrya. Taktiež bola zistená zvýšená expresia oboch receptorov v trofoblaste blastocysty (Schmidt a kol., 2008). Adiponektínové receptory sú tiež exprimované v placentе ľudí a potkanov (Chen a kol., 2006). Tieto zistenia poukazujú na možnú úlohu adiponektínu v procese implantácie embrya, v preimplantačnom vývine embrya a celkovo v reprodukcií.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-0620-07.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M,

- Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 257:79-83.
- Atègbo JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, Khan NA. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91:4137-43.
- Bang OY, Saver JL, Ovbiagele B, Choi YJ, Yoon SR, Lee KH. Adiponectin levels in patients with intracranial atherosclerosis. *Neurology*. 2007; 68:1931-7.
- Baran V, Fabian D, Rehak P, Koppel J. Nucleolus in apoptosis-induced mouse preimplantation embryos. *Zygote*. 2003; 11:271-83.
- Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 285:E527-33.
- Čikoš Š, Rehak P, Czikková S, Veselá J, Koppel J. Expression of adrenergic receptors in mouse preimplantation embryos and ovulated oocytes. *Reproduction* 2007; 133: 1139-1147.
- Čikoš Š, Veselá J, Il'ková G, Rehak P, Czikková S, Koppel J. Expression of beta adrenergic receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*. 2005; 71: 145-153.
- Domaracký M, Rehak P, Juhás S, Koppel J. Effects of selected plant essential oils on the growth and development of mouse preimplantation embryos in vivo. *Physiol Res*. 2007; 56:97-104.
- Fabian D, Il'ková G, Rehak P, Czikková S, Baran V, Koppel J. Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured in vitro. *Theriogenology*. 2004; 61:745-55.
- Fabian D, Juhás S, Il'ková G, Koppel J. Dose- and time-dependent effects of TNFalpha and actinomycin D on cell death incidence and embryo growth in mouse blastocysts. *Zygote*. 2007a; 15:241-9.
- Fabian D, Koppel J, Maddox-Hyttel P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology*. 2005; 64:221-31.
- Fabian D, Makarevich AV, Chrenek P, Bukovská A, Koppel J. Chronological appearance of spontaneous and induced apoptosis during preimplantation development of rabbit and mouse embryos. *Theriogenology* 2007b; 68:1271-81.
- Fabian D, Rehak P, Czikková S, Il'ková G, Baran V, Koppel J. Induced cell death of preimplantation mouse embryos cultured in vitro evaluated by comet assay. *Theriogenology*. 2003; 60:691-706.
- Gema Frühbeck, Javier Gómez-Ambrosi, Francisco José Muruzábal, and María Angela Burrell. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: E827-E847
- Guerre-Millo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab*. 2004; 30:13-9.
- Herrid M, Nguyen VL, Hinch G, McFarlane JR. Leptin has concentration and stage-dependent effects on embryonic development in vitro. *Reproduction*. 2006; 132:247-56.
- Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*. 1996; 271:10697-703.
- Huppertz B, Herrler A. Regulation of proliferation and apoptosis during development of the preimplantation embryo and the placenta. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005; 75: 249-61.
- Chen J, Tan B, Karteris E, Zervou S, Digby J, Hillhouse EW, Vatish M, Randeve HS. Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia*. 2006; 49:1292-302.
- Ilkova G, Rehak P, Vesela J, Cikos S, Fabian D, Czikkova S, Koppel J. Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development. *Zygote* 2004; 12:205-213.
- Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes*. 2003; 52:1779-85.
- Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction*. 2005; 130:583-97.
- Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem*. 1996; 120:803-12.
- Oh DK, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin in health and disease. *Diabetes Obes Metab*. 2007; 9:282-9.

- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 2000; 102:1296-301.
- Schmidt T, Fischer S, Tsikolia N, Navarrete Santos A, Rohrbach S, Ramin N, Thieme R, Fischer B. Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice embryos. *Histochem Cell Biol*. 2008; 129:817-25.
- Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Yano T, Kadowaki T, Taketani Y. Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology*. 2006; 147:3203-10.
- Tiikkainen M, Häkkinen AM, Korshennikova E, Nyman T, Mäkimattila S, Yki-Järvinen H. Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004; 53:2169-76.
- Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc*. 2001 Aug;60(3):329-39.
- Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. 2004; 92:347-55.
- Trujillo ME & Scherer PE. Adiponectin – journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *Journal of Internal Medicine* 2005; 257:167–175.
- Veselá J, Rehák P, Mihalik J, Czikková S, Pokorný J, Koppel J. Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Physiol Res*. 2003; 52:223-8.
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:1930-5.
- Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, Prins JB. Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*. 2006; 8:264-80.
- Wong GW, Wang J, Hug C, Tsao TS, Lodish HF. A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:10302-7.
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003; 423:762-9.
- Yang YJ, Cao YJ, Bo SM, Peng S, Liu WM, Duan EK. Leptin-directed embryo implantation: leptin regulates adhesion and outgrowth of mouse blastocysts and receptivity of endometrial epithelial cells. *Anim Reprod Sci*. 2006; 92:155-67.

VPLYV MATERSKÉHO PROSTREDIA NA KVALITU BLASTOCÝST U MYŠÍ

Bystriansky J., Burkuš J.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Štúdia bola zameraná na zistenie fyziologického stavu rastových parametrov a bunkovej smrti u embryí v štádiu blastocysty a vplyvu nešpecifického zápalu lokalizovaného mimo reprodukčný trakt matky na kvalitu preimplantačných embryí.

V prvom experimente sme embryá získavali zo zdravých gravidných matiek, v druhom z gravidných matiek, u ktorých bol indukovaný nešpecifický zápal. Blastocysty boli následne kultivované *in vitro* v štandardných podmienkach. Po izolácii, respektíve kultivácii boli embryá fixované a následne ofarbené fluorescenčnými farbivami, ktoré umožnili vizualizáciu morfológie jadier, špecificky degradovanej DNA a viability buniek.

V prvom experimente sa zistilo, že približne štvrtina skorých blastocýst obsahuje apoptotické bunky a ich priemerný výskyt sa pohybuje okolo 1,19%. Počet blastocýst s jednou a viac apoptickými bunkami ako aj celkový počet apoptických buniek u blastocýst sa následne zvýšil počas ich postupujúceho vývinu *in vivo* i *in vitro*.

V druhom pokuse sme u gravidných samíc indukovali zápal subkutánnym podaním 1% karagénanu do pravej zadnej labky (24 h pred izoláciou). Morfológické vyšetrenie pokusných a kontrolných skupín čerstvo vyizolovaných embryí neukázalo negatívny vplyv karagénanu na kvalitu blastocýst. Po 24 h kultivácii *in vitro* došlo k miernemu nárastu počtu embryí s jednou a viac apoptickými bunkami. Po kultivácii zároveň neboli zaznamenané žiadne rozdiely v priemernom počte buniek v blastocystách ($P > 0,05$), ale u zápalom ovplyvnených embryí napriek tomu došlo k signifikantnému nárastu percenta umierajúcich buniek ($P < 0,001$), z ktorých prevažná väčšina bola apoptického charakteru.

ÚVOD

Apoptóza je fyziologický proces vyskytujúci sa vo väčšine bunkových populácií. Jej úloha spočíva v eliminácii abnormálnych, geneticky poškodených a nadbytočných buniek a tým napomáha správne embryonálnemu vývinu. Aj keď sa javí, že apoptickými procesmi bunky zanikajú zvnútra, procesy vedúce k programovanej bunkovej smrti majú len v málo prípadoch striktno endogénny charakter. To dokazuje že na zvýšenie výskytu apoptózy v preimplantačných embryách majú vplyv rôzne vonkajšie podnety (viď prehľad Fabian a kol., 2005a; Fabian a kol., 2004). Predchádzajúce štúdie preukázali, že preimplantačné embryá sú vysoko citlivé na podmienky svojho prostredia (Fabian a kol., 2005b; Fabian a kol., 2007a; Fabian a kol., 2007b; Fleming a kol., 2004) a preto všetky poruchy zdravotného stavu matky môžu byť dôležitými činiteľmi, ovplyvňujúcimi kvalitu preimplantačných embryí. Súvislosť medzi zápalovými procesmi lokalizovanými mimo reprodukčný trakt matky a fertilitou kráv a oviec bola preukázaná už dávnejšie (Hansen a kol., 2004). Priamy vplyv týchto procesov na preimplantačné embryá však doposiaľ preskúmaný nebol. Aj na základe týchto poznatkov sme sa rozhodli tento stav preskúmať u myší tým, že u gravidných matiek sme indukovali zápal za použitia karagénanu. Karagénan je polysachrid, ktorý sa získava zo zelených rias využíva sa ako prísada do jedál, zahusťovadlo či stabilizátor. Na vyvolanie zápalu sa pri modelových pokusoch štandardne využíva Lambda forma v 1 až 2 % roztoku (Bukovská a kol., 2007; Juhás a kol., 2008).

MATERIÁL A METODIKA

V experimentoch boli použité 4 týždňové samice myší (kmeň ICR, Velaz, Praha, Česká Republika), ktoré sme superovulovali peritoneálnym podaním PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin), po ktorom nasledovalo o 47 h podanie hCG (human chorionic gonadotropin).

Po podaní hCG boli samice pripustené samcami a oplodnenie bolo na druhý deň potvrdené identifikáciou vaginálnej zátky. Pred izoláciou sa myši usmrtili cervikálnou dislokáciou. Embryá sme izolovali za pomoci FHM (flushing holding medium) 90 h po aplikácii hCG, ktorým sme prepláchli maternice a vajcovody (Lavits and Biggers, 1993). Pri pokusoch testujúcich vplyv zápalu na embryá sme 24 h pred izoláciou vpichli gravidným matkám do labiek 1 % karagénan (pokusným skupinám) alebo fyziologický roztok (kontrolným skupinám). Embryá sa po zozbieraní buď rovno fixovali a farbili alebo ďalej kultivovali v kultivačnom médiu (KSOM) a fixovali a farbili až po uplynutí ďalších 24 h. Kultivácia prebiehala v 15, 20 alebo 25 μ l kvapkách KSOM v kultivačnom boxe za štandardných podmienok (5% CO₂, 37 °C). Po kultivácii, resp. izolácii sa embryá 3-krát premyli v KSOM a zafarbili propídiom jodidom (10 μ g /ml; farbenie mŕtvych buniek) 5 min pri 37 °C. Následne sa embryá premyli v PBS (phosphate-buffered saline) obsahujúcom BSA (bovine serum albumin), 1 h fixovali v 4% paraformaldehyde pri izbovej teplote a skladovali v 1% paraformaldehyde pri 4°C. Na detekciu špecificky degradovanej DNA v jadrách sa použilo farbenie TUNEL, ktoré je založené na enzymatickom naväzovaní na 3'-OH DNA označený dUTP (Gjorret a kol., 2003; Fabian a kol., 2007a). Na vizualizáciu morfológie jadier sa použilo ešte 5 min farbenie Hoechstom 33342. Po ukončení farbenia sa embrya premyli a v zriedenom krycom médiu preniesli na podložné sklíčko, prikryli krycím médiom a krycím sklíčkom. Pozorovanie embryí prebiehalo pod fluorescenčným mikroskopom. Jadrá embryí boli roztriedené podľa morfológie (M), prítomnosti špecifickej DNA fragmentácie (T) a prítomnosti PI farbenia na: normálne (M-T-P-; bez morfológických zmien, TUNEL a PI označenia), apoptické (M+T±P-; PI negatívne s kondenzovanou alebo fragmentovanou štruktúrou, obyčajne obsahujúcou degradovanú DNA), sekundárne nekrotické (M±T±P+; PI pozitívne väčšinou s fragmentovanou štruktúrou, často obsahujúcou degradovanú DNA) a nekrotické (M-T-P+; PI pozitívne bez morfológických zmien a TUNEL označenia) (Fabian a kol., 2004). Počty jednotlivých typov buniek boli spočítané, vyhodnotené a navzájom porovnávané štandardnými štatistickými metódami (ANOVA, Dunnett test, chi-square test).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pokus zameraný na zistenie fyziologického stavu rastových parametrov a bunkovej smrti u embryí v štádiu blastocysty vyizolovaných zo zdravých matiek ukázal, že približne štvrtina skorých blastocýst obsahuje apoptotické bunky a ich priemerný výskyt sa pohybuje okolo 1,19%. Počet blastocýst s jednou a viac apoptickými bunkami ako aj celkový počet apoptických buniek u blastocýst sa následne zvýšil počas ich postupujúceho vývinu *in vivo* i *in vitro*. 68,03% neskorých blastocýst izolovaných 120 h post hCG a 92,52% neskorých blastocýst izolovaných 90 h post hCG a kultivovaných 24 h *in vitro* obsahovalo minimálne 1 apoptotickú bunku (P<0.001). U neskorších blastocýst došlo aj k nárastu priemerného počtu apoptických buniek. Pri blastocystách izolovaných 120 h post hCG sa počet apoptických buniek zvýšil na 4,46% a pri blastocystách izolovaných 90 h post hCG a kultivovaných 24 h *in vitro* s kultiváciou to bolo dokonca 4,98% z celkového počtu jadier (P<0.001). K nárastu incidencie apoptózy pri skupine s kultiváciou mohlo dôjsť nielen vekom, ale aj horšími podmienkami než boli fyziologické.

V druhom experimente sa síce vplyv zápalu na kvalitu čerstvo vyizolovaných embryí najprv nepreukázal (zastúpenie blastocýst, morúl a embryí s omeškaným rastom bolo obdobné), ale následná kultivácia prispela k miernemu nárastu embryí s jednou a viac apoptickými bunkami (97,49% vs. 91,96%; P<0.05) a k signifikantnému nárastu percenta mŕtvych buniek, s ktorých väčšina bola apoptického charakteru: kontrolná skupina obsahovala 3,16% umierajúcich buniek a pokusná 5,26% umierajúcich buniek na celkový počet buniek v danej skupine (P<0,001). Po kultivácii neboli zaznamenané žiadne rozdiely v priemernom počte buniek v blastocystách (86.43±19.09 vs. 83.26±21.83; P>0,05).

Na záver možno konštatovať, že incidencia apoptózy sa u neovplyvnených blastocýst zvyšuje s ich vekom. Na základe výsledkov z druhého pokusu môžeme konštatovať, že zápal lokalizovaný mimo reprodukčného traktu matky môže mať na kvalitu embryí mierne negatívny vplyv, s ktorého následkami sa embryá dokážu vysporiadať autoregulačnými mechanizmami ako je apoptotická bunková smrť.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená Slovenskou akadémiou vied na základe Zmluvy č. VEGA 2/0046/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bukovská A, Cikos S, Juhás S, Il'ková G, Reháč P, Koppel J. Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice. *Mediators Inflamm.* 2007; 2007:23296.
- Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, Miller DJ, Watkins AJ, Eckert JJ. The embryo and its future. *Biol Reprod.* 2004; 71(4):1046-54
- Fabian, D., Il'kova, G., Rehak, P., Czikkova, S., Baran, V., Koppel, J. Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology* 2004; **61**, 745–55.
- Fabian D, Gjorret JO, Berthelot F, Martinat-Botté F, Maddox-Hyttel P. Ultrastructure and cell death of *in vivo* derived and vitrified porcine blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 2005a; 70(2):155-65.
- Fabian, D., Koppel, J., Maddox-Hyttel, P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology* 2005b; **64**, 221–31.
- Fabian D, Juhás S, Il'ková G, Koppel J. Dose- and time-dependent effects of TNF α and actinomycin D on cell death incidence and embryo growth in mouse blastocysts. *Zygote.* 2007a; 15(3):241-9.
- Fabian D, Makarevich AV, Chrenek P, Bukovská A, Koppel J. Chronological appearance of spontaneous and induced apoptosis during preimplantation development of rabbit and mouse embryos. *Theriogenology.* 2007b; 68(9):1271-81
- Gjorret, J.O., Knijn, H.M., Dieleman, S.J., Avery, B., Larsson, L.I., Maddox-Hyttel, P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Reprod.* 2003; **69**, 1193–200.
- Hansen PJ, Soto P, Natzke RP. Mastitis and fertility in cattle - possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am J Reprod Immunol.* 2004; 51(4):294-301.
- Juhás S, Cikos S, Czikková S, Veselá J, Il'ková G, Hájek T, Domaracká K, Domaracký M, Bujnáková D, Reháč P, Koppel J. Effects of borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. *Folia Biol (Praha).* 2008; 54(1):1-7.
- Lawits, J.A., Biggers, J.D. Culture of preimplantation embryos. In: *Guide to Techniques in Mouse Development*, Wassarman PM, DePhamphilis ML (Ed.), San Diego, Academic Press, pp. 1993; 153–64.

VPLYV TEPLoty, AKTIVITY VODY A BIKARBONÁTU AMÓNNEHO NA RAST MIKROMYCÉTY *ASPERGILLUS FLAVUS*

Cicoňová P., Laciaková A., Máté D.

Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVL, Košice

ABSTRAKT

V práci sme sledovali vplyv teploty, aktivity vody a bikarbonátu amónneho na rast mikromycét *Aspergillus flavus*. Zistili sme, že minimálna aktivita vody potrebná pre rast mikromycét bola 0,80 a optimálna 0,99. Rast mikromycét bol pozorovaný pri minimálnej teplote 10°C a optimálnej teplote 30°C. Rôzne chemické látky vplývajú na rast mikromycét. Napríklad bikarbonát amónny inhibuje rast *A. flavus*. Výsledky ukázali, že čím koncentrácia tejto látky bola vyššia, tým nižší počet mikromycét sa nachádzal vo vzorkách.

ÚVOD

Mikroskopické vlákňité huby plnia v prírode nezastupiteľnú úlohu deštruentov pri rozklade rastlinných a živočíšnych zvyškov, lebo sú schopné produkovať celú radu enzýmov. Niektoré z nich sú využívané v potravinárskom, farmaceutickom priemysle a ďalších biotechnológiách. Naproti tomu mnohé môžu pôsobiť z hľadiska zdravia človeka nepriaznivo a to rozkladom potravín uskladnených za nevhodných podmienok, produkciou mykotoxínov do potravín a niektoré môžu byť patogénne pre človeka a zvieratá. Určité mikromycéty sú schopné produkovať viac než jeden mykotoxín, niektorý mykotoxín je naopak produkovaný viacerými druhmi mikromycét. Medzi najznámejšie toxinogénne rody patria *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporidium* a *Stachybotris* (Hudáček a kol., 2007).

Rod *Aspergillus* je jeden z najrozšírenejších sa vyskytujúcich rodov mikromycét, jednotlivé druhy môžu byť izolované z pôdy, zo vzduchu, z potravín a z mnoho ďalších zdrojov. Tieto mikromycéty môžu rásť na mnohých poľnohospodárskych a potravinárskych komoditách, nachádzajú sa hlavne na olejových semenách, orechoch, korení, cereáliách a sušenom ovocí. Rast mikromycét a produkcia mykotoxínov závisí na teplote, aktivite vody, pH, chemickom zložení substrátu, prístupe kyslíka a prítomnosti iných mikroorganizmov. *A. flavus* sa vyskytuje na celom svete a produkuje aflatoxíny, ktoré majú hepatotoxické, mutagénne, karcinogénne, teratogénne a imunotoxické účinky (Malíř a kol., 2003).

MATERIÁL A METODIKA

Metodický postup pozostával z niekoľkých krokov:

1. Z kmeňov *A. flavus* po 5 dňovej inkubácii na GKCH agare bola pripravená suspenzia spór.
2. Substrátom bola strúhanka, u ktorej bola upravená aktivita vody na 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95 a 0,99. Po naočkovaní substrátu spórovou suspenziou, bol sledovaný rast mikromycét pri teplote 10°C, 15°C, 25°C a 30°C po dobu 10 dní. Aby sa zistil vplyv bikarbonátu amónneho, pripravil sa substrát s aktivitou vody 0,98. Bikarbonát amónny bol pridaný v takom množstve, aby jeho koncentrácia predstavovala 0,1%, 0,5% a 1%. Kontrolou bol substrát bez prídavku bikarbonátu amónneho. Po naočkovaní substrátu spórovou suspenziou, bol sledovaný rast mikromycét pri teplote 25 °C po dobu 15 a 25 dní.
3. Počet mikromycét sa stanovil zalievaním riedení substrátu GKCH agarom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vplyv a_w a teploty na rast mikromycét *A. flavus* je uvedený v tabuľkách 1 a 2. Minimálna a_w potrebná pre rast bola 0,80 a najvyššie množstvo mikromycét sa nachádzalo v substráte pri a_w 0,99. Sanchis a Magan (2004) uvádzajú, že *A. flavus* rastie od a_w 0,73. Podľa Malířa a kol. (2003) je minimálna a_w potrebná pre rast 0,78 a optimálna a_w 0,95. Na základe výskumu vedeného Pittom a Miscamblem (1995) sa zistilo, že minimálna a_w je 0,80-0,83 a optimálna

a_w je 0,99. Rast *A. flavus* bol pozorovaný pri minimálnej teplote 10°C a optimálnej teplote 30°C. *A. flavus* rastie od 6-8°C, pri optimálnej teplote 36°C (Malíř a kol., 2003). Pitt a Hocking (1997) uvádzajú minimálny rast pri 10-12°C a optimálny pri 32-33°C.

Tabuľka 1: Vplyv aktivity vody na rast mikromycét *A. flavus* pri 30°C a expozícií 10 dní

Aktivita vody (a_w)	Priemerný počet KTJ/g
0,75	$1,0 \cdot 10^3$
0,80	$7,3 \cdot 10^3$
0,85	$1,5 \cdot 10^5$
0,90	$5,9 \cdot 10^5$
0,95	$1,4 \cdot 10^6$
0,99	$1,3 \cdot 10^7$

Tabuľka 2: Vplyv teploty na rast mikromycét *A. flavus* pri a_w 0,99 a expozícií 10 dní

Teplota (°C)	Priemerný počet KTJ/g
10	$4,6 \cdot 10^3$
15	$5,1 \cdot 10^4$
25	$5,7 \cdot 10^6$
30	$1,3 \cdot 10^7$

V tabuľke 3 je uvedený inhibičný účinok bikarbonátu amónneho o koncentracii 0,1%, 0,5% a 1% na rast *A. flavus*. Rast bol hodnotený po 15 a 25 dňoch inkubácie. Najvyšší počet mikromycét bol stanovený vo vzorkách, ktoré neobsahovali bikarbonát amónny. Čím koncentrácia tejto látky bola vyššia, tým nižší počet mikromycét sa nachádzal vo vzorkách.

Tabuľka 3: Priemerný počet mikromycét stanovený po 15 a 25 dňoch kultivácie

Počet dní	Koncentrácia bikarbonátu amónneho			
	0%	0,1%	0,5%	1%
15	$1,5 \cdot 10^9$	$8,0 \cdot 10^8$	$6,5 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$
25	$5,0 \cdot 10^9$	$4,0 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^6$	$<1,0 \cdot 10^6$

Inhibičný účinok bikarbonátu amónneho na rast rôznych druhov mikromycét bol uvedený niekoľkými autormi. Samapundo a kol. (2007) skúmali účinok bikarbonátu amónneho na rast mikromycét rodu *Aspergillus* a *Fusarium*. Zvyšovaním koncentrácie tejto látky, stúpal aj jej inhibičný účinok na rod *Aspergillus*. Rast bol rýchlejší, ak koncentrácia bikarbonátu amónneho bola vyššia, až do koncentrácie 0,2 %, ďalšie zvyšovanie koncentrácie spôsobilo spomalenie rastu mikromycét rodu *Fusarium*. Bikarbonát amónny o koncentracii 0,8 % úplne inhiboval rast *F. verticillioides* a *F. proliferatum* a 1 % bikarbonát amónny bol potrebný na úplnu inhibíciu rastu *A. flavus* pri a_w 0,97. Výskumom vedeným De Pasqualem a kol. (1990) bolo dokázané, že mikromycéty *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *Penicillium griseofulvum*, *P. notatum*, *A. ochraceus*, *A. flavus* a *A. niger* nerástli, ak koncentrácia bikarbonátu amónneho bola min. 0,87 %. Mutasa a Magan (1990) uviedli, že niektoré mikromycéty môžu metabolizovať nízke koncentrácie antimikrobiálnych látok. Stimulačný účinok bikarbonátu môže byť spôsobený využívaním tejto látky pri jej nízkej koncentrácii ako zdroj N a C. Existuje niekoľko teórií o mechanizme inhibície rastu mikromycét bikarbonátom amónnym. Punja a Gragon (1982) predpokladali, že inhibícia je spôsobená neionizovaným amoniakom so soľou. Títo autori tiež uviedli, že disociácia iónov NH_4^+ , ktorej výsledkom je voľný amoniak závisí od hodnoty pH. De Pasquale a Montville (1990) skúmali schopnosť

voľného amoniaku inhibovať rast mikromycét použitím sulfátu amónneho. Autori zistili, že táto látka mala rovnaký inhibičný účinok ako bikarbonát amónny pri hodnote pH $\geq 8,7$, ale bola úplne neúčinná pri hodnote pH $\leq 7,8$. Bikarbonátové ióny majú tiež inhibičný účinok na rast mikromycét (Montville a Goldstein, 1987).

POĎAKOVANIE

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore z grantovej úlohy č. 1/2386/06 (VEGA).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- DePasquale D A, El-Nabarawy A, Rosen J D, Montville T J. Ammonium bicarbonate inhibition of mycotoxigenic fungi and spoilage yeasts. *Journal of Food Protection*. 1990; 53 : 324–328.
- DePasquale D A, Montville T J. Mechanism by which ammonium bicarbonate and ammonium sulfate inhibit mycotoxigenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990; 56 : 3711–3717.
- Hudáček J, Zalán Z, Chumchalová J, Halász A. Antifungálny účinok lactobacilov na plesne rodu *Aspergillus* a *Fusarium*. *Chem. Listy*. 2007; 101:730-737.
- Malíř F, Ostrý V, Bárta I, Buchta V. Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví človeka. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských oborů. 2003; 349 s.
- Montville T J, Goldstein P K. Sodium bicarbonate reduces viability and alters aflatoxin distribution of *Aspergillus parasiticus* in Czapek's agar. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987; 53 : 2303–2307.
- Mutasa E S, Magan N. Utilisation of potassium sorbate by tobacco spoilage fungi. *Mycological Research*. 1990; 94 : 965–970.
- Pitt J I, Hocking A D. *Aspergillus* and related teleomorphs. In: Pitt, J.I., Hocking, A.D. (Eds.), *Fungi and Food Spoilage*. London: Academic Press. 1997; 339–416.
- Pitt J I, Miscamble B F. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *J. Food Prot.* 1995; 58 : 86–90.
- Punja Z K, Grogan R G. Effects of inorganic salts, carbonate–bicarbonate anions, ammonia, and the modifying influence of the pH on sclerotial germination of *Sclerotinium rolfsii*. *Phytopathology* 1982; 72 : 635–639.
- Samapundo S, Devlieghere F, De Meulenaer B, Debever J. Effect of Water Activity and Temperature on Growth and the Relationship between Fumonisin Production and the Radial Growth of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on Corn. *Journal of Food Protection*. 2005; 68 : 1054–1059.
- Sanchis V, Magan N. Environmental profiles for growth and mycotoxin production. In: N. Magan and M. Olsen, Editors, *Mycotoxins in Food: Detection and Control*, Woodhead Publishing Ltd. 2004

PLAZMIDOM KÓDOVANÁ PREOSNÁ TETRACYKLÍNOVÁ REZISTENCIA U ENTEROBAKTÉRIÍ

Fecskeová L.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

V tejto práci sme PCR analýzou študovali determinant prenosnej a neprenosnej tetracyklínovej rezistencie u vybraných enterobakteriálnych izolátov pochádzajúcich z tráviaceho traktu ovce. Dokázali sme *tetB* kódovanú tetracyklínovú rezistenciu u všetkých testovaných izolátoch. V prípade prenosnej rezistencie je tento gén spojený s transpozónom. Zistili sme, že za samotný prenos tetracyklínovej rezistencie je zodpovedný plazmid, na ktorom je lokalizovaný transpozónom asociovaný *tetB* gén. Izolovali sme nízkokópiový, konjugatívny plazmid s približnou veľkosťou >50 kbp, ktorý sme sa pokúsili čiastočne charakterizovať.

ÚVOD

Bachor prežúvavcov predstavuje unikátny mikrobiálny ekosystém s ideálnymi podmienkami pre horizontálny prenos génov medzi rôznymi mikroorganizmami. V prirodzených ekosystémoch, ako je bachor, šírenie génov je sprostredkované horizontálnym prenosom mobilných génových elementov (MGE), ako sú plazmidy, transpozóny a integróny. Tieto MGE majú vysoký potenciál šíriť determinanty antibiotickej rezistencie aj medzi fylogeneticky vzdialenými bakteriálnymi druhmi. Na možnosť horizontálneho šírenia determinantu kanamycínovej rezistencie v bachore poukazuje aj práca Pristaša a kol (2005), v ktorom popisuje výskyt tejto rezistencie u rôznych druhov bachorových baktérií. V nedávnej dobe sa popisala plazmidom kódovaná ampicilínová rezistencia rozšírená v prirodzenej populácii enterobaktérií v tráviacom trakte ovce (Malík, 2004). Determinanty tetracyklínovej rezistencie gram-negatívnych baktérií – predovšetkým gény kódujúce proteíny zodpovedné za eflux (triedy *tetA* až *tetE*) – sa nachádzajú na veľkých, konjugatívnych plazmidoch rôznych inkompatibilných skupín (Jones a kol, 1992; Schnabel a Jones, 1999, Mendez a kol, 1980). *tetB* determinant tetracyklínovej rezistencie bol popísaný ako najbežnejšie sa vyskytujúci tetracyklínový determinant u zástupcov *Enterobacteriaceae* (Marshall a kol, 1983; Aminov a kol, 2002).

V predchádzajúcich prácach sa pozorovala významná sezónna dynamika tetracyklínovej rezistencie u enterobakteriálnych izolátov odobratých z bachora a čriev ovce domácej, pričom zviera bolo izolované a kŕmené rovnakou stravou počas celej doby experimentu bez prídavku antibiotík (Malík a kol, 2005). Výsledky predošlých štúdií poukázali na prenosnú tetracyklínovú rezistenciu v niektorých izolátoch. V sérii kokultivačných experimentov sa ukázalo, že kým neprenosná rezistencia pravdepodobne lokalizovaná na chromozóme predstavuje významnú metabolickú záťaž pre hostiteľský organizmus, mobilný génový element kódujúci prenosnú rezistenciu je schopný túto záťaž znížiť resp. eliminovať istými funkciami, ktoré kóduje (Seliga, 2006). Cieľom práce bola identifikácia mobilného génového elementu kódujúceho prenosnú Tc-rezistenciu a jeho čiastočná charakterizácia.

MATERIÁL A METODIKA

Bakteriálne kmene, kultivácia a izolácia DNA

V práci sme použili divoké izoláty enterobaktérií pochádzajúcich z predošlých experimentov (Malík a kol, 2004), ďalej *Escherichia coli* DH5a a transkonjugant *E. coli* DH5a/F1/1. Zdroj a vlastnosti použitých baktérií sú uvedené v tabuľke 1. Bakteriálne bunky sme kultivovali v LB tekutom médiu počas 16 hodín pri 37°C s prídavkom tetracyklínu v koncentrácii 12,5 µg/ml, resp. nalidixínu v koncentrácii 100 µg/ml. Totálnu DNA sme izolovali z 25 ml nočnej

kultúry podľa návodu Pospiech a Neumann (1995). Plazmidovú DNA sme izolovali zo 150 ml nočnej kultúry pomocou kitu JETstar Plasmid Purification Midi Kit (Genomed, USA) a podrobili sme restriktívnej analýze.

Tabuľka 1. Zdroj a vlastnosti jednotlivých baktérií použitých v práci

kmeň	rezistencia	zdroj
R0/11	Tc(<i>tetB</i>)-Tra ⁻	bachor
R2/30	žiadna	bachor
F1/1	Tc(<i>tetB</i>)-Tra ⁺	faeces
DH5α/F1/1	Nal-Tra ⁻ , Tc(<i>tetB</i>)-Tra ⁺	transkonjugant
DH5α	Nal-Tra ⁻	laboratórny kmeň

Tra⁻ - neprenosná rezistencia, Tra⁺ - prenosná rezistencia

PCR amplifikácia

Ako templát v PCR reakciách sme použili totálnu DNA izolátov R0/11, R2/30, F1/1, totálnu DNA transkonjugantna *E. coli* DH5α/F1/1 a ako negatívnu kontrolu DNA z *E. coli* DH5α. Jednotlivé priméry, ich sekvencie a veľkosti očakávaných amplikónov sú zhrnuté v tabuľke 2. Časovo-teplotný profil PCR reakcií pri amplifikácii všetkých génov okrem oblasti *tetB-tnp10* pozostával z iniciačnej denaturácie (94°C, 3 min), z 30 cyklov s parametrami: denaturácia (94°C 1 min), annealing (55°C 1 min pre *tetB* gén, 68°C 1 min pre *tnp10* gén, 60°C 1 min pre *mobA* gén, 57°C 1 min pre *trfA* gén a *oriV* oblasť), extenzia (72°C 1 min) a zo záverečnej extenzie pri 72°C počas 10 min.

Na amplifikáciu oblasti nachádzajúcej sa medzi génmi *tetB* a *tnp10* sme použili Phusion DNA-polymerázu (Finnzymes, Fínsko) a nasledovný časovo-teplotný profil: iniciačná denaturácia (98°C 30s), 30 amplifikačných cyklov s parametrami: denaturácia (98°C 10s), annealing (59°C 30s), extenzia (72°C 1 min), záverečná extenzia (72°C 7 min). Vzniknuté produkty sme vizualizovali elektroforézou v 1% agarózovom géli. Na porovnanie molekulových hmotností sme použili 100 bp alebo 1 kb štandard molekulovej hmotnosti (Invitrogen, USA).

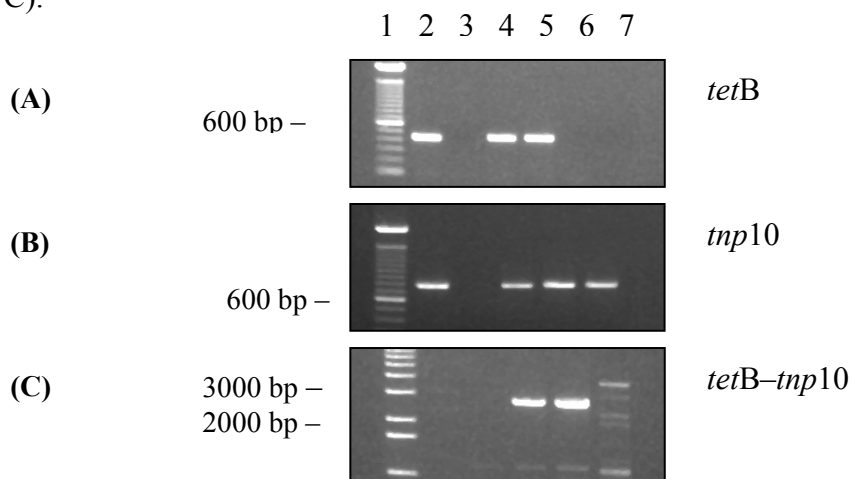
Tabuľka 2. Sekvencie primérov použité v PCR analýzach a veľkosti očakávaných amplikónov

primér (amplifikovaný gén)	sekvencie primérov (5'→3')	veľkosť amplikónu	zdroj
tetB (<i>tetB</i>)	F CTCAGTATTCCTAAGCCTTTG R CTAAGCACTTGTCTCCTGTT	430 bp	Aminov a kol (2002)
Tn10trans (<i>tnp10</i>)	F TTACCGAACTTGGCCGTAAC R CCGTAGGCAGGACTTTTCAA	789 bp	Táto práca
pTCmob (<i>mobA</i>)	F CCGGTCTCGAGAAAATCAG R TCTTCCAGGTTCCGCTGTAT	799 bp	Táto práca
<i>tetB-tnp10</i>	vid' Tn10transF vid' <i>tetB</i> F	2700 bp	Táto práca
trfA2 (<i>trfA</i> IncP)	F CGAAATTCAGTAGTGGGAGAAGTA R CGCTTTGCAATGCACCAGGTC	241 bp	Götz a kol (1996)
oriV (<i>oriV</i> IncQ)	F CTCCCGTACTAACTGTCACG R ATCGACCGAGACAGGCCCTGC	436 bp	Götz a kol (1996)

VÝSLEDKY A DISKUSIA

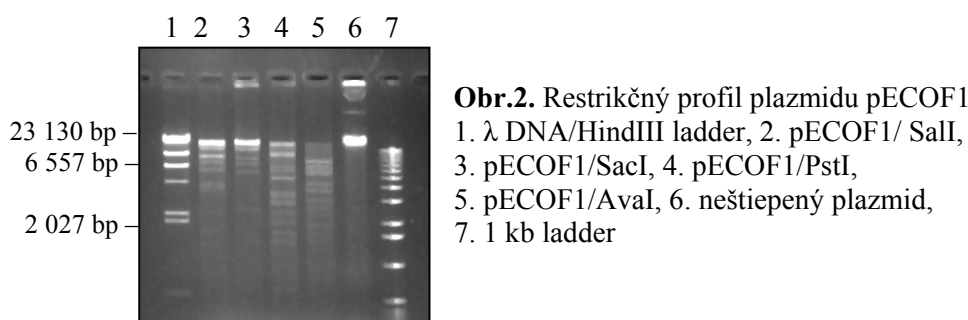
PCR reakciou sme potvrdili prítomnosť 430 bp úseku génu *tetB* u všetkých Tc-rezistentných izolátov (Obr. 1A). V ďalšom kroku sme študovali možnosť prítomnosti transpozónom kódovanej tetracyklínovej rezistencie. Známy transpozón, ktorý často sprostredkuje tetracyklínovú rezistenciu u *E. coli* je Tn10. Je to zložený transpozón na oboch koncoch

ohraničený IS elementami. Navrhli sme priméry na amplifikáciu génu kódujúceho enzým transpozóazu (*tnp10*), ktorý je lokalizovaný na sekvenciách IS elementov transpozónu Tn10. PCR analýza odhalila prítomnosť tohto génu vo všetkých *tetB* pozitívnych izolátoch (Obr. 1B). Na potvrdenie toho, že Tc-rezistencia je skutočne asociovaná s transpozónom Tn10, v PCR reakcii sme použili kombináciu dvoch rôznych typov primérov, konkrétne TetBF a Tn10transF, ktoré amplifikujú 2700 bp dlhú oblasť ohraničenú génmi *tetB* a *tnp10*. Výskyt *tetB-tnp10* regiónu sme detegovali v prípade izolátu F1/1 a transkonjuganta DH5 α /F1/1 (Obr.1C).



Obr.1. Elektroforetický záznam PCR amplifikácie *tetB* génu (A), *tnp10* génu (B), *tetB-tnp10* regiónu (C). Dráha 1: 100 bp ladder (A, B), 1 kb ladder (C), 2. R0/11, 3. R2/30, 4. F1/1, 5. DH5 α /F1/1, 6. DH5 α , 7. negatívna kontrola

Zistili sme *tetB* kódovanú tetracyklínovú rezistenciu u všetkých testovaných izolátoch. Dokázali sme, že v prípade prenosnej rezistencie je tento gén lokalizovaný na transpozóne Tn10. Je známe, že transpozóny všeobecne nie sú schopné sprostredkovať prenos génov medzi jednotlivými baktériami, teda za prenosnú rezistenciu je zodpovedný iný typ mobilného génového elementu, pravdepodobne plazmid. Z dôvodu ľahšej manipulácie sme v ďalšom kroku izolovali plazmidovú DNA z transkonjuganta DH5 α /F1/1. Približná veľkosť vyzolovaného plazmidu sa pohybuje okolo >50 kbp a pravdepodobne ide o nízkokópiový plazmid. Výsledky restriktčných analýz potvrdili, že sa naozaj jedná o plazmidovú DNA (Obr. 2).



Obr.2. Restriktčný profil plazmidu pECOF1
1. λ DNA/HindIII ladder, 2. pECOF1/ Sall,
3. pECOF1/SacI, 4. pECOF1/PstI,
5. pECOF1/AvaI, 6. neštiepený plazmid,
7. 1 kb ladder

Plazmid pochádzajúci z fekálneho enterobakteriálneho izolátu F1/1 sme nazvali pECOF1 a podrobili sme ďalším analýzám založených na PCR. Použili sme dva sady univerzálnych primérov (*trfA2R* a *trfA2F*; *oriVR* a *oriVF*) (Götz a kol, 1996), ktoré amplifikujú charakteristické oblasti prítomné na sekvenciách plazmidov patriacich do IncP alebo IncQ skupiny inkompatibility. Prvý pár primérov amplifikuje 241 bp úsek IncP-špecifickej sekvencie, druhý pár primérov amplifikuje 436 bp oblasť charakteristickú pre IncQ skupinu

plazmidov. Výsledky PCR reakcii ukázali, že nami študovaný plazmid nepatrí ani do IncP a ani do IncQ skupiny plazmidov. Autori Olsz a kol (2005) nedávno objavili nový Tc-rezistentný plazmid pochádzajúci z *E. coli*, nazvaný pTC, ktorý tiež obsahuje gén *tetB*. Na základe čiastočnej sekvencie plazmidu pTC v GenBank databáze navrhli sme priméry na amplifikáciu časti génu *mobA*. Výsledkom PCR amplifikácie však bol nešpecifický amplikón a jeho restričná analýza potvrdila, že sa nejedná o fragment plazmidu pTC. Zhrnutie výsledkov všetkých PCR reakcií je uvedený v tabuľke 3.

Tabuľka 3. Výsledky PCR analýz

kmeň	PCR amplifikácie					
	<i>tetB</i>	<i>Tnp10</i>	<i>tetB-tnp10</i>	pTCmob	IncP	IncQ
R0/11	+	+	-	-	-	-
R2/30	-	-	-	-	-	-
F1/1	+	+	+	-	-	-
DH5 α /F1/1	+	+	+	-	-	-
DH5 α	-	+	-	-	-	-

Plazmid pECOF1 nesúca *tetB* kódovanú transpozómom spojenú prenosnú tetracyklínovú rezistenciu pravdepodobne kóduje aj ďalšie funkcie zvyhodňujúce hostiteľskú bunku, ako to naznačujú výsledky predošlých kokultivačných experimentov (Seliga, 2006). Identifikácia týchto funkcií ako aj podrobná charakterizácia tohto zatiaľ neznámeho Tc-rezistentného plazmidu bude predmetom našich ďalších štúdií.

POĎAKOVANIE

Tento projekt bol podporovaný Vedeckou Grantovou Agentúrou VEGA, grant č. 2/0051/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aminov R.I., Chee-Sanford J.C., Garrigues N., Teferedegne B., Krapac I.J., White B.A., Mackie R.I.: Development, validation and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68:1786-93.
- Götz, A., Pukall R., Smit E., Tietze E., Prager R., Tschäpe H., van Elsas, J.D., Smalla K.: Detection and characterisation of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62:2621-28.
- Jones C.S., Osborne D.J., Stanley J.: Enterobacterial tetracycline-resistance in relation to plasmid incompatibility. *Mol. Cell. Probes* 1992; 6:313-317.
- Malík R., Javorský P., Pristaš P.: Occurrence of plasmid mediated ampicillin resistance among enterobacteria from the ovine rumen. *Folia Microbiol.* 2004; 49:187-90.
- Malík R., Ivan J., Javorský P., Pristaš P.: Seasonal dynamics of antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* in the gastrointestinal tract of domestic sheep. *Fol. Microbiol.* 2005; 50:349-352.
- Marshall B., Tachibana C., Levy S.B.: Frequency of tetracycline resistance determinants classes among lactose-fermenting coliforms. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1983; 24:835-40.
- Mendez B., Tachibana C., Levy S.B.: Heterogenicity of tetracycline-resistance determinants. *Plasmid* 1980; 3:99-108.
- Olsz F, Fekete P.Zs., Blum-Oehler G., Boldogkői Zs., Nagy B.: Characterisation of an F18⁺ enterotoxigenic *Escherichia coli* strain from post weaning diarrhoea of swine, and of its conjugative virulence plasmid pTC. *Microbiol. Let.* 2005; 244:281-89.

- Pospiech A., Neumann B.: A versatile quick/prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 1995; 11:217-18
- Pristaš P., Vanát I., Kostrábová N., Javorský P.: A study of molecular mechanisms for spreading of kanamycin resistance gene among ruminal bacteria. *Rumen Microbiol. Satellite symposium of IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores*, Clermond Ferrand, France,66
- Schnabel E.L., Jones A.L.: Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phylloplane bacteria in Michigan apple orchards. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65:4898-907
- Seliga R: „Biologická cena“ prenosnej rezistencie na antibiotiká. *Nové smery vo veterinárnej fyziológii.* 2006; 1:68-71

VPLYV β (1,3/1,6)D – GLUKÁNU NA VYBRANÉ NEŠPECIFICKÉ A ŠPECIFICKÉ IMUNOLOGICKÉ UKAZOVATELE PSOV

Haladová E., Mojžišová J., Smrčo P., Hipíková V., Ondrejková A., Prokeš M.

Katedra epizootológie a parazitológie, UVL, Košice

ABSTRAKT

Táto štúdia je zameraná na sledovanie imunostimulačného efektu β (1,3/1,6)D glukánu u imunosuprimovaných psov so súčasným ovplyvnením účinnosti vakcinácie proti besnote. Aplikácia glukánu výrazne ovplyvnila v I.G skupine t.j. u šteniat, ktorým sme podávali sirup Plerasan s obsahom β (1,3/1,6) D glukánu nešpecifické imunologické ukazovatele ako napr. funkčnú aktivitu fagocytov (FALe, FILE, IMA) a lymfocytov (SIP) v smere zvýšenia oproti 0.odberu aj kontrole. U šteniat s potvrdenou imunosupresiou pri 0.odbere bola na 28. deň po antirabickej vakcinácii v skupine II.K (bez podania glukánu) zistená signifikantne nižšia hladina antirabických protilátok, pričom nedosiahli požadovanú hladinu ani pri jednom odbere, čo je z imunologického pohľadu závažné zistenie. Naopak u skupiny šteniat (I.G) s aplikáciou glukánu sme pozorovali dosiahnutie protekčnej hladiny antirabických protilátok už na 14.deň po vakcinácii (>1 UE/ml). Najvyššia hladina Ab ($P<0.0001$) bola dosiahnutá na 28. po antirabickej vakcinácii u psov ošetrovaných glukánom. Dokázali sme, že β (1,3/1,6) D glukán má významné imunostimulačné vlastnosti v prípade alterovanej imunity u psov a je možné využiť ako imunostimulačný preparát v klinickej praxi malých zvierat. V prípade potvrdenej imunosupresie sa doporučuje opakovať antirabickú vakcináciu, pretože primovakcinácia nezabezpečí dostatočnú protekciu.

ÚVOD

Glukány sú polysacharidové substancie izolované z kvasiniek a húb. Hliva ustricová (*Pleurotus ostreatus*, *Hiratake*) spomedzi priemyselne používaných drevokazných húb má najlepšie nutričné hodnoty. Beta glukán izolovaný z tejto huby má výrazný protirakovinový a imunomodulačný účinok (Mizuno, 1996). Stimuluje humorálnu aj bunkovú sprostredkovanú imunitu a hematopoézu (Tizard, 2004).Dôležitým efektom glukánov je sekrécia IL-1 makrofágmi, t.j. rozhodujúceho cytokínu pre aktiváciu T-lymfocytov v procese prezentácie antigénu a pre produkciu IL-2 (Thompson, Forrester 1994). Glukány zvyšujú protekciu voči infekčným, inváznym a neoplastickým ochoreniam. Cieľom našej práce bolo sledovať špecifické a nešpecifické imunologické ukazovatele po imunostimulácii β (1,3/1,6) D glukánom.

MATERIÁL A METODIKA

Zvieratá. Skupina I. G :6 psov rôzneho plemena, pohlavia vo veku asi 4 mesiace pochádzajúce z útulku, ktorým po 0. odbere krvi bola podávaná *per os* predpísaná dávka imunoglukánu (sirup Plerasan, PLEURAN, Bratislava) 2ml/5kg po dobu 2 mesiacov a vykonaná vakcinácia proti infekčným chorobám: psinke, parvoviróze, parainfluenze, infekčnej hepatitíde, leptospiróze živou atenuovanou vakcínou a proti besnote inaktivovanou vakcínou. Vakcinácia bola vykonaná podľa štandardnej vakcinačnej schémy. U oboch skupín psov (I. G a II .K) bola vykonaná primovakcinácia s následnou revakcináciou v dvojtýždňovom intervale. Vyšetřili sme vybrané nešpecifické imunologické parametre a titer protilátok proti besnote.

Skupina II. K: 6 psov rôzneho plemena, pohlavia vo veku asi 4 mesiace pochádzajúce z útulku, bez podania imunoglukánu, ktoré boli vakcinované v rovnakej vakcinačnej schéme ako skupina I.G s následnou detekciou hladiny antirabických protilátok a hladiny nešpecifických imunologických ukazovateľov.

Odber krvi. Psom bola súčasne odobratá krv punkciou *v.cephalica* a následne podrobená imunologickej analýze, pričom 0.odber nám potvrdil predpokladanú imunopresiu psov. Ďalšie odbery boli vykonané na 14., 28., 42., 56. a 70. deň po podaní glukánu a vakcinácii.

Imunologická analýza: Blastogénna odpoveď krvných lymfocytov k mitogénom bola hodnotená ELISA BrdU (colorimetric) testom, použitím 20 µg/ml fytohemagglutíninu PHA – P (Sigma, USA). Úroveň blastogénnej odpovede lymfocytov je vyjadrená ako stimulačný index (SI). **Fagocytárna schopnosť krvných leukocytov** bola stanovená ingesciou 2-hydroxyethylmetakrylátových častíc (MSHP, priemer 1.2 µm, ARTIM Praha, ČR), (Větvicka a kol., 1982). **Fagocytárna aktivita leukocytov** - je vyjadrená ako percento leukocytov fagocytujúcich 3 a viac MSHP častíc, a ako **fagocytárny index** - predstavuje ingescnú kapacitu leukocytov (pomer počtu fagocytovaných MSHP a počtu všetkých potenciálnych fagocytov). **Chemotaktická aktivita** sa stanovila metódou chemotaxie polymorfonukleárov (PMNL) pod agarózou (Procházková a kol., 1986). Ako chemotaktický faktor sme použili zymozan (fy Sigma, USA). Stanovili sme **chemotaktický index (CHI)** ako podiel dĺžky chemotaktickej a spontánnej migračnej dráhy.

Tab. č. 1: nešpecifické imunologické parametre a titer antirabických protilátok pred a po aplikácii vakcíny

PARAMETER SK. I. G VAKCINÁCI A+GLUKÁN	0.ODBER PRIMOVAKCINÁCIA (CDV, CPV, CAV _{1,2} , CP)	1.ODBER (14. DEŇ) REVAKINÁCI A+(LEPTOSPIROSIS)	2.ODBER (28. DEŇ) VAKCINÁCI RABIES	3.ODBER (42.DEŇ)	4.ODBER (56DEŇ)	5.ODBER (70.DEŇ)
FA Le%	X 32 ns SD 7,46	35,8 ns 15,78	33,66667 ns 18,08007	35,16667 ns 10,73028	38,16667 ns 9,990273	54,33333 ns 3,72678
FI Le	X 5,2 ns SD 1,0	6,22 ns 1,635	5,255 *P=0,0486 1,139645	6,543333 ns 0,900845	7,311667 ns 1,117265	8,81 ns 1,901464
IMA	X 1,24 ns SD 0,43	1,25 ns 0,244	1,376667 ns 0,245402	1,536667 ns 0,297415	1,646667 ns 0,233928	1,956667 ns 0,386422
ChI	X 1,46 *P=0,037 SD 0,520	1,797 *P=0,0168 0,238	1,416667 ns 0,506776	1,435 ns 0,233577	1,068333 ns 0,094	1,29 ns 0,155991
SIP	X 1,4 ns SD 0,1	3,62 *P= 0,029 1,081	2,116667 ns 0,566912	1,2 ns 0,258199	1,45 ns 0,368	1,183333 ns 0,437
Ab Rabies UE/ml	X 0,627 *P=0,0194 SD 0,335	0,66 ns 0,381	1,023667 ns 0,21944	1,512667 *P=0,024 0,338486	1,7833 ***P<0,0001 0,152192	1,524 **P=0,006 0,392755
Parameter sk. II. K vakcinácia	0.odber Primovakcinácia (CDV, CPV, CAV _{1,2} , CP)	1.odber (14. deň) Revakcinácia (+Leptospirosis sp.)	2.odber (28. deň) Vakcinácia Rabies	3.odber (42.deň)	4.odber (56deň)	5.odber (70.deň)
FA Le %	X 29,3 ns SD 6,7	30,17 ns 23,92	32,166 ns 13,62113	36,83333 ns 13,37743	34,16667 ns 15,61865	57,83333 ns 17,31123
FI Le	X 5,34 ns SD 1,5	8,405 ns 2,957	7,793333 ns 2,506578	7,746667 ns 2,412072	5,62 ns 2,073734	9,346667 ns 2,815318
IMA	X 1,18 ns SD 0,11	1,282 ns 0,118	1,251667 ns 0,347029	1,548333 ns 0,385225	1,586667 ns 0,419078	2,248333 ns 0,630451
ChI	X 1,29 ns SD 0,155	1,47 ns 0,105	1,365 ns 0,421212	1,498333 ns 0,381352	1,043333 ns 0,261432	1,12 ns 0,310392
SIP	X 1,43 ns SD 0,85	2,02 ns 0,9	2,183333 ns 0,785137	0,916667 ns 0,345051	1,433333 ns 0,820545	1,4 ns 0,484728
Ab Rabies UE/ml	X 0,460 ns SD 0,34	0,461 ns 0	0,6952 ns 0,238497	0,669833 ns 0,547949	0,641833 ns 0,635	0,494167 ns 0,627614

FALe – fagocytárna aktivita leukocytov, FILE – fagocytárny index leukocytov, IMA – index metabolickej aktivity fagocytov, ChI – index chemotaktickej aktivity, SIP – stimulačný index lymfocytov pomocou fytohemagglutíninu, Ab Rabies – antirabické protilátky Ab UE/ml, X – priemer, SD- smerodajná odchýlka, Štatistické porovnanie sk. I.G vs II.K: ***P<0.0001, **P<0.01, *P<0.05, ns – nesignifikantnosť

Tab. č. 2: Štatistické porovnanie 0. odberu vs ostatných odberov v jednotlivých skupinách pred a po vakcinácii

	Porovnanie	FA Le	FI Le	IMA	CHI	SIP	Ab Rabies
Skupina I.G	0 vs 14 deň	ns	ns	ns	ns	**P=0,0051	ns
	0 vs 28 deň	ns	ns	ns	ns	*P=0,0448	ns
	0 vs 42 deň	ns	ns	ns	ns	ns	**P=0,0058
	0 vs 56 deň	ns	*P=0,012	**P=0,0098	ns	ns	**P=0,0034
	0 vs 70 deň	***P<0,0001	**P=0,0042	**P=0,0034	ns	ns	**P=0,0073
Skupina II.K	0 vs 14 deň	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	0 vs 28 deň	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	0 vs 42 deň	ns	ns	***P<0,0001	ns	ns	ns
	0 vs 56 deň	ns	ns	**P=0,0059	*P=0,0104	ns	ns
	0 vs 70 deň	**P=0,0041	*P=0,0139	**P=0,0065	ns	ns	ns

Vysvetlivky vid' v Tab. č. 1

Jódnitrotetrazoliový (INT) test sme robili v úprave podľa autorov Mareček a Procházková (1986). Ako indikátor metabolických dejov sme použili 2-(4-jodfenyl)-5-fenyltetrazolium chlorid – INT (Lachema Brno) a ako stimulujúci faktor zymozan (fy Sigma, USA). Na posúdenie funkčnej zdatnosti fagocytov je významný podiel medzi spontánnou aktivitou a aktivitou po pôsobení stimulancia, tzv. index metabolickej aktivity (IMA). **Hladina špecifických antirabických protilátok** bola hodnotená ELISA testom. Použili sme kontrolné pozitívne antirabické psie sérum o známej hodnote antirabických protilátok (2,5 IU/cm³) a tiež negatívne psie sérum, pričom sme každé sérum vyšetřili dvakrát.. Pre detekciu a kvantifikáciu antirabických protilátok (Beníšek a kol., 1989; Süliová a kol., 1994) sme použili konjugát anti-dog IgG /Px. Titer protilátok sme vyjadrili v UE/ml (ekvivalentné jednotky k jednotkám medzinárodným) pričom za pozitívny sa považuje titer nad 1.0 UE/ml.

Štatistická analýza –ANOVA – test (GraphPad InStat)

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky a štatistické porovnanie medzi skupinou I. G a II. K sú uvedené v Tab. č. 1.

Štatistické porovnanie 0. odberu a ostatných odberov v jednotlivých skupinách pred a po vakcinácii je uvedené v Tab. č.2.

FA Le % mala v porovnaní s 0. odberom stúpajúci charakter s najvýraznejšou hodnotou pri poslednom odbere. V skup. I.G po podaní glukánu a vakcinácii dosiahla signifikantný rozdiel (P<0.0001), v kontrolnej skupine stúpala menej výrazne (P<0.01).

FI Le dosiahol v I.skup. sinifikantnej hodnoty už 56. deň po vakcinácii (P<0.05), pričom vrchol (P<0.01) dosiahol 70. deň po aplikácii glukánu. U kontroly bol signifikantný (P<0.05) až 70. deň po vakcinácii. Hodnoty **IMA** u vakcinovaných zvierat s glukánom v porovnaní s kontrolou boli nesignifikantné, avšak 0. vs 56.deň a 0. vs 70. deň signifikantne (P<0.01) stúpali u oboch skupín. Index bol významnejšie zmenený v skup. č II.K už pri 3.odbere (P<0.0001). **CHI** (P<0.05) je signifikantne vyšší len prvé 2 odbery medzi oboma skupinami.

SIP výrazne stúpol (P<0.05) v I.skup. už na 14. deň oproti skup.II.K a štatisticky najvýznamnejšieho vzostupu P<0.01 dosiahol u šteniat I. G skupiny 0 vz 14 deň.Za signifikantný považujeme aj 0 vz 28 deň v tejto skupine. **AB Rabies UE/ml** - Antirabické protilátky dosiahli protekčnú hladinu (>1 UE/ml) pri každom odbere v I.G skupine od zahájenia imunoprofylaxie, kdežto pri II. skupine nedosiahli požadovanú hladinu ani pri jednom odbere. Najvyššia hladina Ab (P<0.0001) bola dosiahnutá 28 dní po podaní antirabicej vakcíny u psov ošetrovaných glukánom oproti kontrole. Štatisticky významné (P<0.01) sú aj hodnoty 42., 56., a 70. deň oproti 0.dňu skupiny I.G. Na rozdiel od predchádzajúcich štúdií (Van Loveren a kol., 2001., Henry a kol., 2001), ktorí nezaznamenali výraznejší rozdiel v protilátkovej odpovedi po vakcinácii u imunosuprimovaných a imunokompetentných zvierat, naše výsledky dokumentujú výrazný rozdiel v produkcii

antirabických protilátok u psov s alterovanými imunitnými parametrami. Titer antirabických protilátok meraný ELISA testom je podľa (WHO,1996) považovaný za protekčný na hladine > 1,0 EU/ml (Cliquet, 2000). Takýto titer nebol detekovaný u imunosuprimovaných psov bez imunostimulačného pôsobenia glukánu v porovnaní so psami, ktorých imunita bola podporená $\beta(1,3/1,6)$ D glukánom, ktorý mal pozitívny efekt na alterované špecifické aj nešpecifické imunologické parametre u imunosuprimovaných jedincov. Na základe nami dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať, že aplikovanie $\beta(1,3/1,6)$ D glukánu zvyšuje úroveň imunitnej odpovede vzostupom špecifických (antirabických protilátok) aj nešpecifických (IMA, FI, SI) imunologických parametrov. Je ho možné využiť v klinickej praxi malých zvierat pri prevencii, ale aj pri imunopotenciácii účinku vakcín. V prípade potvrdenej imunosupresie sa doporučuje opakovať antirabickú vakcináciu, pretože primovakcinácia nezabezpečí dostatočnú protekciu.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla za podpory VEGA 1/3506/06 Slovenskej Republiky

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Beníšek, Z., Suliová, J., Švrček, Š., Zavadová, J.: ELISA test pre titráciu antirabických protilátok. Veterinárske správy III., 1989, (1-2), 25-27.
- Cliquet, F., Sagné, L., Schereffer, J.L., Aubert, M.F.A.: ELISA test for rabies antibody titration. Vaccine, 2000, 18, 3272-3279.
- Henry, C.J., McCaw, D.L., Brock, K.V., Stoker, A.M., Tyler, J.W., Tate, D.J., Higginbotham, M.L.: J.Am.Vet.Med.Assoc., 2001, 219 (9), 1238-1241.
- Mareček, D., Procházková, J.: Vybrané diagnostické metódy lekárske imunologie, Praha, Avicenum, 1986, 219.
- Mizuno, T: A development of antitumour polysaccharides from mushroom fungi. Food Ingredients Journal (Japan), 1996, 167, 69-85.
- Suliová, J., Beníšek, Z., Švrček, Š., Ďurove, A., Zavadová, J.: Kvantifikácia hladiny antirabických protilátok v sére vakcinovaných ľudí. Bratisl. lek. Listy, 1994, 95, 73-77.
- Tizard, I. (2004): Veterinary immunology. An Introduction. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 494s.
- Thompson, A.W., Forrester, J.V.: Therapeutic advances in immunosuppression, Clin Exp Immunol. 1994, 98:351-357.
- Van Loveren H., Van Amsterdam J.G., Vanderbriel R.J., Kimman T.G., Rumke H.C., Steerenberg P.S., Vos J.G.: Vaccine-induced antibody responses as parameters of the influence of endogenous and environmental factors. Environ. Health Perspect., 2001, 109, 757-764.
- Větvíčka, V., Fornusek, I., Kopeček, J., Kamínková, J., Kašpárek, I., Vránová, M.: Immunol. Lett., 1982, 5, 97-100.
- WHO, 1996. Laboratory technique in rabies. In: Meslin F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H.(eds.) 4th ed. WHO Geneva, 353-397.

ŠTÚDIUM 23 BP - A 12 BP - INDEL POLYMORFIZMU V PRNP GÉNE HOVÄDZIEHO DOBYTKA

Hreško S., Tkáčiková L.

Ústav imunológie, Katedra mikrobiológie a imunológie, UVL, Košice

ABSTRAKT

Polymorfizmy v proteín kódujúcej časti *PRNP* génu sú v silnej asociácii s výskytom transmisívnych špongioformných encefalopátií u oviec a ľudí. U hovädzieho dobytku nebola doposiaľ dokázaná podobná súvislosť. Predchádzajúcou štúdiou (Sander a kol., 2004) bola zistená možná súvislosť polymorfizmov typu inercia/delécia (indel) v promótorovej oblasti a oblasti prvého intrónu *PRNP* génu s výskytom BSE u hovädzieho dobytku chovaného v Nemecku. V našej štúdii bolo vyšetrených 76 vzoriek zdravého hovädzieho dobytku na výskyt 23 bp – a 12 bp – indel polymorfizmov. Alely s inerciami v oboch sledovaných polymorfizmoch sú spájané s vyššou rezistenciou voči BSE. Pri analýze 23 bp – indel polymorfizmu bol zistený rovnaký počet heterozygotných jedincov ako homozygotov s 23 bp – deléciou, kým homozygoti s 23 bp – inerciou sa vyskytovali v nižšom počte. Analýzou 12 bp – indel polymorfizmu bol zaznamenaný najvyšší výskyt heterozygotných jedincov a najnižší výskyt jedincov s 12 bp – inerciou.

ÚVOD

Transmisívne špongioformné encefalopátie (TSE), alebo prionózy, sú degeneratívne ochorenia centrálného nervového systému zvierat aj ľudí vedúce k motorickým dysfunkciám, demencii a smrti. K týmto chorobám patrí bovinná špongioformná encefalopátia hovädzieho dobytku (BSE), scrapie oviec (klusavka) a Creutzfeldt-Jakobova choroba ľudí (CJD) (Weissmann a kol., 2002; Aguzzi a kol., 2004). Hlavnú úlohu v prenose týchto chorôb má infekčná proteínová molekula, tzv. prión (PrP^{Sc}) (Prusiner, 1982), ktorá je konformačne zmenenou formou celulárneho priónového proteínu (PrP^{C}). Bolo zistené, že polymorfizmy v proteín kódujúcej časti génu, kódujúcom celulárny priónový proteín (*PRNP* gén), ovplyvňujú vnímavosť oviec voči scrapie (Hunter a kol., 1992; Belt a kol., 1995). Podobne u ľudí je polymorfizmus v kodóne 129 proteín kódujúcej časti *PRNP* génu spájaný s vnímavosťou voči variantu Creutzfeldt-Jakobovej choroby (vCJD). Všetci pacienti postihnutí vCJD boli homozygotní pre metionín v kodóne 129 (Haase a kol., 2007). Žiadny z doteraz známych polymorfizmov v proteín kódujúcej časti *PRNP* génu hovädzieho dobytku nie je spájaný s vnímavosťou voči BSE. Podľa hypotézy, že zmeny v endogénnej expresii PrP^{C} môžu ovplyvňovať vnímavosť voči TSE a/alebo inkubačnú dobu (Bossers a kol., 1996), Sander a kol. (2004) analyzovali polymorfizmy v promótorovej oblasti *PRNP* génu hovädzieho dobytku chovaného v Nemecku. Pri tejto analýze boli zistené dva polymorfizmy typu inercia/delécia (indel): 23 bp – indel v promótorovej oblasti a 12 bp – indel v prvej intrónovej oblasti *PRNP* génu, ktoré vykazovali značnú spojitosť s vnímavosťou voči BSE. Najčastejšie sa vyskytujúce haplotypy boli typu inercia – inercia (I-I) alebo delécia – delécia (D-D). Štúdie promótorovej oblasti naznačujú, že pri haplotype I-I inzerčný úsek 23 bp je schopný viazať represný transkripčný faktor RP-58. Tento faktor v interakcii so špecifickým proteínom SPI1, ktorého väzobné miesto sa nachádza v inzerčnom úseku 12 bp, znižuje expresiu *PRNP* génu. Pri haplotype D-D sa takáto represia nemôže uskutočniť a expresia *PRNP* génu prebieha vo zvýšenej miere (Haase a kol., 2007). Účinok 12 bp - indel polymorfizmu bol potvrdený nezávislými štúdiami na nemeckom a anglickom dobytku (Geldermann a kol., 2006; Juling a kol., 2006; Kashkevich a kol., 2007). Cieľom tejto práce bolo analyzovať výskyt 23 bp – a 12 bp – indel polymorfizmu u hovädzieho dobytku chovaného na Slovensku.

MATERIÁL A METODIKA

DNA vzorky: 76 vzoriek genomickej DNA bolo získaných z krvi hovädzieho dobytku. Z krvných leukocytov bola DNA izolovaná pomocou metódy opísanej Sambrookom a kol. (1989).

Amplifikácia DNA: Na analýzu 23 bp - indel polymorfizmu bola použitá metóda PCR. Použitím primerov 23indel-F a 23indel-R (navrhnutých podľa Sander a kol. (2004)) (Tab. 1.) bol amplifikovaný úsek DNA dlhý 100 bp, resp. 123 bp. Prítomnosť 123 bp dlhého produktu predstavovala prítomnosť inzercie 23 básových párov. V 100 bp dlhom produkte sa tento úsek nenachádzal (delécia). Reakcia prebehla za nasledovných podmienok: iniciálna denaturácia (94°C, 5 min), 35 cyklov vlastnej amplifikácie (Tab. 1.) a finálna extenzia (72°C, 5 min). Pre potrebu analýzy 12 bp – indel polymorfizmu bol amplifikovaný úsek DNA dlhý 414 bp resp. 426 bp. Amplifikácia prebehla s použitím primerov 12indel-F a 12indel-R (podľa Nakamitsu a kol.(2006)) (Tab. 1.) za nasledovných podmienok: iniciálna denaturácia (94°C, 5 min), 35 cyklov vlastnej amplifikácie (Tab. 1.) a finálna extenzia (72°C, 5 min).

Tab. 1. Oligonukleotidové primery použité pri PCR

Primer	Nukleotidová sekvencia 5'-3'	Produkt	Podmienky PCR
23indel-F	gtg cca gcc atg taa gtg	100 bp / 123 bp	35x: 94°C, 45 s.; 61,9°C, 45 s.; 72°C, 45 s.;
23indel-R	tgg aca ggc aca atg gg		
12indel-F	ctt ctc tct cgc aga agc ag	414 bp / 426 bp	35x: 94°C, 45 s.; 59,3°C, 45 s.; 72°C, 45 s.;
12indel-R	ccc ttg ttc ttc tga gct cc		

RFLP analýza: Úsek DNA 12 bp – inzercie obsahuje rozpoznávacie miesto pre reštrikčný enzým *SacII*, ktorý bol použitý na analýzu 12 bp – indel polymorfizmu. V prípade prítomnosti 12 bp – inzercie dochádzalo k štiepeniu PCR produktu za vzniku rôzne veľkých reštrikčných fragmentov. V prípade výskytu delécie tohto úseku k štiepeniu PCR produktu nedochádzalo.

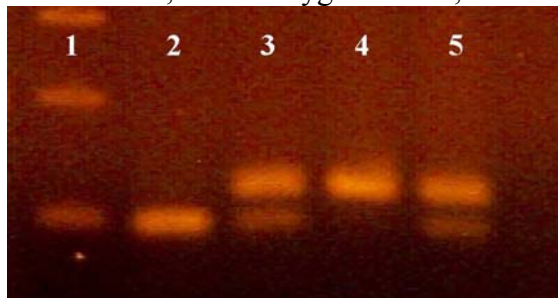
Detekcia DNA: PCR produkty a reštrikčné fragmenty boli analyzované v 1-2 % agarózovom gély v 1x TAE tlmivom roztoku. Gél bol po ofarbení etídiom bromidom vizualizovaný pod UV lampou. Ako štandard molekulovej hmotnosti bol použitý 100 bp DNA ladder.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

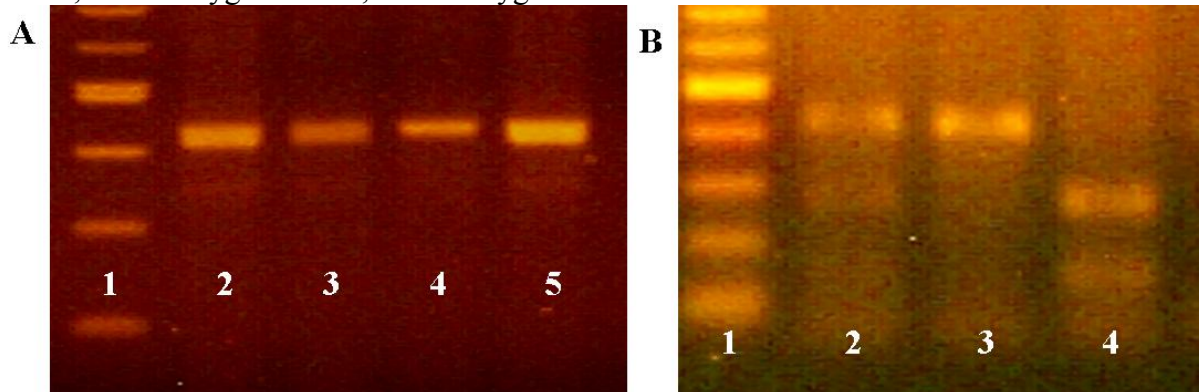
Pomocou PCR reakcie, použitej na analýzu 23 bp – indel polymorfizmu, boli amplifikované úseky DNA dlhé 100 bp, resp. 123 bp. Prítomnosť výsledného produktu 100 bp predstavovala homozygotného jedinca s deléciou 23 bp (del/del) v analyzovanom úseku, prítomnosť produktu 123 bp homozygotného jedinca s inzerciou 23 bp (in/in). Prítomnosť oboch produktov charakterizovala heterozygotného jedinca (in/del) pre analyzovaný polymorfizmus (Obr. 1.). Z celkového počtu 76 vzoriek bolo zistených 32 (42,1 %) homozygotov s deléciou 23 bp, 12 (15,8 %) s inzerciou a 32 (42,1 %) heterozygotných jedincov. Za účelom analýzy 12 bp – indel polymorfizmu boli pomocou PCR reakcie amplifikované úseky DNA dlhé 414 bp resp. 426 bp (Obr. 2.A). Tieto PCR produkty boli následne analyzované pomocou RFLP metódy (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) s použitím enzýmu *SacII*. V prípade homozygotného jedinca s inzerciou 12 bp (in/in) dochádzalo k štiepeniu 426 bp dlhého PCR produktu za vzniku reštrikčných fragmentov dlhých 150 bp a 276 bp. V prípade homozygotného jedinca s deléciou 12 bp (del/del) nedochádzalo k štiepeniu 414 bp dlhého PCR produktu. Heterozygotný jedinec bol po RFLP analýze charakterizovaný prítomnosťou troch fragmentov (150 bp, 276 bp a 414 bp) (Obr. 2.B). Zo 76 analyzovaných vzoriek bolo

zistených 24 (31,6 %) homozygotných jedincov s deléciou 12 bp, 12 (15,8 %) s inzerciou a 40 (52,6 %) heterozygotných jedincov.

Obr. 1. Analýza 23 bp – indel polymorfizmu: 1. štandarda molekulových hmotností - 100 bp DNA ladder; 2. homozygot del/del; 3. a 5. heterozygot in/del; 4. homozygot in/in.



Obr. 2. Analýza 12 bp – indel polymorfizmu: A. PCR produkty (414 bp resp. 426 bp); B. RFLP analýza: 1. štandarda molekulových hmotností - 100 bp DNA ladder; 2. heterozygot in/del; 3. homozygot del/del; 4. homozygot in/in.



Pre oba sledované polymorfizmy bolo zo všetkých analyzovaných vzoriek 29 (37 %) heterozygotných (23 bp in/del; 12 bp in/del), 24 (32 %) homozygotných s 23 bp a 12 bp deléciou (23 bp del/del; 12 bp del/del) a 9 (12 %) homozygotných s inzerciou v oboch sledovaných polymorfizmoch (23 bp in/in; 12 bp in/in). Výskyt 23 bp – a 12 bp – indel polymorfizmu bol sledovaný vo viacerých štúdiách. Pri analýze genotypu u malej skupiny zvierat (48 zdravých, 43 BSE postihnutých jedincov), Sander a kol. (2004) zaznamenali výrazne vyššiu frekvenciu výskytu 23 – bp inzercie u zdravých jedincov. Pri podobnej štúdií na skupine 449 BSE postihnutých a 431 zdravých zvierat chovaných vo Švajčiarsku a Nemecku, bola opäť zaznamenaná výrazná spojitosť 23 bp – indel polymorfizmu s vnímavosťou voči BSE (Haase a kol., 2007). Seabury a kol. (2004) vykonali analýzu *PRNP* génu vo vzorkách semena plemenných býkov rôznych plemien hovädzieho dobytka. Podobnú spojitosť medzi 23-bp indel polymorfizmom a výskytom BSE však nezaznamenali. Frekvencia výskytu 23-bp delécie v skupine zdravých zvierat bola podobná frekvencii výskytu u BSE infikovaného nemeckého dobytka. V našej štúdií sme zaznamenali nízky výskyt homozygotných jedincov s 23 bp – inzerciou a rovnaký výskyt heterozygotných jedincov ako homozygotov s 23 bp – deléciou. Juling a kol. (2006) prezentujú silnú spojitosť predovšetkým 12 bp – indel polymorfizmu s výskytom BSE u hovädzieho dobytka. Heterozygotní jedinci a jedinci s 12 bp – deléciou predstavujú zvýšené riziko postihnutia BSE. Pri analýze 12 bp – indel polymorfizmu sme v našej štúdií zaznamenali najvyšší výskyt heterozygotných jedincov (40; 52,6 %), 24 (31,6 %) homozygotných jedincov s deléciou 12 bp a len 12 (15,8 %) homozygotných jedincov s inzerciou. Pre potreby presnejšej analýzy distribúcie 23 bp – a 12 bp – indel polymorfizmov v populácii hovädzieho dobytka chovaného

na Slovensku a vyhodnotenie ich prípadnej asociácie s výskytom BSE bude potrebné vyšetriť vzorky od BSE pozitívnych zvierat a väčší počet zdravých zvierat, čo bude predmetom našich ďalších štúdií.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla s podporou vedeckej grantovej agentúry MŠ SR a SAV (VEGA) (grant č.1/0646/08).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aguzzi A, Heikenwalder M, Miele G. Progress and problems in the biology, diagnostics, and therapeutics of prion diseases. *J. Clin. Invest.* 2004; 114(2):153-60.
- 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.
- Bossers A, Schreuder BE, Muileman IH, Belt PB, Smits MA. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol.* 1996 Oct; 77(Pt 10):2669-73.
- Geldermann H, He H, Bobal P, Bartenschlager H, Preuss S. Comparison of DNA variants in the PRNP and NF1 regions between bovine spongiform encephalopathy and control cattle. *Anim Genet.* 2006 Oct; 37(5):469-74.
- Haase B, Doherr MG, Seuberlich T, Drögemüller C, Dolf G, Nicken P, Schiebel K, Ziegler U, Groschup MH, Zurbriggen A, Leeb T. PRNP promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle. *BMC Genet.* 2007 Apr 16; 8:15.
- Hunter N, Foster JD, Hope J. Natural scrapie in British sheep: breeds, ages and PrP gene polymorphisms. *Vet Rec.* 1992 May 2; 130(18):389-92.
- Juling K, Schwarzenbacher H, Williams JL, Fries R. A major genetic component of BSE susceptibility. *BMC Biol.* 2006 Oct 2; 4:33.
- Kashkevich K, Humeny A, Ziegler U, Groschup MH, Nicken P, Leeb T, Fischer C, Becker CM, Schiebel K. Functional relevance of DNA polymorphisms within the promoter region of the prion protein gene and their association to BSE infection. *FASEB J.* 2007 May; 21(7):1547-55.
- Nakamitsu S, Miyazawa T, Horiuchi M, Onoe S, Ohoba Y, Kitagawa H, Ishiguro N. Sequence variation of bovine prion protein gene in Japanese cattle (Holstein and Japanese Black). *J. Vet. Med. Sci.* 2006; 68(1):27-33.
- Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* 1982; 216(4542):136-44.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. 1989; 9.16.
- Sander P, Hamann H, Pfeiffer I, Wemheuer W, Brenig B, Groschup MH, Ziegler U, Distl O, Leeb T. Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds. *Neurogenetics.* 2004; 5(1):19-25.
- Seabury CM, Womack JE, Piedrahita J, Derr J.N. Comparative PRNP genotyping of U.S. cattle sires for potential association with BSE. *Mamm. Genome.* 2004; 15(10):828-33.
- Weissmann C, Enari M, Klöhn PC, Rossi D, Flechsig E. Transmission of prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002; 99 Suppl 4:16378-83.

POROVNANIE VYBRANÝCH PARAMETROV KVALITY VČELIEHO MEDU

Kasperová J., Nagy J., Šoltysová L.

Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVL, Košice

ABSTRAKT

Bolo vyšetrených 17 vzoriek medu z obchodnej siete (5) a od domácich producentov (12) z regiónov Košice-okolie, Rožňava a Revúca. Vzorky medu od domácich producentov pochádzali zo znášky roku 2007 (10 vzoriek) a zo znášky roku 2006 (2 vzorky). Obsah vody sa pohyboval v rozsahu od 17 do 21 %, pričom u medu kvetového z obchodnej siete bola prekročená max. prípustná hodnota podľa Potravinového kódexu Slovenskej republiky (PK SR). Kyslosť medu bola v rozsahu od 6 do 40 miliekvivalentov kyseliny na 1000g⁻¹, elektrická vodivosť sa pohybovala od 0,156 (med agátový) do 1,046 mS.cm⁻¹ (med medovicový) a obsah cukru bol v rozpätí od 76,5 do 81°Bx. Všetky vzorky vyhovovali požiadavkám potravinového kódexu na tieto ukazovatele kvality medu, ale označenie medu ako med lesný neumožňuje vyhodnotiť požiadavku Potravinového kódexu SR na elektrickú vodivosť, pretože nie je jasný pôvod medu. Vo vzorkách medu bol stanovovaný obsah vody, kyslosť, elektrická vodivosť a obsah cukrov. Na stanovenie obsahu hydroxymethylfurfuralu (HMF) bolo analyzovaných 15 vzoriek medu z obchodnej siete (4) a od domácich producentov (11) z regiónov Košice - okolie, Rožňava, Revúca a Svidník. Vzorky medu pochádzali zo znášky roku 2007 (13 vzoriek) a zo znášky roku 2006 (2 vzorky). Hodnoty obsahu HMF sa pohybovali v rozsahu 0,17 až 31,86 mg.kg⁻¹. Pričom priemerná hodnota HMF vo vzorkách medu od chovateľov včiel bola takmer trojnásobne nižšia ako priemerná hodnota HMF vzoriek z obchodnej siete.

ÚVOD

Med je prírodná sladká látka produkovaná včelami (*Apis mellifera*) z nektáru rastlín, zo sekrétov živých častí rastlín, alebo z výlučkov hmyzu cicajúceho živé časti rastlín, ktorý včely zbierajú, pretvárajú a obohacujú vlastnými špecifickými látkami, ukladajú, zahusťujú, uskladňujú a ponechávajú v plástoch aby vyzrel (Potravinový kódex SR, tretia časť, deviata hlava, 2004). Med je produkt, ktorý možno použiť bez akéhokoľvek predbežného spracovania, preto je dôležitá jeho kvalita a zdravotná bezchybnosť.

Množstvo vody v mede kolíše podľa druhu kvetov, z ktorých med pochádza, sezóny, zrelosti, sily včelstva, ako aj spôsobu vytáčania. Pretože med je hygroskopický, pri zlom skladovaní pohlcuje vodu z okolia a od povrchu sa zrieduje (Dobrovoda 1986). Obsah vody v mede môže byť najviac 20 %. Vyšší obsah vody je povolený pre vres v pekárskom mede všeobecne a to najviac 23 % a pre pekársky med z vresu najviac 25 % (Potravinový kódex SR, 2004).

Med môže obsahovať voľné kyseliny v mede všeobecne najviac 50 miliekvivalentov kyseliny na 1000g a pre pekársky med najviac 80 miliekvivalentov kyseliny na 1000g (Potravinový kódex SR, 2004).

Elektrická vodivosť v mede je tým vyššia, čím viac iónových častíc med obsahuje, teda čím je obsah minerálnych látok v mede vyšší. Medovicové druhy medu majú vzhľadom na svoj vysoký obsah minerálnych látok vyššiu elektrickú vodivosť ako kvetové medy. Elektrickú vodivosť vyjadrujeme v símensoch (Dobrovoda, 1986). Podľa Potravinového kódexu SR (2004) musí byť elektrická vodivosť medovicového a gaštanového medu najmenej 0,8 mS/cm. Pre všetky ostatné druhy okrem výnimiek (jahodovec obyčajný, vresovec, eukalyptus, lipa, vres obyčajný, manuka alebo kel rôsolovitý, kustovnica cudzia) musí byť elektrická vodivosť najviac 0,8mS/cm.

5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd alebo hydroxymethylfurfural (HMF) je cyklický aldehyd produkovaný pri kyslom rozklade monosacharidov. Ďalšia možnosť ako HMF vzniká je cez kondenzáciu karbohydrátov, ktoré majú voľné amino skupiny, podľa dobre známej

Maillardovej reakcie (Tomlinson a kol., 1993). Zahrievaním medu sa tvorba HMF urýchľuje. Dlhodobým uskladnením medu pri nevhodnej teplote napr. 30°C alebo zahriatím stúpa koncentrácia veľmi rýchle. Z hygienického hľadiska zvýšený obsah HMF znamená, že ide o med horšej kvality, alebo dokonca falšovaný s prídavkom invertného cukru (Toporčák, 1999). Tepelné ošetrovanie medu a čas musí byť limitované. Krátkodobý ohrev je menej škodlivý, ale HMF dosahuje vysoké hodnoty pri vysokej teplote alebo dlhšom čase (Tosi a kol., 2002). Obsah HMF všeobecne okrem pekárskoho medu má byť najviac 40 mg.kg⁻¹ a pre druhy medu s deklarovaným pôvodom z regiónov s tropickým podnebíom a zmesi z takýchto druhov medov najviac 80 mg.kg⁻¹ (Potravinový kódex SR, 2004).

MATERIÁL A METODIKA

Pre stanovenie vybraných ukazovateľov kvality medu bolo analyzovaných 17 vzoriek medu z obchodnej siete (5) a od domácich producentov (12) z regiónov Košice-okolie, Rožňava a Revúca. Vzorky medu od domácich producentov pochádzali zo znášky roku 2007 (10 vzoriek) a zo znášky roku 2006 (2 vzorky). Vo vzorkách medu bol stanovovaný obsah vody, kyslosť, elektrická vodivosť a obsah cukrov. Na stanovenie obsahu HMF bolo analyzovaných 15 vzoriek medu z obchodnej siete (4) a od domácich producentov (11) z regiónov Košice - okolie, Rožňava, Revúca a Svidník. Vzorky medu pochádzali zo znášky roku 2007 (13 vzoriek) a zo znášky roku 2006 (2 vzorky).

Obsah vody a cukru bol stanovený refraktometrom. Obsah vody je vyjadrený v %, a obsah cukru v stupňoch Brix (váhové percento koncentrácie cukru vo vode). Kyslosť medu bola stanovovaná titračne roztokom NaOH na fenolftaleín do ružového zafarbenia, ktoré vydrží 10 sekúnd. Elektrická vodivosť bola stanovená podľa STN 570190 v 20 %-om vodnom roztoku medu. Navážku medu volíme podľa vzorca: $x = 100 \times 20 / S$, kde S je refraktometrická sušina medu. Takto pripravený roztok sa vytemperuje na 20 °C a do roztoku sa ponorí elektróda konduktometra. Hodnota elektrickej vodivosti sa odčíta z konduktometra v mS.cm⁻¹.

Hydroxymethylfurfural bol stanovený v čistom, filtrovanom vodnom roztoku medu za použitia HPLC s reverznou fázou a UV detekciou. Výstupný signál vzorky bol zrovnaný so signálom štandardu o známej koncentrácii HMF. HMF bol stanovený na Stavebnicovom kvapalinovom chromatografe Breeze (Waters, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky sledovania vybraných ukazovateľov kvality medu sú uvedené v tabuľkách 1 a 2. Priemerná hodnota obsahu vody v sledovaných vzorkách bola 18,3 %, pričom v mede z obchodnej siete bola nameraná priemerná hodnota obsahu vody mierne vyššia (18,6 %). V jednej vzorke medu bola nameraná hodnota obsahu vody až 21 %, čo presahuje najvyššiu povolenú hodnotu (20 %) podľa Potravinového kódexu Slovenskej republiky (2004). Obsah vody vo vzorkách medu od domácich producentov bol v priemere 18 %, dve vzorky mali nameranú hodnotu pod hranicou najvyššej povolenej normy (Región Revúca).

Priemerná hodnota kyslosti v analyzovaných vzorkách bola 20,65 mekv. kyseliny.1000g⁻¹, a to vo vzorkách z obchodnej siete 20,6 mekv. kyseliny.100g⁻¹ a v mede od domácich producentov bola mierne vyššia (20,9 mekv. kyseliny.100g⁻¹). Najvyššia hodnota kyslosti bola stanovená v medovicovom mede z minuloročnej znášky (región Košice). V žiadnej vzorke neprekročili hodnoty kyslosti limit stanovený Potravinovým kódexom SR (50 mekv. kyseliny.100g⁻¹).

Priemerná hodnota elektrickej vodivosti vo všetkých vzorkách medu bola 0,460 mS.cm⁻¹. Vo vzorkách medu z obchodnej siete 0,328 mS.cm⁻¹ a od domácich producentov 0,593 mS.cm⁻¹. Najvyššia elektrická vodivosť bola nameraná v medovicovom mede (región Košice-okolie, medovicový med) 1,046 mS.cm⁻¹. Vzorka medu označeného ako „lesný med“ z obchodnej

siete a šesť vzoriek od domácich producentov mali hodnotu vodivosti pod $0,8 \text{ mS.cm}^{-1}$, jedna vzorka (okres Revúca) mala hodnotu prevyšujúcu $0,8 \text{ mS.cm}^{-1}$ ($0,960 \text{ mS.cm}^{-1}$).

Obsah cukru bol priemerne $80,1 \text{ }^\circ\text{Bx}$, pričom hodnoty sa pohybovali v rozpätí od $76,5^\circ\text{Bx}$ do $81,5^\circ\text{Bx}$. Najnižšia hodnota bola nameraná v kvetovom mede z obchodnej siete (vyšší obsah vody – 21 %). Najvyššie hodnoty ($81,5 \text{ }^\circ\text{Bx}$) boli namerané v mede medovicovom (región Košice-okolie) a v mede lesnom (región Rožňava).

Tabuľka 1 Výsledky sledovania vybraných ukazovateľov kvality medu z obchodnej siete

Pôvod medu	Druh medu	Obsah vody (%)	Kyslosť (miliiekvivalentov. kyseliny. 1000g^{-1})	Elektrická vodivosť (mS.cm^{-1})	Obsah cukru ($^\circ\text{Bx}$)
Obchodná sieť	Lesný	17,5	30	0,647	81
	Kvetový	21	30	0,164	76,5
	Agátový	18	12	0,16	80,5
	Kvetový	18,5	14	0,225	80
	Lipový	18	16	0,442	80
Priemer		18,6	20,4	0,328	79,6

Tabuľka 2 Výsledky sledovania vybraných ukazovateľov kvality medu od domácich producentov

Pôvod medu	Druh medu	Obsah vody (%)	Kyslosť (miliiekvivalentov. kyseliny. 1000g^{-1})	Elektrická vodivosť (mS.cm^{-1})	Obsah cukru ($^\circ\text{Bx}$)
Košice-okolie	Agátový	18	11	0,156	80
	Lesný	17,5	24	0,71	81
Košice	Medovicový	17	40	1,046	81,5
Rožňava	Lesný	18	19	0,505	79
		17,5	20	0,508	81,5
		18,5	28	0,430	80
		17,5	14	0,549	81
		17,5	15	0,434	80,5
Svidník	Kvetový	18	22	0,589	80,5
Revúca	Lipový	19,5	6	0,794	81
	Kvetový	19,5	30	0,436	81
	Lesný	17,5	22	0,960	80,5
Priemer		18	20,9	0,593	80,6

Výsledky obsahu HMF z rôznych regiónov východného a stredného Slovenska sú uvedené v tabuľkách 3 a 4. Priemerná hodnota obsahu HMF bola $10,81 \text{ mg.kg}^{-1}$, pričom priemerná hodnota vo vzorkách medu z obchodnej siete bola $20,41 \text{ mg.kg}^{-1}$ a priemerná hodnota vo vzorkách medu od domácich producentov bola $7,33 \text{ mg.kg}^{-1}$. Najvyššia hodnota HMF bola nameraná vo vzorke medu lesného z obchodnej siete a najnižšia hodnota vo vzorke od chovateľov včiel v mede kvetovom z okresu Svidník. Aj keď všetky vzorky zodpovedali požiadavkám Potravinového kódexu SR (2004), boli zistené výrazné rozdiely medzi vzorkami medu z obchodnej siete a vzorkami od chovateľov včiel. Priemerná hodnota HMF od chovateľov včiel bola takmer trojnásobne nižšia ako priemerná hodnota HMF vzoriek z obchodnej siete.

Tabuľka 3 Výsledky obsahu HMF v mede z obchodnej siete

Pôvod medu	Druh medu	Priemerná hodnota obsahu HMF (mg.kg ⁻¹)
Obchodná sieť	Lesný	31,86
	Kvetový	2,18
	Agátový	27,01
	Kvetový	20,58
Priemer		20,41

Tabuľka 4 Výsledky obsahu HMF v mede od domácich producentov

Pôvod medu	Druh medu	Priemerná hodnota obsahu HMF (mg.kg ⁻¹)
Košice-okolie	Agátový	21,65
Košice	Medovicový	17,03
Rožňava	Kvetový	13,01
		2,99
		2,93
		5,74
Svidník	Kvetový	0,24
Revúca	Lipový	0,17
	Kvetový	0,88
	Lesný	4,32
	Kvetový	11,62
Priemer		7,33

POĎAKOVANIE

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore z grantovej úlohy AV 1/3502/06. Obsah HMF vo vzorkách medu bol analyzovaný na pracovisku Hygieny a technológie mlieka Veterinárnej a farmaceutickej univerzity v Brne.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Baranová M. Hygiena rastlinných potravín a potravinárskych prídavných látok. Prešov M&M. 1999; 249s.
- Boháček L. HMF - významný parameter kvality medu. Včelár L18. 1994; 10, 152–153.
- Dobrovoda I. Včelie produkty a zdravie. 1. vyd. Bratislava Príroda 1986; 305 s.
- Kalábová K, Vorlová L, Borkovcová I, Večerek V. Hydroxymethylfurfural in Czech honeys. Czech. J. Anim. Sci. 48. 2003; (12): 551-557.
- Čavojský V. Včelárstvo. Príroda Bratislava 1981; 639s.
- Čermáková T, Kantíková M. Slov. vet. časopis. 2003; 2, 23–26.
- Kantíková M, Slanická M. Slov. vet. časopis. 2005; 6, 365-366.
- Ohe W, Ohe K. Honey quality : the effect of temperature. Deutches imker journal. 1992; 3:3, 78-82, Bj.
- Potravinový kódex Slovenskej republiky, tretia časť, deviata hlava. Výnos Ministerstva pôdohospodárstva SR a Ministerstva zdravotníctva SR č.1188/2004-100.
- Sancho M.T, Munitequi S, Huidobro J.F, Lozano J.S. Aging of honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1992; 40:1, 134-138, 29 ref.
- Tomlinson A. J, Landers J.P, Lewis L.A.S. Naylor S. J. Chromatogr. 652, 1993; 171.
- Toporčák J. Zdravotné včelárske vademecum. Štátna veterinárna správa Slovenskej republiky Bratislava, 1999; 116s
- Tosi E, Ciapini M R E, Lucero H. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. Food chemistry. 2002; 71-74.

White J W. Quality evaluation of honey: role of HMF and diastase assay Papers presented at technical seminar on honey standards, testing procedures quality kontrol. May 25. Riyadh, Saudi Arabia. 1992; 25–50, Bdo.

VYHODNOTENIE PORÚCH SKUSU U PSOV

Lacková M., Capík I.

Klinika malých zvierat, UVL, Košice

ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo sledovať výskyt ortodontických problémov v populácii psov vo vzťahu k plemennej príslušnosti, pohlaviu a vekovej kategórii ošetrovaných na Klinike malých zvierat v období roku 2007 a v prvej polovici roku 2008. Druhou časťou tejto štúdie bolo vyhodnotenie dĺžky ortodontickej terapie, výskytu komplikácií v priebehu korekcie skusu, ako aj výskytu a charakteru recidív ortodontických problémov.

Z celkového počtu 299 stomatologických pacientov bolo diagnostikovaných 53 prípadov s poruchami skusu, z toho najvyšší výskyt bol u plemena jorkšírsky teriér 30,2 %. Až u 67,9 % psov boli poruchy oklúzie zistené do veku 1 roka. Z hľadiska pohlavia bolo 69,8 % prípadov diagnostikovaných u samcov. Dĺžka terapie sa pohybovala v rozmedzí 1 týždeň až 10 mesiacov. Recidívy sa vyskytli v 4 prípadoch, čo predstavuje 9,8 %.

ÚVOD

Normálna oklúzia predstavuje normálne postavenie zubov, integritu zubných oblúkov a normálnu funkčnosť temporomandibulárnych kĺbov. Normálne postavenie zubov alebo skus, je u psov charakterizovaný anizognátnym vzťahom oboch zubných oblúkov (mandibula je mierne kratšia a užšia) a je označovaný ako nožnicový skus (Johnston, 2001).

Nesprávna oklúzia môže byť príčinou abrázie, periodontálnej traumy (s výslednou predčasnou periodontitídou a následnou stratou zubov), ako i traumatizácie mäkkých tkanív (Harvey a Emily, 1993). Niektoré ortodontické chyby, hlavne nahromadenie zubov, ale aj otvorený skus alebo hlboký skus, zvyšujú náchylnosť ku vzniku zubného kazu (Jedličková a Raszka, 1990).

Ortodontická terapia predstavuje korekciu nesprávneho skusu pomocou oklúzných úprav, fixných alebo snímateľných prístrojov. Ortodontická korekcia skusu u psov je kontraindikovaná v prípade, že sa jedná o dedičný problém, ak nie je jedinec súčasne kastrován. Dôvodom pre tento prístup je zabrániť šíreniu dedičných chýb v rámci plemena. Niektoré krajiny už prijali legislatívu týkajúcu sa tejto záležitosti (Gorrel, 2004).

Zvýšený záujem veterinárnych lekárov, ale aj majiteľov a chovateľov psov prispeli k nárastu pacientov s výskytom ortodontických porúch skusu. Preto cieľom našej práce bolo vyhodnotiť poruchy skusu u jednotlivých plemien psov a úspešnosť ortodontickej terapie.

MATERIÁL A METODIKA

Na Klinike malých zvierat Univerzity veterinárskeho lekárstva, oddelení chirurgie, ortopédie a röntgenológie bol v roku 2007 a prvej polovici roku 2008 sledovaný výskyt ortodontických problémov v populácii psov vo vzťahu k plemennej príslušnosti, pohlaviu a vekovej kategórii. Pacienti zahŕňali predovšetkým psov prichádzajúcich so stomatologickými problémami a v menšej miere psov podstupujúcich chirurgickú terapiu z iných dôvodov, u ktorých bolo vykonané posúdenie skusu v priebehu celkovej anestézie. V prípade diagnostikovania dentálnych ortodontických problémov a záujmu majiteľa o terapiu bola sledovaná terapia jednotlivých ortodontických problémov vo vzťahu k dĺžke terapie, výskytu komplikácií v priebehu terapie, ako aj výskyt a charakter recidív ortodontických problémov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V roku 2007 a v prvej polovici roku 2008 bolo ošetrovaných na Klinike malých zvierat Univerzity veterinárskeho lekárstva, oddelení chirurgie, ortopédie a röntgenológie 299 stomatologických pacientov (193 v roku 2007 a 106 v prvej polovici roka 2008).

V danej skupine pacientov bolo diagnostikovaných 53 prípadov s poruchami skusu. 12 ortodontických pacientov vykazovalo genetické vplyvy skeletálneho charakteru a 41 dentálne ortodontické problémy. Vo vzťahu k veku u väčšiny pacientov 67,9 % boli poruchy skusu diagnostikované do veku jedného roka predovšetkým v súvislosti so zadržanými mliečnymi zubami, alebo zistením zmien v skuse majiteľom v období rastu (Obr. 1). U zvyšných 32,1 % psov boli poruchy skusu diagnostikované v neskoršom veku v súvislosti či už so stomatologickými výkonmi alebo iným chirurgickým ošetrením.

V sledovanom období sme zaznamenali častejší výskyt porúch skusu u samčieho pohlavia 69,8 % oproti 30,2 % výskytu ortodontických problémov u súk.

Poruchy skusu sme diagnostikovali u 19 plemien psov. V plemennom zastúpení boli poruchy skusu diagnostikované najčastejšie u jorkšírskeho teriéra 30,2 %, bulteriéra 15,1 %, čivavy 9,4 % , labradorského retrívera 7,5 % a Kavalier king charles španiela 5,6 %. Ostatné plemená psov boli zastúpené ojedinele.

Genetické poruchy skusu skeletálneho charakteru boli najčastejšie diagnostikované u plemena čivava s 80 % prevalenciou, nasledované plemenom bulteriér s 50 % výskytom (Obr. 2).

Pri diagnostike porúch skusu sme zistili, že 41,5 % pacientov malo jeden ortodontický problém a u 58,5 % pacientov bolo diagnostikovaných dva a viac ortodontických problémov (Obr. 3).

Dĺžka terapie v závislosti od zložitosti ortodontického problému sa pohybovala od jedného týždňa do 10 mesiacov. Najdlhšiu ortodontickú terapiu si vyžadovali prípady s rostrálnym posunom a smerovaním špičiakov. Z hľadiska vyhodnotenia ortodontickej terapie, ktorú sme vykonali u 13 pacientov, sme u všetkých dosiahli fyziologické postavenie zubov v oklúzii. Z daného počtu u štyroch pacientov došlo k určitému stupňu recidívy problému v oklúzii. Vo všetkých týchto prípadoch opakované ortodontické ošetrenie odstránilo vzniknutú komplikáciu.

Zmeny skusu u psov zaznamenávame relatívne často. Literárne zdroje často uvádzajú genetický pôvod týchto zmien (Danzi, 2003). Naše výsledky v prevažnej miere poukazujú na dentálny charakter zmien v oklúzii. Linguálne posunuté mandibulárne špičiaky sú popisované primárne ako následok zadržaných mliečnych zubov (Oakes a Beard, 1992). Verhaert (1999) popisuje pri sledovaní tohto problému len štyri prípady z 38 ošetrených psov, ktoré súviseli so zadržanými mliečnymi zubami. Vo viac ako 50 % prípadov uvádza za príčinu klinicky zjavné zmeny v dĺžke alebo šírke sánky. Naše výsledky sa viac prikláňajú k etiológii súvisiacej so zadržanými mliečnymi špičiakmi predovšetkým u malých plemien psov a v prípade, že sa jednalo o jediný ortodontický problém. Naopak u väčších plemien, predovšetkým u plemena bulteriér, sú tieto problémy vo veľkej miere sprevádzané zmenami v rozmeroch sánky.

V našej štúdii sme používali fixné ortodontické prístroje využívajúce aktívnu ortodontickú silu prostredníctvom ťahových retiazok kotvených na plastické ortodontické brekety a v prípade úzko postavených špičiakov šikmú akrylátovú plôšku využívajúcu oklúzne sily. Nami dosiahnuté výsledky, čo sa týka dĺžky terapie, potvrdzujú efektívnosť terapie. Komplikácie súvisiace s rizikom uvoľnenia fixovaných ortodontických brekiet na korunky kotviacich zubov sme eliminovali cirkumdentálnymi cerklážami v krčkovej oblasti.

Záverom môžeme konštatovať, že ortodontická terapia oklúzných zmien dentálneho charakteru je efektívna s trvalými výsledkami.

Obr. 1. Retencia mliečnych špičiakov vedúca k rostrálnemu posunu trvalého maxilárneho špičiaka a linguálnemu posunu mandibulárneho špičiaka.



Obr. 2. Brachygnácia inferior (mandibulárna brachygnácia).



Obr. 3. Hypodontia 104, mandibulárna brachygnácia, rostrálne smerujúce 3,404.



POUŽITÁ LITERATÚRA

- Danzi G: Orthodontic Treatment in a Young Rottweiler with a Severe Mandibular Brachygnathism. Proceedings of the 12th European Congress of Veterinary Dentistry Pisa. 2003: 42-43
- Gorrel C: Orthodontics. 29th World Congress of the WSAVA, Rhodes, Greece. 2004
- Harvey CE a Emily PP: Small Animal Dentistry. MOSBY – Year Book. St. Louis, 1993: 266-297
- Jedličková O a Raszka M: Vybrané kapitoly z ortodontie a dentoalveolárnej chirurgie. Brno, 1990: 16-64
- Johnston N: Introduction to Orthodontics. 26th World Congress of the WSAVA, Vancouver, Canada. 2001
- Oakes A a Beard G: Lingually Displaced Mandibular Canine Teeth: Orthodontic Treatment Alternatives in the Dog. J Vet Dent 9(1), 1992: 20-25
- Verhaert L: A Removable Orthodontic Device for the Treatment of Lingually Displaced Mandibular Canine Teeth in Young Dogs. J Vet Dent 16(2), 1999: 69-75

PROBIOTICKÉ VÝŽIVOVÉ DOPLNKY A ZDRAVIE DETÍ

Lovayová V.¹, Majorová E.², Rimárová K.³

¹Ústav hygieny a technológie mlieka, UVL, Košice

²II. klinika detí a dorastu, Fakultná nemocnica SNP, Košice

³Ústav hygieny, Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika, Košice

ABSTRAKT

Cieľom pilotnej štúdie bolo zistenie účinku probiotík u sledovaných skupín detí vo veku od 4 do 18 rokov života s rôznou diagnózou gastroenterologických ochorení (celiakia, potravinová alergia). Do štúdie bolo zahrnutých 35 pacientov (20 chlapcov a 15 dievčat) s priemerným vekom 11 rokov. Probiotikum v tabletovej forme sa podávalo počas troch mesiacov. Pred vstupom do štúdie a po jej ukončení sa hodnotili imunologické, biochemické a hematologické parametre. Subjektívne symptómy sa hodnotili pomocou dotazníka. Na základe odpovedí rodičov možno povedať, že väčšina z nich má základné znalosti o probiotikách. Rodičia majú tiež dobrý názor o možnostiach použitia probiotík v ľudskej výžive s potencionálnym zdravotným alebo nutričným prospechom.

Zistené výsledky síce poukázali na fakt, že väčšina krvných parametrov sledovaných v štúdiu sa štatisticky významne nezmenila, ale bol zistený štatisticky významný vzostup celkových bielkovín a eozinofilových leukocytov. Došlo k zníženiu cholesterolu v krvi sledovaných jedincov a k zvýšeniu imunoglobulínov triedy IgA a IgM.

ÚVOD

Probiotické mikroorganizmy vytvárajú v črevnom trakte prostredie chrániace pred jeho poškodením škodlivými mikroorganizmami. Sú známe niektoré probiotické mikroorganizmy, predovšetkým zo skupiny laktobacilov a bifidobaktérií, ktoré sa vyznačujú týmito účinkami.

Laktobacily a bifidobaktérie majú niekoľko veľmi podobných vlastností, medzi ktoré patrí schopnosť produkovať metabolity podobné antibiotikám a organické kyseliny, schopnosť prežívať a rásť v anaeróbnom prostredí a schopnosť fungovať ako konkurenční antagonisti. Potláčajú rozvoj enteropatogénov, najmä *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Proteus* spp. (Hyung, 1988).

Probiotiká sa uplatňujú ako podporné výživové doplnky aj u väčšiny chronických gastrointestinálnych ochorení, kde úpravou mikrobiálnej flóry môžu priaznivo pôsobiť na zdravotný stav a zvyšovať kvalitu života týchto pacientov (Rimárová a kol. 2005; Rimárová 2006).

Probiotiká môžu pôsobiť v tráviacom trakte protinádorovo, pretože úprava rovnováhy imunitných a mikrobiologických pomery v črevnom trakte znižujú riziko vzniku nádorov (Rimárová a Petriľáková 1999).

Vzhľadom na bezpečnosť probiotík, poznávanie ich stále širšieho preventívneho a terapeutického využitia už v detskom veku, ich dostáva do pozície stále atraktívnejších potravinových a výživových doplnkov.

MATERIÁL A METODIKA

Cieľom pilotnej štúdie bolo zistenie účinku podávaných probiotík v tabletovej forme na vybrané sledované parametre u detí vo veku od 4 do 18 rokov života s rôznou diagnózou ochorení gastrointestinálneho traktu. Do prospektívnej štúdie bolo zahrnutých 35 pacientov, z toho 20 chlapcov a 15 dievčat. Boli sledované deti s diagnózou hepatitídy, celiakie, malabsorpcie, gastroezofágového refluxu, gastritídy, pankreatitídy a potravinovej hypersenzitivity. Zo štúdie boli vyradení pacienti s imunosupresívnou liečbou, pacienti v antibiotickej liečbe a pacienti liečení liekmi ovplyvňujúcimi črevnú mikroflóru. Štúdia sa

realizovala v časovom období október (2006) - december (2007) na gastroenterologickej ambulancii Detskej fakultnej nemocnice v Košiciach.

Detským pacientom sa podávalo probiotikum v kapsulovej forme s počtom 30 kapsul určených pre deti od 4 rokov a dospelých v dĺžke 3 mesiacov, pričom dávku určil gastroenterológ.

Probiotický výživový doplnok obsahoval 9 kmeňov vitálnych mikroorganizmov v počte 9 miliárd v dennej dávke, t.j. v dávke v ktorej sú príslušné mikroorganizmy schopné optimálne osídliť tráviaci trakt a harmonizovať črevnú mikroflóru. Komplex neobsahoval žiadne konzervačné prísady.

Objektívne parametre ako hematologické, biochemické a imunologické vyšetrenia boli vykonané rutinným vyšetrením v laboratóriách Detskej fakultnej nemocnice v Košiciach.

Subjektívne parametre v štúdiu sa hodnotili pomocou rozšírenej empirickej metódy sociálneho výskumu a to dotazníkom s následným vyhodnotením.

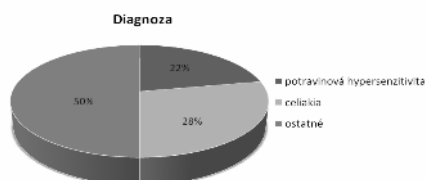
Dotazník bol zostavený autorom, takže jeho validita nie je overená na väčšom počte osôb. Pri zostavovaní dotazníku bolo nutne brať ohľad na cieľovú skupinu (rodičia), ktorá bola oslovená a tomu bolo podriadené množstvo otázok tak, aby sa zachovala jeho jednoduchosť a hlavne krátka doba vyplňovania. Preto dotazníky boli doporučené odborníkmi pracujúcimi s touto cieľovou skupinou.

Dotazníkovou metódou sa u rodičov zisťovalo výskyt chorobnosti, ich vývoj a zmeny, zvyšujúci či znižujúci sa trend výskytu chorôb a ich prejav, postoje a praktické návyky v oblasti probiotík.

Pre štatistickú analýzu bol použitý program Microsoft Excel 2007 a Statistica Cz 6.1, firmy Statsoft Inc., StatsDirect 2.5.2. Výsledky boli hodnotené pomocou popisnej štatistiky, kontingenčných tabuliek a metód induktívnej štatistiky - párového t-testu pre testovanie rovnosti priemerov medzi závislými parametrami, korelačný ϕ koeficient pre zistenie tesnosti vzťahu medzi dvoma nominálnymi premennými, Fisherov exaktný test resp. χ^2 pre zistenie rozdielnosti výskytu vybraných znakov, Goodman - Kruskal gamma pre zistenie miery súhlasu.

VÝSLEDKY

Na základe vyhodnotenia získaných hodnôt veku detských pacientov zaradených do štúdie bol vekový priemer detí v čase prebiehajúcej štúdie 11 rokov. Z celkového počtu 35 detí bola u 22 % diagnostikovaná potravinová hypersenzitivita, u 28 % celiakia a u 50 % detí ostatné sledované ochorenia gastrointestinálneho traktu. Frekvenčné rozloženie najviac vyskytujúcich sa diagnóz u detí v prebiehajúcej probiotickej štúdiu je znázornený na grafe 1.



Graf. 1 Frekvenčné rozloženie najviac vyskytujúcich sa diagnóz u detí

Pri porovnaní výsledkov pred a po aplikácii probiotického výživového doplnku sa zistilo štatisticky významné zvýšenie bielkovín z 74,339 g/l na 75,873 g/l (2,06 %), relatívnych eozinofilových leukocytov z 3,095 % na 4,072 % (31,56 %). Mierne štatisticky významne stúpili aj absolútne hodnoty eozinofilových leukocytov z 0,200 $10 \times 9/l$ na 0,231 $10 \times 9/l$ (15,5 %) v krvi. Z ďalších stanovených hodnôt sa zistilo štatisticky nevýznamné zvýšenie zinku z 11,187 $\mu\text{mol/l}$ na 11,557 $\mu\text{mol/l}$ (3,3 %).

Výsledky priemerných hodnôt vybraných biochemických, imunologických a hematologických parametrov sú uvedené v tabuľke 1.

Tab. 1 Priemerné hodnoty vybraných biochemických, imunologických a hematologických parametrov u detských pacientov pred a po aplikácii probiotického výživového doplnku po dobu 3 mesiacov (n=35)

Sledované parametre	I. odber	II. odber	smerodajná odchýlka	p
Zinok (μmol/l)	11,187	11,557	3,522	P=0,747
Vitámín D3 (pg/ml)	42,933	34,586	21,813	P=0,161
Neutrofilly absolútne (10x9/l)	3,245	3,065	1,927	P=0,638
Absolútne lymfocyty (10x9/l)	2,365	2,359	0,539	P=0,954
Absolútne monocyty (10x9/l)	0,551	0,520	0,182	P=0,381
Absolútne eozinofily (10x9/l)	0,200	0,231	0,086	P<0,05 *
Relatívne eozinofily (%)	3,095	4,072	2,424	P<0,05 *
Bielkoviny (g/l)	74,339	75,873	2,732	P<0,01 **
Cholesterol (mmol/l)	4,141	4,109	0,568	P=0,785
IgG (g/l)	9,573	9,861	3,250	P=0,661
IgA (g/l)	1,939	1,713	0,839	P=0,201
IgM (g/l)	1,046	1,154	0,335	P=0,166

(I. odber - začiatok štúdie, II. odber - koniec štúdie)

Po troch mesiacoch sa zistil pokles hodnoty krvného cholesterolu z 4,141 mmol/l na 4,109 mmol/l (0,7 %). Zistené hodnoty nasvedčujú, že probiotiká by mohli pri dlhodobejšom podávaní priaznivo upravovať metabolizmus celkového cholesterolu.

U ostatných vybraných parametrov sa nezistili štatisticky významné rozdiely.

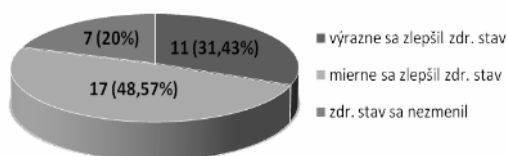
V dotazníkovej štúdií sa následne zistilo, že najčastejšími príznakmi za posledné 3 mesiace pred vstupom do štúdie boli bolesti brucha (25,71 %), nechutenstvo (14,29 %) a grganie (11,43 %). Príznaky sa najčastejšie objavovali nezávisle na prijme potravy (40 %) a po jedle (22,86 %).

Z vlastných skúseností a liečbou probiotickými liekmi u svojich detí sa stretlo 65,71 % rodičov, pričom nezanedbateľných je aj 34,29 % uvádzajúcich negatívnu odpoveď.

Veľmi pozitívne môžeme hodnotiť odpovede týkajúce sa uprednostňovania liečby probiotickými liekmi, kde až 85,71 % rodičov uviedlo kladnú odpoveď a v 14,29 % by liečbu probiotikami uprednostnilo v niektorých prípadoch.

V priebehu užívania sa podľa udania rodičov v 31,43 % prípadoch výrazne zlepšil zdravotný stav, v 48,57 % sa mierne zlepšil zdravotný stav a u 20 % detí sa zdravotný stav nezmenil, pričom tak isto ako pred začatím štúdie aj počas nej sa objavovali problémy nezávislé na prijme potravy (45,71 %), čo je o 5,71 % viac ako pred začatím štúdie. V grafe 2 vidíme zmeny zdravotného stavu počas užívania probiotík.

Zmeny počas užívania probiotík



Graf 2 Zmeny počas užívania alebo v priebehu užívania probiotického prípravku

Kým pred začatím štúdie 82,86% rodičov uviedlo výskyt chronických príznakov u dieťaťa (predovšetkým dominoval výskyt tráviacich problémov u potravinovej alergie, $p=0,008$), počas užívania sa výskyt príznakov vyplývajúcich z tráviaceho traktu znížil v 60% prípadoch. Čo sa týka formy užívania probiotík 68,57 % rodičov by uprednostnilo potravinovú formu a zvyšných 31,43 % by radšej užívalo kapsulovú formu.

Z hľadiska subjektívneho hodnotenia na konci štúdie až 68,57 % rodičov hodnotilo zdravie svojho dieťaťa za veľmi dobré, 22,86 % za dobré a len 8,57 % za nezmenené. Voči hodnoteniu zdravotného stavu dieťaťa pred štúdiou ide o mierny štatisticky nevýznamný súhlas medzi subjektívnym hodnotením zdravotného stavu dieťaťa, $\gamma=360$. Na základe toho 62,86 % rodičov hodnotilo liečbu probiotickým doplnkom za úspešnú a len 37,14 % nevedelo sa vyjadriť resp. nevedelo posúdiť, či liečba bola efektívna.

Interpretácia výsledkov získaných v pilotnej prospektívnej trojmesačnej nerandomizovanej klinicko-nutričnej štúdii je limitovaná pre významnejšie tvrdenia tak pre krátkosť trvania štúdie, ako aj pre nízky počet pacientov v štúdii.

Ako sa predpokladalo, je znalosť o probiotických doplnkoch u rodičov rozdielna, aj keď väčšina sa v tejto problematike orientuje. Pravidelne užíva probiotické prípravky 54,29 % detí, a naopak 45,71 % ešte probiotické prípravky neužívali. Aj napriek preferujúcemu prísunu výživových doplnkov formou farmaceutických prípravkov 68,57 % respondentov uprednostňuje potravinovú formu. V tomto prípade veľkú úlohu zohrávajú práve zdravotnícky personál a v prvom rade televízna reklama.

Štúdie dokazujú, že pokiaľ sa probiotické baktérie užívajú pravidelne, možno ich izolovať z fekálnej flóry, ale rýchlo miznú krátko po prerušení užívania probiotík. Preto sa pre trvalý účinok musí výživový doplnok užívať nepretržite, aby probiotické baktérie zostali trvalou súčasťou črevnej flóry. V budúcnosti pilotnú štúdiu bude možné nahradiť longitudinálnou dlhodobou nutričnou štúdiou, u ktorej predpokladáme dosiahnutie významnejších výsledkov.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporovaná z Grantu VEGA 1/0123/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Hyung, K.S. (1988) Characterization of Lactobacilli and Bifidobacteria as applied to Dietary Adjuncts. Cultured dairy products journal, August.
- Rimárová, K., Petriláková, T. 1999.: Karcinogénne látky v životnom prostredí. Environmentálne problémy miest: zborník príspevkov z 3. celoštátnej konferencie s medzinárodnou účasťou proceedings, Košice, 1999, s 48-51.
- Rimárová, K., Majorová, E., Mareková, M. 2005.: Sprievodca a pomocník pre osoby zdravotne postihnuté celiakiou. Vyd.: Združenie rodičov a priateľov detí a mladistvých s celiakiou, Košice, 2005, s.88. ISBN 80-89041-89-2.
- Rimárová, K. 2006.: Kvalita života u osôb s chronickým ochorením - celiakiou. SAVEZ. 2. konferencia s medzinárodnou účasťou Podpora zdravia - 20 rokov od Ottawy po Bangkok, Košice, 21.- 22.9.2006, s. 23 - 24.

KLINICKÁ KAZUISTIKA –DIFERENCIÁLNA DIAGNOSTIKA NEUROLOGICKÉHO PACIENTA S FOKÁLNOU ENCEFALOPÁTIOU A S PRIDRUŽENÝMI EPILEPTIFORMNÝMI PAROXYZMAMI

Maďari A.¹, Skalka J.²

¹*Klinika malých zvierat, UVL, Košice*

²*Katedra výživy, dietetiky a chovu zvierat, UVL, Košice*

ABSTRAKT

U 9 ročnej suky plemena rhodézsky ridgeback s veľmi rýchlym progredujúcim priebehom ako aj s klinicky atypicky pestrú multifokálnou manifestáciou paroxyzmálneho ochorenia sa po komplexnom vyšetrení s akcentom na vyšetrenie nervového systému upresňovala etiológia ochorenia a skúšali sa možnosti terapeutického ovplyvnenia ochorenia. EEG vyšetrenie poukázalo na silne epileptogénne ložisko s typickými epigrafoelementami, s lokalizáciou v ľavom prefrontálnom laloku a frontálnu encefalopátiou s paroxyzmálnou generáciou. EEG nález bol potvrdený patologicko-anatomickým vyšetrením mozgu po eutanázii suky so súhlasom majiteľky na základe reálneho zhodnotenia stavu a prognózy ochorenia. Prípád poukazuje na dôležitosť EEG vyšetrení pri paroxyzmálnych ochoreniach psov.

ÚVOD

Klinická diagnostika epilepsie a ďalších záchvatových ochorení skrýva v sebe ešte stále veľa diagnostických problémov a úskalí. Popri klinickom prejave - symptomatológii a hodnote tzv. “imaging” metód v skupine záchvatových ochorení, najmä epilepsie, má svoje nezastupiteľné miesto i EEG vyšetrenie (Kolár a kol., 2003).

Záchytnosť špecifických epileptiformných EEG prejavov po prvom neprovokovanom epileptickom záchvate sa pri prvom EEG vyšetrení udáva v 30-40% prípadov (King a kol., 1998). Opakovaním EEG snímania pravdepodobnosť zachytenia epileptiformných abnormalít narastá (Sabinskí a kol., 1987). Elektroencefalografia (EEG) je v epileptológii úplne suverénna a nenahraditeľná vyšetrovacia metóda, predovšetkým pre jej neinvazívnosť, ľahkú opakovateľnosť a z ekonomického hľadiska patrí medzi najlacnejšie vyšetrovacie metódy (Faber, 1995). I napriek rozvoju neurozobrazovacích metód a dlhodobého video-EEG je stále veľmi dôležitá a drží si vysokú hodnotu pri vyšetovaní všetkých typov epilepsií a rade iných záchvatových ochorení, ktoré môžu imitovať epilepsie. Z toho dôvodu sa najčastejšie používa pri vyšetrení pacientov so záchvatovými ochoreniami (Vojtěch, 2005).

V epileptológii musíme využívať v závislosti na klinickej problematike vždy niekoľko vyšetrení a ich výsledky hodnotiť vo vzájomnej korelácii (Vojtěch, 2005).

Skutočnosť, že diferenciálna diagnostika epileptických a neepileptických záchvatov nie je vždy ľahká, potvrdzujú i literárne údaje, podľa ktorých zhruba pätina až štvrtina pacientov vedených pod diagnózou farmakorezistentná epilepsia, v skutočnosti trpí inými (neepileptickými) záchvatmi (Brázdil a kol., 2004).

Prezentovaný prípad atypickej epilepsie u psa s veľmi rýchlym a progredujúcim priebehom ako aj s klinicky atypicky pestrú manifestáciou poukazuje na zložitosť diagnostiky ochorenia a na hodnotu EEG vyšetrenia pri etiologickej identifikácii patologického procesu.

MATERIÁL A METODIKA

Biologickým objektom sledovania bola 9 ročná suka plemena rhodézsky ridgeback, ktorá bola 24.01.2008 privezená na Kliniku malých zvierat UVL v Košiciach so záchvatovým ochorením a výraznou zmenou správania sa, po neúspešnej liečbe privolanými veterinárnymi lekármi.

Po získaní kompletných anamnestických údajov boli u pacienta prevedené komplexné neurologické vyšetrenie, biochemické vyšetrenia krvi v rozsahu: AST, ALT, ALP, CREAT,

UREA, BilT, GLU, CHOL, TG a K konštantnými metodikami, používanými na klinike, s použitím spektrofotometrického analyzátoru Reflotron. Okrem toho bolo prevedené hematologické vyšetrenie: EC, LC, Leukogram a Htk, bežne používanými metodikami.

Na EEG vyšetrenie bol použitý EEG prístroj Bioscript 2000. Príprava psa na EEG vyšetrenie pozostávala z 12 hodinovej hladovky pred EEG vyšetrením, minimalizácie stresu, vylúčenia všetkých medikamentov s účinkom na CNS s výnimkou antiepileptík, auskultačného vyšetrenia a vyšetrenia kardiovaskulárneho systému. Nasledovne sa u pacienta navodila čiastočná anestézia, i.m. aplikáciou Xylazínu v dávke 1mg/kg ž.h.(živej hmotnosti). Na prípadnú aplikáciu antidótu sa zaviedol i.v. katéter. Po 10-15 minútach, keď bol pacient dostatočne sedovaný, ale pri vedomí, boli zavedené do kože lebky ihlové elektródy, subkutánne, do určitých bodov podľa Herrinovej schémy (Fp-frontopolárne, F-frontálne, P-parietálne, O-okcipitálne, T-temporálne, CP-centroparietálne, CO-centrookcipitálne). Na EEG prístroji boli nastavené tieto parametre: časová konštanta zosilovača 0,3 s, filter 70 Hz, amplitúdu 50 $\mu\text{m}/\text{cm}$, posun papiera 30 mm/s, citlivosť 1 mV/cm. Snímanie EEG záznamu trvalo cca. 30 minút. Pes bol pri tom bez telesného pohybu, aby sa vylúčili artefakty. Pacient bol sledovaný, vyšetrený a ošetrovaný denne v neurologickej ambulancii Kliniky malých zvierat UVL.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počiatočný status a chronologický priebeh ochorenia

20.01.2008

Majiteľka prvý krát zbadala u suky nervový záchvat s pomočením, ktorý trval asi 2 minúty. Privolaný veterinárny lekár aplikoval Diazepam. Záchvat sa opakoval na druhý deň, ďalší veterinárny lekár ordinoval Phenemaletten. Záchvat sa znova opakoval, i keď s nižšou intenzitou. Na tretí deň sa záchvat zopakoval s pomočením. Suka začala kňučať a občas sa pohybovala do kruhu. Podobná situácia bola 23.01. aj 24.01.2008 ráno, kedy sa opäť dostavil nervový záchvat a suka kňučala. Majiteľka sa rozhodla priniesť suku na Kliniku malých zvierat UVL.

24.01.2008

Po príchode na kliniku v priebehu vyšetrenia suka dostala opäť tonický nervový záchvat s opistonom, ktorý bol zvládnutý aplikáciou Apaurinu inj. Po uplynutí záchvatu sa suka pohybovala po ambulancii v kruhu v protismere hodinových ručičiek, ostávala stáť v rohoch miestnosti s neprítomným pohľadom upretým dopredu. Po vyrušení pokračovala v krúžení a kňučaní. Bola vyslovená diagnóza Grand mal s tonickou zložkou a opistonom, so suspektnou fokálnou etiológiou.

Pro domo bolo ordinované: Phenaemal tabl. 0,1, 2x 1tabl. denne, vit. E, B-komplex a diazepam-desitin pri záchvate.

25.01.2008

Suka mala ráno o 7.00 hod. nervový záchvat a preto jej bol aplikovaný rektálne Diazepam-desitin. Po príchode na kliniku bola odobratá krv na vyšetrenie a bola jej aplikovaná 5% glukóza, cerebrolýzín, ďalej 2ml Apaurínu. Pro domo: 2x denne ½ tabl. Phenaemal + 2 tabl. Phenemaletten. Večer sa suka opäť pohybovala v kruhu a kňučala.

26.01.2008

Suka nemala záchvat, stále však chodila do kruhu a občas kňučala. O 16.30 majiteľka spozorovala psychomotorický neklud, intenzívne a výrazné kňučanie, bojzlivosť a celkovú excitáciu. Po telefonickom konzultácii aplikovala suke 10 mg Diazepam-desitin per rectum. Keďže sa nedostavil účinok, po opakovanom telefonickom dohovore dávku postupne zvyšovala až do 30 mg. Suka stále vykazovala silné podráždenie a kňučala, preto s ňou majiteľka prišla o 17.30 na Kliniku malých zvierat UVL. Suke bol aplikovaný Acepromazín

v dávke 35 mg + 35mg pro domo. Po sedatívne sa suka ukl'udnila, nekňučala. Bola objednaná na druhý deň.

27.01.2008

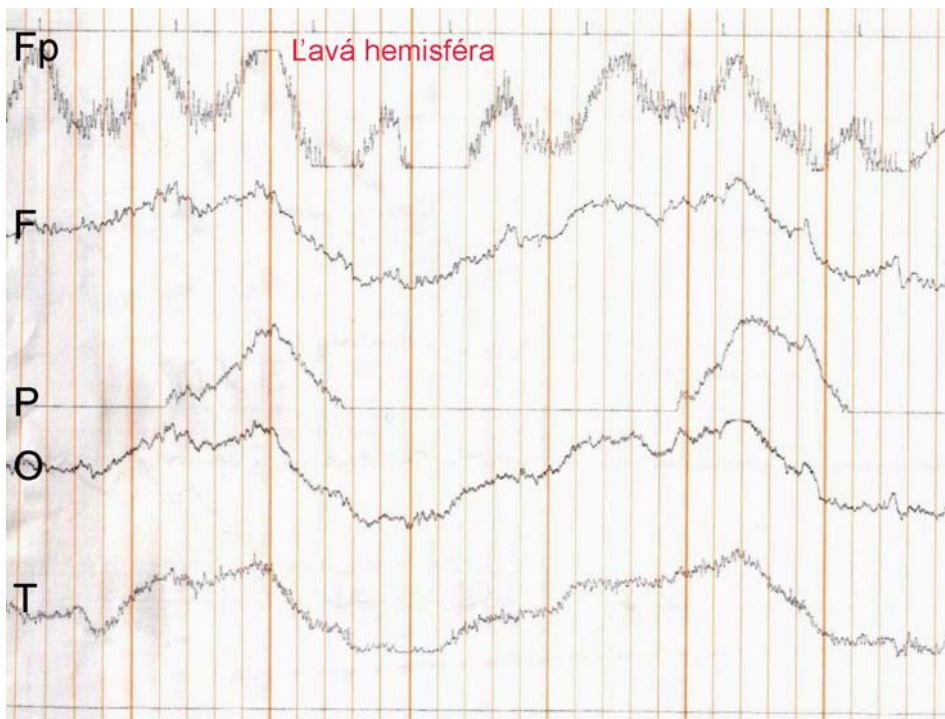
Cez deň sa stav mierne zlepšil, neobjavil sa záchvat a suka nekňučala. Večer nastalo celkové zhoršenie stavu. Po aplikácii tabl. Sedalin forte suka spala asi dve hodiny. Po prebudení bol stav opäť zhoršený, silne kňučala a došlo u nej k spontánnej mikcii, objavili sa kŕče, po ich odznení suka opäť zaspala. Po prebudení bola apatická, kňučala a spontánne močila. Tento stav trval celú noc, preto s ňou ráno(28.01.2008) majiteľka prišla na kliniku.

28.01.2008

Po príchode na kliniku mala suka zastreté vedomie, spontánne močila, vykazovala celkovú hypersenzitivitu. U suky bolo prevedené EEG vyšetrenie.

EEG nález: silné epileptogénne ložisko s typickými epigrafoelementami s vysokými hrotmi v ľavom prefrontálnom laloku, frontálna encefalopátia s paroxyzmálnou generáciou.

Obr. 1 Vysoká a nepravidelná β -aktivita v ľavom prefrontálnom laloku.

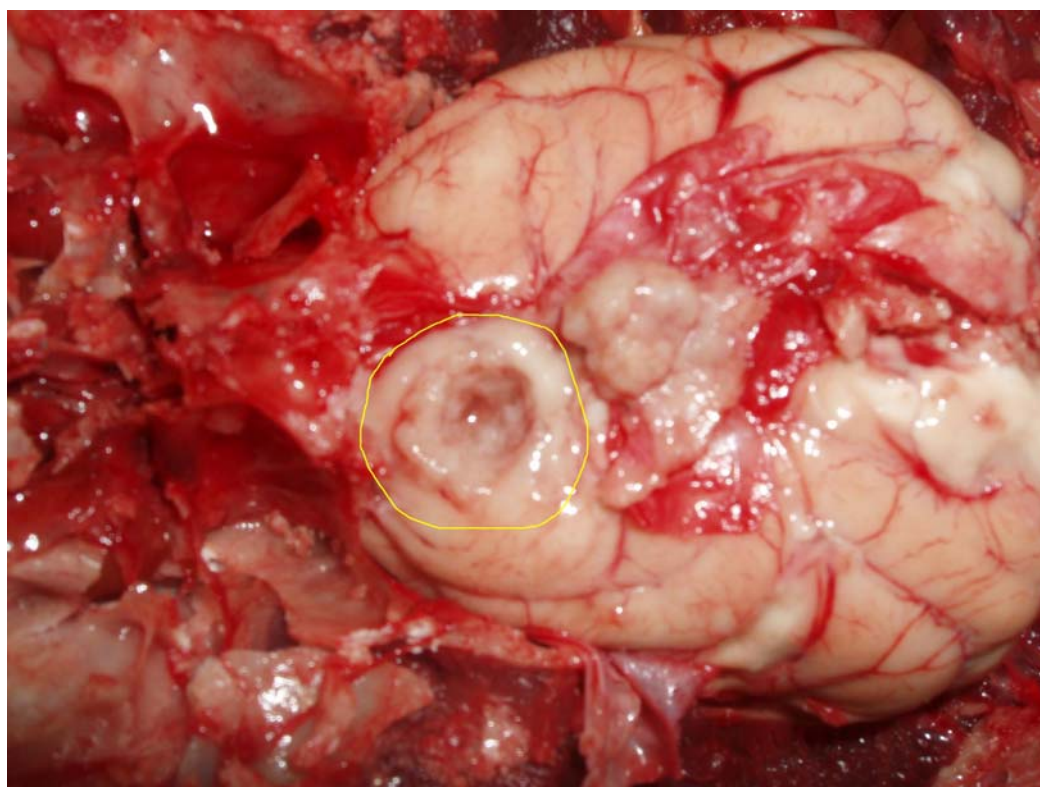


Vzhľadom na celkový stav a neúspešnosť liečby majiteľka súhlasila s eutanáziou suky.

Po eutanázii (28.01.2008) bola na Ústave patologickej anatómie UVL 29.01.2008 prevedená pitva a vyšetrenie mozgu.

Nález na mozgu: difúzne zrasty dura a pia mater na dorzálnej čelovej ploche obidvoch hemisfér-fibrózna ložisková pachymeningitída. Po odstránení dura máter na ľavej hemisfére v čelovej oblasti boli prítomné postmalatická cysta a farebné zmeny na kôre mozgu, na ľavej hemisfére navyše edém a v porovnaní s pravou hemisférou zväčšenie. Po narezaní ľavej hemisféry encefalomalácia.

Obr. 2 Cysta a farebné zmeny prítomné na kôre mozgu.



Dobrovzdanie: pitevný nález potvrdil klinicky zistený nález. Lokalizované ložisko a silné narušenie nervového tkaniva boli príčinou epileptických záchvatov zvierat'a.

Výsledok EEG vyšetrenia ukázal, že zachytenie špecifických epileptiformných abnormalít, ako to prezentujú King a kol. (1998) a Salinský a kol. u ľudí, je reálne i u psov.

Súčasne poukazuje i na diagnostickú hodnotu EEG vyšetrenia pri záchvatových ochoreniach, ako to zdôrazňuje Faber (1995) a Vojtěch (2005). V našom prípade diagnostická hodnota EEG vyšetrenia bola prezentovaná tým, že EEG vyšetrením bolo zistené epileptické ložisko, ktorého lokalizácia bola potvrdená patologicko-anatomickým nálezom v mozgu.

EEG vyšetrenia sú dôležité i pri diferenciálnych diagnostikách epileptických a neepileptických porúch paroxyzmálneho charakteru, ako to uvádzajú Sackellares a kol. (1985) a Devinski a kol. (2001) u ľudí a Wheeler (1995) u malých zvierat.

EEG vyšetrenie je cennou prognostickou pomôckou pri epilepsiách psov.

POĎAKOVANIE

Tento článok bol spracovaný na základe podpory projektu VEGA grant s číslom 1/4367/07 .

POUŽITÁ LITERATÚRA

Brázdil M., Hadač J., Marusič P. Farmakorezistentní epilepsie. Praha: Triton, 2004; 268: ISBN 80-7254-562-0

Devinski O., Mesad S., Alper K., Nondominant hemisphere lesions and conversion nonepileptic seizures. *Neuropsychiatry Clin Neurosis* 2001;13:367-73

Faber J. Epilepsie a epileptózy. Praha: Maxdorf-Jessenius, 1995; 105: ISBN 80-85875-80-2.

King MA, Newton MAR, Jackson GD Epidemiology of the first seizure presentation: a clinical electroencephalographic and magnetic resonance imaging study of 300 consecutiva patients. *Lancet* 1998, 352:1007-11

- Kollár B., Buranová D., Varsik P., Klobúčniková K., Krajčijová A., Traubner P., Interiktálne EEG vyšetrenie u epilepsie, migrény a tetanického syndróme. *Neurologie pro praxi* 2003;4:193-6
- Sackellares JC., Giordani B., Berent S. Patients with pseudoseizures intellectual and cognitive performance. *Neurology* 1985;35:116-9
- Salinsky M., Kanter R., Dashieff R. Effectiveness of multiple EEGs in supporting the diagnosis of epilepsy: an operational curve, *Epilepsia* 1987; 28: 331-334
- Vojtěch Z. EEG v epileptologii dospělých. Praha: Grada publishing, a.s., 2005; 680:ISBN 80-247-0690-3
- Wheeler SJ. Manual of small animal neurology. Gloucestershire, BSAVA, 1995;256

URČOVANIE ANTIBIOTICKEJ REZISTENCIE KOAGULÁZO-NEGATÍVNYCH STAFYLOKOKOV IZOLOVANÝCH ZO ZAJACOV A BAŽANTOV

Mártonová M., Pipová M., Jevinová P.

Katedra hygieny a technológie potravín, UVL, Košice

ABSTRAKT

V štúdií sa zisťovala citlivosť 72 a 25 koagulázo-negatívnych stafylokokokov izolovaných zo zajacov poľných (*Lepus europaeus*) a bažantov (*Phasianus colchicus*) z farmového chovu na vybrané antibiotiká diskovou difúznou metódou. Na základe týchto výsledkov sa potom vytvorila skupina vybraných stafylokokokových izolátov, u ktorých sa zisťovali aj minimálne inhibičné koncentrácie antibiotík agarovou dilučnou metódou a prítomnosť *mecA* génu multiplexnou PCR metódou. Porovnaním výsledkov získaných difúznou a dilučnou metódou, sme zistili, že u koagulázo-negatívnych stafylokokokových izolátov zo zajacov sa zaznamenalo 6,2 % a u bažantov len 3,1 % prípadov, v ktorých výsledky získané oboma metódami neboli navzájom totožné. Pri určovaní metícilín/oxacilínovej rezistencie stafylokokokov dilučnou metódou sa zistil vyšší počet oxacilín-rezistentných izolátov ako u zajacov tak aj u bažantov (7 a 11) ako pri použití difúznej metódy (5 a 8). PCR metódou sa zistila prítomnosť *mecA* génu len v jednom izoláte (5,6%) zo zajacov a v troch izolátoch (12,0%) z bažantov. Vo všetkých štyroch prípadoch oxacilínovú rezistenciu odhalili aj disková difúzna a agarová dilučná metóda.

ÚVOD

Vznik rezistencie niektorých bakteriálnych druhov na bežne používané antibiotiká v humánnej, veterinárnej medicíne a v poľnohospodárstve sa čoraz viac stáva nebezpečným celosvetovým fenoménom. V poslednom čase sa veľa popísalo najmä o MRSA (metícilín-rezistentný *S. aureus*) a MRCoNS (metícilín-rezistentné koagulázo-negatívne stafylokoky) (Shopsin a Kreiswirth, 2001; Normanno a kol., 2007). Koagulázo-negatívne stafylokoky sú väčšinou bežnými komenzálmi na koži ľudí a zvierat a vyznačujú sa nižšou patogenitou ako *S. aureus* (Livermore, 2000), pre ktorého sú však neustálym zdrojom génov rezistencie (Archer, 1988). Charakter antibiotickej rezistencie sa môže meniť veľmi rýchlo na lokálnej, regionálnej aj medzinárodnej úrovni a preto je potrebné robiť jej neustále monitorovanie z rôznych zdrojov, ktoré je dôležitým indikátorom vhodného alebo nevhodného používania antibiotík.

MATERIÁL A METODIKA

V zmysle pokynov STN EN 6888-1 sa na izoláciu kmeňov stafylokokokov zo svalového tkaniva z oblasti dutiny brušnej zajaca poľného (*Lepus europaeus*) a zo stehennej svaloviny bažantov (*Phasianus colchicus*) použila arbitrážna selektívno-diagnostická pôda podľa Baird-Parkera (Himedia, India). 132 takto vyizolovaných kmeňov sa podrobilo plazmokoagulátovej skúške (Staphylo PK, ImunaPharm, Šarišské Michaľany).

Vo všetkých koagulázo-negatívnych kmeňoch bola zisťovaná ich citlivosť na penicilín 10 μ g (P), ampicilín 10 μ g (Amp), metícilín 5 μ g (Met), oxacilín 1 μ g (Ox), streptomycín 10 μ g (S), gentamicín 10 μ g (CN), erytromycín 15 μ g (E), tetracyklín 30 μ g (Te) a vankomycín 30 μ g (Van) diskovou difúznou metódou podľa CLSI (2006a), kde sa merali priemery zón inhibície rastu týchto kmeňov. Na základe výsledkov diskovej difúznej metódy sa potom vytvorila skupina vybraných stafylokokokových izolátov, u ktorých sa zisťovali aj minimálne inhibičné koncentrácie (MIC) týchto antibiotík (okrem metícilínu) agarovou dilučnou metódou podľa postupu CLSI (2006b). V tejto skupine izolátov sa navyše otestovala aj ich citlivosť na novobiocín ako diskovou tak aj dilučnou metódou. Rezistencia, intermediárna citlivosť alebo citlivosť vyšetovaných izolátov voči danému antibiotiku sa vyhodnotila podľa interpretačných kritérií CLSI (2006c).

Koagulázo-negatívne kmene stafylokokov boli potom testované multiplexnou PCR metódou podľa Strommenger a kol. (2003).

Izolácia DNA: 3 ml stafylokokovej kultúry pomnoženej v BHI bujóne (Oxoid, Veľká Británia) sa zcentrifugovalo (10 min., 2600 g) a premylo so 100 µl 0,5% Tritonu X-100. Centrifugácia sa zopakovala a sediment bol resuspendovaný v 200 µl 0,5% Tritonu X-100. Vzorky boli potom inkubované pri 95 °C 10 min. a znova zcentrifugované (10 min., 2600 g). Supernatant sa ako zdroj DNA použil v ďalších reakciách.

PCR amplifikácia: Na PCR reakciu boli použité primery 16s 1 a 16s 2 amplifikujúce 16S rDNA gén, ktorý je prítomný len u kmeňov patriacich do rodu *Staphylococcus*, primery Sau1 a Sau2 špecifické iba pre kmene *S. aureus* a primery *mecA* 1 a *mecA* 2 určujúce prítomnosť génu pre meticilínovú rezistenciu (Tab. 1). Iniciačná denaturácia pri 94°C 3 min., po ktorej nasledovalo 30 cyklov amplifikácie pri 94 °C 30 s, annealingu pri 55 °C 30 s a extenzie pri 72 °C 30 s. Po poslednom cykle nasledovala ešte finálna extenzia pri 72 °C 4 min.

Detekcia amplifikovanej DNA: PCR produkty boli analyzované v 1% agarózových géloch (Invitrogen). Gél bol po ofarbení etídiom bromidom vizualizovaný pod UV lampou.

Tab. 1 Zoznam primerov použitých na multiplexnú PCR podľa Strommenger a kol., 2003

Primer	Nukleotidová sekvencia 5' - 3'	Veľkosť produktu (bp)
16s 1	CAG CTC GTG TCG TGA GAT GT	420
16s 2	AAT CAT TTG TCC CAC CTT CG	
Sau1	AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG	107
Sau2	CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA	
<i>mecA</i> 1	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	532
<i>mecA</i> 2	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po vyhodnotení plazmokoagulázového testu sa u 72 koagulázo-negatívnych kmeňov stafylokokov izolovaných zo zajacov a 35 koagulázo-negatívnych kmeňov stafylokokov izolovaných z bažantov stanovovala ich citlivosť voči vybraným antibiotikám pomocou diskovej difúznej metódy (Tab. 2).

Tab. 2 Výskyt intermediárnej citlivosti a rezistencie v koagulázo-negatívnych stafylokokoch izolovaných zo zajacov a bažantov podľa diskovej difúznej metódy

Antibiotiká	Zajace		Bažanty	
	I [%]	R [%]	I [%]	R [%]
penicilín	0	52.8	0	31.4
ampicilín	0	55.6	0	28.6
metecilín	8.3	8.3	5.7	14.3
oxacilín	0	20.8	0	22.9
streptomycín	13.9	2.8	20.0	5.7
gentamicín	0	2.8	0	0
erytromycín	26.4	23.6	11.4	48.6
tetracyklín	0	11.1	5.7	28.6
vankomycín	0	1.4*	0	0

I - intemediárna citlivosť, R - rezistencia

Na základe výsledkov získaných diskovým difúznym testom sa vytvorila skupina izolátov, ktorú tvorilo 18 izolátov zo zajacov a 25 izolátov z bažantov. U tejto skupiny izolátov sa zisťovali aj MIC pomocou agarovej dilučnej metódy, prítomnosť *mecA* génu, či ich príslušnosť do rodu *Staphylococcus* a identita so *S. aureus* pomocou PCR metódy.

Multiplexná PCR metóda potvrdila, že vybrané izoláty zo zajacov a bažantov patrili do rodu *Staphylococcus* a žiadny z nich nebol identifikovaný ako *S. aureus*.

Porovnaním výsledkov získaných difúznou a dilučnou metódou, sme zistili, že u koagulázonegatívnych stafylokokových izolátov zo zajacov sa zaznamenalo 6,2 % a u bažantov len 3,1 % prípadov, v ktorých výsledky získané oboma metódami neboli navzájom totožné. Najviac rozdielov vo výsledkoch (3) sa u izolátov zo zajacov zaznamenalo pri NV a žiadna nezhoda nebola zistená pri určovaní citlivosti na P, CN, E a Te. U bažantov najviac problémov robilo určovanie citlivosti stafylokokov na Ox (3 prípady nezhôd) a tiež NV (2 prípady nezhôd). Nezhody sa nezaznamenali pri Amp, S, CN, Te a Van. Vo všeobecnosti to znamená, že žiadne rozdiely vo výsledkoch získaných oboma metódami sa nezistili pri CN a Te.

Existuje mnoho metód na určenie fenotypovej meticilínovej rezistencie u stafylokokov. Jej presná detekcia sa komplikuje kvôli heterogénnej expresii rezistencie stafylokokov na β -laktámové antibiotiká a kvôli rôznej interakcii faktorov ovplyvňujúcich expresiu rezistencie ako sú testovaný agens, médium, koncentrácia NaCl, inokulum, teplota a dĺžka inkubácie a správne odčítavanie výsledkov (Sakoulas a kol., 2001; Brown, 2001). V súčasnosti sa za štandardné metódy na odhalenie meticilínovej rezistencie považujú PCR metódy. Napriek tomu, ich používanie nie je v bežných laboratóriách ešte stále možné, najmä kvôli ich ekonomickej náročnosti. Preto sa na iniciálnu detekciu meticilínovej rezistencie ešte stále najčastejšie používajú difúzne a dilučné metódy. Keďže falošne negatívny výsledok je nežiaduci, bežne používané fenotypové metódy sa vyznačujú vyššou senzitivitou ako špecificitou (Midha, 1997).

Diskovou difúznou metódou sa zistilo, že až 5 z 18 (27,8%) stafylokokových izolátov zo zajacov bolo fenotypovo rezistentných na Ox. Vo všetkých piatich izolátoch sa pomocou agarovej dilučnej metódy rezistencia na Ox potvrdila, pričom sa u nich fenotypovo prejavila aj rezistencia na P-Amp a u troch aj na Met. To by mohlo poukazovať na prítomnosť *mecA* génu, ktorý je vlastne „pravým“ ukazovateľom meticilín/oxacilínovej rezistencie u stafylokokov a zodpovedným za problémy v liečbe infekcií spôsobených takýmito stafylokokovými kmeňmi. PCR metódou sa však zistila prítomnosť *mecA* génu len v jednom kmeni (5,6%), u ktorého sa fenotypovo prejavila vysoká úroveň rezistencie na P (16 mg.l⁻¹), Amp (8 mg.l⁻¹), Met, Ox (32 mg.l⁻¹), E (128 mg.l⁻¹) a intermediárna citlivosť voči S. V ďalších dvoch stafylokokových izolátoch zo zajacov sa zistila hraničná úroveň rezistencie na Ox (0,5 mg.l⁻¹) len dilučnou metódou, čo môže znamenať, že tieto kmene ani nie sú rezistentné na Ox. Vysvetľuje sa to tým, že u niektorých kmeňov stafylokokov (*S. lugdunensis*, *S. schleiferi* a *S. saprophyticus*) je lepšie určovať oxacilínovú rezistenciu podľa kritérií určujúcich rezistenciu na Ox u *S. aureus*, ktoré sú vyššie pre MIC (4 mg.l⁻¹) a nižšie pre priemery inhibičných zón (10 mm) (PHAC, 1998).

U bažantov sa podľa difúznej metódy zistilo, že až 8 z 25 (32,0%) kmeňov je rezistentných na Ox. Vo všetkých prípadoch sa pomocou dilučnej metódy potvrdila rezistencia na Ox a v troch prípadoch sa zároveň fenotypovo prejavila aj na P-Amp (v dvoch prípadoch aj na Met). V ostatných piatich prípadoch sa úroveň rezistencie na Ox pohybovala od 0,5-2 mg.l⁻¹, ale voči ďalším antibiotikám penicilínovej rady sa rezistencia fenotypovo neprejavila (okrem rezistencie na Met v jednom prípade). Okrem toho, sa v ďalších troch izolátoch zistila rezistencia voči Ox (0,5-1 mg.l⁻¹) iba dilučnou metódou podobne ako to bolo u zajacov. Priemery zón inhibície získané diskovou difúznou metódou však boli od hraničnej hodnoty určujúcej rezistenciu odlišné iba o 1 mm. V jednom prípade sa fenotypovo prejavila aj rezistencia voči P-Amp. Z výsledkov vyplýva, že len štyri stafylokokové izoláty z bažantov sa

fenotypovo prejavili ako rezistentné na P-Amp-Ox (2 z nich na P-Amp-Met-Ox) a teda by mohli byť nositeľmi *mecA* génu. PCR metódou sa zistila prítomnosť *mecA* génu až v troch kmeňoch (12,0%). Dva z nich vykazovali vysokú úroveň rezistencie na P (64 mg.l⁻¹), Amp (64 mg.l⁻¹), Met, Ox (128 mg.l⁻¹) a Te (32 mg.l⁻¹) a jeden izolát bol aj intermediárne citlivý voči S. Tretí *mecA*-pozitívny kmeň bol fenotypovo rezistentný na P (4 mg.l⁻¹), Amp (4 mg.l⁻¹), Ox (2 mg.l⁻¹), Te (64 mg.l⁻¹), NV (16 mg.l⁻¹) a súčasne intermediárne citlivý na Met a E. Meticilín-oxacilínová rezistencia sa môže fenotypovo prejavovať aj u stafylokokov, ktoré nie sú *mecA*-pozitívne kvôli ich hyperprodukcii β-laktamáz, neobvyklým meticilinázam a iným menej preskúmaným mechanizmom. Tieto typy meticilínovej rezistencie sa fenotypovo prejavujú nízkou alebo hraničnou úrovňou rezistencie a ich odlíšenie od heterorezistentných *mecA*-pozitívnych kmeňov je bežnými metódami problematické. Ich klinický význam je však zatiaľ dubiózny (Brown, 2001).

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0661/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Archer GL. Molecular epidemiology of multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. J. Antimicrob. Chemoth. 1988; 21:133-8.
- Brown DFJ. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. J. Antimicrob. Chemoth. 2001; 48:65-70.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 9th Ed., M2-A9. Wayne, PA, USA. 2006a.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 7th Ed., M7-A7. Wayne, PA, USA. 2006b.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 16th Informational Supplement, M100-S16. Wayne, PA, USA. 2006c.
- Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. Int. J. Antimicrob. Ag. 2000; 16:3-10.
- Midha NK. Rapid Testing Methods for the Detection of Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus*. Antimicrobics and Infectious Diseases and Newsletter. 1997; 16:62-3.
- Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, Greco G, Bellacicco AL, Virgilio S, Celano GV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. Int. J. Food Microbiol. 2007; 117:219-22.
- PHAC (Public Health Agency of Canada). Guidelines for the testing and reporting of antimicrobial susceptibilities of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and commentary on methicillin resistant coagulase negative staphylococci (MR-CNS). 1998. <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ceqa-pceeq/mrsa98-eng.php>.
- Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, DeGirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. J. Clin. Microbiol. 2001; 39:3946-51.
- Shopsin B, Kreiswirth B. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect. Dis. 2001; 7:322-6.
- 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.
- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 2003; 41:4089-94.

VARIÁCIE ODSUPU ARTERIA FACIALIS, ARTERIA LINGUALIS A ARTERIA THYROIDEA CRANIALIS U KRÁLIKA (ORYCTOLAGUS FUNICULUS F. DOMESTICA)

Maženský D.

Ústav anatómie, UVL, Košice

ABSTRAKT

Sledovali sme morfológické variácie *arteria lingualis*, *arteria facialis* a *arteria thyroidea cranialis* na základe ich odstupu na 30 korozívnych preparátoch dospelých králikov oboch pohlaví. K príprave preparátov sme použili: fyziologický roztok, nástrekovú hmotu UR 3558, farbivá, hydroxid draselný, chirurgické nástroje a laboratórne pomôcky. Po prepláchnutí krvného riečišťa cez ľavú komoru fyziologickým roztokom sme injekovali nami už vopred pripravenú nástrekovú hmotu. Vzorky sme nechali dopolymerizovať vo vlažnej vode 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, že *arteria lingualis* odstupuje z *arteria carotis externa* v 7 % prípadov, *arteria lingualis* z *truncus linguofacialis* v 96 % prípadov a *arteria thyroidea cranialis* z *arteria carotis communis* v 97 % prípadov.

ÚVOD

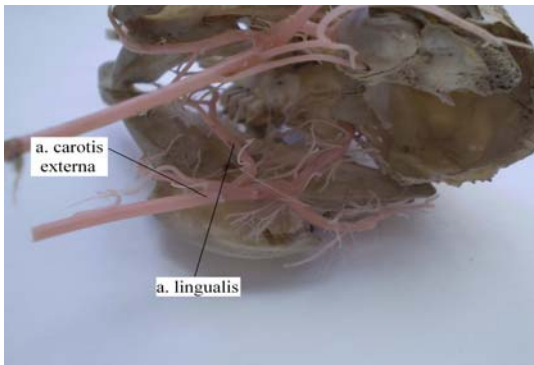
Veterinárna morfológia sa v súčasnosti nezaobíde bez zdôraznenia porovnávacej anatómie, nakoľko okruh činnosti veterinárnej praxe vyžaduje anatomické poznatky rozmanitých druhov stavovcov. Nejedná sa pritom iba hosp. zvieratá ako napr; kôň, hovädzí dobytok, ovca, koza, ošípaná, či domácich miláčikov chovaných pre zábavu a potešenie, ale ide aj o laboratórne zvieratá reprezentujúce často príslušníkov rôznych tried. V súvislosti s rozvojom medicínskeho výskumu sa v experimentálnej praxi využívajú laboratórne zvieratá. Toto vyžaduje dokonalú znalosť anatomických údajov týkajúcich sa jednotlivých orgánov a orgánových sústav. V našej práci sme sa zamerali na variácie odstupu vybraných tepien hlavy v krvnom systéme králika.

MATERIÁL A METODIKA

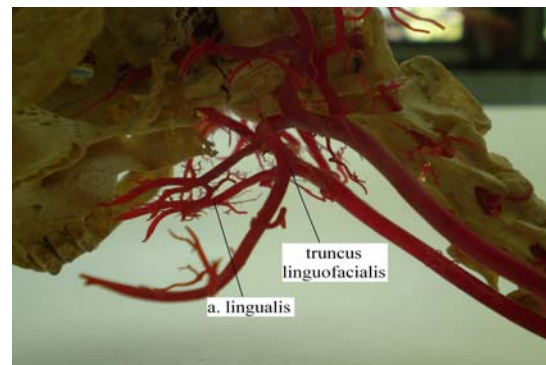
Zamerali sme sa na variácie odstupu *arteria lingualis*, *arteria facialis*, a *arteria thyroidea cranialis* u 30 králikov. Eutanáziu sme vykonávali éterom. Po vypreparovaní srdca sme pristúpili k prepláchnutiu cievneho riečišťa. Ako perfúzne médium bol použitý fyziologický roztok NaCl. K dokonalejšiemu 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). Ako nástrekovú hmotu sme použili UR 3558 pripravený v spolupráci s Ústavom polymérov SAV v Bratislave. Túto hmotu sme po príprave zmiešaním oboch zložiek: polyol a izokyanát v stechiometrickom pomere udanom výrobcom ofarbili špeciálnym farbivom určeným pre tento účel. Nádobu s hmotou sme uzavreli a pokračovali v premiešavaní, čím sa zabraňuje jej adsorbácii na stenu nádoby. Po 1–2 minútach sme 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 50 °C. Všetky tkanivá musia byť v roztoku ponorené. Macerácia trvala približne 2–3 dni.

VÝSLEDKY

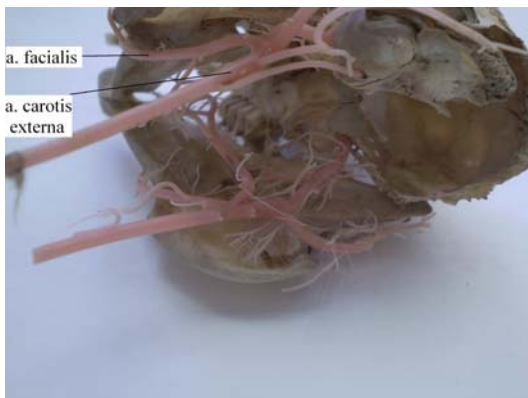
Obr. 1. Odstup *arteria lingualis* z *arteria carotis externa*



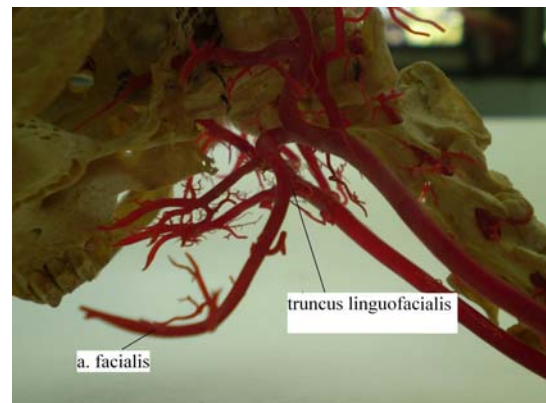
Obr. 2. Odstup *arteria lingualis* z *truncus linguofacialis*



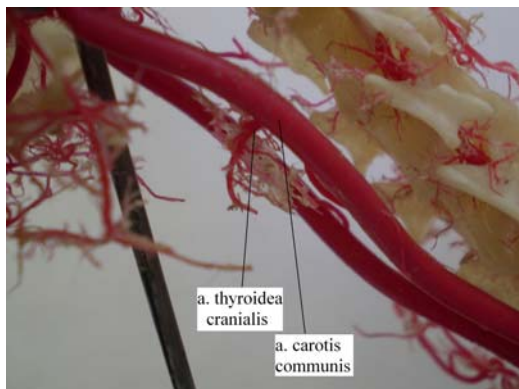
Obr. 3. Odstup *arteria facialis* z *arteria carotis externa*



Obr. 4. Odstup *arteria facialis* z *truncus linguofacialis*



Obr. 5. Odstup *arteria thyroidea cranialis* z *arteria carotis communis*



Obr. 6. Odstup *arteria thyroidea cranialis* z *arteria lingualis*



Na nami pripravených korozívnych preparátoch sme zistili, že *arteria lingualis* odstupuje z *arteria carotis externa* v 7 % prípadov a v 93 % prípadov z *truncus linguofacialis*, *arteria lingualis* z *truncus linguofacialis* odstupovala v 96 % prípadov a z *arteria carotis externa* v 4 % prípadov a *arteria thyroidea cranialis* z *arteria carotis communis* v 97 % prípadov a v 3 % prípadov z *arteria lingualis*. Tieto nami zistené morfológické variácie odstopu ciev svedčia o potrebe venovať sa cievnemu systému kráľika a zachytiť jeho vnútroruhovú interindividuálnu diverzitu. Opísané variácie ciev sú jednými z veľkého počtu, ktoré boli nami zistené. Týka sa to tepien celého arteriálneho systému kráľika.

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, 2000:179-181.
- 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 2003:116.
- Vdoviaková K. Morfológické variácie truncus costocervicalis sinister, arteria intercostalis suprema sinistra, arteria cervicalis superficialis dextra u kráľika, Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu, 2007, II:120-122.

NOVÉ POZNATKY O PARAZITOCCH INVÁZNYCH DRUHOV RÝB VO VODÁCH VÝCHODOSLOVENSKEJ NÍŽINY

Mihok T.¹, Košuthová L.¹, Košuth P.¹, Koščo J.², Jusko J.²

¹Katedra výživy, dietiky a chovu zvierat, Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, UVL, Košice

²Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied Prešovskej univerzity, Prešov

ABSTRAKT

V období október 2007 – júl 2008 bolo vyšetrených helmintologickou pitvou 223 vzoriek rýb. Z toho bolo 164 ks hrúzovca sieťovaného (*Pseudorasbora parva*) z lokality Perínske rybníky na východnom Slovensku, 45 ks býčkovca amurského (*Perccottus glenii*), 10 ks sumčeka čierneho (*Ameiurus melas*) a 4 ks slnečnice pestrej (*Lepomis gibbosus*) všetky pochádzajúce z Východoslovenskej nížiny. V predloženej práci sú prezentované výsledky helmintologického prieskumu zamerané na prevalenciu a intenzitu invadovanosti spomínaného druhu.

ÚVOD

P.tomentosa je holarktický typ, rozšírený v palearktiskej časti Euroazie a Severnej Amerike, parazitujúci v čreve. Definitívny hostitelia sú hlavne z čelade *Cyprinidae* a *Cobitidae*. Často je nájdená aj v čeladiach *Percidae*, *Gadidae*, *Anguillidae*, *Esocidae* a *Siluridae*. Tento druh je často nájdený u akváriových rýb *Lebistes reticulatus* a *Puntius tetrazona*, *Ancistrus sp.* a iných.

N.mogurndae patriaca do rodu *Nippotaenia*, rad *Nippotaeniidea*. Je to malý rad cestód, parazitujúci u šesť druhov sladkovodných rýb pochádzajúcich z Japonska, Číny, Ruska a Nového Zélandu.

Postihnuté ryby trpia inapetenciou, poruchami plávania, majú znížené reflexy, hynú alebo sa stávajú korisťou predátorov. V pokročilých štádiách sa objavuje kachexia, zápalové a degeneratívne zmeny na sliznici čрева. Poškodená črevná sliznica môže byť vstupnou bránou pre ďalších pôvodcov chorôb. Silnejšie napadnutie je doprevádzané nechutenstvom a poruchami trávenia. Ryby chudnú, dochádza k poruchám rastu a výskytu deformít, oslabené ryby majú zníženú obranyschopnosť a znižujú sa ich prírastky. Negatívne sa tiež môžu uplatniť toxické látky produkované týmito helmintami. Terapia nematodóz a cestodóz vo voľných vodách ale aj v rybníčných chovoch sa neprevádza.

MATERIÁL A METODIKA

V období október 2007 – júl 2008 bolo vyšetrených helmintologickou pitvou 223 vzoriek rýb. Z toho bolo 164 ks hrúzovca sieťovaného (*Pseudorasbora parva*) z lokality Perínske rybníky na východnom Slovensku, 45 ks býčkovca amurského (*Perccottus glenii*), 10 ks sumčeka čierneho (*Ameiurus melas*) a 4 ks slnečnice pestrej (*Lepomis gibbosus*) všetky pochádzajúce z Východoslovenskej nížiny. Od každej ryby boli zaznamenané pohlavie, celková a relatívna dĺžka tela a hmotnosť. Nematódy a cestódy izolované z čрева rýb boli fixované horúcim 4% formalínom. Pri identifikácii bol použitý kľúč na určovanie helmintov: podľa Moravec (1994) a Dubinina (1971).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

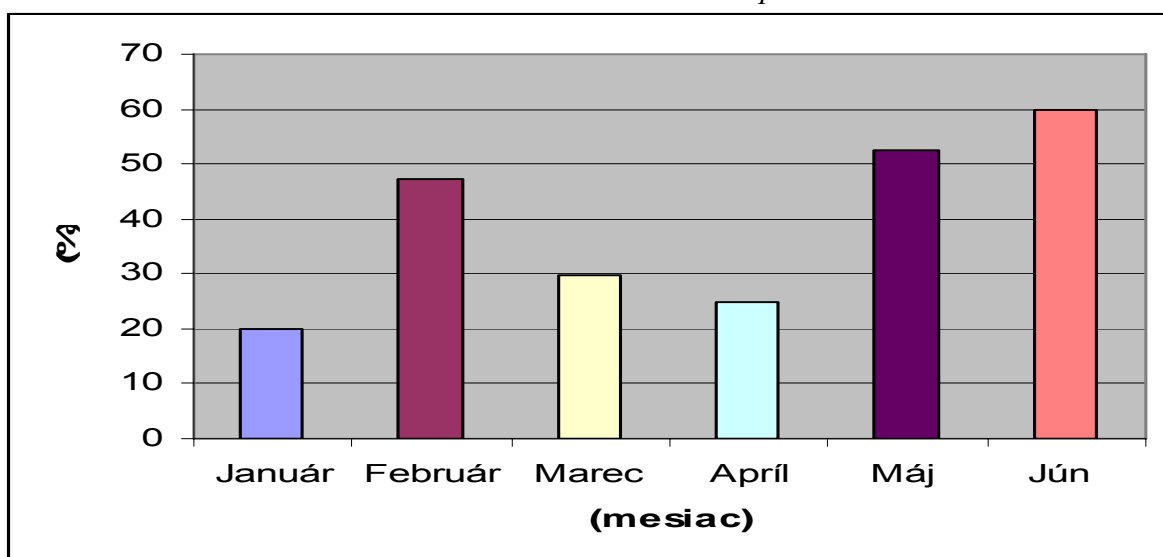
Na základe uskutočnených meraní a prítomnosti typických znakov prislúchajúcich danému druhu, boli nájdené u *P.parva* nematódy identifikované ako *Pseudocapillaria tomentosa*, čelad' *Capillaridae*. Prevalencia – 42,6 % (70/164). Intenzita invázie – do 9 nematódov v jednej rybe.

Je to parazit s priamym vývinovým cyklom. Dopusiaľ bola *P. tomentosa* nájdená u rýb patriacich do čelade *Cyprinidae*, *Cobitidae*, *Percidae*, *Gadidae*, *Anguillidae*, *Esocidae*

a *Siluridae*. Tento druh sa často nachádza aj u akváriových rybách, kde spôsobuje značné straty.

U *P.glenii* boli nájdené cestódy *Nippotaenia mogurndae* patriace do radu *Nippotaeniidea*. Je to parazit s nepriamym vývinovým cyklom. Medzihostiteľmi sú cyklopy. Prevalencia – 8,8 % (4/45). Intenzita invázie – do 12 cestódov v jednej rybe. Je to parazit s nepriamym vývinovým cyklom. Doposiaľ bola *N. mogurndae* popísaná len u *P. glenii* na území Slovenska.

Tab.č.1 Prevalencia nematódov v sledovanom období u *P.parva*



Tab.č.2 Počet vyšetrených vzoriek (N)

Hostiteľ	Druh parazita	N	%
<i>Pseudorasbora parva</i>	<i>Pseudocapillaria tomentosa</i>	164	42,6
<i>Perccottus glenii</i>	<i>Nippotaenia mogurndae</i>	45	8,8
<i>Ameiurus melas</i>	—	10	—
<i>Lepomis gibbosus</i>	—	4	—
Spolu	—	223	33,1

Pseudocapillaria tomentosa je pomerne častým parazitom rôznych druhov sladkovodných a akváriových rýb, ktorá za určitých okolností je schopná spôsobiť pomerne vážne zdravotné ťažkosti až úhyn. Mohli sme sa o tom presvedčiť aj my, v prvej vyšetrovanej skupine spôsobila straty na hmotnosti, stratu únikového reflexu a aj pomerne veľký úhyn.

Výskyt *N.mogurndae* v Európe je očividne spojený s nedávnou introdukciou rybieho hostiteľa ryby - *Perccottus glenii* z jeho pôvodného teritória z povodia rieky Amur v Rusku do riek na Ukrajine, Maďarsku, Poľsku a na Slovensku. Vzhľadom na expanziu tejto ryby spôsobenú schopnosťou prežiť v extrémnych podmienkach a obývať rôzne typy habitatov sa dá predpokladať že táto pásomnica bude hlásená aj z ostatných krajín Európy.

POĎAKOVANIE

Práca bola finančne podporená grantom VEGA č. 1/0718/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dubinina, M. N.: Cestodes from fishes of the River Amur's basin, 1971 *Parasitol. Sb.* 255: 77-119
- Horák, P., Scholz, T.: *Biologie helmintů*, 1998, s. 116-123
- Košuthová, L. Letková, V. Koščo, J. Košuth, P. First record of *Nippotaenia mogurndae* Yamaguti and Miyata, 1940 (Cestoda: Nippotaeniidea), a parasite of *Perccottus glenii* Dybowski, 1877, from Europe. [Journal article] *Helminthologia. SAP - Slovak Academic Press Ltd, Bratislava, Slovakia*: 2004. 41: 1, 55-57. 13 ref.
- Moravec, F.: Parasitic nematodes of freshwater fishes of Europe, 1994, s. 114-118
- Moravec, F., Wolter J., Körtling, W.: *Folia parasitologica*, 46, 1999, s. 296-310
- Navrátil, S., Svobodová, Z., Lucký, Z.: *Choroby rýb*, 1999, s. 98-102

MNOŽSTVO MÄSA AKO KVALITÄTIVNY UKAZOVATEĽ MÄSOVÝCH VÝROBKOV V SLOVENSKEJ REPUBLIKE

Mikulášová M., Turek P., Marcinčák S., Popelka P., Korimová L.,
Katedra hygieny a technológie potravín, UVL, Košice

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo vyrobiť vybrané mäkké mäsové výrobky, stanoviť ich kvalitatívne parametre so zameraním sa na stanovenie čistej svalovej bielkoviny, vypočítať množstva mäsa dvoma spôsobmi („nemecká metóda prepočtu“ a „írsky – FSA metóda prepočtu“) a porovnať výsledky výpočtov s legislatívne stanovenou hodnotou a navzájom. Rozdiely medzi vypočítanými hodnotami a legislatívne danou hranicou množstva mäsa sa javili štatisticky významné (24,45 a 19,36 % rozdiel v priemere), rozdiel medzi výsledkami prepočtu medzi metódami navzájom dosahoval 0-18 %, v priemere 5, 37 %. Ukazovateľ množstvo mäsa v hmotnostných % považujeme za orientačný ukazovateľ (rozdiel vo výpočtoch medzi 2 metódami 0-18 %), ťažko kontrolovateľný, vo väčšine prípadov však veľmi nízko postavený a dôležitý predovšetkým pre spotrebiteľa na rýchlu orientáciu na trhu a nie ako legislatívne stanovený kvalitatívny ukazovateľ. Preto navrhujeme vytvorenie nového legislatívneho predpisu a stanovenie nových kvalitatívnych parametrov, so zameraním sa na ukazovateľ čistú svalovú bielkovinu.

ÚVOD

Za ostatných 13 rokov možno konštatovať pokles kvality mäsových výrobkov, ktorý bol spôsobený predovšetkým tlakom na ekonomický ukazovateľ - cenu mäsového výrobku, realizoval sa formou náhrady mäsovej suroviny v receptúre výrobku, čím došlo k odklonu od typických („tradičných“) technicko-hospodárskych noriem. V súčasnom období slovenskí producenti vyrábajú mäsové výrobky s rovnakým názvom v rôznej kvalite a tým aj v rôznej cene (Lagin a Kročko, 2007; Turek, 2007). Pri hodnotení kvality mäsa sú najdôležitejšími merateľnými parametrami pH hodnota, teplota, elektrická vodivosť a intenzita farby (Schwägele, 1992). Predstavujú dôležité kritériá pri zrení mäsa a pre kvalitu výsledného produktu, medzi inými určujú chuť, mäkkosť, farbu, schopnosť viazať vodu a skladovateľnosť (Peters, 1996). Otázne je, aké kvalitatívne parametre a teda merateľné hodnoty sú určujúce (najvýstižnejšie) pre mäsové výrobky. Túto otázku si riešia jednotlivé krajiny EÚ samostatne, keďže nepatrí do harmonizovanej legislatívy.

Po vstupe Slovenska do EÚ bol pre zabezpečenie konkurencieschopnosti našich výrobcov v mäsiarstve vytvorený nový legislatívny predpis vychádzajúci z legislatívneho predpisu Českej republiky (Vyhláška MZ č. 326/2001 Sb. v znení neskorších predpisov) a to Výnos MP SR a MZ SR z 18. augusta 2005 č. 1985/2004-100, ktorým sa vydáva hlava PK SR upravujúca mäsové výrobky. V súčasnosti je pre skupinu mäkkých mäsových výrobkov stanovená skupina vybraných mäsových výrobkov, kde sú kvalitatívne parametre postavené na ukazovateľoch: množstvo mäsa najmenej v hmot.% a množstvo tuku najviac v hmot.%, ďalej sú stanovené organoleptické požiadavky a požiadavky na zloženie. Ostatné mäkké mäsové výrobky musia spĺňať len požiadavky na kvalitu podľa vnútorného predpisu výrobcu a podľa zásad správnej výrobných praxe. V tomto predpise chýba definícia pojmu mäsový výrobok a vynechalo sa členenie výrobných mias, čo nebola najšťastnejšia voľba, keďže sa tým vlastne stratila väzba mäsových výrobkov na kategorizáciu výrobných mias v receptúre. Stratou tejto nadväznosti zanikla kontinuita medzi receptúrou a finálnym výrobkom, ktorý tým stráca očakávanú a žiadanú akosť.

Ukazovateľ množstvo mäsa v %, (ktorý v našej a aj v českej legislatíve predstavuje kvalitatívny ukazovateľ vo vybraných mäsových výrobkoch), je Európskou úniou zavedený ukazovateľ, ktorý má poskytnúť spotrebiteľovi rýchle, transparentné a dôsledné informácie od

výrobcov mäsových výrobkov a je povinnosťou výrobcov uvádzať ho na obale spolu s označením druhu mäsa. Keďže si bežný spotrebiteľ pod pojmom mäso vždy predstavoval sval, resp. kostrovú svalovinu s bezprostredne prilahlým spojivovým a tukovým tkanivom, je za mäsový výrobok z tohto dôvodu spotrebiteľom považovaná potravina, ktorá je z tejto svaloviny vyrobená. Miera zastúpenia svaloviny vo výrobku je do značnej miery určujúca pre jeho kvalitu a spoločne s cenou výrobku patrí medzi hlavné parametre, podľa ktorých sa spotrebiteľ môže pri nákupe orientovať. Tieto tézy však narážali na skutočnosť, že pre označovanie mäsových výrobkov bola využívaná definícia mäsa prevzatá z veterinárno-hygienických predpisov, ktorá pod pojmom „mäso“ zahrňuje všetky časti jatočných zvierat, ktoré sú vhodné k ľudskej spotrebe. Mäsom pre výrobu mäsových výrobkov tak bola nielen kostrová svalovina, ale aj koža, separát, poživatelné vnútornosti a krv. A tak spotrebiteľ nebol zrozumiteľne informovaný o skutočnej povahe mäsových výrobkov, čo viedlo v niektorých členských krajinách EÚ k prijatiu svojich vlastných národných pravidiel. Takáto rozdielnosť však viedla k nepriaznivému vplyvu na fungovanie vnútorného trhu EÚ (vytváranie prekážok voľného pohybu tovaru). Snaha Európskej komisie o nápravu vzniknutej situácie viedla k zavedeniu harmonizovanej definície mäsa prostredníctvom smernice č. 2001/101/ES (s účinnosťou od roku 2003) (Katina, 2006).

Implementáciou Smernice Komisie 2001/101 EHS do našej právnej úpravy, konkrétne do Výnosu MP SR a MZ SR z 28. apríla 2004 č. 1187/2004 – 100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu SR upravujúca označovanie potravín, vznikla povinnosť pre výrobcov mäsových výrobkov uvádzať na obale množstvo mäsa s označením druhu mäsa, čo je však výkladovo nejasne legislatívne upravené.

MATERIÁL A METODIKA

Vyrábali sme mäsové výrobky zo skupiny vybraných mäkkých mäsových výrobkov s taxatívne udávanými („tradičnými“) názvami v zmysle Technicko – hospodárskych noriem (THN) a stanovovali ich kvalitatívne parametre, so zameraním sa na čistú svalovú bielkovinu. Súčasne boli v postupnosti výroby sledované kvalitatívne parametre výrobného mäsa, ktoré sa podľa delenia v THN používajú na výrobu mäsových výrobkov a taktiež pripraveného diela pre vyrábané mäsové výrobky. Analyticky sme stanovovali obsah vody (ISO 1442), obsah voľného tuku (ISO 1444), obsah dusíka (ISO 937) a hydroxyprolínu (príloha č. 67 Vestníka MP SR z 9. januára 2004, v ktorom sa zverejňuje zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív). Prepočtom sme zistili obsah celkových bielkovín, čistých svalových bielkovín a kolagénu. Štatisticky vyhodnotené analytické ukazovatele mäsa sme využili na výpočet množstva mäsa v jednotlivých výrobkoch-a to podľa „nemeckého systému prepočtu“ (QUID für das Fleischerhandwerk, Deutscher Fleischer-Verband) a „írskeho systému prepočtu“ (FSA – Labelling and Composition of Meat Products, Guidance Notes, 2003).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tabuľke 1 je prehľad kvalitatívnych parametrov pre jednotlivé vybrané mäkké mäsové výrobky so zameraním sa na celkovú bielkovinu, tuk a čistú svalovú bielkovinu. Čistú svalovú bielkovinu sme stanovili odčítaním bielkovín spojivového tkaniva od celkovej bielkoviny, keďže sme pri výrobe nepoužívali žiadne nemäsové bielkoviny. V tabuľke je možné porovnať nami stanovené množstvo tuku s legislatívne daným množstvom tuku najviac v hmotnostných %, pričom u 2 výrobkov je táto hranica prekročená, u Domácej klobásy o 0,02% a u Špekačiek o 1,76%. U ostatných výrobkov je analyticky stanovené množstvo tuku pod legislatívne určenou hranicou, u mnohých výrobkov s veľkým rozdielom, napr. u Šunkovej salámy (rozdiel 13,43%) a Jemných párkov (rozdiel 16,36%).

Pre výpočet množstva mäsa sme využili štatisticky vyhodnotené analytické ukazovatele mäsa, pričom sme pracovali s nemeckým systémom prepočtu a írskym systémom doporučeným FSA (Food Standard Agency, Írsko).

Pri použití nemeckého systému prepočtu a po porovnaní s legislatívne stanovenou hranicou sa vypočítané množstvo mäsa pohybuje v rozmedzí 9-38 % nad stanoveným minimálnym množstvom mäsa v hmotnostných %, pričom v priemere je toto množstvo presiahnuté o 24,45 %. Pre porovnanie pri írskom systéme prepočtu množstva mäsa sa toto rozmedzie pohybovalo medzi 2-33 %, v priemere bola legislatívne stanovená hranica množstva mäsa prekročená o 19,36 %. 24,45 % a 19,36 % rozdiel v množstve mäsa v priemere navyše (voči legislatívne stanovenej hranici množstva mäsa najmenej v hmotnostných %) predstavuje vysokú hodnotu a poukazuje na vytvorený priestor pre výrobcov mäsových výrobkov na náhradu tejto percentuálnej hodnoty množstva mäsa inou surovinou (nemäsovou) voči pôvodnej receptúre. Tieto hodnoty poukazujú aj na skutočnosť, že legislatívne stanovená hranica množstva mäsa (najmenej v hmotnostných %) je diskutabilná (nízko postavená).

Najväčší rozdiel v porovnaní s legislatívne stanovenou hranicou množstva mäsa a nemeckým systémom výpočtu (38 %) bol u Šunkovej salámy (rozdiel pri írskom systéme 25 %) a najmenší (9 %) sme sledovali u Špekačiek (rozdiel pri írskom systéme 5 %).

Pri írskom systéme výpočtu a porovnaní výsledkov s legislatívne danou hranicou množstva mäsa bol najväčší rozdiel sledovaný u Liptovskej salámy (33 %) (rozdiel pri nemeckom systéme 33 %) a najmenší u Jemných párkov (2 %) (rozdiel pri nemeckom systéme 20 %).

Pri porovnaní oboch systémov výpočtu množstva mäsa najväčší rozdiel vo výpočte možno sledovať u Jemných párkov (18 %), ďalší vyšší rozdiel 13 % je u Šunkovej salámy, v priemere je rozdiel 5,37 % (rozmedzie 0-18 %). Množstvo mäsa bolo v 6 prípadoch stanovené vyššie u nemeckého systému, v 2 výrobkoch pri írskom systéme (Súl'ovská a Pohronská klobása) a v 2 výrobkoch bolo identické (Liptovská saláma, Domáca klobása).

Rozdiely vo výsledkoch medzi oboma spôsobmi výpočtu sú pravdepodobne ovplyvnené tým, že pri nemeckom systéme sa zohľadňuje len korekcia na tuk, avšak pri írskom systéme je to korekcia na tuk a aj bielkoviny spojivového tkaniva a množstvo mäsa sa počíta pre každý druh mäsa zvlášť.

V Českej republike sa pod mäsovým výrobkom rozumie podľa Vyhlášky č. 326/2001Sb. v znení neskorších predpisov technologicky opracovaný výrobok obsahujúci ako prevažujúcu základnú surovinu mäso (takáto definícia u nás chýba). Kvalitatívne parametre sú postavené rovnako ako v SR (naša legislatíva čerpala z českej v tejto oblasti) a taktiež majú skupiny vybraných mäsových výrobkov i keď samotné členenie mäsových výrobkov je iné.

V Nemecku sa pod mäsovými výrobkami sa rozumejú výrobky, ktoré pozostávajú výlučne alebo prevažne z mäsa. Pre jednotlivé mäsové výrobky a skupiny mäsových výrobkov sú vždy zadané: východiskový materiál (podľa kategorizácie vychádzajúcej z platnej legislatívy), špecifické znaky a analytické hodnoty. Analytické hodnoty sú založené najmä na ukazovateli - tzv. „BEFFE“ (bindegewebsfreiweisses Fleischeiweiss), teda mäsovej bielkovine bez obsahu bielkovín spojivového tkaniva a na „BEFFE im FE“ (bindegewebsfreiweisses Fleischeiweiss im Fleischeiweiss), teda mäsovej bielkovine bez obsahu bielkovín spojivového tkaniva v mäsovej bielkovine (Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse).

Tab. 1 Stanovené kvalitatívne parametre vybraných mäkkých mäsových výrobkov vyrobených podľa THN spolu s legislatívne stanovenou hranicou množstva tuku najviac v hmotnostných %

	CB [%]	ČSB [%]	Tuk [%]	Legislatívne dané množstvo tuku [najviac v hmotn. %]
Liptovská saláma	11,26 ± 0,36	9,66 ± 0,25	33,04 ± 1,03	35
Parižska saláma	11,12 ± 0,74	9,25 ± 1,10	36,26 ± 2,21	40
Šunková saláma	20,79 ± 1,01	20,05 ± 1,21	6,57 ± 2,51	20
Sliačska saláma	12,25 ± 1,32	9,62 ± 0,79	41,03 ± 2,25	45
Súľovská klobása	15,25 ± 1,11	12,58 ± 0,84	34,34 ± 2,12	40
Domáca klobása	16,03 ± 0,53	14,09 ± 0,42	40,02 ± 2,05	40
Špekáčky	8,38 ± 2,05	5,33 ± 1,42	46,76 ± 3,08	45
Spišské párky	14,13 ± 0,32	11,39 ± 0,28	22,68 ± 1,23	35
Jemné párky	14,60 ± 0,98	9,10 ± 0,83	18,64 ± 1,45	35
Bratislavské párky	15,55 ± 1,65	13,08 ± 1,25	28,53 ± 1,68	35
Pohronská klobása	15,60 ± 0,95	12,92 ± 0,92	32,03 ± 0,92	35

Tab. 2 Vypočítané množstvo mäsa nemeckým a írskym spôsobom prepočtu v porovnaní ku legislatívne stanovenej hranici

	Obsah mäsa stanovený „nemeckou metódou“ [%]	Obsah mäsa stanovený „írskou metódou“ [%]	Obsah mäsa stanovený legislatívne [najmenej v hmotn. %]
Liptovská saláma	83	83	50
Parižska saláma	66	61	50
Šunková saláma	93	80	55
Sliačska saláma	82	75	55
Súľovská klobása	81	83	55
Domáca klobása	90	90	60
Špekáčky	49	45	40
Spišské párky	77	74	45
Jemné párky	70	52	50
Bratislavské párky	75	77	50
Pohronská klobása	78	68	65

POĎAKOVANIE

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

Deutscher Fleischer-Verband QUID fuer das Fleischerhandwerk. Deutscher Fleischer-Verband. 2003; 41.

Labelling and Composition of Meat Products. In: Food Standard Agency [online] Guidance Notes September 2003; <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/meatguidance.pdf>

Lagin L, Kročko M. V čom sú príčiny neuspokojivej kvality mnohých mäsových výrobkov na Slovensku. Maso, 4, 2007; 18-20.

- Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, vom 27. /28. 11. 1994 (Beilage zum Banz. Nr. 134 vom 25. 7. 1975, GMBI Nr. 23 S. 489 vom 25. 7. 1995), zuletzt geändert am 2. 10. 2001 (Banz. Nr. 199 vom 24. 10. 2001, GMBI Nr. 38 S. 754 ff vom 30. 10. 2001). pp 66.
- Katina J. Stanovení obsahu masa v masných výrobcích [online]. <http://www.cszm.cz/clanek.asp?typ=1&id=898>
- Peters H. Qualitätsbewertung von Fleisch und Fleischerzeugnissen. In: Sielaff H.: Fleischtechnologie. 1. Auflage. Hamburg: Behr's Verlag, 1996; 559-606.
- Schwägele F. Erfassung von Qualitätsmerkmalen nach dem Schlachten. In: Qualitätssicherung im Fleischbereich. Bundesanstalt für Fleischforschung, 1992; 48-72.
- Stanovenie obsahu hydroxiprolínu v mäse a mäsových výrobkoch. Vestník Ministerstva pôdohospodárstva SR v ktorom sa zverejňuje zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív, 36, 2004; No. 1, 265-270.
- STN ISO 1442 Mäso a mäsové výrobky. Stanovenie obsahu vody. Bratislava: Slovenský ústav technickej normalizácie, 2001;7.
- STN ISO 1444 Mäso a mäsové výrobky. Stanovenie obsahuvoľného tuku. Bratislava: Slovenský ústav technickej normalizácie, 2002; 8.
- STN ISO 937 Mäso a mäsové výrobky. Stanovenie obsahu dusíka. Bratislava: Slovenský ústav technickej normalizácie, 2001; 8.
- Technicko-hospodárske normy. Bratislava: Mäsový priemysel, Generálne riaditeľstvo trustu, 1989; 435.
- Turek P. Vývoj kvality mäsových výrobkov na Slovensku (Tézy inauguračnej prednášky). Habilitačné a inauguračné spisy UVL v Košiciach, 2007; ISBN 978-80-8077-073-0, 1-42.
- Vyhláška č. 264/2003 Sb., ze dne 6. srpna 2003, kterou se mění vyhláška č. 326/2001 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), g), h), i) a j) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich. Sbírka zákonů, Česká republika, 2003; No. 89: 4354-4370.
- Výnos MP SR a MZ SR z 18. augusta 2005 č. 1895/2004 – 100, ktorým sa vydáva hlava PK SR upravujúca mäsové výrobky. Vestník Ministerstva pôdohospodárstva SR, 37, 2005; No. 22: 29.
- Výnosu MP SR a MZ SR z 28. apríla 2004 č. 1187/2004 – 100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu SR upravujúca označovanie potravín. Vestník Ministerstva pôdohospodárstva SR, 36, 2004; No. 13: 1-16.
- Výnos MP SR a MZ SR zo 17. apríla 2002 č. 811/3/2002 – 100, ktorým sa vydáva hlava PK SR upravujúca mäsové výrobky a jedlé tuky živočíšneho pôvodu, v znení neskorších predpisov. Vestník Ministerstva pôdohospodárstva SR, 34, 2002; No. 12: 16-39.

KOZIE SYRY VO VÝŽIVE ĽUDÍ A ICH KVALITA Z OBCHODNEJ SIETE V KOŠICIACH

Poľáková L.

Ústav hygieny a technológie mlieka, UVL, Košice

ABSTRAKT

V syroch vyrobených z kozieho pasterizovaného mlieka boli sledované senzorické vlastnosti (vzhľad, chuť, vôňa, textúra, doznievanie chuti, celková kvalita a intenzita chute a vône), fyzikálno-chemické parametre (sušina, voda v beztukovej sušine, tuk v sušine) a mikrobiologická kvalita syrov (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*). Na základe obsahu vody v beztukovej sušine (68,6 % - 81,0 %) boli kozie syry zadené do skupiny čerstvých syrov. Podľa množstva tuku v sušine (40,4 – 62,26 %) syry patrili do kategórie stredne tučných (1 vzorka) a plnotučných syrov (9 vzorky). Rozdiel v obsahu sušiny a tuku v sušine (tvs) v nami vyšetrených vzorkách syrov sa výrazne nelíšil od hodnôt deklarovaných na obale jednotlivými výrobcami syrov. Obsah sušiny sa v kozích syroch pohyboval od 28,0 % do 50,8 % verus 27,0 – 54,0 % (originálne balenie syrov), resp. 40,4 – 62,26 % oproti 40,0 – 50 % pre obsah tvs. Množstvo tvs môže byť nižšie o 2 hmotnostné percentá v porovnaní s deklarovanou hodnotou. Obsah tvs u mäkkých syrov kolíše od 40 – 65 % a rovnako obsah tvs deklarovaný výrobcami kozích syrov sa pohyboval v tomto rozpätí. Koncentrácia NaCl v nami vyšetrených o vzorkách sa pohybovala od 0,6 % do 3,0 %.

Stanovené počty koliformných baktérií sa u čerstvých prírodných kozích syrov pohybovali v rozpätí od < 1 KTJ. g⁻¹ do 10⁵ KTJ. g⁻¹, resp. v rozpätí < 1 KTJ . g⁻¹ – 10⁴ KTJ. g⁻¹ u prírodných kozích syrov zrejúcich. *E. coli* nebola izolovaná ani v jednom prípade. Počty stafylokokov sa pohybovali v priemere 10⁵ KTJ. g⁻¹ u čerstvých kozích syrov, resp. 10⁴ KTJ. g⁻¹ u syrov zrejúcich. Listérie rovnako ako *L. monocytogenes* neboli izolované ani v jednom prípade. Medzi jednotlivými druhmi kozích syrov v senzorickom komisionálnom hodnotení boli štatisticky významné rozdiely, a to v hodnotení vône (4 – 8), textúra, doznievanie chuti, celková kvalita (5 – 8), s hodnotou P < 0, 05. Respondentom sa chuť kozích syrov páčila až mimoriadne páčila (7 – 8). Na otázku či by si kúpili kozie výrobky respondenti odpovedali "áno".

ÚVOD

V poslednej dekáde v západnej spoločnosti klesá konzumácia mlieka a mliečnych výrobkov (Anonymus, 2003). Insel a kol (2004) tento trend čiastočne vysvetľujú tvrdením negatívneho zdravotného účinku mlieka a mliečnych výrobkov, ktoré vzniklo domnienkou, že mliečny tuk s vysokou frakciou nasýtených mastných kyselín prispieva k vzniku srdcových ochorení, k zvyšovaniu hmotnosti a k vzniku obezity. Niekoľko intervenčných štúdií ukázalo, že diéta obsahujúca nízkotučné mliečne produkty má priaznivé zmeny na sérový cholesterol (Sanstrom a kol., 1992; Seidel a kol., 2005). Avšak konzumácia mliečného tuku má menej výrazné účinky na sérové lipidy ako sa predpokladá z obsahu tuku (Bosaeus, 1991; Eichholzer a kol., 1993). Elwood a kol. (2004) nezistili koreláciu u osôb s vysokou konzumáciou mliečného tuku a rizikom kardiovaskulárneho ochorenia. Lipidové zloženie kozieho mlieka je jednou z najdôležitejších zložiek jeho technologickej a nutričnej kvality. Je spojené s výťažnosťou syrov a jeho senzorickými vlastnosťami, ako je konzistencia, farba a vôňa (Delacroix - Buchet a Lamberet, 2000).

Syry sa vyznačujú relatívne vysokou koncentráciou esenciálnych živín v porovnaní s ich energetickou hodnotou. Výživová hodnota syrov kolíše od mlieka použitého na výrobu syrov, od použitej štartovacej kultúry a nakoniec aj od podmienok zretia syrov. Bielkoviny syrov, najmä kazeín majú nízky obsah aminokyselín s obsahom síry, preto ich výživová hodnota je nižšia ako je celkový obsah bielkovín v mlieku. Ultrafiltrácia mlieka využívaná

v mliekarstve pred vlastnou technologickou výrobou syrov sa môže využívať na vychytávanie srvátkových bielkovín, čím sa zvýši výživová hodnota bielkovín syra. Progresívna degradácia kazeínov počas zrenia ešte zvyšuje ich stráviteľnosť. Obsah tuku v syroch je rovnako esenciálny. Znižovanie obsahu tuku v syroch má ale nepriaznivý vplyv na vôňu a reologické vlastnosti syrov (Henning a kol., 2006).

Cieľom práce bolo zistiť záujem konzumentov o syry vyrobené z kozieho mlieka z obchodnej siete v Košiciach, ako aj senzorické vlastnosti, fyzikálno - chemické parametre a mikrobiologickú kvalitu kozích syrov zakúpených v obchodnej sieti v Košiciach.

MATERIÁL A METODIKA

V období máj – jún 2008 bolo v obchodnej sieti v Košiciach zakúpených 10 vzoriek syrov vyrobených z kozieho mlieka (EÚ) v originálnom balení (2 - 3 ks v závislosti od hmotnosti balenia, alebo v prípade predaja na hmotnosť, boli zakúpené vzorky kozích syrov o hmotnosti 200 g). V syroch sa sledovali senzorické vlastnosti kozích syrov (vzhl'ad, chuť, vôňa, textúra, doznievanie chute, celková kvalita a intenzita chute a vône), fyzikálno-chemické parametre (sušina, voda v beztukovej sušine, tuk v sušine) a mikrobiologická kvalita syrov (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*). Senzorickej analýzy sa zúčastnili siedmi študenti dennej formy doktorandského štúdia na UVL v Košiciach, ktorí súhlasili s účasťou na experimente. Vzorky kozích syrov sa servírovali o veľkosti 2 x 4 cm, v prípade mäkkých syrov sa jednalo o vzorky o hmotnosti 10 g. Na neutralizáciu chuti medzi jednotlivými vzorkami kozích syrov mali hodnotitelia k dispozícii biele pečivo. Vo vzorkách sa hodnotili vybrané senzorické vlastnosti kozích syrov (vzhl'ad, chuť, vôňa, textúra, doznievanie chute, celková kvalita), a to hedonickou stupnicou od mimoriadne sa mi nepáči (0) až do mimoriadne sa mi páči (9). Päťbodovou stupnicou sa hodnotila intenzita vône a chuti od nevnímateľná (0) do veľmi silno vnímateľná (5).

Fyzikálno-chemické parametre kozích syrov boli stanovené nasledovne: stanovenie sušiny metódou sušením do konštantnej hmotnosti, tuk v sušine (tvs) výpočtom podľa vzťahu $s : t = 100 : x$, kde x je obsah tvs v %, s = sušina v % a t = tuk v %. Stanovenie chloridu sodného bolo prevedené prevádzkovou metódou, a to extrakciou vodou a titráciou dusičnanom strieborným. Všetky uvedené fyzikálno-chemické parametre boli stanovené paralelne a výsledky sú uvedené ako aritmetický priemer.

Pri mikrobiologickom vyšetrení vzoriek kozích syrov boli z každej vzorky kozieho syra urobené príslušné desaťnásobné riedenia, ktoré boli očkované na povrch selektívnych agarov a inkubované podľa druhu sledovaného mikrobiologického ukazovateľa. Na izoláciu koliformných baktérii ako indikátorov možnej prítomnosti črevných patogénov, resp. indikátorov znečistenia fekálneho pôvodu sme použili Endov agar (Hi Media) metódou rozterom, inkubáciou za aerobných podmienok pri 37 °C 24 – 48 hod. Suspektné kolónie *E. coli* charakteristické svojím sfarbením a kovovým leskom a zmenou Endovej pôdy boli konfirmované použitím biochemických testov (schopnosť vytvárať z tryptofánu indol a dôkaz aktivity enzýmu β - d - glukuronidázy) a rozterom na krvnom agare na dôkaz prípadných hemolytických kmeňov *E. coli*. Na izoláciu *S. aureus* sme použili 0,1 ml vzorky syrov príslušného desaťnásobného riedenia, ktoré sme rozotrelí na povrch Baird-Parker agaru s vaječnou emulziou a teluricitanom draselným (Hi media) a inkubovali aerobne pri 37 °C po dobu 24 – 48 hod. Následne sme previedli konfirmáciu vybraných typických a atypických kolónií koagulázovým testom (Imuna Šarišské Michal'any) a upravili počet kolónií na miskách podľa výsledkov konfirmácie. Na izoláciu listérií (*L. monocytogenes*) vo vzorkách kozích syrov bol použitý PALCAM agar (Hi Media). Prvé riedenie z každej vyšetrovanej vzorky kozieho syra bolo inkubované 48 hod. pri teplote 35 °C za mikroaerofilných podmienok.

Na štatistické spracovanie výsledkov bol použitý program Graph Pad Prism 5 Demo.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkovo bolo vyšetrených 10 druhov kozích syrov vyrobených z pasterizovaného mlieka. Na základe obsahu vody v beztukovej sušine (68,6 % - 81,0 %) boli kozie syry zadelené do skupiny čerstvých syrov. Podľa množstva tuku v sušine (40,4 – 62,26 %) syry patrili do kategórie stredne tučných (1 vzorka) a plnotučných syrov (9 vzorky). Rozdiel v obsahu sušiny a tuku v sušine (tvs) v nami vyšetrených vzorkách syrov sa výrazne nelíšil od hodnôt deklarovaných na obale jednotlivými výrobcami syrov.

Obsah sušiny sa v kozích syroch pohyboval od 28,0 % do 50,8 % verzus 27,0 – 54,0 % (originálne balenie syrov), resp. 40,4 – 62,26 % oproti 40,0 – 50 % pre obsah tvs. Množstvo tvs môže byť nižšie o 2 hmotnostné percentá v porovnaní s deklarovanou hodnotou. Obsah tvs u mäkkých syrov kolíše od 40 – 65 % (Janštová a kol., 2007), rovnako obsah tvs deklarovaný výrobcami kozích syrov sa pohyboval v tomto rozpätí. Nami zistené výsledky rovnako viac alebo menej korelovali s údajmi uvedenými na etikete syrov.

Koncentrácia NaCl v syroch sa môže pohybovať v rozmedzí 0,7 – 4,5 % závislosti od druhu syra. Vo vzorkách sa koncentrácia chloridu sodného pohybovala od 0,6 % do 3,0 %. Koncentrácia NaCl v jednotlivých vzorkách kozích syrov nebola uvedená na etiketách ani v jednom prípade. V štyroch prípadoch výrobca uviedol v zložení, že výrobok obsahuje jedlú soľ. Podobné výsledky uvádzajú aj Janštová a kol. (2007). Solenie je nevyhnutným krokom pri výrobe syrov. Soľ je základnou zložkou syrov s ohľadom na jeho trvanlivosť, chuťnosť, konzistenciu atď.. Obsah soli môže byť štatisticky rozdielny nielen medzi druhmi syra, ale aj medzi syrmi jednej šarže. Veľa druhov syrov obsahuje približne 2 % soli (Walstra a kol., 1999).

Stanovené počty koliformných baktérii sa u čerstvých prírodných kozích syrov pohybovali v rozpätí od < 1 KTJ. g^{-1} do 10^5 KTJ. g^{-1} , resp. v rozpätí < 1 KTJ. g^{-1} – 10^4 KTJ. g^{-1} u prírodných kozích syrov zrejúcich. *E. coli* nebola izolovaná ani v jednom prípade. Počty stafylokokov sa pohybovali v priemere 10^5 KTJ. g^{-1} u čerstvých kozích syrov, resp. 10^4 KTJ. g^{-1} u syrov zrejúcich. Listérie rovnako ako *L. monocytogenes* neboli izolované ani v jednom prípade.

Medzi jednotlivými druhmi kozích syrov v senzorickej komisionálnej hodnotení boli štatisticky významné rozdiely, a to v hodnotení vône (4 – 8), textúra, doznievanie chuti, celková kvalita (5 – 8), s hodnotou $P < 0,05$. Respondentom sa chuťnosť kozích syrov páčila až mimoriadne páčila (7 – 8). Na otázku či by si kúpili kozie výrobky respondenti odpovedali "áno". Na zlepšovanie senzorickej vlastností kozích syrov možno využívať rôzne technologické postupy. Príkladom môže byť využitie ohmického spôsobu výroby kozích syrov portugalskej proveniencie (doposiaľ výrobné tajomstvo), ktoré nemalo vplyv na vznik významných rozdielov v senzorickej hodnotení kozích syrov vyrobených týmto spôsobom oproti kozím syrom vyrobených tradičnou technológiou (Staruch a kol., 2007).

Álvarez a kol. (2006) uvádzajú, že na zlepšenie fyzikálnych, chemických a senzorickej vlastností kozích syrov má vplyv aj správne zloženie kŕmnej dávky dojnych kôz, nakoľko zloženie kŕmnej dávky má významný vplyv na zloženie mastných kyselín so stredným reťazcom tuku v syroch (C_6 až C_{14}), obsahom ktorých vzniká v kozích syroch vyhľadávaný typický „kozí flavour“.

Z výsledkov porovnania odpovedí respondentov pre ukazovatele chuti a vône syrov vyplynulo, že najvýraznejšou chuťou bola typická mliečna chuť a vôňa kozích syrov s typickým „kozím flavourom“. Na typickej vôni a chuti kozieho mlieka a výrobkov sa podieľa predovšetkým obsah mastných kyselín so stredným reťazcom (Ha a Lindsay, 1993), ktoré môžu veľmi meniť obsah voľných mastných kyselín, ktoré majú hlavnú úlohu práve v tomto výraznom „kozom flavoure“ (Chilliard a kol., 2003, Álvarez a kol., 2006).

Záverom možno konštatovať, že nami vyšetrené syry vyrobené z kozieho mlieka boli respondentmi hodnotené kladne, rovnako, ako chemické parametre kvality, ktoré korelovali s údajmi uvedenými na etiketách vyšetrených druhov syrov. To znamená, že syry vyrobené z kozieho mlieka môžu v blízkej budúcnosti predstavovať obohatenie jedálneho lístka aj slovenských spotrebiteľov, hoci na základe našich výsledkov senzorického hodnotenia, niektoré typické senzorické vlastnosti („kozí flavour“) boli našimi respondentmi hodnotené skôr ako negatívne.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená agentúrou VEGA SR č. 1/3493/06. Ďakujeme p. A. Sobotovej, A. Kiktovej a A. Jánošíkovej za technickú spoluprácu a laboratórne spracovanie vzoriek.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Álvarez, S., Fresno, M., Méndez, P., Castro, N., Fernández, J.R., Sanz Sampelayo, M.R.: Alternatives for improving physical, chemical, and sensory characteristics of goat cheeses: the use of arid-land forages in the diet. *J. Dairy Sci.*, 2006, 90, 2181-2188.
- Anonymus: Utviklingen i norsk kosthold : Rapport fra Sosial og helsedirektoratet, Norway, 2003.
- Bosaeus, I.: Milk and cholesterol. *Vår Föda*, 1991, 43, 98-101.
- Delacroix- Buchet, A., Lamberet, G.: Sensorial properties and typicity of goat dairy products. In: *Proceed. 7th Int. Conf. On Goats, Tours, France, 15-21 May 2000. Tome 2, 559-663.*
- Eichholzer, M., Stahelin, H.: Is there a hypocholesterolemic factor in milk and milk products? *Int. J. Vita. Nutr. Res.*, 1993, 63, 3, 158-167.
- Henning DR, Baer RJ, Hassan AN, Dave R :Major advances in concentrated and dry milk products, cheese, and milk fat-based spreads. *J. Dairy Sci.* 2006, 89, 4, 1179-88.
- Jantošová, B., Dračková, M., Přidalová, H., Navrátilová, P., Vorlová, L.: Sledování jakosti kozích sýrů z produkce farmy v České republice. In: *Zb. Hygiena Alimentorum XXVIII. Štrbské Pleso, 2.-4. máj 2007, 229-231.*
- Insel, P., Turner, RE., Ross, D.: *Nutrition. Second edition. American dietetic association, Jones and Bartlett, USA, 2004.*
- Sanstrom B., Marckmann, P., Bindslev N: An eight-month controlled study of a low-fat high-fibre diet: effects on blood lipids and blood pressure in healthy young subjects. *Eur J. Clin. Nutr.*, 1992, 46 : 95-109.
- Seidel, C., Deufel, T., Jahreis, G.: Effects of fat-modified dairy products on blood lipids in humans in comparison with other fats. *Ann. Nutr. Metab.*, 2005, 49: 42-48.
- Staruch, L., Polakovič, M., Greifová, M., Schmidt, Š., Pipek, P.: Senzorické hodnotenie kozieho syra. In: *Zb. Hygiena Alimentorum XXVIII. Štrbské Pleso, 2.-4. máj 2007, 274-279.*

STANOVENIE STRÁVITEĽNOSTI VYBRANÝCH KRMÍV DVOJSTUPŇOVOU METÓDOU IN VITRO

Šamudovská A., Demeterová M.

Katedra výživy, dietiky a chovu zvierat, UVL, Košice

ABSTRAKT

V laboratórnych podmienkach bola stanovená stráviteľnosť sušiny, organickej hmoty a dusíkatých látok deviatich rôznych krmív a dvoch kompletných krmných zmesí použitím dvojstupňovej metódy in vitro simulujúcej trávenie v žalúdku a v tenkom čreve monogastrických zvierat. Koeficienty stráviteľnosti živín vybraných krmív stanovené po 6 hodinovej inkubácii vzoriek v roztoku pepsínu a po 18 hodinovej inkubácii v roztoku pankreatínu v inkubátore Daisy II pri 39 °C boli porovnateľné s literárnymi údajmi. V hodnotení vzťahu stráviteľnosti organickej hmoty a dusíkatých látok k obsahu neutrálnodetergentnej vlákniny bola zistená negatívna korelácia ($r = 0,97$; $r = 0,46$).

ÚVOD

Pri výbere krmných komponentov do krmných dávok pre hospodárske zvieratá je potrebné zohľadniť nielen zloženie jednotlivých krmív, ale aj množstvo stráviteľných živín. Na určenie stráviteľnosti živín sa môžu použiť metódy in vivo alebo menej časovo náročné a ekonomickejšie metódy in vitro (Boisen a Fernández, 1997). Väčšina metód in vitro simulujúcich trávenie v tráviacom trakte monogastrických zvierat je založená na fakte, či výsledkom procesu trávenia je rozpustný (prípadne aj neprecipitovateľný) alebo dialyzovateľný produkt. V závislosti od toho sú tieto produkty oddelené od nestrávených zvyškov filtráciou, ultrafiltráciou, centrifugáciou alebo dialýzou (Boisen a Eggum, 1991). Pre stanovenie ileálnej stráviteľnosti živín sa môže použiť jedноступňová alebo dvojstupňová metóda s použitím purifikovaných enzýmov, pankreatínu alebo intestinálnej tekutiny (Löwgren a kol., 1989; Babinszky a kol., 1990) a pre stanovenie celkovej stráviteľnosti trojstupňová metóda, v ktorej je mikrobiálna fermentácia prebiehajúca v hrubom čreve simulovaná použitím živých baktérii z intestinálnej alebo bachorovej tekutiny alebo použitím mikrobiálnych enzýmov (Vervaeke a kol., 1989; Boisen a Fernández, 1997; Wilfart a kol. 2007). Stráviteľnosť in vitro môže byť ovplyvnená špecifickosťou a aktivitou enzýmov, množstvom vzorky a veľkosťou častíc vzorky. Aktivitu enzýmov ovplyvňuje dĺžka inkubácie, teplota, pH a prítomnosť aktivátorov a inhibítorov v krmive (Boisen a Eggum, 1991). Na základe hodnotenia viacerých štúdií stráviteľnosti in vitro Boisen a Eggum (1991) odporúčajú 6 hodinovú inkubáciu v roztoku pepsínu a 18 hodinovú inkubáciu v roztoku pankreatínu pre stanovenie ileálnej stráviteľnosti.

Cieľom práce bolo stanovenie stráviteľnosti sušiny, organickej hmoty a dusíkatých látok vybraných krmných komponentov a dvoch kompletných krmných zmesí použitím dvojstupňovej metódy in vitro (pepsín-pankreatín) simulujúcej trávenie v žalúdku a v tenkom čreve monogastrických zvierat na prístroji Daisy II inkubátor a zistenie vzťahu stráviteľnosti organickej hmoty a dusíkatých látok k obsahu neutrálnodetergentnej vlákniny v sledovaných krmivách.

MATERIÁL A METODIKA

165 vzoriek deviatich vybraných krmív (pšenica, kukurica, jačmeň, tritikale, pšeničné otruby, sójový extrahovaný šrot (SEŠ), plnotučná sója (FFSB), hrach, slnečnicový extrahovaný šrot) a dvoch kompletných krmných zmesí pre brojlerové kurčatá (bez a s obsahom tepelne ošetrenej FFSB) ($n = 15$) bolo analyzovaných in vitro na prístroji Daisy II inkubátor pre stanovenie stráviteľnosti sušiny (S), organickej hmoty (OH) a dusíkatých látok (NL) (metóda

podľa Boisen a Egguma, 1991) a pre vyjadrenie závislosti stráviteľnosti organickej hmoty a dusíkatých látok od obsahu neutrálnodetergentnej vlákniny (NDF) v krmivách.

Z každého krmiva, pomletého na veľkosť častíc 1 mm, bolo navážených po 5 g do 15 nylónových vrecúšok (5 x 10 cm, Ankom Technology), ktoré boli po zatavení vložené do inkubačnej fľaše s objemom 2 L. Celkovo do jednej inkubačnej fľaše bolo vložených 30 vrecúšok. K vzorkám vo fľaši boli pridané 2 L roztoku 0,1 N HCl upraveného na hodnotu pH 2,0, a 2 g pepsínu (P-7000) a teplota roztoku bola upravená na 39 °C. Fľaše boli po uzavretí vložené do inkubátora Daisy II a obsah bol inkubovaný 6 hodín pri 39 °C za konštantnej rotácie. Po inkubácii boli vrecúška premyté studenou tečúcou vodou, vložené opäť do inkubačnej fľaše s 2 L roztoku pankreatínu (2 L M KH₂PO₄ pufru s pH upraveným na hodnotu 6-8 a 6 g pankreatínu (P-7545) obsahujúceho amylázu, trypsín, lipázu, ribonukleázu, proteázu) predhriateho na 39 °C a inkubované 18 hodín pri uvedenej teplote za konštantnej rotácie. Po inkubácii boli vrecúška premývané studenou tečúcou vodou, pokiaľ odtekajúca voda nebola číra, sušené 4-5 hodín v sušiarňi pri 65 °C a odvážené.

Obsah živín vo vybraných krmivách, kompletných krmných zmesiach a vo zvyškoch po inkubácii bol stanovený analytickými metódami podľa Výnosu MP SR č. 2145/2004-100 a koeficienty stráviteľnosti (KS) boli vypočítané podľa vzťahu:

$$KS = \frac{(A \times N) - (B \times Z)}{(A \times N)} \times 100$$

A – obsah sušiny, organickej hmoty alebo dusíkatých látok v navážke [g]; N – hmotnosť navážky [g]; B – obsah sušiny, organickej hmoty alebo dusíkatých látok vo zvyšku [g]; Z – hmotnosť zvyšku [g]

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Obsah živín v analyzovaných krmivách, kompletných krmných zmesiach a vo zvyškoch po inkubácii, ktorých stráviteľnosť bola stanovená, a obsah NDF v krmivách je uvedený v tabuľke 1.

Tabuľka 1. Obsah živín vo vzorkách a vo zvyškoch po strávení jednotlivých krmív a krmných zmesi

	Vzorka				Zvyšok		
	Sušina [g]	Popol [g/kg S]	NL [g/kg S]	NDF [g/kg S]	Sušina [g]	Popol [g/kg S]	NL [g/kg S]
Pšenica	879,8	17,3	99,3	124,2	934,9	15,9	46,7
Kukurica	891,9	13,1	78,9	110,7	925,7	8,9	41,0
Jačmeň	898,4	20,3	83,9	162,7	947,8	19,4	44,6
Tritikale	893,0	17,3	112,6	120,3	908,3	13,9	42,2
Pšeničné otruby	892,0	50,9	150,5	413,2	938,7	16,7	50,0
SEŠ	931,7	69,8	457,9	78,1	917,0	46,6	79,5
FFSB	928,9	53,1	350,8	208,1	944,9	27,8	162,8
Hrach	888,6	28,2	174,7	130,1	924,1	21,4	46,1
Slniečnicový EŠ	912,4	56,9	301,6	428,9	938,3	33,7	41,2
KZ bez FFSB	889,8	62,0	195,1	–	910,9	38,9	63,8
KZ s FFSB	886,9	64,2	197,1	–	916,6	36,5	122,8

Pri hodnotení ileálnej stráviteľnosti sušiny, popola a dusíkatých látok vybraných krmív sme zistili najvyšší KS sušiny a organickej hmoty u pšenice (85,72 %; 85,68 %) a najvyšší KS dusíkatých látok u sójového extrahovaného šrotu (97,28 %) (Tab. 2.). Najnižší KS sušiny, organickej hmoty a dusíkatých látok bol zaznamenaný u pšeničných otrúb (50,05 %; 47,97 %; 84,23 %). Nami zistené hodnoty koeficientov stráviteľnosti sú porovnateľné s literárnymi

údajmi, ktoré sú uvedené v tabuľke 3. Vyššie rozdiely v niektorých hodnotách môžu byť spôsobené použitím inej odrody krmiva a inými podmienkami stanovenia.

Tabuľka 2. Koefficienty stráviteľnosti sušiny, organickej hmoty a dusíkatých látok [%] (\pm STD)

	Sušina	OH	NL
Pšenica	85,72 \pm 0,82	85,68 \pm 0,83	93,68 \pm 0,36
Kukurica	77,30 \pm 1,70	77,18 \pm 1,70	88,64 \pm 0,85
Jačmeň	75,91 \pm 0,54	75,85 \pm 0,54	87,86 \pm 0,27
Tritikale	84,20 \pm 0,50	84,13 \pm 0,50	94,18 \pm 0,18
Pšeničné otruby	50,05 \pm 0,85	47,97 \pm 0,89	84,23 \pm 0,27
SEŠ	84,08 \pm 0,48	84,21 \pm 0,50	97,28 \pm 0,09
FFSB	73,09 \pm 0,63	72,30 \pm 0,65	87,72 \pm 0,29
Hrach	74,28 \pm 0,55	74,05 \pm 0,56	93,47 \pm 0,14
Slniečnicový EŠ	50,33 \pm 1,95	48,93 \pm 2,00	93,40 \pm 0,26
KZ bez FFSB	64,53 \pm 1,38	63,50 \pm 1,42	88,67 \pm 0,44
KZ s FFSB	63,97 \pm 1,24	62,70 \pm 1,28	78,28 \pm 0,75

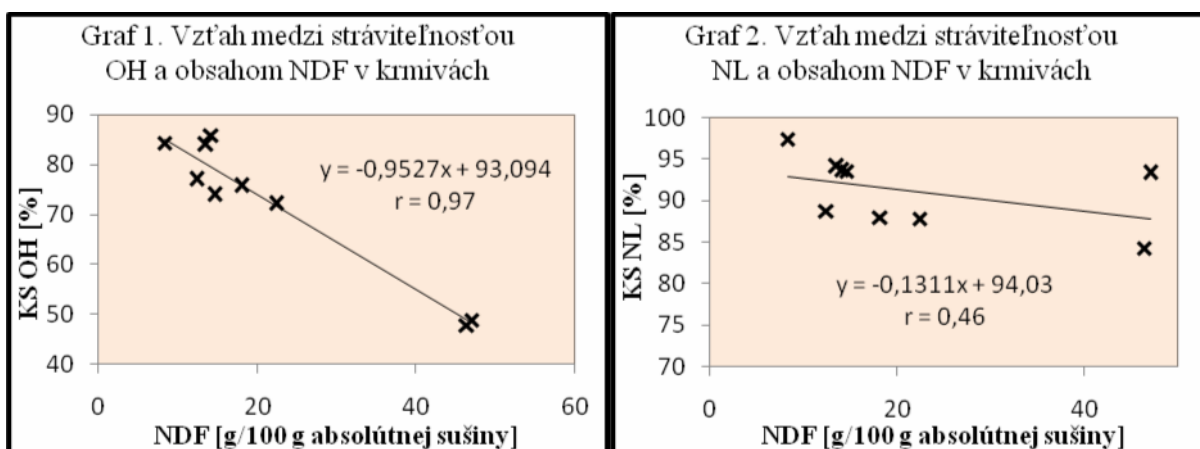
Tabuľka 3. Literárne údaje stráviteľnosti organickej hmoty a dusíkatých látok [%]

Krmivo	KS	Literárny zdroj	Metóda
Pšenica	OH: 77	Wilfart a kol. (2007)	In vitro
	NL: 79,9	Ravindran a kol. (1999)	In vivo – hydina
	95,8	Jondreville a kol. (2001)	In vivo – ošípané
	92	Taverner a Farrell (1981)	In vitro
Kukurica	NL: 74,4	Ravindran a kol. (1999)	In vivo – hydina
	94,8	Jondreville a kol. (2001)	In vivo – ošípané
	90	Monforte-Braga a kol. (2006)	In vivo – hydina
Jačmeň	OH: 73	Wilfart a kol. (2007)	In vitro
	NL: 88,2	Jondreville a kol. (2001)	In vivo – ošípané
	88	Taverner a Farrell (1981)	In vitro
Tritikale	NL: 97,7	Jondreville a kol. (2001)	In vivo – ošípané
Pšeničné otruby	OH: 56	Wilfart a kol. (2007)	In vitro
	NL: 60	Monforte-Braga a kol. (2006)	In vivo – hydina
SEŠ	OH: 76	Wilfart a kol. (2007)	In vitro
	NL: 79,3	Ravindran a kol. (1999)	In vivo – hydina
	94	Monforte-Braga a kol. (2006)	In vivo – hydina

KS živín plnotučnej sóje bol nižší v porovnaní s KS živín sójového extrahovaného šrotu, čo predstavuje 13,07 % rozdiel pre sušinu, 14,14 % rozdiel pre organickú hmotu a 9,83 % rozdiel pre dusíkaté látky. Nižšie KS boli zistené aj u kompletnej kŕmnej zmesi s obsahom tepelne ošetrenej plnotučnej sóje (S – 63,97 %; OH – 62,70 %; NL – 78,28 %) v porovnaní s kompletnou kŕmnou zmesou, ktorá ju neobsahovala (S – 64,53 %; OH – 63,50 %; NL – 88,67 %). Nižšiu ileálnu stráviteľnosť sušiny a dusíkatých látok kŕmnej zmesi obsahujúcej plnotučnú sóju v porovnaní s kŕmnou zmesou obsahujúcou sójový extrahovaný šrot zaznamenali aj Fan a kol. (1995), ktorí stanovovali stráviteľnosť metódou in vivo na ošípaných použitím oxidu chromitého ako markera.

V hodnotení vzťahu stráviteľnosti organickej hmoty k obsahu neutrálnodetergentnej vlákniny krmiva bola zistená vysoká regresná závislosť ($r = 0,97$), čo vyjadruje závislosť stráviteľnosti organickej hmoty od obsahu vlákniny (Graf 1.). So zvyšujúcim sa obsahom vlákniny v

krmive sa znížila stráviteľnosť organickej hmoty - negatívna korelácia. Aj pri hodnotení vzťahu stráviteľnosti dusíkatých látok k NDF bola zistená negatívna korelácia, ale nižšia regresná závislosť ($r = 0,46$) (Graf 2.).



V práci uvedené výsledky sú predbežné a pre potvrdenie ich správnosti bude potrebné odskúšať aj iné postupy a takto získané výsledky porovnať s hodnotami in vivo, čo bude cieľom našej ďalšej práce.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla za podpory výskumného zámeru č.1/0677/08 – Nutrično-dietetické hodnotenie krmív vo vzťahu k metabolizmu živín a produkčným ukazovateľom u monogastrických zvierat

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Babinszky L, van der Meer JM, Boer H, den Hartog LA. An in-vitro method for prediction of the digestible crude protein content in pig feeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1990; 50: 173-178.
- Boisen S, Eggum BO. Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews* 1991; 4: 141-162.
- Boisen S, Fernández JA. Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by in vitro analyses. *Animal Feed Science Technology* 1997; 68: 277-286.
- Fan MZ, Sauer WC, de Lange CFM. Amino acid digestibility in soybean meal, extruded soybean and full-fat canola for early-weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology* 1995; 52: 189-203.
- Jondreville C, van den Broecke J, Gatel F, Grosjean F, van Cauwenberghe S, Sève B. Ileal digestibility of amino acids and estimates of endogenous amino acid losses in pigs fed wheat, triticale, rye, barley, maize and sorghum. *Anim. Res.* 2001; 50: 119-134.
- Löwgren W, Graham H, Aman P. An in vitro method for studying digestion in the pig. 1. Simulating digestion in the different compartments of the intestine. *British Journal of Nutrition* 1989; 61: 673-687.
- Monforte-Braga G, Sarmiento-Franco L, Capetillo-Leal C, Santos-Ricalde R, Segura-Correa J. Comparison of two dietary markers in the determination of amino acid digestibility in some foodstuffs for growing broiler chickens. 2006, dostupné na internete <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200009&lng=es&nrm=iso>
- Ravindran V, Cabahug S, Ravindran G, Bryden WL. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. *Poultry Science* 1999; 78: 699-706.

- Taverner MR, Farrell DJ. Availability to pigs of amino acids in cereal grains. *Br. J. Nut.* 1981; 46: 181-192.
- Vervaeke I J, Dierick NA, Demeyer DI, Decuypere JA. Approach to the energetic importance of fibre digestion in pigs. II. An experimental approach to hindgut digestion. *Animal Feed Science and Technology* 1989; 23: 169-194.
- Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky z 23. augusta 2004 č. 2145/2004-100, ktorým sa mení a dopĺňa výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky zo 7. októbra 1997 č. 1497/4/1997 – 100 o úradnom odbere vzoriek a o laboratórnom skúšaní a hodnotení krmív v znení výnosu Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky z 12. februára 2003 č. 149/2/2003-100
- Wilfart A, Joguelin-Peyraud Y, Simmins H, Noblet J, van Milgen J, Montagne L. A step-wise in vitro method to estimate kinetics of hydrolysis of feeds. *Livestock Science* 2007; 109: 179-181.

VÝZNAM CWB DOMÉNY PRE CIEĽOVÚ ŠPECIFICITU ENTEROLYZÍNU A

Serenčová L.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Enterolyzín A je bakteriocín, produkovaný kmeňom *Enterococcus faecalis* II/1, s pomerne širokým spektrom aktivity. Jeho štruktúra pozostáva z dvoch domén: N-terminálnej, ktorá zaisťuje katalytickú aktivitu a C-terminálnej, ktorá je sekvenčne príbuzná niekoľkým fágovým lyzínom a predpokladá sa, že zodpovedá za väzbu bakteriocínu na povrch senzitivných baktérií. Cieľom našej práce bolo potvrdiť tento predpoklad, prostredníctvom prípravy fúzneho proteínu GFP-CWB(EnIA), pozostávajúceho zo zeleného fluorescenčného proteínu (Green Fluorescent Protein; GFP) a C-terminálnej domény (predpokladaná Cell Wall Binding; CWB doména) enterolyzínu A. Testovali sme schopnosť tohto fúzneho proteínu, viazať sa na povrch bakteriálnych buniek, voči ktorým bol enterolyzín A aktívny. Naše výsledky potvrdzujú predpokladanú funkciu C-terminálnej domény ako CWB a jej význam pre cieľovú špecificitu enterolyzínu A.

ÚVOD

Enterolyzín A je tepelne labilný bakteriocín, produkovaný kmeňom *Enterococcus faecalis* II/1 (Nigutová a kol., 2007). Patrí do skupiny hydroláz bakteriálnych bunkových stien s relatívne širokým spektrom účinku, zahŕňajúcim viaceré kmene *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* i niektoré patogénne kmene rodov *Streptococcus*, *Listeria* a *Lactobacillus*. Sekvenčná analýza enterolyzínu A odhalila dvojdoménovú štruktúru tohto enzýmu. Zatiaľ čo N-terminálna doména, príbuzná metalopeptidázam z rodiny M37, zaisťuje katalytickú funkciu enzýmu, ktorá spočíva v štiepení peptidoglykánu, sekvencia C-terminálnej domény vykazuje homológiu s niekoľkými fágovými lyzínmi. Predpokladá sa, že práve C-terminálna doména zaisťuje väzbu tohto bakteriocínu na bunkové steny senzitivných baktérií (Nilsen a kol., 2003). Na našom ústave sa podarilo exprimovať a purifikovať rekombinantný enterolyzín A aj obe jeho samostatné domény. Tieto proteíny boli následne testované na biologickú aktivitu voči indikátorovému kmeňu *Enterococcus malodoratus* NDCO846, ktorá sa však potvrdila iba v prípade kompletného bakteriocínu. Samostatné domény neboli biologicky aktívne (Nigutová a kol., 2008). Naším cieľom bolo overiť, či je C-terminálna doména skutočne CWB, keďže tento predpoklad dosiaľ nebol v žiadnej práci potvrdený. Zároveň sme chceli dokázať význam tejto domény pre cieľovú špecificitu enterolyzínu A.

MATERIÁL A METODIKA

KONŠTRUKCIA FÚZNEHO PROTEÍNU GFP-CWB(EnIA)

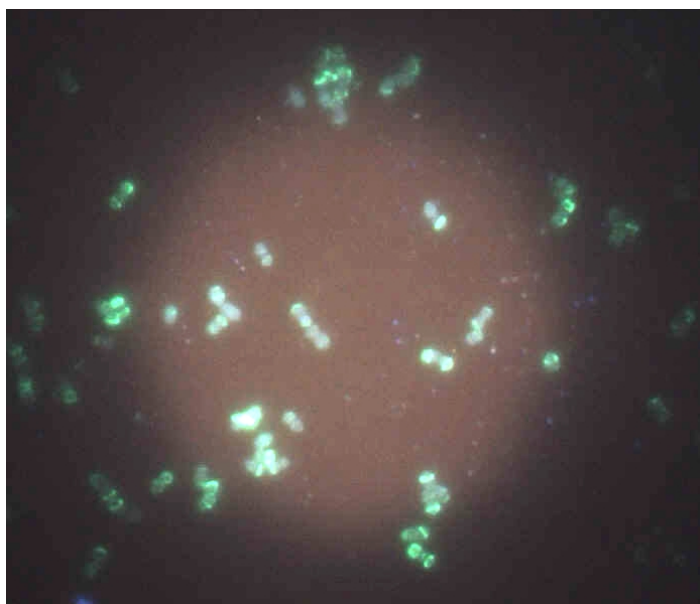
Pomocou PCR sme amplifikovali gén *gfp* (green fluorescent protein) a C-terminálnu (CWB) doménu enterolyzínu A. Použité primery obsahovali restričné miesta pre endonukleázy SacI a SalI. Amplikón *gfp* sme klonovali do expresného vektora pQE-30 UA (Qiagen Co.). Vektor s inzerovaným *gfp* génom a amplifikovanú CWB doménu sme poštiepili restričnými endonukleázami SacI a SalI a následne spolu ligovali. Výsledným rekombinantným vektorom sme transformovali bunky hostiteľského kmeňa *E. coli* ER 2566 (New England Biolabs). Klony exprimujúce rekombinantný fúzny proteín GFP-CWB(EnIA) sme identifikovali pod UV svetlom a pomocou SDS-PAGE analýzy.

TESTOVANIE VÄZBY FÚZNEHO PROTEÍNU GFP-CWB(EnIA) NA POVRCH BAKTERIÁLNYCH BUNIEK

Rekombinanty exprimujúce GFP-CWB(EnlA) rástli na LB agarových platniach s ampicilínom cez noc, pri 37°C. Následne sme ich z platní zmyli pomocou fyziologického roztoku, homogenizovali a scentrifugovali. Supernatant sme použili na otestovanie väzby fúzneho proteínu na povrch buniek viacerých enterokokových a streptokokových kmeňov: bakteriálne bunky z 3 ml nočnej kultúry jednotlivých testovaných kmeňov sme scentrifugovali, pelet sme premyli fyziologickým roztokom a takto pripravené bunky sme inkubovali približne 40 minút so supernatantom obsahujúcim GFP-CWB(EnlA). Bunky sme následne scentrifugovali, opätovne premyli fyziologickým roztokom a prípadnú fluorescenciu (v dôsledku naviazania GFP-CWB(EnlA)) sme pozorovali fluorescenčným mikroskopom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na overenie predpokladu, že C-terminálna doména enterolyzínu A je zodpovedná za väzbu tohto bakteriocínu na bunkové steny senzitivných baktérií, sme skonštruovali fúzny proteín GFP-CWB(EnlA), ktorého naviazanie na bakteriálny povrch je ľahko detekovateľné pod UV svetlom. Podobný postup bol už viackrát použitý v prácach, zameraných na štúdium CWB domén peptidoglykánových hydroláz (Loessner a kol., 2002; Low a kol., 2005; Ahmed a kol., 2007). Prvým testovaným bakteriálnym kmeňom bol *Enterococcus malodoratus* NCDO846, ktorý sa v predošlých prácach ukázal ako vhodný indikátorový kmeň pre biologickú aktivitu bakteriocínov (Morovský a kol., 2001; Lauková a kol., 2003). Po inkubácii buniek so supernatantom obsahujúcim GFP-CWB(EnlA), sme pozorovali výraznú fluorescenciu bunkových povrchov (obr. 1), čo svedčí o naviazaní proteínu na bunkové steny.



Obrázok 1: *Enterococcus malodoratus* NCDO846 po 40 min. inkubácii s GFP-CWB(EnlA).

Následne sme testovali väzbu GFP-CWB(EnlA) na bunkový povrch viacerých enterokokových a streptokokových kmeňov, zároveň sme tieto kmene testovali na senzitivitu/rezistenciu voči enterolyzínu A a výsledky porovnávali s predošlými prácami (Nigutová a kol., 2005). Pozorovali sme jednoznačnú koreláciu medzi väzbou GFP-CWB(EnlA) a senzitivitou voči enterolyzínu A (tab. 1). Tieto výsledky potvrdzujú, že C-terminálna doména enterolyzínu A je skutočne Cell Wall Binding doménou a zodpovedá za cieľovú špecifickosť bakteriocínu. Otázkou nateraz zostáva, aký je charakter väzby CWB domény na bakteriálne bunkové steny. Riešeniu tohto problému sa budeme ďalej venovať.

Výsledky našej práce naznačujú, že hlavným mechanizmom rezistencie baktérií voči enterolyzínu A je neschopnosť tohto bakteriocínu viazať sa na povrch rezistentných buniek.

Tabuľka 1: Porovnanie výskytu senzitivity vybraných enterokokových a streptokokových kmeňov na enterolyzín A a detekcie väzby fúzneho proteínu GFP-CWB(EnIA) na ich bunkové steny.

Bakteriálny kmeň	Senzitivita na EnIA	Väzba s GFP-CWB(EnIA)
<i>E. faecium</i> 1A	+	+
<i>E. faecium</i> 1C	+	+
<i>E. faecium</i> 1D	+	+
<i>E. faecium</i> 1F	+	+
<i>E. faecium</i> 1H	+	+
<i>E. sp.</i> 3A	+	+
<i>E. mundtii</i> 3B	+	+
<i>E. mundtii</i> 3E	+	+
<i>E. casseliflavus</i> 3F	+	+
<i>E. durans</i> 5A	+	+
<i>E. hirae</i> 6A	+	+
<i>E. hirae</i> 8E	+	+
<i>E. durans</i> 8H	+	+
<i>S. bovis</i> 44/9	+	+
<i>S. bovis</i> 46/2	-	-
<i>S. bovis</i> 47/3	-	-
<i>S. bovis</i> 59/2	-	-
<i>S. gallolyticus</i> LRC0253	+	+
<i>S. gallolyticus</i> LRC0255	-	-
<i>E. malodoratus</i> NCDO 846	+	+
<i>E. faecalis</i> II/1	-	-
<i>E. hirae</i> 3B-1	+	+

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0586-07 a Vedeckou grantovou agentúrou VEGA - grant č. 2/0006/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ahmed, A. B., Noguchi, K., Asami, Y., Nomura, K., Fujii, H., Sakata, M., Tokita, A., Noda, K., Kuroda, A. Evaluation of cell wall binding domain of *Staphylococcus aureus* autolysin as affinity reagent for bacteria and its application to bacterial detection. *J. Biosci. Bioeng.* 2007,104(1): 55-61.
- Lauková, A., Vlaemynck, G. Use of bacteriocin preparation with anti-microbial activity in Saint-Paulin Cheese. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2003, 47: 497-505.
- Loessner, M. J., Kramer, K., Ebel, F., Scherer, S. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.* 2002, 44(2): 335-349.
- Low, L.Y., Yang, C., Perego, M., Osterman, A., Liddington, R. C. Structure and lytic activity of a *Bacillus anthracis* prophage endolysin. *J. Biol. Chem.* 2005, 280(42): 35433-35439.

- Morovský, M., Pristaš, P., Javorský, P., Nes, I. F., Holo, H. Isolation and characterization of enterocin BC25 and occurrence of the entA gene among ruminal Gram-positive cocci. *Microbiol. Res.* 2001, 156: 133-138.
- Nigutová, K., Pristaš, P., Javorský, P. Bacteriocin-like activity production and resistance in selected enterococci and streptococci of animal origin. *Arch. Anim. Nutr.* 2005, 59(3): 205-211.
- Nigutová, K., Morovský, M., Pristaš, P., Teather, R. M., Holo, H., Javorský, P. Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram-positive cocci. *J. Appl. Microbiol.* 2007, 102(2): 563-569.
- Nigutová, K., Serenčová, L., Píknová, M., Javorský, P., Pristaš, P. Heterologous expression of functionally active enterolysin A, class III bacteriocin from *Enterococcus faecalis*, in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2008, 60(1): 20-24.
- Nilsen, T., Nes, I. F., Holo, H. Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69(5): 2975-2984.

DGGE ANALÝZA VARIABILITY TREPONÉM

Sikorová L.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Treponémy patria medzi gram-negatívne anaeróbne baktérie čeľade *Spirochetaceae*, ktoré sa našli v širokom spektre hostiteľov a prostredí. Jedným z týchto prostredí je aj gastrointestinálny trakt (GIT) teplokrvných živočíchov, vrátane človeka. V tejto práci sme sa venovali štúdiu variability bachorových a fekálnych druhov treponém pochádzajúcich z GIT teplokrvných živočíchov. Variabilita treponém sa študovala pomocou DGGE (Denaturated Gradient Gel Electrophoresis - denaturačná gradientová gélová elektroforéza) a ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis - restričná analýza amplifikovanej rDNA) metódy. Pri PCR amplifikácii 16S rRNA génov treponém sa použili treponema-špecifické priméry TrepC90R a Trep1500F pomocou, ktorých sa podarilo dokázať prítomnosť treponém v polovici z 23 vzoriek celkovej DNA z GIT teplokrvných živočíchov, a univerzálne bakteriálne priméry 968f-GC a 1401r. PCR amplikóny 16S rRNA génov sa taktiež analyzovali ARDRA metódou, pri ktorej sa použili *HaeIII*, *HinfI*, *HpaI* a *RsaI* restričné endonukleázy. Obidve použité metódy (DGGE a ARDRA) potvrdili výraznú medzidruhovú a vnútrodruhovú variabilitu treponém pochádzajúcich z GIT teplokrvných živočíchov a preukázali porovnateľnú rozlišovaciu schopnosť.

ÚVOD

Treponémy sú anaeróbne baktérie, ktoré podľa výskytu možno klasifikovať na orálne, dermálne, bachorové, intestinálne, genitálne a fekálne druhy treponém. Variabilita treponém sa nateraz študovala len u orálnych druhov treponém pomocou druhovo špecifických PCR primerov použitých v DGGE metóde (Siqueira a kol., 2005). DGGE metóda patrí medzi spoľahlivé metódy schopné analyzovať a identifikovať blízko príbuzné druhy baktérií, prípadne asociované druhy mikrobiálneho spoločenstva ako dokazujú niektoré práce (Tóthová a kol., 2008), (Regensbogenova a kol., 2006). Využíva sa aj pri štúdiu ekológie mikroorganizmov v rozličných prostrediach ako napríklad štúdium bakteriálnych a protozoálnych populácií v bachore (Regensbogenova a kol., 2004a). Jednou z ďalších molekulárnych techník, ktoré sa úspešne používajú pri analýze bakteriálnych komunit je ARDRA analýza. Pomocou tejto metódy sa aj v prípade troch novo- objavených bachorových kmeňov treponém KT, S a T potvrdilo, že každý z týchto kmeňov reprezentuje odlišný bakteriálny druh treponém (Piknová a kol., 2006).

MATERIÁL A METODIKA

Izolácia totálnej DNA

Totálna DNA sa získala izoláciou čistých kmeňov treponém metódou popísanou Pospiechom a Neumannom (1995), ako aj z fekálnych vzoriek uvedených v Tab.1 pomocou QIAamp® DNA Stool Mini Kit Handbook (2001).

PCR amplifikácia totálnej DNA

PCR amplifikácia totálnej DNA pozostávala z dvoch na seba nadväzujúcich 16S rDNA PCR reakcií. V prvej PCR reakcii sa amplifikoval ~ 500bp PCR produkt použitím špecifických primerov pre treponémy, a to *reverse* primerom TrepC90R

(5'-GTTACGACTTCACCCTCCT-3'), a *forward* primerom Trep1500F

(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), (Dewhirst, 2000). PCR amplifikácia sa robila v štandardnom termocykléri (Techne TC-300, ChemosCz) za nasledujúcich podmienok: iniciálna denaturácia (2 min., 94°C), 30 amplifikačných cyklov: denaturácia (45s, 94°C),

annealing (45s, 60°C), extenzia (90s, 72°C) a finálna extenzia (15 min., 72°C); 1 µl PCR produktu z prvej PCR reakcii sa použil ako templát v nasledujúcej 16S rDNA PCR reakcii. Použitím univerzálnych bakteriálnych prímerv 968f-GC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3') a 1401r (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'), (Nubel a kol., 1996) sa amplifikoval PCR produkt o veľkosti ~ 1500bp. Amplifikácia druhej PCR reakcii sa robila za týchto podmienok: iníciaľna denaturácia (2 min., 94°C), 28 amplifikačných cyklov: denaturácia (1 min., 94°C), annealing (1 min., 55°C), extenzia (2 min., 72°C) a finálna extenzia (10 min., 72°C). PCR Master Mix obsahoval 40 pmol z každého primeru v prvej PCR reakcii a 25 pmol z každého primeru v druhej PCR reakcii, 5 µl 10x PCR pufru (*Invitrogen*, Brazília), 2 mM MgCl₂ (*Invitrogen*, Brazília), 1.25 U Platinum *Taq*® DNA polymerázy (*Invitrogen*, Brazília), 0.2 mM z každého dNTP (*Invitrogen*, Brazília). PCR zmes sa doplnila sterilnou vodou (*Biotika*, Slovensko) na finálny objem 50 µl. Ako templát pre negatívnu kontrolu sa použil 1 µl sterilnej vody (*Biotika*, Slovensko).

Detekcia amplifikovanej DNA

PCR produkty sa analyzovali v 0.8 % agarovom gély v 5 x TAE tlmivom roztoku. Gél sa farbilo etídiom bromidom (0,5µg/ml) a vizualizovalo sa pod UV lampou.

DGGE analýza PCR produktov

DGGE analýza sa robila použitím *DCode Universal Mutation Detection System* (*Bio-Rad*, USA) pri 50 V, po dobu 18 hodín v 0.5 x TAE tlmivom pufru (20 mM tris-acetát, 10 mM acetát sodný, 0,5 mM EDTA disodný, pH = 8) pri 60°C. PCR produkty (40 µl), ktoré sa získali v druhej PCR reakcii sa použili na DGGE analýzu v 6 % (w/v) polyakrylamidovom gély obsahujúcom lineárny gradient močoviny a formamidu v rozmedzí 20 % - 70 %. Gél sa farbilo etídiom bromidom (0,5µg/ml) po dobu 30 min.. Výsledok DGGE analýzy sa zaznamenal použitím *MiniBis Pro User Guide* (*Bio-Imaging Systems*, Izrael).

Extrakcia DGGE fragmentov

DGGE fragmenty sa extrahovali z polyakrylamidového gélu, sterilne premiestnili do 50 µl TE roztoku (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH = 8), vortexovali a následne centrifugovali 1 min. pri 10 000 rpm a izbovej teplote.

Reamplifikácia DNA z extrahovaných DGGE fragmentov

Reamplifikácia DNA z extrahovaných DGGE fragmentov sa robila za rovnakých PCR podmienok ako v druhej PCR reakcii. Ako templát bol použitý 1 µl DNA extrahovanej z DGGE fragmentov jednotlivých vzoriek. Reamplifikované vzorky sa purifikovali použitím *MicroElute Gel Extraction Kitu* (*Omega*, USA).

ARDRA analýza

PCR amplicóny 16S rRNA génov sa analyzovali ARDRA metódou použitím *HaeIII* (*Takara*), *HinfI* (*Takara*), *HpaI* (*Fermentas*) a *RsaI* (*Fermentas*) restričných endonukleáz.

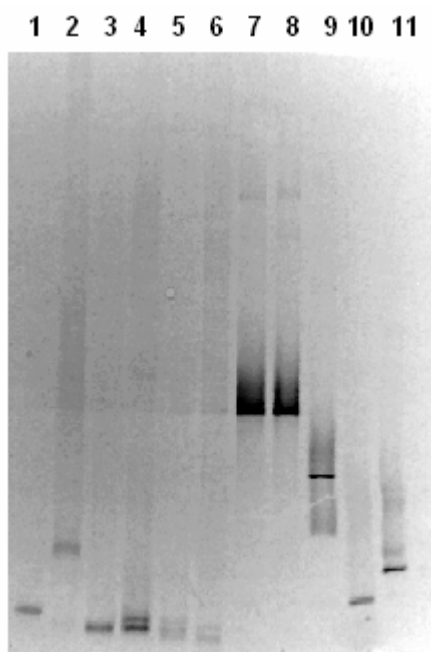
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom tejto práce bolo štúdium variability treponém pochádzajúcich z GIT teplokrvných živočíchov, vrátane človeka uvedených v Tab.1. V experimente sa testovalo 23 vzoriek. Použitím treponema-špecifických primerov TrepC90R a Trep1500F v 16S rDNA PCR reakcii sa v 48 % prípadoch dokázala prítomnosť treponém. Pomocou DGGE a ARDRA analýzy sa pozorovala výrazná vnútrodrohová a medzidruhová variabilita bachorových a fekálnych druhov treponém z GIT teplokrvných živočíchov (Obr.1, Tab.1)

Tab.1 ARDRA analýza bachorových a fekálnych druhov treponém

Vzorka	Hostiteľ	Druh	<i>Hae</i> III GG/CC	<i>Hinf</i> I G/ANTC	<i>Hpa</i> II C/CGG	<i>Rsa</i> I GT/AC
tDNA KT	<i>Treponema zioleckii</i>	bachorová	300,150,50	300,100	250	250,150
tDNA S	Ovca ¹	bachorová	300,200	400,50	-	-
tDNA T	Ovca ¹	bachorová	300,150,50	400,50	-	250,150
tDNA TB	<i>Treponema bryantii</i> ¹	bachorová	300,200	250,200 50	250,150	400,200
tDNA TS	<i>T. saccharophilum</i> ¹	bachorová	300,200	250,200 50	250,150	400,200
tDNA LM	Laboratórna myš ²	fekálna	200,150	500,250, 150	250,150	-
tDNA PS	Pes ²	fekálna	200,150	500,250	150	400,200
tDNA RE	Škrečok ²	fekálna	300,150	400,50	250,150	-
tDNA LS	Človek ²	fekálna	200,150	500,250	250,150	-
tDNA MS	Človek ²	fekálna	200,150	500,250	250,150	300,200
tDNA TN	Človek ²	fekálna	200,150	300,200, 100	150	300,200

¹ Pospiech a Neumann (1995); ² QIAamp ® DNA Stool Mini Kit Handbook (2001)



Obr.1 DGGE analýza 16S rRNA génov amplifikovaných z totálnej DNA bachorových a fekálnych druhov treponém: 1- tDNA TN, 2- tDNA RE, 3- tDNA PS, 4- tDNA MS, 5- tDNA LS, 6- tDNA LM, 7- tDNA TS, 8- tDNA TB, 9- tDNA T, 10- tDNA S, 11- tDNA KT

Vnútrodruhovú variabilitu, ktorá je charakteristická medzi jedincami toho istého druhu sa zaznamenala v prípade fekálnych treponém pochádzajúcich z rozličných zvieracích hostiteľov ako laboratórna myš, pes a škrečok. Menej výrazná vnútrodruhovú variabilitu sa zaznamenala u troch fekálnych druhov ľudských treponém. Najvýraznejšia vnútrodruhovú variabilitu sa potvrdila medzi bachorovými kmeňmi KT z *T. ziolekkii*, S, a T, čím sa potvrdilo zistenie dokumentované v práci Píknovej a kolektívu (2006), ktoré tvrdí, že všetky spomínané kmene predstavujú rozličné bakteriálne druhy bachorových treponém. Na druhej strane medzi bachorovými kmeňmi pochádzajúcimi z *T. bryantii* a *T. saccharophilum* sa nepreukázala žiadna vnútrodruhovú variabilitu. Medzi testovanými bachorovými a fekálnymi druhmi treponém pochádzajúcimi z GIT teplokrvných živočíchov sa zaznamenala taktiež výrazná medzidruhovú variabilitu, ktorá poukazuje na zjavnú odlišnosť medzi bachorovými a fekálnymi druhmi treponém, ako aj na medzidruhovú variabilitu fekálnych druhov rozličných teplokrvných živočíchov, akými sú človek a škrečok.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná Vedeckou Grantovou Agentúrou VEGA-grant č.2/0051/08

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dewhirst F E, Tamer M A, Ericson R E, Lau C N, Levanos V A, Boches S K. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000, 15: 196-202.
- Nubel U, Engelen B, Felske A, Snaird J, Wieshuber A, Amann R I. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 5636-5643.
- Posiech B, Neumann A. A versatile quick-prep of genomic DNA from Grampositive bacteria. *Trends Genet.* 1995; 11: 217.
- Píknová M, Javorský P, Guczynska W, Kasperowicz A, Michalowski T, Pristaš P. New Species of Rumen Treponemes. *Folia Microbiol.* 2006; 51: 303-305.
- Regensbogenova M, Pristaš P, Javorský P, Monn-van der Staay S Y, 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, Javorský P, Moon-van der Staay S Y, Moon-van der Staay G W, Hackstein J H P, Pristaš P, Newbold C J. Use of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study ciliate protozoal diversity in the rumen. *Endocytobiosis Cell Res.* 2006; 17: 65-66.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977; 74: 5463-5467.
- Siqueira J F, Rocas I N, Cunha C D, Rosado A S. Novel Bacterial Phylotypes in Endodontic Infections. *J. Dent. Res.* 2005; 84: 565-569.
- Tóthova T, Píknová M, Kišidayová S, Javorský P, Pristaš P. Distinctive Archaeobacterial Species Associated with Anaerobic Rumen Protozoan *Entodinium caudatum*. *Folia Microbiol.* 2008; 53: 266-269.

VČASNÁ DIAGNOSTIKA DYSPLÁZIE BEDROVÉHO KLĚBU

Skurková L., Ledecký V.

Klinika malých zvierat, UVL Košice

ABSTRAKT

Zisťovali sme efektívnosť a možnosti využitia včasnej diagnostiky dysplázie bedrového kĺbu u psov plemena nemecký ovčiak pomocou röntgenologického vyšetrenia, a to porovnaním klasickej extenznej polohy I s kompresno-distrakčnou metódou upravenou podľa Vezzonihho (2004). Okrem toho sme použili aj palpačnú Ortolaniho techniku a röntgenologické vyšetrenie bedrového kĺbu za účelom získania pohľadu na jeho dorzálny acetabulárny okraj (DAO) a uhla DAO s hlavicou femuru (Slocum, Devine, 1990). Vyšetrenia sme uskutočnili vo veku 4 - 6 mesiacov psa a opakovane vo veku 12 mesiacov.

Stanovili sme hodnoty Norbergovho uhla (NA), distrakčného indexu (DI), každý kĺb sme obodovali podľa stupnice FCI (Flückiger, 1996).

Zistili sme významnú koreláciu medzi DI12/FCI12 a DI4/FCI12 (0,86 a 0,78). Pri vyslovovaní včasnej prognózy na základe hodnôt DI a UDAO (uhol dorzálného acetabulárneho okraja) vo veku 4 mesiacov, sme v porovnaní s konečnou diagnózou vyslovenou na základe hodnôt NA a bodovania FCI vo veku 12 mesiacov, dosiahli zhodu u 80% hodnotených psov.

ÚVOD

Dysplázia bedrového kĺbu je vývojové ortopedické ochorenie s polygénnou dedičnosťou, ktoré sa prejavuje znížením kongruentnosti medzi hlavicou stehnovkej kosti a acetabulom, a vyúsťuje do degeneratívneho poškodenia kĺbu (Lust, 1997). Dysplázia vzniká na základe inkongruity kĺbových plôch a nadmernej voľnosti kĺbu (laxity). Túto je možné vyšetriť palpačne alebo röntgenologicky od 16-teho týždňa veku psa.

Z palpačných metód bol z humánnej medicíny prebratý Ortolaniho test (Ortolani, 1937) a Barlowov test (Barlow, 1962), a v roku 1968 popísal Bardens palpačnú metódu špeciálne pre bedrový kĺb u psov (Bardens, 1968). Jednou z röntgenologických pozícií pre hodnotenie pasívnej laxity je kompresno-distrakčná metóda (PennHIP) popísaná Smithom a kol. (1990). Výsledkom tejto metódy je číselné vyjadrenie laxity vo forme indexov, distrakčného (DI) a kompresného (CI), nadobúdajúcich hodnoty 0 až 1. Laxita v kĺbe je prítomná ako predispozícia pre neskorší vývoj DBK. Ďalšou možnosťou je využitie polohy poskytujúcej pohľad na jej dorzálny acetabulárny okraj (Slocum, Devine, 1990), pri ktorom sa zisťujú hodnoty tangenciálneho uhla a uhla dorzálného acetabulárneho okraja (U DAO).

Naším cieľom bolo zhodnotiť, nakoľko je možné použiť včasné vyšetrenie kompresno-distrakčnou metódou upravenou podľa Vezzonihho (2004), meraním dorzálného acetabulárneho okraja a Ortolaniho palpačným testom pre vyslovenie prognózy vývoja bedrového kĺbu a jeho laxity u rastúceho šteňaťa, a pre včasnú chirurgickú terapiu, v porovnaní s metódami klasickej röntgenologickej diagnostiky dysplázie bedrového kĺbu u psov vykonávanej vo veku 12 mesiacov.

MATERIÁL A METODIKA

Experiment sa uskutočnil na vzorke 25 psov plemena nemecký ovčiak. Röntgenologické vyšetrenie sme previedli v sedácii (atropinizácia, xylazín, butomidol).

Polohy pri röntgenologickom vyšetrení

Najprv sme psa uložili do ventrodorzálnej polohy s končatinami v extenzii, čím sme získali klasickej extenzný röntgenogram bedrových kĺbov. Následne sme postupovali podľa kompresno-distrakčnej metódy. Pes ležal s končatinami natiahnutými smerom dozadu v

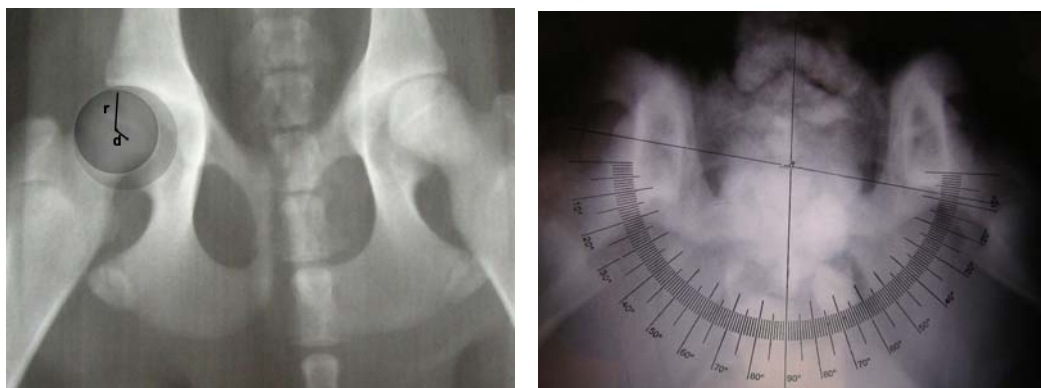
dorzálnej polohe, pričom distrakciu bedrových kĺbov sme zabezpečili použitím talianskeho distraktora FSA (Fondazione Salute Animale). Postavenie femurov vzhľadom ku stolu bolo 45 - 90 ° a holenné kosti boli paralelné s rovinou stola. Kompresný snímok sme zhotovili vo ventrodorzálnej polohe, s panvovými končatinami v extenzii, a na oblasť bedrových kĺbov sme nasadili nastaviteľný textilný pás (dĺžka cca 40 cm), ktorý sme pevne utiahli. Tým sa hlavice stehnových kostí pevnejšie zasunuli do acetabulárnych jamiek.

Napokon bol pes uložený do sternálnej polohy a bol zhotovený pohľad na dorzálny acetabulárny okraj. Panvové končatiny boli uložené pozdĺž trupu smerom kraniálnym tak, že bol vytvorený uhol 90° medzi femurom a holennými kosťami.

Na röntgenograme musia byť viditeľné štruktúry panvy. Na záver bola u niektorých psov prevedená aj palpačná Ortolaniho technika. Pes bol uložený do laterálnej polohy, pričom bol vyvíjaný tlak na femur smerom dorzálnym a následne boli abdukované končatiny a bola zisťovaná prítomnosť počuteľného lupnutia (Ortolaniho príznak).

Hodnotenie röntgenogramov

Pri klasickej ventrodorzálnej polohe sme hodnotili 6 ukazovateľov na určenie stupňa DBK, pri bodovaní sme použili metodiku podľa Flückigera (1996). Body sme sčítali a určili výsledný stupeň dysplázie (A, B, C, D, E) podľa medzinárodnej klasifikácie FCI. Na distrakčnom röntgenograme sme stanovili distrakčný index, ktorý je pomerom vzdialenosti stredu hlavice femuru a stredu acetabula ku polomeru hlavice stehnovej kosti ($DI = d / r$; d je vzdialenosť stredov, r je polomer hlavice femuru)(Obr. 1). DI môže mať hodnotu od 0 do 1. Kompresný snímok sme posúdili iba vizuálne, hodnotili sme zapadnutie hlavice femuru do acetabula, t. j. kongruentnosť kĺbu. Pri pohľade na dorzálny acetabulárny okraj sme odmerali hodnotu uhla dorzálneho acetabulárneho okraja (UDAO) a tangenciálneho uhla. UDAO získame tak, že vedieme líniu pozdĺžnou osou chrčtice, druhú líniu vedieme cez miesto kontaktu dorzálneho acetabulárneho okraja s hlavicom femuru a na uhlomere odčítame výslednú hodnotu uhla pre daný kĺb (Obr. 2). Tangenciálny uhol sme získali ako uhol medzi dvoma líniami prechádzajúcimi cez miesto kontaktu femorálnej hlavice a DAO.



Obr. 1, 2: Meranie distrakčného indexu (DI) a uhla dorzálneho acetabulárneho okraja (UDAO)

Každý kĺb bol posúdený 3 rozličnými metódami. Tieto sme vzájomne porovnali, vypočítali sme korelačné koeficienty a štatistickú významnosť pre jednotlivé dvojice meraní.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe výsledkov získaných po vyhotovení röntgenogramov vo veku 4 mesiacov sme sa zamerali na vyslovenie prognózy vývoja bedrového kĺbu. Po röntgenologickom vyšetrení vo veku 12 mesiacov sme na základe metodiky podľa FCI vyslovili konečnú diagnózu. Následne sme porovnali prognózu s diagnózou, a prípady, keď sa tieto zhodovali, boli označené ako

pozitívne (preukázala sa zhoda medzi hodnotením na základe včasných metód diagnostiky DBK s hodnotením používaným od veku 12 mesiacov). Zistili sme zhodu v 80% prípadov. V ďalšom kroku sme urobili štatistické vyhodnotenie celého experimentu. Zistili sme, že najvyššia miera korelácie bola dosiahnutá medzi hodnotami DI12/FCI12 a DI4/FCI2. Najnižšie hodnoty korelácie boli zaznamenané medzi parametrami NA12/DI12 a NA12/DI4 (-0,18; -0,38) (Tab. 1).

Tab.1: Pearsonov korelačný koeficient pre jednotlivé dvojice meraní

		4 mesiace			12 mesiacov		
		FCI	NA	DI	FCI	NA	DI
4 mesiace	FCI	1	-0,67	0,42	0,45	-0,50	0,44
	NA	-	1	-0,52	-0,52	0,71	-0,49
	DI	-	-	1	0,78	-0,38	0,82
12 mesiacov	FCI	-	-	-	1	-0,42	0,86
	NA	-	-	-	-	1	-0,18
	DI	-	-	-	-	-	1

Včasná diagnostika DBK predstavuje novú možnosť v rámci programov snažiacich sa o odhalenie a eradikáciu DBK u psov. Nevýhodou doterajšej metodiky hodnotenia klasickej ventrodorzálnej projekcie je to, že nemožno vylúčiť určitý stupeň subjektivity hodnotenia.

Určitý stupeň subjektivity v prípade hodnotenia na základe včasnej diagnostiky je taktiež zrejmý. Podstatná je v prvom rade skúsenosť fixátora a röntgenológa, pretože je dôležité vytvorenie röntgenogramu určitého štandardu, ktorý by bolo možné objektívne zhodnotiť. Ďalším stupňom je hodnotenie röntgenogramov, ktoré musí vykonávať skúsený odborník.

Okrem toho, niektorí odborníci považujú PennHIP za nie príliš špecifickú. V rozmedzí DI 0,3-0,7 je až 47% šanca falošne pozitívnych výsledkov, pretože nie všetky kĺby postihnuté pasívnou laxitou budú postihnuté dyspláziou (Charette et al., 2001).

Pohľad na dorzálny acetabulárny lem je využitelným doplnkom ku štandardnej ventrodorzálnej polohe, pretože nám referuje o nosnej, t.j. najviac zaťaženej časti kĺbu. Kľúčovým pri polohovaní je dosiahnutie superimpozície 4 štruktúr panvy, smerom kranio-kaudálnym sú to ala ossis ilii, corpus ossis ilii, acetabulum a tuber ischii. Oproti palpačnému vyšetreniu je možné túto metódu považovať za objektívnejšiu. Niektorí autori uvádzajú, že pri pozorovaní zvýšenej laxity, nedostatočnej hladkosti chrupky, či iných príznakov miernej dysplázie, táto nebola zistiteľná na štandardnom röntgenograme, ale 35% týchto prípadov, DAO röntgenogram ukazoval znaky poškodenia dorzálneho acetabulárneho okraja (Slocum, Devine, 1990). Opäť sa však stretávame s problémom subjektivity hodnotenia, pretože bola zistená signifikantná odchýlka medzi meraniami dorzálneho acetabulárneho sklonu medzi hodnotiteľmi (Charette et al., 2001).

Palpačná Ortolaniho metóda bola v našom pokuse použitá len sporadicky, preto nie je možné údaje o jej spoľahlivosti potvrdiť, ani vyvrátiť. Existuje však štúdia, ktorá popisuje, že Ortolaniho metóda je najspoľahlivejšia vo veku 16 - 18 týždňov, pričom najvyššia spoľahlivosť hodnotenia na základe DI a NA je vo veku 6 - 10 a 16 - 18 týždňov (Adams et al., 1998).

Z hľadiska využitia metód včasnej diagnostiky DBK sa nám jednoznačne najspoľahlivejšou ukázala metóda zisťovania distrakčného indexu. Zo štatistického vyhodnotenia nášho

experimentu pri porovnávaní korelácie dvoch metód sme dosiahli vysokú mieru korelácie medzi DI4/FCI12 ($r=0,78$) a DI12/FCI12 ($r=0,82$). To znamená, že na základe hodnôt DI z merania vo veku 4 mesiace je možné so 78% pravdepodobnosťou zhody určiť výsledné hodnotenie podľa FCI vo veku 12 mesiacov. Pre porovnanie, podľa inej štúdie (Smith *et al.*, 1993), korelačné koeficienty pre DI4/DI12 boli 0,82 (v našom experimente $r=0,86$, t.j. rozdiel +4%), DI4/OFA12 bolo $r=0,52$ (rozdiel +26%) a DI12/OFA12 bolo $r=0,67$ (rozdiel +15%). Pokiaľ ale zistujeme hodnotu DI v mladšom veku ako 16 týždňov, výsledok sa stáva nespoľahlivým (napr. štúdia na nemeckých ovčiakoch vo veku 2 mesiacov (Smith *et al.*, 1988)).

Včasnou röntgenologickou diagnostikou dysplázie bedrového kĺbu sme zistili, že metódyčasnej diagnostiky majú svoje opodstatnenie v komplexe opatrení zameraných na odhaľovanie a eradikáciu DBK v chove psov.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Adams, W. M., Dueland, R. T., O'Brien, R. T., Guilano, E., Nordheim, E. V. Early detection of canine hip dysplasia comparison of two palpation and five radiographic methods. JAAHA. 1998; 34: 339
- Bardens, J. W. New observations on the diagnosis and cause of hip dysplasia in Proceedings. OFA/AVMA Symp Hip Dysplasia. 1968: 71-77
- Barlow, T. G. Early diagnosis and treatment of congenital dislocation of the hip. J Bone Joint Surgery. 1962: 292-301
- Charette, B., Dupuis, J., Beauregard, G., Breton, L., Paré, J. Palpation and dorsal acetabular rim radiographic view for early detection of canine hip dysplasia. V. C. O. T.. 2001; 14: 130
- Flückiger, M. A. Neue Aspekte in der Röntgendiagnostik der HD. In: Dtsch. Vet. Ges. Vol. 41. Jahrestagung Fächgruppe Kleintierkrankheit. München. 1966: 262-263
- Lust, G. An overview of the pathogenesis of canine hip dysplasia. J AM Vet Med Assoc. 1997; 210: 1443-5
- Ortolani, M. Un segno poco noto e sua importanza per la diagnosi precoce di prelussazione congenita dell'anca. Pediatria. 1937; 45: 129
- Slocum, B., Devine, T. M. Dorsal acetabular rim radiographic view for evaluation of the canine hip. JAAHA. 1990; 26: 289-292
- Smith, G. K., Gregor, T. P., Rhodes, W. H., Biery, D. N. Coxofemoral joint laxity from distraction radiography and its contemporaneous and prospective correlation with laxity, subjective score, and evidence of degenerative joint disease from conventional hip-extended radiography in dogs. AmJVetRes. 1993; 54: 1021-1041
- Smith, G. K., Hill, C. M., Gregor, T. P., Olson, K. Reliability of the hip distraction index in two-month-old German Shepherd Dogs. JAVMA. 1988; 212: 1560-1563
- Vezzoni, A. Is early evaluation reliable for CHD diagnosis? 12th ESVOT Congress. Mnichov. 2004

ZMENY IMUNITNEJ REAKTIVITY PRI HERPESVÍRUSOVEJ CHOROBE Psov IMMUNOLOGIC CHANGES DURING HERPESVIRAL INFECTION OF DOGS

Smrčo P.¹, Mojžišová J.¹, Haladová E.¹, Hreško S.², Lehotská M.²

¹Katedra epizootológie a parazitológie, UVL, Košice

²Katedra mikrobiológie a imunológie, UVL, Košice

ABSTRAKT

Vyšetrili sme 81 psov rôznych plemien, pohlavia a veku u ktorých majitelia uvádzali reprodukčné problémy. Vyšetrenie sme vykonali ELISA testom na dôkaz špecifických protilátok v krvnom sére (37,03 % pozitívnych vzoriek), kultiváciou vzoriek z výterov na bunkových kultúrach (MDCK) sledovaním typického cytopatického efektu (40,74 % pozitívnych vzoriek). V niektorých prípadoch výsledky virologického a sérologického vyšetrenia spolu nekorešponovali. U pozitívnych jedincov bola potvrdená imunosupresia.

ÚVOD

Herpesvírusová choroba psov je ochorenie, ktoré spôsobuje vysoké straty v chovoch psov abortami a úhynmi novorodených šteniat. U dospelých jedincov spôsobuje mierne laryngotracheitídy prípadne vaginitídy alebo balanopostitídy.

Pôvodcom ochorenia je *Canid herpesvirus 1* (CaHV-1) obalený vírus, ktorý patrí do čeľade *Herpesviridae*, a má afinitu k epiteliám horných dýchacích ciest a reprodukčných orgánov, je patogénny len pre psovité šelmy, vyznačuje sa fenoménom latencie a jeho vylučovanie závisí od súčasnej miery imunosupresie organizmu.

MATERIÁL A METODIKA

Vyšetrili sme 81 psov (69 - ♀ = 85,18%; ♂ - 12 = 14,81%) rôznych plemien vo veku od 8 týždňov do 8 rokov. Tieto jedince boli vyšetované buď preventívne, alebo na základe anamnézy udanej majiteľom (u súk poruchy gravidity, pôrody mŕtvych a úhyny šteniat spravidla do 2 týždňov po pôrode; u psov neplodnosť prípadne možnosť kontaktu s pozitívnym jedincom).

Od zvierat boli odoberané vzorky krvi punkciou *v. cephalica antebrachii*, a stery z bukálnej, nazálnej a vaginálnej, prípadne prepuciálnej sliznice. Z krvi bolo centrifugáciou izolované sérum.

Protilátky v sére boli zisťované Canine Herpes Virus antibody ELISA testom, (EVL, Holandsko).

Po odobratí slizničného steru, bol tento prechovávaný v transportnom médiu RPMI 1640, (SEVAC, Praha, ČR). Izolácia a identifikácia vírusu bola vykonávaná na stabilnej bunkovej kultúre psích obličkových buniek MDCK.

U 25 pozitívnych a 16 negatívnych jedincov bola vykonaná imunologická analýza.

Blastogénna odpoveď krvných lymfocytov k mitogénom bola hodnotená ELISA BrdU (colorimetric) testom, použitím 20 µg/ml fytohemaglutinínu PHA – P (Sigma, USA). Úroveň blastogénnej odpovede lymfocytov je vyjadrená ako stimulačný index (SI). Fagocytárna schopnosť krvných leukocytov bola stanovená ingesciou 2-hydroxyethylmetakrylátových častíc (MSHP, priemer 1.2 µm, ARTIM Praha, ČR), (Větvička a kol., 1982). Fagocytárna aktivita leukocytov (FA)- je vyjadrená ako percento leukocytov fagocytujúcich 3 a viac MSHP častíc a ako fagocytárny index (FI)- predstavuje ingesciú kapacitu leukocytov (pomer počtu fagocytovaných MSHP a počtu všetkých potenciálnych fagocytov).

Štatistická analýza: Na stanovenie signifikantných rozdielov bol použitý ANOVA-tst (GraphPad InStat).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kultiváciou slizničných sterov na bunkovej kultúre sme z celkového počtu $n = 81$ psov zistili 40,74 % pozitívnych, 32,09% negatívnych jedincov. 27,16% vyšetrovaných vzoriek bolo vyhodnotených ako dubiózne. Vyšetrením tých istých jedincov ELISA testom na dôkaz protilátok v krvnom sére sme zistili 37,03 % pozitívnych, 59,25 % negatívnych a 3,7 % dubióznych vzoriek.

Za pozitívnu bola považovaná vzorka, ktorá vykazovala pozitivitu aspoň v jednom teste.

U 25 pozitívnych jedincov bolo vykonané imunologické vyšetrenie, ktorého výsledky sme porovnali s parametrami 16 negatívnych jedincov.

U sledovaných zvierat, pozitívnych na prítomnosť psieho herpesvírusu, bola dokázaná vo väčšine prípadov výrazná imunosupresia, potvrdená znížením stimulačného indexu lymfocytov na hladine významnosti $p \leq 0,001$ a znížením fagocytárnej aktivity a indexu ($p \leq 0,005$) oproti hodnotám zistených u negatívnych psov (Tab.1).

Tab.1: Parametre nešpecifickej imunity u psov postihnutých herpesvírusovou infekciou v porovnaní s negatívnymi zvieratami

zvieratá	FA (%)	FI	SI
Pozitívne na prítomnosť CHV-1 (n=25)	24,5±7,1**	5,6±2,1**	1,14±0,6***
Negatívne na prítomnosť CHV-1 (n=16)	38,2±9,1	8,2±3,4	2,21±0,9

** = $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,001$

Titer neutralizačných protilátok narastá po infikovaní a udržuje sa na vysokých hladinách len 1 až 2 mesiace. Nízke titry protilátok môžu byť detekované až dva roky od infekcie. Detekcia protilátok potvrdzuje exponovanie organizmu vírusom, nemusí znamenať aktívnu infekciu aj keď do úvahy musí byť braná možnosť latentnej infekcie. Hladina neutralizačných protilátok v sére narastá po terapii dexametazonom, pravdepodobne kvôli reaktivácii vírusu.(Miyoshi a kol., 1999)

Počas latentnej fázy infekcie vírus perzistuje v rôznych tkanivách, epidemiologicky najdôležitejšími miestami lokalizácie latentného vírusu sú trigeminálne a lumbosakrálne gangliá,(Ronsse a kol., 2002) tonzily a slinné žľazy infikovaných psov. (Švrček a kol., 2001) Počas latentnej infekcie môže byť vírus detekovaný v lymfocytoch. (Chester a kol., 1997) Greene (2006), uvádza, že izolácia vírusu je možná 2 – 3 týždne po infikovaní.

Pri porovnaní výsledkov kultivácie na bunkovej kultúre a ELISA testu sa tieto v niektorých prípadoch nezhodujú. Dôvodom absencie protilátok môže byť ich rýchly polčas rozpadu, prípadne v čase odberu vzorky nebol ešte titer protilátok dostatočný.

Ronsse uvádza, že sérologická diagnostika môže byť zmätočná, z dôvodu slabej imunogénnosti vírusu.(Ronsse a kol., 2002)

Výrobca ELISA testu udáva za pozitívny nález titra protilátok väčšieho ako 90. Klinicky zdravé zvieratá s titrom protilátok v rozmedzí 90 – 270 môžu byť vírusonosičmi, a je potrebné opätovné vyšetrenie po 3 mesiacoch. Tieto vyšetrenia boli z dôvodu neochoty majiteľov vykonané len na niekoľkých jedincoch.

Morresey považuje za signifikantné porovnanie párových vzoriek sér odobratých v rozmedzí 2 týždňov kde štvornásobný,(Morresey, 2004) podľa Svobodu (1996) dvoj až osemnásobný nárast titra protilátok poukazuje na aktívnu infekciu.

Z našich výsledkov vyplýva že herpesvírusová choroba psov je rozšírená aj v našich podmienkach.

U pozitívnych jedincov je zjavná korelácia medzi imunosupresiou a nálezom postinfekčných protilátok prípadne detekciou vírusu zo slizničných výterov. Vylučovanie vírusu môže byť navodené imunosupresiou organizmu – terapiou glukokortikoidmi, stresom apod. Okuda (2003) uvádza reaktiváciu vírusu podávaním prednisolonu v dávke 600mg/deň počas piatich dní u štyroch z piatich pokusne infikovaných súk. Počas gravidity je kvôli ochrane plodu fyziologicky potlačovaná reaktivita matkinho imunitného systému.(Toman a kol., 2000) Predpokladáme, že tento mechanizmus môže mať vplyv na reaktiváciu vírusu. Naše výsledky potvrdzujú imunosupresiu vyšetovaných jedincov pozitívnych na prítomnosť psieho herpesvírusu. Určitú úlohu z imunitného hľadiska môže zohrávať plemenná príslušnosť. Napr. po experimentálnom intravenóznom infikovaní líšky hrdzavej (*Vulpes vulpes*) čelenžou vírusu, ktorá u dospelých domácich psov spôsobila mierne príznaky choroby, došlo k rozvinutiu systémových a dýchacích príznakov ochorenia. Pri infikovaní líšok rovnakou čelenžou perorálnou cestou, nedošlo k rozvinutiu klinických príznakov, aj keď infikované jedince boli séropozitívne. Táto skutočnosť poukazuje na významnú úlohu lokálnej slizničnej imunity (Reubel a kol., 2001).

Experimentálne štúdie dokázali význam spôsobu infikovania pri šírení vírusu v organizme. Pri intranazálnom a intravenóznom podaní vírusu bol vírus izolovaný len z nazálnych sekrétov, pri intravaginálnom infikovaní bol vírus detekovaný ako vo vaginálnom, tak aj v nazálnom sekréte. Po 2 až 4 mesiacoch sa vírus nepodarilo izolovať zo žiadnej sliznice. Po vykonaní pitvy nebol vírus izolovaný zo žiadneho tkaniva, ale použitím PCR vírus zistený v trigeminálnom gangliu a retrofaryngeálnych lymfatických uzlinách, bez ohľadu na cestu infikovania. U uzdravujúcich sa jedincov bola vírusová DNA detekovaná tiež v lumbosakrálnom gangliu, tonzilách, mediastinálnych a hypogastrických lymfatických uzlinách (Miyoshi, a kol., 1999).

Chovatelia, ktorí o tejto chorobe ešte nemajú potrebné vedomosti problémy v chove často pripisujú iným agensom – nedostatočnej starostlivosti matky o šteňatá, neplodnosti, zlej voľby termínu krytia a podobne.

Stratám spôsobených psím herpesvírusom je možné úspešne predchádzať imunizáciou matky v čase gravidity vakcínou Eurican Herpes 205 od firmy Merial, ktorá je registrovaná na európskom trhu. Vakcína sa aplikuje v dvoch dávkach podľa vopred zvolenej schémy. Výrobca vakcíny doporučuje aplikáciu prvej vakcinačnej dávky suke v rozmedzí od začiatku proestra do desiateho dňa po nakrytí, druhej dva týždne pred predpokladaným pôrodom. Vakcína neinterferuje s PCR diagnostikou a vírus neutralizačným testom.(Morresey, 2004) Vakcinácia s inaktivovanou vakcínou navodí štvornásobný nárast vírusneutralizačných protilátok, ktoré ale nemajú dlhodobý protektívny účinok.(Greene a kol., 2006) Zahraničné štúdie udávajú 93,5 % prežívateľnosť šteniat infikovaných matiek, ktoré boli vakcinované lyofilizovanou purifikovanou vakcínou CHV kmeňa F 205 obohatenou o glykoproteíny na 10 deň po nakrytí a o 6 týždňov neskôr bola vykonaná revakcinácia kvôli navýšeniu titra rýchlo sa rozpadávajúcich protilátok proti CHV.(Poulet a kol., 2001)

Pred vypuknutím klinických príznakov je možná jednorazová aplikácia hyperimúnného séra získaného od senzibilizovaného jedinca, najlepšie matky šteniat. Sérum aplikujeme intraperitoneálne v množstve 1 – 2 ml pro toto. Úspech tejto terapie závisí od koncentrácie protilátok v sére a od rozvinutia choroby.(Svoboda a kol., 1996), (Greene a kol., 2006).

Terapia s použitím antivirových priniesla kontroverzné výsledky.(Greene a kol., 2006).

Keďže vylučovanie CHV-1 je závislé na súčasnom statuse imunitného systému jedinca je možné toto ovplyvniť imunostimuláciou organizmu.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla za podpory VEGA 1/3506/06 Slovenskej Republiky

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Greene C. E. et al. Infectious Diseases of the dog and cat. Third edition, Philadelphia; W. B. Saunders Company, 2006:1387.
- Chester P. M., Allsop R., Purewal A. et al. Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *Virology* 1997;71(5):3437-3443.
- Miyoshi M., Ishii Y., Takiguchi M., et al. Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. *J Vet Med Sci* 1999;61:375-379.
- Morresey P. Reproductive effects of canine herpesvirus. *Compend Contin Educ Pract Vet* 2004;(26):804-811.
- Okuda, Y., Ishida, K., Hashimoto, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., Carmichael, L.E. Virus reactivation in bitches with a medical history of herpesvirus infection *Am J Vet Res.* 1993 Apr;54(4):551-4.
- Poulet H., Guigal P. M., Soulier M. et al.. Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams. *Vet Rec* 2001;148:691-695.
- Reubel, G.H., Pekin, J., Venables, D., Wright, J., Zabar, S., Leslie, K., Rothwell, T. L.W., Hinds, L.A., Braid, A.: Experimental infection of European red foxes (*Vulpes vulpes*) with canine herpesvirus, Received 11 december 2000; revised 8 May 2001; accepted 4 June 2001 Available online 20 September 2001.
- Ronsse V., Verstegen J., Onclin K. et al. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 2000. *Reprod Domest Anim* 2002;37(5):299-304.
- Svoboda M., Pospíšil, Z. a kol. Infekční nemoci psa a kočky. Brno; ČAVLMZ, 1996:504.
- Švrček Š. a kol. Vírusové a priónové choroby. Prešov; M&M, 2001:567.
- Toman M., Bárta O., Dostál J. Veterinární imunologie. Praha; Grada Publishing, 2000:411.
- Větvička, V., Fornusek, I., Kopeček, J., Kamínková, J., Kašpárek, I., Vránová, M.: *Immunol.Lett.*,1982, 5, 97-100.

ANTIOXIDAČNÁ AKTIVITA A OBSAH POLYFENOLOV EXTRAKTOV VYBRANÝCH RASTLÍN

Šoltysová L., Marcinčák S., Nagy J., Kasperová J.

Ústav hygieny a technológie mäsa, UVL, Košice

Katedra hygieny a technológie potravín, UVL, Košice

ABSTRAKT

V experimente bola pozorovaná antioxidačná aktivita a obsah polyfenolov metanolových extraktov 10 vybraných rastlín aktuálne dostupných v našom regióne. Išlo o *Agrimonia eupatoria* L, *Melissa officinalis* L, *Salvia officinalis* L, *Origanum vulgare* L, *Thymus serpyllum vulgare* L, *Geranium pratense* L, *Polygonum aviculare* L, *Achillea millefolium* L, *Satureja hortensis* L a *Crataegus oxyacantha* L. Najvyšší antioxidačný efekt bol zaznamenaný u extraktov oregana, medovky a repíka. U týchto troch extraktov sme zaznamenali najvyšší obsah celkových fenolov a tieto rastliny môžu byť preto budú použité v našich ďalších experimentoch. Najnižšiu antioxidačnú aktivitu a najnižší obsah fenolov sme zaznamenali u extraktu z rebríčka obyčajného, a preto jeho použitie nemá význam.

ÚVOD

Antioxidanty sú látky, ktoré potláčajú deštruktívnu činnosť voľných radikálov. Ochraňujú tukové zložky pred devastačnými účinkami kyslíka. Niekoľko málo molekúl antioxidantov je schopných neutralizovať mnoho molekúl voľných radikálov. Antioxidanty bránia samovoľnej oxidácii potravín, čím prispievajú k zachovaniu ich pôvodných fyzikálnych a chemických vlastností. Z tohto dôvodu sa pridávajú do potravín (Marcinčák a kol., 2008), ktoré sú oxidáciou nadpriemerne poškodzované (mäso a mäsové výrobky, rastlinné oleje). Antioxidanty sa dajú deliť na prirodzené (v prírode alebo v danej potravine sa prirodzene vyskytujú) a syntetické. V posledných rokoch sa prejavil zvýšený záujem v používaní prírodných antioxidantov získaných z tokoferolových, flavonoidových a rozmarínových extraktov (*Rosmarinus officinalis* L.) na konzerváciu potravín (Bruni a kol., 2004; Frutos a Hernandez-Herrero, 2005; Hras a kol., 2000), pretože pri ich používaní nedochádza ku problémom s toxicitou, ku ktorej môže dôjsť pri používaní syntetických antioxidantov, ako sú butylhydroxyanizol, butylhydroxytoluén a propylgaláty (Amarowicz a kol., 2000; Aruoma a kol., 1992). Rastliny, vrátane bylín a korenín, majú množstvo komponentov, ktoré sú prirodzenými zdrojmi prirodzených antioxidantov, napr. fenolické diterpény, flavonoidy, taníny a fenolové kyseliny (Dawidowicz a kol., 2006). Tieto komponenty majú antioxidačné, protizápalové a protirakovinové účinky (Lee a kol., 2004). Medzi rastlinami a koreninami ako zdrojmi antioxidantov bola najväčšia pozornosť zameraná na rozmarín. V predošlých štúdiách sa šalvia (*Salvia officinalis* L.) a rozmarín ukázali ako rastliny s podobnou skladbou fenolických komponentov a ich antioxidačná aktivita je pripisovaná hlavne kyseline karnozovej, karnozolu a kyseline rozmarínovej (Frankel a kol., 1996; Thorsen a Hildebrandt, 2003).

Cieľom práce bolo stanoviť antioxidačnú aktivitu a množstvo celkových fenolov v nami pripravených metanolových extraktoch rastlín.

MATERIÁL A METODIKA

Výroba alkoholových extraktov

Extrakcia rastlín metanolom bola vykonaná podľa Miliuskas a kol. (2003). 30 g vysušených rastlín (medovka lekárska, repík lekárske, klinčekovec voňavý, šalvia lekárska, pamajorán obyčajný, materina dúška – tymián, pakost lúčny, hloh obyčajný, stavikrv vtáčí, saturejka záhradná a rebríček obyčajný) sme pomleli v mixéry na prášok. Extrakcia bola vykonaná

v dvoch krokoch. Do 250 ml banky s normovaným zábrusom sme k 10 g rastlinného prášku pridali 50 ml metanolu a extrahovali 2 hodiny za stáleho miešania. Po 2 hodinách sme odobrali metanolovú časť do pripravenej banky, k rastlinnej vzorke pridali ďalších 50 ml metanolu a extrahovali ďalšie 2 hodiny. Následne sme extrakty zmiešali, prefiltrovali a odparili vo vákuovej odparke pri teplote 40 °C. Po zväžení vyextrahovanej časti a vypočítaní výťažnosti sme pripravili zásobné roztoky jednotlivých bylenných extraktov o koncentrácii 10 mg.ml⁻¹.

Stanovenie antioxidačnej aktivity

Schopnosť rastlinných extraktov zachytávať voľné radikály oproti stabilite DPPH· radikálu (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) bola meraná spektrofotometricky (Heilerová a kol., 2003). Reakciou DPPH· radikálu s antioxidačnými zložkami, ktoré sú donormi vodíka dochádza k jeho redukcii. Touto reakciou dochádza k zmene farby (z tmavo-fialovej na svetlo-žltú). Zmena farby bola meraná pri 515 nm na UV-spektrofotometri (Helios γ v 4.6, Thermospectronic, Veľká Británia). Jednotlivé extrakty rastlín boli každý deň pred stanovením rozriedené metanolom v pomere 1:25 zo zásobného roztoku. Roztok DPPH· v metanole (0,1 μM) bol pripravený každý deň pred stanovením čerstvý. 3,9 ml takto pripraveného roztoku sme napipetovali do 1 cm hrubej kyvety a zmerali extinkciu (absorbanciu) pri 515 nm (A₀). Následne sme pridali 100 μl rastlinného extraktu, premiešali a merali absorbanciu pri 515 nm v 1 minútových intervaloch až do 10 min. stanovenia (A_A). Schopnosť rastlinných extraktov zachytávať voľné radikály bola vypočítaná podľa vzorca:

$$\% \text{ inhibície} = [(A_0 - A_A) / A_0] \times 100$$

kde : A₀ – je absorbancia blanku (t = 0 min.)

A_A – je absorbancia testovanej vzorky (t = 10 min)

Spektrofotometrické stanovenie množstva celkových fenolov

Koncentrácia celkových fenolov bola stanovená testom Folin-Ciocalteu (Singleton a kol., 1999). Pred stanovením množstva celkových polyfenolov boli jednotlivé zásobné roztoky riedené 1:25 alebo 1:50 (klinčekovec voňavý) destilovanou vodou, v závislosti od predpokladaného množstva prítomných polyfenolov.

1 ml pripraveného extraktu sme v 25 ml odmernej banke zmiešali s 5 ml FC-reagentu (zriedeného 1:10 destilovanou vodou) a 4 ml Na₂CO₃ (75 g.l⁻¹). Po 30 min inkubácii pri izbovej teplote sme zmerali absorbanciu na UV-spektrofotometri (Helios γ v 4.6, Thermospectronic, Veľká Británia) pri 765 nm oproti slepej vzorke. Výsledky sú prezentované ako množstvo kyseliny galikovej (mg.g⁻¹), ktorá bola použitá na prípravu kalibračnej krivky.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky stanovenia antioxidačnej aktivity udáva tabuľka 1. Zo všetkých metanolových extraktov najvyššie percento inhibície vykazovali extrakty oregana, medovky a pakostu lúčneho (95,2; 91,2, 88,30 %). Veľmi dobrú zachytávaciu aktivitu vykazuje aj repík a hloh. Tymián, saturejka, šalvia a stavikrv majú nižšiu antioxidačnú aktivitu, ale ich hodnoty neklesajú pod 40 %. Najnižšiu aktivitu vykazoval rebríček obyčajný (14,3 %). Pri hodnotení množstva celkových fenolov (tabuľka), najvyšší obsah bol zaznamenaný v extrakte oregana (262,1 mg.g⁻¹). Vysoký obsah fenolov bol stanovený aj u extraktov medovky, hlohu a repíka (249, 244, 179 mg.g⁻¹). Najnižší obsah celkových fenolov vykazuje extrakt z rebríčka obyčajného (25,3 mg.g⁻¹). K podobným výsledkom došli aj Ivanová a kol. (2005), ktorý pri hodnotení 21 rastlín taktiež stanovili najvyššie množstvá celkových fenolov u extraktov oregana. Taktiež konštatujú, že medovka a repík sú rastliny s vysokým antioxidačným potenciálom. Heilerová a kol. (2004) uvádza signifikantne vyššiu antioxidačnú aktivitu

oregana a medovky oproti repíku a timiánu. Avšak na stanovenie použila vodné extrakty rastlín. Nižšie množstvo antioxidantne pôsobiacich zložiek je pravdepodobne spôsobené extrakčným činidlom (voda).

Tabuľka 1 Stanovenie antioxidantnej aktivity vyjadrená ako DPPH inhibícia (%) a množstva celkových fenolov ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) v metanových extraktoch rastlín.

Rastlinný extrakt	Antioxidantná aktivita (%)	Množstvo celkových fenolov ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
Repík lekársky	85,20	179,2 ± 2,4
Medovka lekárska	91,20	249,85 ± 5,3
Šalvia lekárska	52,30	79,3 ± 1,1
Pamajorán obyčajný	95,20	262,1 ± 3,3
Materina dúška - tymianová	56,60	115,1 ± 3,2
Pakost lúčny	88,30	138,6 ± 5,4
Stavikrv vtáčí	40,30	43,0 ± 0,5
Rebríček obyčajný	14,30	25,3 ± 0,2
Saturejka záhradná	50,30	94,7 ± 1,5
Hloh obyčajný	78,90	244,3 ± 1,2

POĎAKOVANIE

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore z grantovej úlohy VEGA č. 1/0235/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Amarowicz, R., Naczka, M., Shahidi, F. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. *J. Agric. Food Chem.*, 2000; 48:2755–2759.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Aeschbach, R., Loligers, J. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: Carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, 1992; 22:257–268.
- Bruni, R., Muzzoli, M., Ballero, M., Loi, M. C., Fantin, G., Poli, F. Tocopherols, fatty acids and sterols in seeds of four Sardinian wild Euphorbia species. *Fitoterapia*, 2004; 75:50–61.
- Dawidowicz, A. L., Wianowska, D., Baraniak, B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from Sambucus nigra L. (antioxidant properties of extracts). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 2006; 39:308–315.
- Frankel, E. N., Huang, S.-W., Aeschbach, R., & Prior, E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 1996; 44:131–135.
- Frutos, M. J., & Hernandez-Herrero, J. A. Effects of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) on the stability of bread with an oil, garlic and parsley dressing. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 2005; 38:651–655
- Heilerová L., Bučková M., Tarapčík P., Šilhár S., Labuda J. Comparison of antioxidative activity data for aqueous extracts of lemon balm (*Melissa officinalis* L), oregano (*Origanum vulgare* L), thyme (*Thymus vulgaris* L) and agrimony (*Agrimonia eupatoria* L) obtained by conventional methods and the DNA- based biosensor. *Czech J. Food Sci.*, 2003; 21, 2:78-84.

- Hras, A. R., Hadolin, M., Knez, Z., Bauman, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chem.*, 2000; 71:229–233.
- Ivanová D., Gerova D., Chervekov T., Yankova T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 2005; 96:145-150.
- Lee, J.-Y., Hwang, W.-I., Lim, S.-T. Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* a. De Candolle roots. *J. Ethnopharmacol.*, 2004; 93:409–415.
- Marcinčák S., Cabadaj R., Popelka P., Šoltýsová L. Antioxidative effect of oregano supplemented to broilers on oxidative stability of poultry meat. *Slov. Vet. Res.*, 2008; 45, 2:63-68.
- Milliauskas G., Venskutonis P.R., van Beek T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 2004; 85:231-237.
- Singleton V.I., Ortofer R., Lamuela.R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substances and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: *Methods in Enzymology*. Ed L. Packer. Academic Press, Orlando, 1999; 152-178.
- Thorsen, M. A., Hildebrandt, K. S. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts. Aspects of accurate quantification. *J. Chromatogr. A*, 2003; 995:119–125.

PREHĽAD STANOVENÍ KOKCIDIOSTATÍK S VYUŽITÍM KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE S RÔZNYMI TYPMI DETEKTOROV

Tkáčiková S.¹, Kožárová I.², Máté D.²

¹ Štátny veterinárny a potravinový ústav, Košice

² Katedra hygieny a technológie potravín, UVL, Košice

ABSTRAKT

Kokcidiostatiká patria ku skupine liečiv, ktoré sa používajú na kontrolu kokcidiózy nielen v chovoch hydiny. Nakoľko ich účinky majú dosah aj na zdravie ľudí, je nevyhnutné mať k dispozícii univerzálnu, rýchlu a spoľahlivú metódu, ktorou sa dajú stanoviť. Cieľom mojej práce bolo navrhnúť takúto metódu, ktorá by sa dala použiť pri stanovovaní kokcidiostatík v potravinách aj krmivách.

ÚVOD

Kokcidiostatiká patria do skupiny liečiv, ktoré sa denne používajú v chovoch hospodárskych zvierat. Ich použitie nie je obmedzené len na samotnú liečbu kokcidiózy, ale používajú sa rutinne na zabránenie vypuknutia choroby. Vzhľadom na dlhodobé podávanie týchto liečiv počas života zvieratám produkujúcim potraviny je nutné kontrolovať hladinu ich rezíduí. Maximálne limity rezíduí pre väčšinu liečiv používaných na terapiu zvierat sú stanovené v nariadení Rady (EHS) č. 2377/90 z 26. júna 1990 [1] v znení neskorších predpisov. Aj keď v tomto nariadení sú zakomponované skoro všetky povolené liečivá v EÚ, práve kokcidiostatiká boli až donedávna mimo záujmu. Od roku 2006 stanovuje toto nariadenie maximálny reziduálny limit pre lasalocid v svalovine, tuku, pečeni a obličke hydiny a vajciach a od januára roku 2008 monenzín pre svalovine, tuku, pečeni a obličke hovädzieho dobytku a v mlieku. Vo Vestníku MP SR Ročník č.15/2007 z 31. augusta 2007 [2], sú ako povolené kokcidiostatiká v zozname krmných doplnkových látok okrem už spomínaných uvedené aj salinomycín, narazín, maduramycín, semduramycín, nikarbazín, robenidín, diklazuril, halofuginón a dekokochinát. Z toho vyplýva, že ich rezíduá budú prítomné v živočíšnych produktoch zvierat kŕmených krmivom s obsahom kokcidiostatík.

MATERIÁL A METODIKA

Na stanovovanie obsahu kokcidiostatík v krmivách sa v 90 - tých rokoch minulého storočia používala tenkovrstvová chromatografia. Avšak bez udania očakávanej koncentrácie kokcidiostatika v krmive bolo túto hladinu touto metódou priam nemožné stanoviť. Dá sa ňou potvrdiť neprítomnosť vopred vytypovaného kokcidiostatika neobjavením sa škvrny na pozícii naneseného známeho štandardu. Ako presnou inštrumentálnou metódou sa javí vysokoúčinná kvapalinová chromatografia pracujúca pri teplotách v rozsahu 20 – 60 °C. Tieto podmienky sú vhodné pre stanovovanie liečiv, nakoľko napr. pri plynovej chromatografii, pracujúcej pri teplotách okolo 200 °C, nastáva problém s degradáciou liečiva už v samotnom dávkovači. Pri stanovovaní hladiny v krmivách sa dá úspešne na detekciu použiť refraktometrický detektor, merajúci index lomu mobilnej fázy, ktorá doň vstupuje. Vďaka tomuto detektoru je možné stanoviť každé kokcidiostatikum, avšak prekážkou je nízka citlivosť takéhoto detektora. Na našom ústave bol testovaný refraktometrický detektor Shodex a citlivosť pre stanovenie monenzínu bola 5 mg.kg⁻¹. Z toho vyplýva, že použitie tohto detektora v stanovovaní rezíduí je nevhodné. Ďalším voleným detektorom bol UV detektor. Vzhľadom na rôznu chemickú štruktúru povolených kokcidiostatík nebolo možné použiť jedinou metódu, ktorou by sa stanovili všetky požadované liečivá vedľa seba. Nakoľko robenidín, diklazuril a nikarbazín vykazujú absorbanciu v UV oblasti (280 nm, pri 390 nm len nikarbazín a robenidín), podarilo sa ich odseparovať na kolóne Li - Chrospher RP select - B, 125x4 mm, 5 µm od firmy Merck, využívajúc polárnosť ich molekúl. Problém nastáva u

polyéterických kokcidostatík (monenzín, lasalocid, salinomycín, narazín, maduramycín, semduramycín), pretože ich molekuly neabsorbujú UV žiarenie. Ak chceme takéto analyty stanovovať UV detektorom, musíme do ich štruktúry vniesť chromofór, vďaka ktorému budú v UV oblasti vykazovať absorbanciu. Takýto proces sa nazýva derivatizácia.

V literatúre sa uvádza niekoľko možností. Najznámejšou je Komarowského derivatizácia s použitím vanilínu (4 – hydroxy – 3 – metoxybenzaldehyd) v kyslom prostredí kyseliny sírovej pri 99° C [3, 4], pri ktorej niektoré ionofóry poskytujú produkty absorbujúce pri vlnovej dĺžke 520 nm. Táto reakcia sa dá v kvapalinovej chromatografii použiť ako postkolónová derivatizácia, t.j. po prejdení analytov analytickou kolónou sa pomocnou pumpou dodáva derivatizačné činidlo, ktoré kontinuálne reaguje s odseparovanými analytmi v mobilnej fáze. Výhodou tejto formy derivatizácie je, že aj keď pri reakcii môže vzniknúť viac derivatizačných produktov, budú analyzované ako jeden pík. Nevýhodou tejto reakcie sa ukázala jej nízka senzitivita a to 500 µg.kg⁻¹. Veľkým problémom sa ukázalo, že táto reakcia neposkytovala odozvu pre maduramycín, semduramycín a lasalocid. Výhodou samotného lasalocidu je, že ho je možné detekovať bez derivatizácie pri 250 nm alebo fluorescenčným detektorom pri excitačnej vlnovej dĺžke 300 nm a emisnej vlnovej dĺžke 420 nm. Výhodou je aj citlivosť takéhoto detektora, ktorý je v priemere 10-krát citlivejší ako UV detektor. Ďalej bola testovaná derivatizácia s 2, 4-dinitrofenylhydrazínom, vychádzajúc z prác Dusiho a Gambu [5] a Gerhardta a kol. [6]. Jej výhodou je vyššia citlivosť, ako u derivatizácie vanilínom. Porovnanie citlivosti jednotlivých typov detekcií je uvedený v tabuľke 1. Avšak ani touto derivatizáciou sa nepodarilo v našich podmienkach stanoviť maduramycín a semduramycín.

Technika, ktorou je možné stanoviť všetky tieto kokcidostatiká jednou analýzou, je kvapalinová chromatografia s hmotnostným detektorom, ktorá sa v dnešnej dobe tlačí do popredia v analýzach všetkých, nielen veterinárnych liečiv pre svoju univerzálnosť. Takýmto typom detektora je možné detekovať každú molekulu, ktorá je schopná tvoriť ióny, či už kationy alebo anióny. Na našom pracovisku v súčasnosti analyzujeme 10 kokcidostatík: všetky povolené ionofórové antikokcidiká, robenidín a halofuginón v pozitívnom ionizačnom móde a diklazuril a nikarbazín v negatívnom móde, keďže ochotnejšie tvoria anióny. Vychádzali sme z metodiky vyvinutej Komunitným referenčným pracoviskom pre detekciu veterinárnych liečiv BVL v Berlíne, ktorú sme upravili na naše podmienky. Analýzu uskutočňujeme na kvapalinovom chromatografe Alliance a hmotnostnom detektore Quattro Micro od firmy Waters. Hmotnostný analyzátor tohto detektora je tandemový hmotnostný spektrometer zložený z dvoch hmotnostných analyzátorov typu quadrupól a kolíznej cely – tzv. triple quadrupól. Prvý analyzátor slúži ako hmotnostný filter, ktorý do kolíznej cely vpúšťa len ióny s vyšpecifikovanou hmotnosťou - prekurzorové (rodičovské) ióny, v závislosti od stanovovaného kokcidostatika a jeho molekulovej hmotnosti. V kolíznej hexapólovej cele sú vyšpecifikované ióny bombardované atómami argónu a fragmentujú na produktové (dcérske) ióny. Druhý hmotnostný analyzátor odfiltruje neželané ióny a do detektora vpustí len dcérske ióny s analytikom presne vyšpecifikovanou hmotnosťou. V detektore ióny atakujú konverznú dynódu, ktorá ďalšími fyzikálnymi procesmi konvertuje ióny až na fotóny, ktoré sú fotomultiplierom v detektore spočítané [7]. Ako mobilnú fázu používame zmes metanol / voda / kyselina octová v pomere 900 / 99 / 1 v / v / v pri prietoku 0,4 ml.min⁻¹. Pri stanovení neionofórov používame gradientovú elúciu, s počiatočným zložením metanol / voda / kyselina octová v pomere 700 / 299 / 1 v / v / v. Separácia sa uskutočňuje pomocou dvoch kolón využívajúc automatický prepínač medzi nimi. Na stanovenie ionofórov kolónu Luna, Phenomenex (C-18, 150 x 2 mm, 3 µm) a kolónu Symmetry, Waters (C-18, 75 x 4,6 mm, 3,5 µm) pre stanovenie robenidínu, halofuginónu, diklazurilu a nikarbazínu. Teplota ionového zdroja je 450° C a prietok nebulizačného plynu – dusíka 600 l.hod⁻¹. Limity detekcie a kvantifikácie pri stanovovaní kokcidostatík touto

metódou sú uvedené v tabuľke č.1. Tieto limity je možné znížiť použitím vyššej navážky matrice, z ktorej sa reziduá analytov budú extrahovať, prípadne odparením finálneho diluenta pred samotnou injektážou do separačného modulu. Naopak v prípade stanovovania kokcidiostatík v krmivách technikou LC/MS/MS, vzhľadom na jej vysokú citlivosť, je nutné vyextrahovaný analyt niekoľkonásobne riediť (napr. v prípade ionofórových kokcidiostatík až 500 – krát). Preto je nutné venovať veľkú pozornosť použitému odmernému sklu a odmerným dávkovacím striekačkám.

Tab.1 Limity detekcie a kvantifikácie jednotlivých kokcidiostatík uvedené na tri platné číslice v mg.dm⁻³ separovaných kvapalinovou chromatografiou v závislosti od použitej detekčnej techniky

Kokcid	LOD FLD	LOQ FLD	LOD DNF	LOQ DNF	LOD vanilín	LOQ vanilín	LOD UV	LOQ UV	LOD LC/MS /MS	LOQ LC/MS /MS
MON	ND	ND	118.	198	70.9	89.7	ND	ND	0.49	1.48
SAL	ND	ND	90.1	152	188	281.	ND	ND	2.15	6.47
LAS	9.53	20.1	NR	NR	NR	NR	ND	ND	0.86	2.59
NAR	ND	ND	56.8	109.	56.2	84.0	ND	ND	0.33	1.00
MAD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.47	1.42
SEM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.62	1.87
ROB	ND	ND	ND	ND	ND	ND	33.4	92.6	0.82	2.45
HAL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	0.81	2.42
NIC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	43.1	69.8	0.56	1.68
DIK	ND	ND	ND	ND	ND	ND	80.4	197	0.96	2.90

Kokcid – kokcidiostatikum, MON – monenzín, SAL – salinomycín, LAS – lasalocid, NAR – narazín, MAD – maduramycín, SEM – semduramycín, ROB – robenidín, HAL – halofuginon, NIC - nikarbazín, DIK – diklazuril, LOD – limit detekcie, LOQ - limit kvantifikácie, ND – not detected (nedetekované, t.j. touto technikou sa nedá analyt stanoviť), NA – not analysed (neanalyzované, technika nebola testovaná), NR – no reaction (nereaguje s príslušným derivatizačným činidlom, DNF – derivatizácia 2,4-dinitrofenylhydra-zínom, vanilín – derivatizácia vanilínom, FLD – detekcia fluorescenčným detektorom, UV – detekcia UV detektorom v ultrafialovej oblasti spektra, LC/MS/MS – detekcia tandemovým hmotnostným spektrometrom

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe testovaných detekčných techník a preštudovanej literatúry na stanovenie kokcidiostatík v rutínnej laboratórnej praxi odporúčame použiť v prípade možnosti jednoznačne techniku LC/MS/MS pre jej univerzálnosť a rýchlosť (jednotlivé analyty nie je potrebné rozdeliť až na baselinu – základnú líniu, čo výrazne skrátí čas analýzy). Ďalšou prednosťou je jednoznačnosť stanovenia jednotlivých analytov, nakoľko sú identifikované na základe svojich molekulových hmotností a na základe svojej štruktúry, podľa ktorej sa správajú pri štiepení na dcérske ióny v iónovom zdroji.

POĎAKOVANIE

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Úradný vestník UL L 224. 1990:1-8.
2. Vestník MP SR. 2007; 15:179-192.

- 3.Moran et.al.: Determination of monensin in chicken tissues by liquid chromatography with postcolumn derivatization. Journal of AOAC International. 1994; 77:885-890 .
- 4.Komarowski, A., Chem.Ztg. 1903; 27:1086.
- 5.Dusi, G., Gamba, V. Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feeds using pre-column derivatization. Journal of Chromatography.1999; 835:243-246.
- 6.Gerhardt, G., Salisbury, C., Campbell, H. Determination of ionophores in the tissues of food animals by liquid chromatography. Food Additives and Contaminants. 1995;12:731- 737.
- 7.Quattro micro Operation and Maintenance Training, Waters Corporation, 2005.

STANOVENIE CITLIVOSTI *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* NA VYBRANÉ DRUHY ANTIMYKOTÍK POMOCOU METÓDY ETESTU

Vantrubová J., Čonková E., Váczi P.

Ústav farmácie a farmakológie, UVL, Košice

ABSTRAKT

Bola testovaná účinnosť vybraných antimykotík voči kvasinke *Malassezia pachydermatis*. Vzorky *Malassezia pachydermatis* boli izolované z výterov vonkajšieho zvukovodu a kože psov s potvrdenou malaseziózou. Na stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) daného antimykotika bola použitá metóda Etestu. Z výsledkov vyplýva, že najúčinnjším antimykotikom na terapiu tejto kvasinkovej infekcie je ketokonazol. Veľmi dobrú účinnosť vykazujú aj amfotericín B a flukonazol. Kaspofungín patrí k najmenej účinným antifungálnym látkam na terapiu malaseziózy.

ÚVOD

Malassezia pachydermatis (*Pityrosporum canis*) je súčasťou prirodzenej mikroflóry kože psov a mačiek (Dorogi, 2002).

Je to lipofilná kvasinka, najčastejšie sa vyskytujúca v oblasti vonkajšieho zvukovodu, v oblasti pyskov, v interdigitálnej a v análnej oblasti (www.utskinvet.org).

Približne 50% klinicky zdravých psov je nositeľom tejto kvasinky. Faktory, ktoré ovplyvňujú premenu malasézie z normálneho mikroorganizmu prítomného na koži, na pôvodcu ochorenia, nie sú celkom známe. Pravdepodobne sa jedná o zmeny, ovplyvňujúce fyzikálne, chemické alebo imunologické mechanizmy, ktoré obmedzujú normálne bakteriologické zloženie kože (Dorogi, 2002). Ochorenia ako *diabetes mellitus*, atopia, bakteriálne kožné infekcie, poruchy keratinizácie (seborrhoea), endokrinopatie (hypotyreóza, hyperadrenokorticismus), imunologické dysfunkcie a kožné neoplázie podmieňujú vznik ochorenia (Mauldin, 2002). K plemenám psov, ktoré majú predispozíciu k dermatitídám spôsobených malaséziami patria: west highland biely teriér, kokeršpaniel, boxer, nemecký ovčiak, maltézsky pinč, čivava, kólia, pudel (Bond, 1994; White a Bourdeau, 1995; Larson a kol., 1998; Scott a kol., 2001).

Na liečbu malaseziózy sa používajú rôzne lokálne antifungálne prípravky na báze ketokonazolu (Evans, 1991), mikonazolu, klotrimazolu a chlorhexidínu (šampóny, krémy, gély, kúpele, spreje) v kombinácii so systémovými azolovými antimykotikami (ketokonazol, itrakonazol, flukonazol) (Paterson a Frank, 1992). Pri otitídach sa uplatnili ušné kvapky s antimykotickou aj antibakteriálnou zložkou. Pri liečbe generalizovanej alebo chronickej formy je liekom prvej voľby ketokonazol a itrakonazol (Svoboda, 2000). *Malassezia pachydermatis* je citlivá na azolové deriváty, nystatín, amfotericín B a 5-fluorocytosín. Griseofulvín a alylamínové deriváty nie sú pri liečbe malaseziózy efektívne (White a Bourdeau, 1995).

Jednou z dostupných a pomerne často používaných metód na stanovenie citlivosti patogénov a minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) antifungálnych prípravkov je Etest. Princíp testu spočíva vo využití difúznej agarovej metódy a stripov s koncentračným gradientom antifungálnych látok, ktorý umožňuje stanovenie MIC, ktorá určuje efektivitu vybraného liečiva.

Cieľom našej práce bolo pomocou tejto metódy stanoviť *in vitro* citlivosť kvasinky *Malassezia pachydermatis* na polyénové makrolidové antibiotikum - amfotericín B, echinokandín - kaspofungín a vybrané druhy azolových derivátov.

MATERIÁL A METODIKA

Etestom bola stanovená citlivosť patogénnych kmeňov *Malassezia pachydermatis* a minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) antifungálnych látok na báze itrakonazolu (IT), ketokonazolu (KE), flukonazolu (FL), flucytozínu (FC), amfotericínu B (AP), vorikonazolu (VOR), posakonazolu (POS) a kaspofungínu (CS).

Kvasinky *Malassezia pachydermatis* boli izolované z výterov vonkajšieho zvukovodu a kožných sterov psov s potvrdenou dermatitídou, resp. otitídou. Z čistých kultúr získaných pasážovaním na Sabouradovom dextrózovom agare s chloramfenikolom bola podľa McFarlandovej stupnice 1 pripravená suspenzia s koncentráciou 10^6 cfu/ml. Sterilným tampónom bolo inokulum nanášané na 90 mm platne agaru, zloženého z RPMI 1640, 2% glukózy, MOPS-u (3-(N- morfolino propán sulfónová kyselina) a 1,5% Bacto agaru v 3 smeroch 2-krát. Po 15 minútach boli pomocou aplikátora na každú platňu rozmiestené po 2 prúžky Etestu, impregnované odstupňovanou koncentráciou antifungálneho prípravku. Kultivácia prebiehala pri 37°C a po 72 hodinách boli odčítané hodnoty MIC, ktoré určené priesečníkom rastovej inhibičnej tóny a kalibrovaného prúžku Etestu. Výsledky boli vyhodnotené podľa interpretačných kritérií pre *Malassezia pachydermatis*, stanovených 3 meraniami kontrolného kmeňa IHEM 19215 (Liege, Belgicko)

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Interpretačné kritériá MIC vybraných druhov antimykotík (ATM) sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 2 dokumentuje rozpätie, priemerné hodnoty MIC ako aj modus, ktorý poukazuje na koncentráciu s najčastejším výskytom. *Malassezia pachydermatis* bola najviac citlivá na ketokonazol, ktorého hodnoty MIC boli v rozpätí od 0,004 do 32 $\mu\text{g/ml}$ (modus (M) = 0,032). Veľmi dobrá účinnosť bola pozorovaná aj pri amfotericíne B (0,002-1,5 $\mu\text{g/ml}$, M= 0,121 a flukonazole (MIC sa pohybovala od 0,016 do 256 $\mu\text{g/ml}$, M= 0,016). Pri novších azolových derivátoch, posakonazole, bola hodnota MIC 0,016-2 $\mu\text{g/ml}$ a hodnota modusu 0,064, pri vorikonazole bola MIC od 0,016 do 4 $\mu\text{g/ml}$, s modusom 0,032 $\mu\text{g/ml}$. Obr.1 – 4 ilustrujú odčítanie hodnôt MIC.

Tabuľka 3 vyhodnocuje stupeň citlivosti citlivosti *Malassezia pachydermatis* na jednotlivé ATM. Izoláty boli najviac citlivé na ketokonazol (70,6%). Práve ketokonazol je najúčinnnejším a najviac používaným antifungálnym prípravkom na liečbu malaseziózy (Odds a kol., 2003, Rosales a kol., 2005). Veľmi dobrá účinnosť bola pozorovaná aj pri flucytozíne (64,7%), flukonazole a amfotericíne B (58,8%). Posakonazol a vorikonazol vykazujú rovnaké percento účinnosti (47,1%). Kaspofungín sa ukázal ako antimykotikum s najnižšou antifungálnou aktivitou voči tomuto patogénu (17,6%).

Výsledky testovania poukazujú na dôležitosť stanovenia citlivosti mikromycét – dôležitého faktora pre vykonávanie cielenej antimykotickej terapie.

Tab. 1 Interpretačné kritériá pre *Malassezia pachydermatis*

ATM	C	I	R
AP	0,125	0,25-1	1
KE	0,125	0,25-0,5	1
IT	0,125	0,25-0,5	1
CS	1	2	4
FC	0,125	0,25-0,5	1
FL	8	16-32	32
POS	0,125	0,25-0,5	1
VOR	0,125	0,25-0,5	1

ATM – antimykotikum, C – citlivý, I – intermediárny, R – rezistentný kmeň

Tab.2 Hodnoty MIC ($\mu\text{g/ml}$) testovaných ATM pre *Malassezia pachydermatis*

ATM	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	Min - Max	$\bar{\sigma}$	Modus
AP	0,002-1,5	0,12	0,125
KE	0,004-32	0,05	0,032
IT	0,002-32	0,24	0,25
CS	0,25-32	1,53	2
FC	0,012-3	0,03	0,016
FL	0,016-256	1,02	0,016
POS	0,016-2	0,13	0,064
VOR	0,016-4	0,07	0,032

ATM – antimykotikum, MIC – minimálna inhibičná koncentrácia, $\bar{\sigma}$ – geometrický priemer

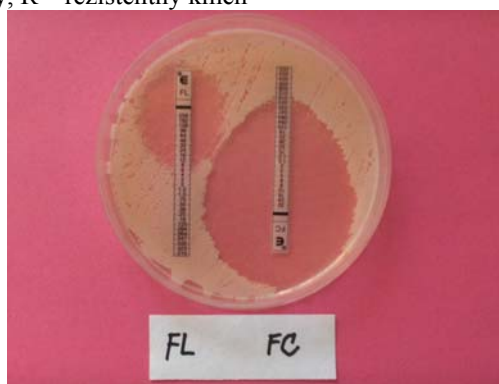
Tab.3 Citlivosť (%) *Malassezia pachydermatis* na ATM podľa interpretačných kritérií

ATM	C		I		R	
	n	%	n	%	n	%
AP	10	58,8	6	35,3	1	5,9
KE	12	70,6	2	11,8	3	17,6
IT	5	29,4	7	41,3	5	29,4
CS	3	17,6	9	52,94	5	29,4
FC	11	64,7	1	5,88	5	29,4
FL	10	58,8	2	11,8	5	29,4
POS	8	47,1	3	17,6	6	35,3
VOR	8	47,1	1	5,9	8	47,1

ATM – antimykotikum, C – citlivý, I – intermediárny, R – rezistentný kmeň



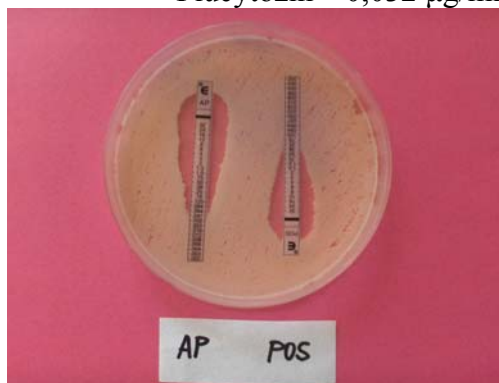
Obr. 1 MIC: Itrakonazol – 0,5 $\mu\text{g/ml}$
Ketokonazol – 0,064 $\mu\text{g/ml}$



Obr. 2 MIC: Flukonazol - 8 $\mu\text{g/ml}$
Flucytozín – 0,032 $\mu\text{g/ml}$



Obr. 3 MIC: Kaspofungín - 0,75 $\mu\text{g/ml}$
Vorikonazol – 0,125 $\mu\text{g/ml}$



Obr. 4 MIC: Amfotericín B – 0,064 $\mu\text{g/ml}$
Posakonazol – 0,5 $\mu\text{g/ml}$

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu vedy a techniky na základe zmluvy č. APVT-20-024104.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bond R., Anthony R. M.: Characterisation of markedly lipid-dependend *Malassezia pachydermatis* isolates from heathly dogs. J Appl Bact 1995, 78:537-542.
- Dorogi J.: Pathological and clinical aspects of the diseases caused by *Malassezia* species. Acta Microbiol Immunolog Hungarica 2002, 49:363-370.
- Evans A. G.: Difficult dermatologic diagnosis. J Amer Vet Med Assn 1991, 187:1141-1142.
http://www.utskinvet.org/dermatoses/malassezia_dermatitis.pdf
- Larson C. E., Larsson M. H., Amaral R. C.: Dermatitis in dogs caused by *Malassezia* (*Pit.*) *pachydermatis*, Ars Vet 1998, 4:63-68.
- Mauldin E. A.: *Malassezia dermatitis* in the dog: A retrospective histopathological and immunopathological study of 86 cases (1990-95). Vet Dermatol 2002, 7:191-202.
- Odds F., Ausma J, F. Van Gerven, J., Woestenborghs F., L. Meerpoel L., J. Heeres J., H. Vanden Bossche H., Borgers H.: *In Vitro* and *In Vivo* Activities of the Novel Azole Antifungal Agent R126638, Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48:388-391.
- Patterson A. P., Frank L. A.: How to diagnose and treat *Malassezia dermatitis* in dogs. Vet Med 2002, 3:612 – 622.
- Rosales M. S., Marsella R, Kunkle G, Harris B. L., Nicklin C. F., Lopez J.: Comparison of the clinical efficacy of oral terbinafine and ketoconazole combined with cephalexin in the treatment of *Malassezia dermatitis* in dogs a pilot study. In: Vet Dermatol 2005, 16:171-176.
- Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E.: In Muller and Kirks: Small Animal Dermatology, W. B. Saunders, Philadelphia, 2001, 412-420.
- Svoboda M., Senior D.F, Doubek J., Klimeš J.: Nemoci psa a kočky, Česká asociace veterinárních lékařů malých zvířat, Brno 2000, 414.
- White S. D., Bourdeau P.: Les dermaties a *Malassezia*. In: Proceedings GEDAC, Le Touquet, 1995, 432-450.

VARIÁCIE V ODSUPE AA. *INTERCOSTALES DORSALES* U POTKANA OBYČAJNÉHO

Vdoviaková K.

Ústav anatómie, UVL, Košice

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo poukázať na morfológické variácie v odstupe *aa. intercostales dorsales*, ktoré sú vetvami z *aorta thoracica*. V práci sme použili potkana obyčajného (*Rattus norvegicus f. domestica*) plemena Wistar oboch pohlaví. Eutanázia bola vykonaná éterom a následne kanyláciou ľavej komory sme prepláchli celé telo fyziologickým roztokom. Ako nástrekovú hmotu sme použili Duracryl Dental® na báze polymetylmetakrylátu (PMMA), ktorú sme zmiešali v pomere stanovenom výrobcom. Po nástreku sme celé telo opatrne preniesli do nádoby s vlažnou vodou, kde hmota dopolymerizovala. Maceráciu mäkkých tkanív sme uskutočnili v 2 – 4% roztoku KOH pri teplote 60 - 70°C po dobu 2 – 3 dní (Barta A., Demčišák L., 2000).

Na základe našich zistení sme dospeli k záveru, že *aa. intercostales dorsales* odstupujú z aorty spoločným odstupovým kmeňom v 7,14%, samostatným odstupom v 71,42% a v 21,43% *aa. intercostales dorsales* odstupujú v kraniálnej časti *aorta thoracica* samostatne, v kaudálnej časti spoločným kmeňom.

ÚVOD

Potkan obyčajný (*Rattus norvegicus f. domestica*) je jedným z často používaných laboratórnych zvierat, ktoré slúži pre štúdium miechy, ako aj okolitého tkaniva. Oblasť hrudníkovej aorty je veľmi častým miestom rôznych biomedicínskych pokusov a chirurgických zákrokov na mieche a v jej blízkosti. Krvenie hrudníkovej časti miechy, ale i okolitého svalstva u tohto druhu zvierat je rozpracované len veľmi málo, preto sme sa rozhodli poukázať na variácie odstupu týchto ciev.

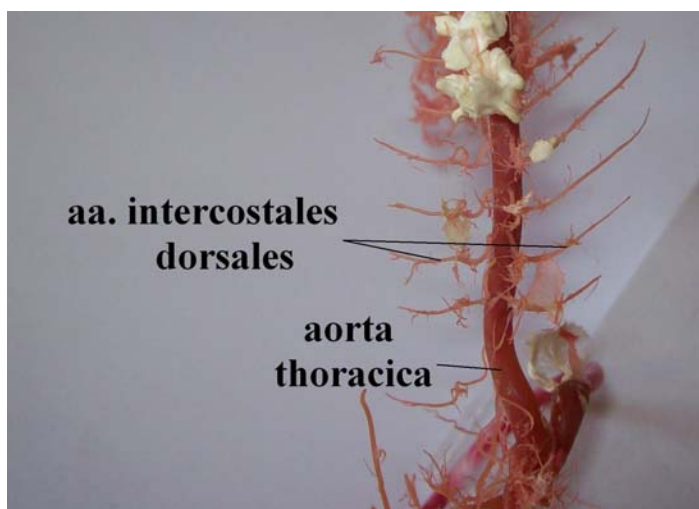
MATERIÁL A METÓDY

V experimente sme použili 14 potkanov plemena Wistar, oboch pohlaví. Eutanázia bola vykonaná éterom. Na takto pripravenom materiáli sme pristúpili k príprave na perfúziu. Veľmi dôležité je zvoliť si správnu cievu na nástrek. V našom prípade sme kanyláciou ľavej komory prepláchli celé telo. Nesmieme však zabudnúť na uvoľnenie niektorej časti venózneho systému pre odtok perfúzneho média. Na daný účel môžeme použiť v. *femoralis*, v. *jugularis externa* alebo *auricula dextra cordis*. Zvolili sme uško pravej predsiene. Samotnú perfúziu sme vykonali pomocou perfúzneho média, ktorým bol fyziologický roztok NaCl. Na dokonalejšie odstránenie krvných zrazenín z ciev môžeme pridať k perfúznemu médiu cca 0,05% NaOH (Flešárová a kol., 2003). Preplach ciev musí byť dokonalý. Veľmi dôležitým faktorom je neprítomnosť vzduchu v cievach. Preto sme perfúzne kanyly opatrili mäkkou plastovou alebo silikónovou hadičkou naplnenou perfúznym roztokom, ktorú sme uzavreli svorkou. Až potom sme ju zaviedli do cievy a zaistili ligatúrou. Hadičku sme pripojili na perfúzne zariadenie, uvoľnili svorku a začali s preplachom (Barta a kol., 2000). Správny priebeh perfúzie sme spoznali podľa rovnomerného vyblednutia tkanív. Preplach sme ukončili vtedy, keď vytekajúci roztok z venózneho systému bol bezfarebný. Na nástreky sme použili hmotu Duracryl Dental®. Je to dvojzložková, metakrylátová živica obsahujúca práškový kopolymér a tekutý monomér. 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 zmiešaní všetkých zložiek sme nádobu s hmotou uzavreli a pokračovali v opatrnom premiešavaní, čím sme zabránili adsorbcií na stenu nádoby. Po 1 – 2 minútach sme hmotu nasali do injekčnej

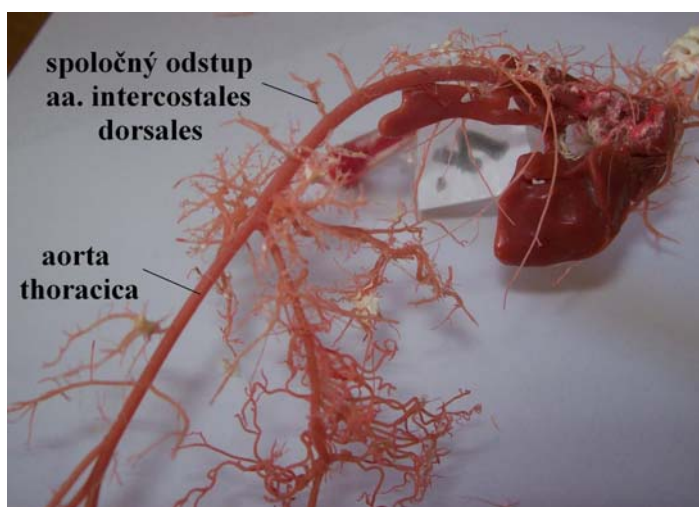
striekačky a jej naklápaním zabránili sedimentácii polyméru. Akonáhle mala zmes v striekačke vhodnú konzistenciu (hustota redšieho sirupu), pristúpili sme k nástreku. Ak sme pocítili zvýšený odpor, tlak na piest striekačky sme na chvíľu uvoľnili a následne pokračovali. V prípade, že odpor neklesal, prírodnú hadičku sme stlačili svorkou a odstránili striekačku. Vhodné je celý objekt opatrne preniesť do nádoby s vlažnou vodou, kde hmota dopolymerizuje, zároveň nadľahčenie tkaniva vodou zabráni deformácii. Maceráciu mäkkých tkanív sme uskutočnili v 2 – 4% roztoku KOH pri teplote 60 - 70°C. Všetky časti tkaniva musia byť v roztoku ponorené. Celý proces macerácie trvá približne 2 – 3 dni (Maženský a kol., 2007).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Obr. č. 1 Samostatný odstup *aa. intercostales dorsales* z *aorta thoracica*



Obr. č. 2 Spoločný odstup *aa. intercostales dorsales* z *aorta thoracica*



Obr. č. 3 Samostatný odstup *aa. intercostales dorsales* kraniálne, spoločný odstup kaudálne z *aorta thoracica*



Na korozívnych preparátoch sme zistili tieto variácie. V 7,14% prípadov *aa. intercostales dorsales* odstupujú z *aorta thoracica* spoločným odstupovým kmeňom. Samostatné odstupy *aa. intercostales dorsales* sú prítomné v 71,42% prípadov. V 21,43% prípadov *aa. intercostales dorsales* odstupujú samostatne v kraniálnej časti *aorta thoracica* a pomocou spoločného odstupového kmeňa v jej kaudálnej časti.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Barta A., Demčišák, L., Technika a metodika prípravy korozívnych preperátov, Proceeding of conference: Current trends in morphology, University of veterinary medicine – dep. of anatomy and histology, slovak anatomical society, Košice, 2000:179 – 181.
- 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 2003:116.
- Maženský, D., Vdoviaková, K., Teleky, J. Morfologické variaácie arteria subclavia u kráľika, IX. konferencie mladých vľdeckých pracovníku s mezinárodní účastí, VFU Brno, 2007: 124-127.

VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV

**Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Bod'u
III. ročník - 2008**

Zostavil: MVDr. Dušan Fabian, PhD.

Vydal: Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4, 04001 Košice
Prvé vydanie. 118 strán.

ISBN 978-80-968618-2-8

EAN 9788096861828

ISBN 978-80-968618-2-8