



VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2009

Zborník zo seminára doktorandov venovaného
pamiatke akademika Bod'u

IV. ročník

1949



2009

Košice, 9. september 2009

Zborník príspevkov prezentovaných na
Seminári doktorandov venovanom pamiatke akademika Boďu
9. september 2009
v Košiciach

**Pri príležitosti
60. výročia založenia
Univerzity veterinárskeho lekárstva v Košiciach**

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

SIGMA-ALDRICH®

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

ISBN 978-80-968618-4-2

OBSAH

VPLYV ADIPONEKTÍNU NA PREIMPLANTAČNÝ VÝVIN MYŠI

Burkuš J.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV

8

BASTA15 AKO POTENCIÁLNE RIZIKO PRE REPRODUKČNÉ ZDRAVIE

Bystriansky J.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV

11

NO-cGMP SIGNÁLNA DRÁHA A JEJ FUNKČNOSŤ PO PORANENIACH KRČNEJ MIECHY

Capková E., Dávidová A., Schreiberová A., Lukáčová N.

Neurobiologický ústav, SAV

14

PREDBEŽNÁ CHARAKTERIZÁCIA PLAZMIDU PSRD77 Z KMEŇA *SELENOMONAS RUMINANTIUM*

Fecskeová L.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV

18

DETEKCIA FRAGILNÝCH MIEST NA CHROMOZÓMOCH HOVÄDZIEHO DOBYTKA

Galdíková M., Šiviková K.

Katedra biológie a genetiky, UVL

22

VÝSKYT VZDUŠNÝCH MIKROORGANIZMOV V BIOAEROSÓLE V OKOLÍ ČISTIARNE ODPADOVÝCH VÔD

Gregová G., Venglovský J., Ondrašovičová O., Sasáková N., Laktičová K., Kišová J.

Katedra hygieny chovu zvierat a životného prostredia, UVL

26

POROVNANIE VÝSKYTU NIEKTORÝCH POLYMORFIZMOV V PROTEÍN KÓDUJÚCEJ OBLASTI PRIÓNOVÉHO PROTEÍNU MEDZI ZDRAVÝM A BSE POSTIHNUTÝM HOVÄDZÍM DOBYTKOM

Hreško S.¹, Mojžiš M.², Tkáčiková E.¹

¹*Katedra mikrobiológie a imunológie, Ústav imunológie, UVL*; ²*Štátny veterinárny ústav, Zvolen*

29

AMINOKYSELINY A NIEKTORÉ METABOLITY V MOČI PACIENTOV S KARCINÓMOM OBLIČKY

Jalč P.¹, Kron I.¹, Valanský L.²

¹*Ústav lekárskej chémie, biochémie, klinickej biochémie a LABMED, a.s., Lekárska fakulta UPJŠ*;

²*Urologická klinika, Fakultná nemocnica UPJŠ*

33

VPLYV ZAHRIEVANIA MEDU NA OBSAH HYDROXYMETHYLFURFURALU

Kasperová J., Nagy J., Dičáková Z.

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

37

VPLYV DENZITY DIVIAČEJ POPULÁCIE NA VÝSKYT JEJ NAJČASTEJŠÍCH PARAZITÓZ

Kiš O., Ciberej J., Oberhauserová K., Maľová J.

Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, UVL

41

PRVÉ SKÚSENOSTI SO SURVEILLANCE MODRÉHO JAZYKA NA FARME HOVÄDZIEHO DOBYTKA A OVIEC

Lacková Z.¹, Bireš J.¹, Kočišová A.²

¹*Klinika prežúvavcov, UVL*; ²*Ústav parazitológie, UVL*

45

POROVNANIE FERMENTAČNÝCH A HYDROLYTICKÝCH AKTIVÍT VO FÉCES KOŇOVITÝCH A ŠIMPANZOV

Laho T.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV

49

VPLYV ODLÚČENIA MLÁĎAT OD MATKY NA NEUROGENÉZU V ROSTRÁLNEJ MIGRAČNEJ DRÁHE POTKANA

Lievajová K., Račeková E., Martončíková M., Orendáčová J.

Neurobiologický ústav, SAV

53

PREŽÍVANIE VYBRANÝCH PROBIOTICKÝCH MIKROORGANIZMOV V JOGURTOCH POČAS SKLADOVANIA

Lovayová V., Burdová O.

Ústav hygieny a technológie mlieka, UVL

56

FYZIKÁLNO-CHEMICKÉ ZMENY V MÄSE BAŽANTOV POĽOVNÝCH (*PHASIANUS COLCHICUS*) POČAS ZRECIEHO PROCESU

Mačanga J., Koréneková B., Nagy J.

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

59

DETEKCIA KOMPLEMENT BLOKUJÚCICH PROTEÍNOV FRANCISELLA SPP.

Maďar M., Bhide M.

Katedra mikrobiológie a imunológie, Ústav imunológie, Laboratórium biomedicínskej mikrobiológie a imunológie, UVL

63

DETEKCIA *ENCEPHALITOOZON CUNICULI* U NOVÉHO HOSTITEĽA SOKOLA LOVECKÉHO (*FALCO RUSTICOLUS*)

Malčeková B.¹, Valenčáková, A.¹, Luptáková L.¹, Molnár L.²

¹*Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVL ;*

²*Klinika vtákov, exotických a voľne žijúcich zvierat, UVL*

66

VÝSKYT RIZIKOVÝCH PRVKOV U VOENE ŽIJÚCEJ ZVERI

Maľová J., Ciberej J., Oberhauserová K., Kiš O.

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

70

JE TOTÁLNA ISCHÉMIA MOZGU SKUTOČNE TOTÁLNOU ISCHÉMIOU?

Maženský D.¹, Petrovová E.¹, Luptáková L.²

¹*Ústav anatómie, UVL ;* ²*Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVL*

73

KOMPARÁCIA HOMOLOGICKÝCH ÚSEKOV GENÓMU ZVIERAT METÓDOU FISH A G-PRŮŽKOVANIA

Mesarč M., Dianovský J.

Katedra biológie a genetiky, UVL

77

DIVERZITA ČREVNÝCH HELMINTOV SLÍŽA SEVERNÉHO (*BARBATULA BARBATULA*) NA RIEKE OLŠAVA

Mihok T.¹, Košuthová L.¹, Košuth P.¹, Koščo J.², Kočišová A.¹, Ševc J.²

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

²*Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied Prešovskej univerzity v Prešove*

80

MONITORING AKTUÁLNYCH OHNÍSK VÝSKYTU PEČEŇOVÝCH TREMATODÓZ (č. *Fasciolidae*) V BIOTOPOCH SLOVENSKA V ROKOCH 2008 - 2009

Oberhauserová K.¹, Špakulová M.², Maľová J.¹, Kiš O.¹

¹*Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, UVL ;* ²*Parazitologický ústav, SAV*

83

SYNTÉZA A SEPARÁCIA STRIEBORNÝCH NANOČASTÍC POKRYTÝCH GLUTATIÓNOM

Peregrinová A.¹, Antalík M.^{1,2}

¹*Katedra biochémie, UPJŠ ;* ²*Ústav experimentálnej fyziky, SAV*

87

ENTEROKOKY AKO POTENCIALNI TVORCOVIA BIOGÉNNYCH AMÍNŮV V OVČÍCH SYROCH

Poláková L.¹, Trivedi K.²

¹*Ústav hygieny a technológie mlieka, UVL,*

²*Ústav hygieny a technológie mlieka, Veterinárni a farmaceutická univerzita Brno*

90

VLASTNOSTI DIMETYLAMINOCALKÓNŮV A ICH SYNTETICKÝCH ANALÓGOV Poškrobová M., Tomečková V., Guzy J. <i>Ústav lekárskej chémie, biochémie, klinickej biochémie a LABMED a.s., LF UPJŠ</i>	93
PROTEOMICKÁ CHARAKTERIZÁCIA RECEPTOR-LIGANDOV, KTORÉ UMOŽŇUJÚ PRESTUP PATOGENOV CEZ HEMATOENCEFALICKÚ BARIÉRU SO ZAMERANÍM NA NEUROBORELIÓZU Pulzová L., Bhide M. <i>Katedra mikrobiológie a imunológie, Ústav imunológie, Laboratórium biomedicínskej mikrobiológie a imunológie, UVL</i>	97
STANOVENIE CITLIVOSTI STAFYLOKOKOV IZOLOVANÝCH Z MÄSA RÝB VOČI VYBRANÝM ANTIBIOTIKÁM POMOCOU DVOCH MIKROBIOLOGICKÝCH METÓD Regecová I., Pipová M., Jevinová P., Popelka P., Máté D. <i>Katedra hygieny potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVL</i>	101
BIOINFORMATICKÁ ANALÝZA PROFÁGOVÝCH ENDOLYZÍNŮV A IM PODOBNÝCH PROTEÍNOV Z RADU <i>LACTOBACILLALES</i> Serenčová L. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV</i>	105
PREKVAPUJÚCO VYSOKÁ VARIABILITA TREPONÉM V BACHORE PREŽÍVAVCOV Sikorová L. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV</i>	109
SLEDOVANIE VPLYVU ZEARALENONU A ADSORBENTOV NA IMUNITNÉ PARAMETRE V PERIFÉRNEJ KRVI BROJLEROVÝCH KURČIAT Slaminková Z. ¹ , Revajová V. ¹ , Leng E. ² , Levkut M. st. ¹ <i>¹Ústav patologickej anatómie, UVL; ²Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV</i>	113
PRODUKCIA A VYUŽITIE ŽIVÍN U BROJLEROVÝCH KURČIAT PRI POUŽITÍ RÔZNYCH ADITÍV Šamudovská A., Demeterová M. <i>Katedra výživy, dietetiky a chovu zvierat, UVL</i>	116
VČASNÁ DIAGNOSTIKA RAKOVINY U ŽIEN PROFILOVOU FLUORESCENČNOU ANALÝZOU Štefeková Z. ¹ , Birková A. ¹ , Ostró A. ¹ , Mareková M. ² <i>¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UPJŠ a Labmed a.s.; ²II. Gynekologicko pôrodnická klinika LF UPJŠ</i>	121
ČIASŤOČNÁ CHARAKTERIZÁCIA GENÓMU ENTEROCOCCUS FAECALIS BAKTERIOFÁGA F4 Šulák M. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV</i>	125
VPLYV <i>THYMUS VULGARIS</i> PRIJATÉHO KRMIVOM NA ANTIOXIDAČNÝ STATUS A INTEGRITU DUODENÁLNEJ STENY U KURČIAT Takáčová J. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV</i>	129
VYBRANÉ SÉROVÉ PROTEÍNY AKÚTNEJ FÁZY A MLIEČNY AMYLOID A U DOJNÍC POSTIHNUÝCH ZÁPALOVÝMI OCHORENAMI MLIEČNEJ ŽLAZY Tóthová Cs., Nagy O., Seidel H., Kováč G. <i>Klinika prežívavcov, UVL</i>	133
POROVNANIE MIKRODILUČNEJ METÓDY A ETESTU PRI STANOVENÍ CITLIVOSTI <i>CANDIDA ALBICANS</i> NA ITRAKONAZOL, KETOKONAZOL A FLUKONAZOL Vantrubová J., Čonková E., Váczi P. <i>Ústav farmácie a farmakológie, UVL</i>	138

VPLYV ADIPONEKTÍNU NA PREIMPLANTAČNÝ VÝVIN MYŠI

Burkuš J.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Adiponektín je proteín produkovaný tukovým tkanivom. Má vplyv na energetický metabolizmus, znižuje inzulínovú rezistenciu buniek, stimuluje oxidáciu mastných kyselín v pečeni a kostrovom svale. Jeho prítomnosť a prítomnosť jeho receptorov bola dokázaná aj v endometriu a placente, čo poukazuje na jeho potenciálnu úlohu v reprodukčnom procese. Najnovšie výsledky naznačujú aj možný vplyv adiponektínu na maturáciu oocytov a na proces implantácie embrya ovplyvňovaním expresie iných biologicky aktívnych látok.

ÚVOD

Tukové tkanivo má významnú úlohu nielen pri udržiavaní energetickej homeostázy, ale aj ako endokrinný orgán, ktorý produkuje množstvo biologicky aktívnych látok, patriacich do podskupiny cytokínov, označovaných ako adipokíny. Do tejto heterogénnej skupiny hormónov patria adiposín (White a kol., 1992), haptoglobín, metalotioneín, retinol viažúci proteín (Trayhurn a Wood, 2004), leptín, inhibítor-1 plasminogénového aktivátora (PAI-1), resistín, TGF- β , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, angiotensinogén, adiponektín (Guerra-Millo, 2004; Pajvani a kol., 2003) a ďalšie.

ADIPONEKTÍN

Adiponektín, peptid pozostávajúci z 244 aminokyselín (Arita a kol., 1999), je hormón produkovaný tukovým tkanivom. Zohráva dôležitú úlohu v regulácii lipidového metabolizmu a v energetickej homeostáze (Arita a kol., 1999; Pajvani a kol. 2003). Má protizápalové a antiaterogénne účinky (Venkatesh a kol. 2009; Bang a kol., 2007), znižuje produkciu glukózy v pečeni a zohráva úlohu pri supresii inzulínovej rezistencie, znižuje lipogézu v tukovom tkanive, stimuluje oxidáciu mastných kyselín a príjem glukózy v kostrovom svale (Kershaw a Flier, 2004). V krvnej plazme cicavcov cirkuluje vo vysokej koncentrácii (okolo 10 $\mu\text{g/ml}$) a tvorí približne 0,01 % všetkých proteínov krvnej plazmy; pri obezite ako aj pri inzulínovej rezistencii je však jeho koncentrácia znížená. Vykazuje aj sexuálny dimorfizmus, u žien je jeho zastúpenie v plazme vyššie ako u mužov (Coppola a kol., 2009).

Adiponektín vytvára širokú škálu charakteristických homomultimérov. V ľudskom a myšacom sére je prítomný ako trimér, hexamér až po multiméry s veľkou molekulárnou hmotnosťou ako napríklad dodekaméry a oktadekaméry. V krvi môže byť prítomný v neskrátenej forme alebo ako menší globulárny fragment. V plazme sa však nachádza iba malé množstvo globulárneho adiponektínu, prítomný je predovšetkým v neskrátenej forme. Globulárny fragment vzniká proteolýtickým štiepením adiponektínu leukocytovou elastázou (Kadowaki a Yamauchi, 2005).

Adiponektínový receptor pozostáva z dvoch izoform, AdipoR1, ktorý sa hojne vyskytuje najmä v kostrovom svale a AdipoR2, ktorý je najviac zastúpený v pečeni (Yamauchi a kol., 2003). Bol objavený aj tretí receptor odpovedajúci na adiponektín, T-kadherín, ale na odhalenie jeho funkcie sú potrebné ďalšie štúdie (Meier a Gressner, 2004). Receptory aktivované adiponektínom pôsobia cez rôzne dráhy: AMPK (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase), PKA (protein kinase A), MAPK (mitogen-activated protein kinase) and PPARs (peripheral peroxisome-activated receptors, Kadowaki a kol., 2006).

ÚLOHA ADIPONEKTÍNU V REPRODUKCII

Najnovšie výskumy naznačujú, že adiponektín zohráva dôležitú úlohu aj v reprodukcii jedinca. Expresia jeho receptorov bola dokázaná v potkaních vaječníkoch a oocytoch (Chabrolle a kol., 2007), v ľudskom endometriu s maximom v čase implantácie embrya

(Takemura a kol., 2006), v endometriu kralika a myši (Schmidt a kol., 2008) a takisto v ľudskej a potkanej placente (Chen a kol., 2006). Expesia receptorov adiponektínu v prasacích oocytoch a v skorých embryonálnych štádiach (Whitworth a kol., 2005), v embryoblaste a trofoblaste myši (Schmidt a kol., 2008) naznačuje možnú úlohu tohto adipokínu v regulácii preimplantačného vývinu a rozširuje paletu faktorov schopných ovplyvniť preimplantačné embryo (Veselá a kol., 2003; Fabian a kol., 2004, 2007; Il'ková a kol., 2004; Čikoš a kol., 2005, 2007). Chappaz a kol. (2008) preukázali, že aplikácia adiponektínu urýchljuje meiotickú maturáciu oocytov in vitro a zvyšuje tiež množstvo partenogeneticky aktivovaných oocytov schopných dosiahnuť štádium blastocysty. Predpokladá sa, že adiponektín môže mať veľký vplyv na energetické zásobenie embrya a môže zohrávať dôležitú úlohu pri jeho implantácii, ovplyvňovaním expresie interleukínov, TNF- α a TGF- β (Schmidt a kol., 2008; Takemura a kol., 2006). U žien trpiacich tehotenskou cukrovkou s nízkou hladinou adiponektínu v plazme bola pozorovaná nižšia pôrodná hmotnosť novorodencov (Ategbo a kol., 2006). Na druhej strane, adiponektín pravdepodobne nemá esenciálnu úlohu v reprodukcii, pretože myši deficientné v gène pre adiponektín (Adipo^{-/-}) sú fertilné (Ma a kol., 2002). Usudzuje sa, že adiponektín má určitú komplementárnu úlohu pri ovplyvňovaní ovulačného cyklu, maturácií oocytov a implantácii embrya (Ledoux a kol., 2006).

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(1):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(10):4137-4143.
- Bang OY, Saver JL, Ovbiagele B, Choi YJ, Yoon SR, Lee KH. Adiponectin levels in patients with intracranial atherosclerosis. *Neurology.* 2007; 68(22):1931-7.
- Coppola A, Marfella R, Coppola L, Tagliamonte E, Fontana D, Liguori E, Cirillo T, Cafiero M, Natale S, Astarita C. Effect of weight loss on coronary circulation and adiponectin levels in obese women. *Int J Cardiol.* 2009; 134(3):414-6.
- Čikoš Š, Rehák 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, Rehák P, Czikková S, Koppel J. Expression of beta adrenergic receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 2005; 71:145-153.
- Fabian D, Il'ková G, Rehák 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 TNF α and actinomycin D on cell death incidence and embryo growth in mouse blastocysts. *Zygote.* 2007; 15:241-9.
- Guerre-Millo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab.* 2004; 30(1):13-9.
- Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction.* 2007; 133:719-31.
- Chappaz E, Alborno MS, Campos D, Che L, Palin MF, Murphy BD, Bordignon V. Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. *Domest Anim Endocrinol.* 2008; 35(2):198-207.
- Chen J, Tan B, Karteris E, Zervou S, Digby J, Hillhouse EW, Vatish M, Randeva HS. Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia.* 2006; 49(6):1292-1303.

- 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.
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6):2548-56.
- Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005; 26(3):439-51.
- Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2006; 116:1784-92.
- Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology.* 2006; 147(11):5178-86.
- Ma K, Cabrero A, Saha PK, Kojima H, Li L, Chang BH, Paul A, Chan L. Increased beta -oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. *J Biol Chem.* 2002; 277(38):34658-61.
- Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem.* 2004; 50:1511-25.
- Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE. Structure-Function Studies of the Adipocyte-secreted Hormone Acrp30/Adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14; 278(11):9073-85.
- 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(6):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(7):3203-3210.
- Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004; 92:347-55.
- Venkatesh B, Hickman I, Nisbet J, Cohen J, Prins J. Changes in serum adiponectin concentrations in critical illness: a preliminary investigation. *Crit Care.* 2009; 13(4):R105.
- Veselá J, Reháč 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.
- White RT, Damm D, Hancock N, Rosen BS, Lowell BB, Usher P, Flier JS, Spiegelman BM. Human adiponin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *J Biol Chem.* 1992; 267:9210-9213.
- Whitworth, K. M., Agca, C., Kim, J. G., Patel, R. V., Springer, G. K., Bivens, N. J., Forrester, L. J., Mathialagan, N., Green, J. A., Prather, R. S. Transcriptional profiling of pig embryogenesis by using a 15-K member unigene set specific for pig reproductive tissues and embryos. *Biol Reprod.* 2005; 72:1437-51.
- 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; 423:762-769.

BASTA15 AKO POTENCIÁLNE RIZIKO PRE REPRODUKČNÉ ZDRAVIE

Bystriansky J.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Štúdia bola zameraná na zistenie vplyvu pesticídu BASTA 15 na vývin preimplantačných embryí. Účinok BASTA 15 sme skúmali na modeloch *in vitro* aj *in vivo*. V *in vitro* experimentoch sme izolované embryá (2-bunkové a blastocysty) kultivovali v kultivačnom médiu obsahujúcom rôzne koncentrácie pesticídu. Koncentrácia 0,001% a vyššie negatívne ovplyvňovali vývin embryí z 2-bunkového štádia do blastocysty (pričom koncentrácia 0,01% a vyššie viedli k úplnému zastaveniu vývinu a k masívnej degenerácii embryí). Pesticíd negatívne ovplyvňoval aj kvalitu blastocýst kultivovaných 24 h – od koncentrácie 0,0001% negatívne ovplyvňoval rast blastocýst a od koncentrácie 0,001% signifikantne zvyšoval incidenciu bunkovej smrti v blastocystách. V pokusoch *in vivo* boli myšiam per os podávané rôzne koncentrácie pesticídu v 200 μ l vody obdeň počas jedného týždňa. Embryá boli izolované 24 h po poslednom podaní pesticídu. Stereomikroskopické vyšetrenie embryí ukázalo, že koncentrácia 29 μ l/kg neovplyvňovala vývin embryí. Všetky koncentrácie nad touto hodnotou signifikantne znižovali percento získaných blastocýst a naopak percento embryí so spomaleným rastom ako aj degenerovaných embryí signifikantne zvyšovali. Testy kvality blastocýst však ukázali, že aj koncentrácia 29 μ l/kg mala negatívny vplyv na ich rast a incidenciu bunkovej smrti. Experimenty preukázali, že prítomnosť pesticídu BASTA 15 v tele matky alebo v kultivačnom médiu môžu silne ovplyvňovať kvalitu preimplantačných embryí.

ÚVOD

Životné prostredie je v dnešnej dobe zaťažované veľkým množstvom odpadov, z ktorých je väčšina chemického charakteru. Medzi chemické látky najviac zaťažujúce životné prostredie a vplyvom ktorých sa ľudia a ostatné živočíchy len ťažko môžu vyhnúť patria hlavne ťažké kovy, rozličné polutanty, či pesticídy. Pesticídy sa do tela najčastejšie dostávajú prijatím potravy (zeleniny, ovocia) obsahujúcej ešte ich zvyšky. Ich účinok na organizmus môže byť rôzny, od porúch reprodukčného traktu (Greenlee a kol., 2003) a kongenitálnych anomálií (Garry a kol., 2002) až po smrť. Z predchádzajúcich štúdií už vieme, že vplyv fungicídov na embryá v závislosti od dávky je i pri relatívne nízkych koncentráciách značný a má vplyv na kvalitu embryí (Domaracký a kol., 2007). Na základe aj týchto vedomostí sme sa rozhodli otestovať vplyv herbicídu BASTA 15 na rastové parametre a incidenciu bunkovej smrti u preimplantačných embryí. Basta 15 je neselektívny listový herbicíd najmä s kontaktným a čiastočne systémovým účinkom (tento sa prejavuje najmä na nadzemných častiach rastlín). Jeho hlavnou účinnou látkou je glufosinate-NH₄ (150 g/l). Rastliny prijímajú prípravok zelenými nadzemnými časťami. V zasiahnutej rastline dochádza k poruche metabolizmu amoniaku, v dôsledku čoho je silne brzdená fotosyntéza.

Počas vývinu preimplantačného embrya sa nepriaznivé alebo škodlivé vplyvy prostredia odrážajú na jeho kvalite. Základnými markermi kvality embrya sú jeho rastové parametre a prítomnosť mŕtvych buniek. Pri vývine embrya väčšina buniek zomiera apoptotickou bunkovou smrťou. Úloha apoptózy spočíva v eliminácii abnormálnych, geneticky poškodených a nadbytočných buniek a tým napomáha správne embryonálnemu vývinu. Aj keď sú apoptotické procesy riadené zvnútra bunky, 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.

MATERIÁL A METODIKA

V experimentoch boli použité 4 týždňové samice myši (kmeň ICR, Velaz, Praha, Česká Republika), ktoré boli superovulované intraperitoneálnym 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 boli vyizolované za pomoci FHM (flushing holding medium) 45 a 96 h (pri *in vitro* pokusoch) a 96 h (pri *in vivo* pokusoch) po aplikácii hCG, ktorým sme prepláchli maternice a vajcovody (Lawits a Biggers, 1993).

Pri pokusoch *in vivo* sme 1 týždeň obdeň per os podávali (celkovo štyri dávky) samiciam pesticíd BASTA 15 v 200 μ l vody v koncentráciách 575 μ l Basta 15/kg (1/5 LD 50), 290 μ l Basta 15/kg (1/10 LD 50), 58 μ l Basta 15/kg (1/50 LD 50) a 29 μ l Basta 15/kg (1/100 LD 50) (LD 50 = 436-464 mg glufosinate-NH₄/kg) okrem SHAM pokusu, kde sme podávali len čistú vodu. Posledná dávka pesticídu bola podaná 24 h pred izoláciou embryí. Embryá sme po zozbieraní stereomikroskopicky vyhodnotili a potom rovno fixovali a farbili.

Pri *in vitro* pokusoch sme po izolácii embryí zo zdravých matiek tieto ďalej kultivovali v kultivačnom médiu (KSOM) obsahujúcom pesticíd BASTA 15 v koncentráciách 0,00001%; 0,001%; 0,001%; 0,002%; 0,01%; a 0,05% a fixovali a farbili ich až po uplynutí ďalších 24 h pri blastocystách a 72h pri dvojbunkových štádiách. Kultivácia prebiehala v 20, 25, alebo 30 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 propidium 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 označeného dUTP na 3'-OH koniec fragmentovanej DNA (Gjorret a kol., 2003; Fabian a kol., 2007a). Na vizualizáciu morfológie jadier sa použilo ešte 5 min farbenie Hoechstom 33342. Po ukončení farbenia sa embryá 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), apoptotické (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 (Studentov t-test, chi-square test).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri pokuse zameranom na sledovanie vplyvu BASTA 15 na kvalitu preimplantačných embryí v *in vitro* podmienkach sme pri 24 h kultivácii blastocýst zistili, že koncentrácia 0,00001% signifikantne neovplyvňovala kvalitu embryí a koncentrácia 0,0001% negatívne ovplyvnila len priemerné počty buniek na embryo (P<0,01). Koncentrácie vyššie ako 0,001% signifikantne ovplyvnili kvalitu embryí vo všetkých parametroch, tzn. znížili priemerné počty buniek na blastocystu (P<0,01) a zvýšili počet mŕtvych buniek (P<0,001). Pri koncentracii 0,05% boli všetky embryá degenerované.

Koncentrácia 0,0001% neovplyvňovala vývinovú schopnosť dvoj bunkových embryí kultivovaných do štádia blastocysty. Koncentrácie nad touto hodnotou signifikantne ovplyvňovali percentuálne zastúpenie embryí s normálnym a spomaleným vývinom s tendenciou k zvyšovaniu počtov pomaly rastúcich embryí a degenerátov so stúpajúcou koncentráciou BASTA 15.

V *in vivo* pokusoch koncentrácia 29 µl/kg neovplyvňovala vývin embryí. Vyššie koncentrácie signifikantne menili zastúpenie embryí s normálnym a spomaleným vývinom ($P < 0,001$) oproti kontrole – signifikantne znižovali percento získaných blastocýst a naopak percento embryí so spomaleným rastom ako aj degenerované embryá signifikantne zvyšovali. SHAM pokus preukázal, že samotná manipulácia so zvieratami a dávkovanie per os nemali vplyv na vývinové parametre získaných embryí ($P > 0,05$). Aj keď koncentrácia 29 µl/kg vývin embryí neovplyvnila, testy kvality blastocýst ukázali, že mala negatívny vplyv na ich rast a incidenciu bunkovej smrti ($P < 0,001$).

Na záver možno konštatovať, že u embryí ovplyvnených istými hraničnými dávkami pesticídu bolo v *in vitro* i *in vivo* podmienkach zaznamenané zníženie priemerného počtu buniek na blastocystu, zvýšená incidencia bunkovej smrti v blastocystách i zvýšené zastúpenie embryí so spomaleným a degenerovaným vývinom. Na základe týchto faktov môžeme povedať, že pesticíd BASTA 15 je pre embryá vysoko toxický aj pri relatívne nízkych koncentráciách.

POĎAKOVANIE

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Domaracký M., Reháč P., Legáth J., Koppel J. Effects of Fungicide Euparen Multi (Tolyfluanid) on Development of Preimplantation Embryos in Mouse. *Acta Vet. Brno* 2007; 76:209-214
- Fleming T.P., Kwong W.Y., Porter R., Ursell E., Fesenko I., Wilkins A., Miller D.J., Watkins A.J., Eckert J.J. The embryo and its future. *Biol Reprod.* 2004; 71(4):1046-54
- Fabian D., Il'kova G., Reháč 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 J.O., 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 TNFalpha and actinomycin D on cell death incidence and embryo growth in mouse blastocysts. *Zygote.* 2007a; 15(3):241-9.
- Fabian D., Makarevich A.V., 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
- Garry V.F., Harkins M.E., Erickson L.L., Long-Simpson L.K., Holland S.E., Burroughs B.L. Birth defects, season of conception, and sex of children born to pesticide applicators living in the Red River. Valley of Minnesota, USA. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 441-449
- 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.
- Greenlee A.R., Arbuckle T.E., Chyou P.H. Risk factors for female infertility in an agricultural region. *Epidemiology* 2003; 14:429-436
- 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.

NO-cGMP SIGNÁLNA DRÁHA A JEJ FUNKČNOSŤ PO PORANENIACH KRČNEJ MIECHY

Capková L., Dávidová A., Schreiberová A., Lukáčová N.
Neurobiologický ústav SAV, Košice

ABSTRAKT

Lézie miechy u ľudí a zvierat spôsobujú poškodenie motorických a senzitivných funkcií, čoho následkom môže byť aj narušenie respiračnej dráhy. Z predchádzajúcich štúdií je zjavné, že táto bulbospinálna descendentná respiračná dráha spájajúca neuróny respiračných centier v predĺženej mieche s neurónmi frenického jadra (FJ) je nitrergická (Maršala a kol., 2002). V našej práci sme sa preto sústredili na výskyt a rozloženie neurónovej syntázy oxidu dusnatého (nNOS), ako aj na distribúciu solubilnej guanylát cyklázy (sGC) a cyklického guanozín 3',5'-monofosfátu (cGMP) v hornej a dolnej časti dýchacej dráhy po jej prerušení na hornej cervikálnej úrovni. Výsledky nášho výskumu dokumentujú, že motoneuróny FJ lokalizované v prednom rohu sivej hmoty v rozmedzí C4-C6 segmentov sú slabó sGC fluorescentné, ale nie sú sfarbené na nNOS. Po hemisekcii miechy na úrovni C3-C4 a nasledovnom 2 dňovom prežívaní sme zaznamenali zníženie denzity tzv. bodkovanej nNOS imunoreaktivity (IR) v neuropile FJ ipsilaterálne k strane poškodenia. Na identifikáciu respiračnej dráhy sme použili retrográdny značkovač Fluorogold (FG). Päť dní po vpichnutí FG do FJ na úrovni C4 sme zaznamenali množstvo FG fluorescentných vlákien v laterálnom a ventrálnom funikule, tieto vlákna boli pozitívne na nNOS. Z našich doterajších experimentov môžeme usudzovať, že bulbospinálna respiračná dráha je zabezpečovaná prostredníctvom NO-cGMP signalizácie.

ÚVOD

Jedným z chemických transmiterov v nervovom systéme cicavcov, ktorý prechádza cez bunkové membrány, bez špecifického uvoľnenia pôsobiaci rýchlo a priamo na jednotlivé komponenty vo vnútri cieľovej bunky je známy ako oxid dusnatý (NO). Vzniká oxidoredukčnou konverziou L-arginínu na L-citrulín v reakcii katalyzovanej syntázou oxidu dusnatého (NOS). Vzniknutý NO sa zúčastňuje na mnohých procesoch a v organizme stimuluje aktivitu solubilnej guanylát cyklázy (sGC) a tak reguluje syntézu cyklického guanozín monofosfátu (cGMP), ktorý vyvoláva vazodilatáciu prostredníctvom cGMP-závislej proteínkinázy. Je známe, že aktivácia sGC a vytvorenie cGMP je hlavná transdukčná dráha NO v nervovom systéme. Niekoľko predchádzajúcich štúdií potvrdilo existenciu NO-cGMP signálnej transdukčnej dráhy v mieche (Lukáčová a Pavel, 2000). Sledovali sme zmeny v tejto dráhe za normálnych a patologických podmienok.

Autori (Allaerts a kol., 1998) potvrdili, že nNOS a cGMP imunoreaktívne (IR) neuróny sú často distribuované v blízkosti jeden druhého. Kajana a Goshgarian (2009) sa zamerali na podanie roliprolínu, ktoré zvýšilo hladinu 3',5' cAMP v mieche a predĺženej mieche a tým sa obnovila funkčnosť motoneurónov frenického jadra po C2 hemisekcii. Výsledky (Boulenquez a kol., 2007) potvrdzujú, že deafferentné motoneuróny frenického jadra ipsilaterálne k strane môžu byť reaktivované kontralaterálne v procese známom ako CPP (crossed phrenic phenomenon). Autori taktiež kvantifikovali respiračné neuróny v rosto-ventrálnej respiračnej skupine (rVRG) a Bötzingеровom komplexe predĺženej miechy ipsilaterálne a kontraleterálne k strane poškodenia pomocou FG. Množstvo FG sfarbených neurónov na kontra a ipsilaterálnej strane bolo identifikovaných v rVRG a Bötzingеровom komplexe. Znížené množstvo týchto neurónov zaznamenali autori po hemisekcii ipsilaterálne k strane poškodenia v porovnaní s kontrolou.

Očakávame, že experimentálne analýzy nám poskytnú informácie o nNOS-IR o prítomnosti sGC v respiračných jadrách predĺženej miechy, v axónoch descendentnej skríženej dráhy a v neuropile frenického jadra.

MATERIÁL A METODIKA

Experimenty boli uskutočnené na dospelých potkanoch (samcoch) z rodu Wistar s hmotnosťou 200-300g a králikoch kmeňa Činčila s hmotnosťou 1,5 kg. Zvieratá boli rozdelené do 3 skupín. Prvá skupina bola kontrolná, druhá pozostávala zo zvierat (potkanov), u ktorých bola vykonaná hemisekcia miechy na hornej cervikálnej úrovni. Tretej skupine zvierat (králikom) sme injekčne vpravili retrográdny značkovač fluorogold (FG) na identifikáciu respiračnej dráhy. Zvieratám bola počas hemisekcie a aj počas vpichovania FG podávaná halotánová anestéza v pomere 1:1 zmes O₂ a NO₂. Hemisekcia miechy bola uskutočnená na hornej cervikálnej úrovni, zvieratá preživali 2 dni. Vpichovanie FG sme vykonali na úrovni C₄ a zvieratá preživali 5 dní.

V prvej a druhej skupine zvierat boli pre imunocytochemické analýzy experimentálne zvieratá anestetizované tiopentalom (50mg/kg, i.p), transkardiálne prepláchnuté fyziologickým roztokom a nasledovne 4% paraformaldehydrom v 0.1 M fosfátovom pufri (PBS; pH 7.4). Po preseknutí chrbtice predĺžená miecha a C₄, C₅ a C₆ miechové segmenty boli uvoľnené z miechového kanála. Segmenty boli uskladnené vo fixatíve na 3 hodiny pri 4 °C a potom boli preložené do 30% sacharózy pri 4°C na dobu 48 hodín. Po dvoch dňoch cervikálne segmenty a predĺžená miecha boli krájané kryostatom (Leica) na 30 µm hrubé rezy.

Na zobrazenie prítomnosti sGC miechové segmenty boli 3x10 minút preplachované v TBS, inkubované primárnou protilátkou sGC β1, riedenou v pomere 1:5000 s TBST po dobu 2 dní pri 4°C, rezy boli prepláchnuté 3x TBST a sekundárnou protilátkou anti-mouse (červená – fluorescenčná) v pomere 5µl/1 ml v TBST na 2 hodiny pri izbovej teplote. Táto reakcia prebiehala v tme. Keďže sme použili metódu dvojitého farbenia na tých istých rezoch sme zobrazili aj nNOS. Rezy sme prepláchli v TBS na 10 minút a potom v PBS 2x10 minút, ďalej sme ponorili rezy do 5% NGST (goat serum) na 2 hodiny pri izbovej teplote, pridali sme primárnu protilátku nNOS rabbit, riedenie 1:1000 s 5% NGST (goat serum), takto rezy ostali v chladničke do rána. Ďalší deň sa rezy prepláchli PBS 3x10 minút, pridaná bola sekundárna protilátka anti-rabbit (zelená fluorescenčná) riedená v pomere 5µl/1 ml v 5% NGST 2 hodiny pri izbovej teplote. Posledný krát boli rezy prepláchnuté v PBS 3x10 minút a následne boli natiiahnuté na sklička a zamontované.

V tretej skupine, kde bola respiračná dráha vizualizovaná prostredníctvom retrográdneho značkovača FG, boli zvieratá prežívajúce 5 dní po vpichnutí FG transkardiálne prepláchnuté rovnako ako zvieratá v prvej a druhej skupine. Segmenty uvoľnené z miechového kanála boli vo fixatíve na 3 hodiny a nasledovne boli preložené do 30% sacharózy pri 4°C na dobu 24 hodín. Segmenty boli krájané v hrúbke 30 µm, natiiahnuté rezy boli farbené aj na nNOS, postupom aký je uvedený vyššie.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tejto práci sme sa pokúsili zistiť, či signalizácia bulbospinálnej dráhy je realizovaná prostredníctvom NO-cGMP. V našich predchádzajúcich prácach sme dokázali, že bulbospinálnu dráhu, spájajúca NOS-IR neuróny v predĺženej mieche s nNOS imunonegatívnymi neurónmi frenického jadra je nNOS-IR.

Expresia neurónovej syntázy oxidu dusnatého (nNOS) a α1 podjednotky sGC bola identifikovaná fluorescenčne. Výskyt nNOS bol zaznamenaný v neuropile frenického jadra u všetkých experimentálnych zvierat. Motoneuróny frenického jadra lokalizované v sivej hmote v rozmedzí C₄-C₆ boli sGC α1 fluorescenčné (Fig. 1 A), ale neboli sfarbené na nNOS (Fig. 1 B).

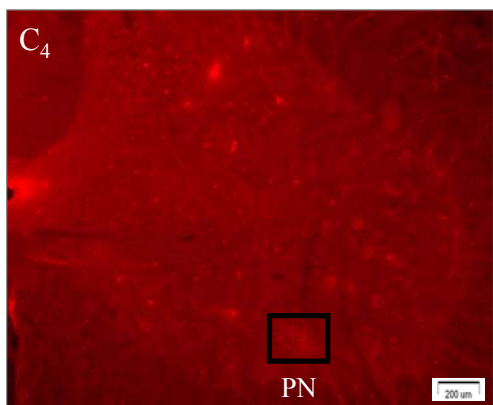


Fig. 1 A

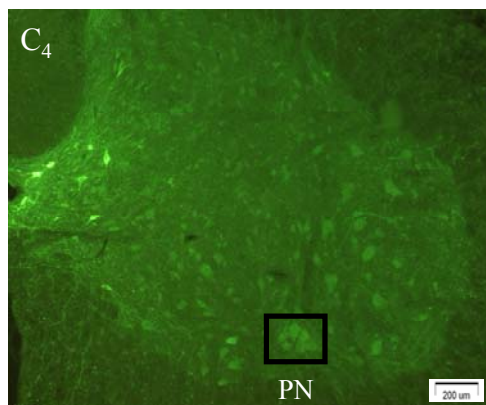


Fig. 1 B

V skupine potkanov, u ktorých bola vykonaná hemisekcia sme zaznamenali silné fluorescenčné nNOS bodkovanie okolo sGC $\alpha 1$ motoneurónov vo frenickom jadre kontralaterálne k strane poškodenia (Fig. 2 A). Výrazné zníženie bodkovanej fluorescenčnej nNOS v neuropile frenického jadra sme zaznamenali ipsilaterálne k strane poškodenia (Fig. 2 B).

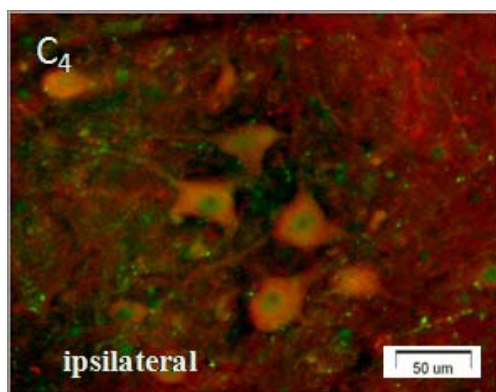


Fig. 2 A

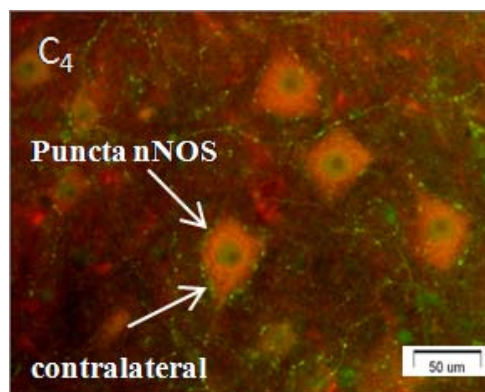


Fig. 2 B

V tretej skupine, kde bol na identifikáciu respiračnej dráhy použitý retrográdny značkovač FG sme zaznamenali množstvo FG sfarbených fluorescenčných vlákien vo ventrálnom a laterálnom funikule ipsilaterálne k strane vpichnutia (Fig. 3 A). Rovnaké vlákna boli nNOS fluorescenčné (Fig. 3 B).

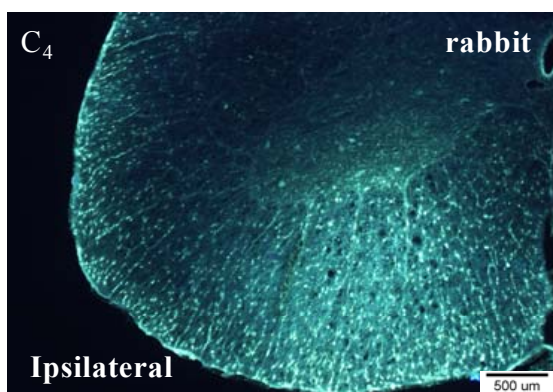


Fig. 3 A

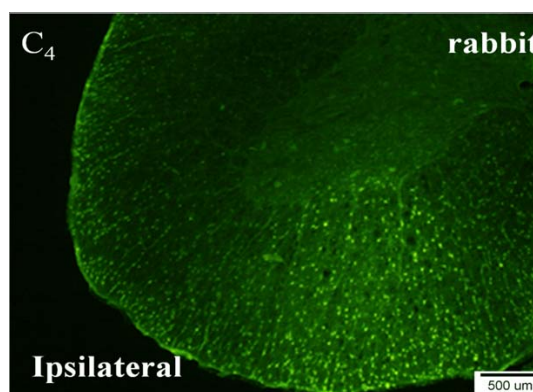


Fig. 3 B

V práci sme demonštrovali existenciu NOS a sGC $\alpha 1$ fluorescenčných neurónov v bulbospinálnej respiračnej dráhe, spájajúcej respiračné jadrá v predĺženej mieche s frenickými

motoneurónmi v C₄-C₆ segmentoch. Naše výsledky poukazujú na prítomnosť NO-cGMP dráhy v bulbospinálnej respiračnej dráhe.

V našej ďalšej práci by sme sa chceli zamerať na eferentnú časť tejto respiračnej dráhy. Pokúsime sa identifikovať hladinu cGMP vo frenickom nerve a v bránici, keďže kolokalizácia nNOS a GC v kostrových svaloch podporujú koncept, že GC môže byť dolnoprúdový cieľ pre NO (Abraham a kol., 1998). Autori v práci dokumentujú aj účinok cGMP ako sekundárneho prenášača, ktorým NO inhibuje kontrakciu bránice.

POĎAKOVANIE

Moja vďaka patrí predovšetkým mojej školiteľke RNDr. Nadežde Lukáčovej DrSc., RNDr. Alexandre Dávidovej, Bc. Annemárii Košovej a Marte Synekovej.

Výskumná práca je podporovaná VEGA Grantom 2/0015/08 a APVV grantom 0314-06.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Abraham RZ, Kobzik L, Moody MR, Reid MB, Stamler JS. Cyclic GMP is a second messenger by which nitric oxide inhibits diaphragm contraction. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 1998; 119(1):177-83.

Allaerts W, De Vente J, Markerink-Van Ittersum M, Tuinhof R, Roubos EW. Topographical relationship between neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity and cyclic 3',5'-guanosine monophosphate accumulation in the brain of the adult *Xenopus laevis*. *J. Chem. Neuroanat.* 1998; 15: 41-56.

Boulenguez P, Gauthier P, Kastner A. Respiratory neuron subpopulations and pathways potentially involved in the reactivation of phrenic motoneurons after C2 hemisection. *Brain Research.* 2007; 1148: 96-104.

Kajana S, Goshgarian G. Systemic administration of rolipram increases medullary and spinal cAMP and activates a latent respiratory motor pathway after high cervical spinal cord injury. *J. Spinal Cord Med.* 2009; 32 (2): 175-182.

Lukáčová N, Pavel J. Catalytic nitric oxide synthase activity in the white and gray matter regions of the spinal cord of rabbits. *Physiol. Res.* 2000; 49: 167-173.

Maršala J, Lukáčová N, Cizková D, Kafka J, Katsube N, Kuchárová K, Marsala M. The case for the bulbospinal respiratory nitric oxide synthase-immunoreactive pathway in the dog. *Exp. Neurol.* 2002; 177(1):115-32.

PREDBEŽNÁ CHARAKTERIZÁCIA PLAZMIDU PSRD77 Z KMEŇA *SELENOMONAS RUMINANTIUM*

Fecskeová L.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

ABSTRAKT

V tejto práci sme študovali úlohu rekombinácie v evolúcii plazmidov *Selenomonas ruminantium*. Pomocou špecifickej PCR amplifikácie a následnej sekvenčnej analýze sme čiastočne charakterizovali nový kryptický plazmid pochádzajúci z kmeňa *S. ruminantium* 77, nazvaný pSRD77. Zistili sme, že kým gén kódujúci samotný replikačný proteín vykazuje najvyššiu podobnosť replikačným proteínom z *Bacillus cereus* a replikačným proteínom ostatných plazmidov zo *S. ruminantium* je len vzdialene podobný, oblasť nachádzajúca sa downstream od tohto génu zdieľa pozoruhodnú homológiu s plazmidom pSRD191 izolovaným z kmeňa *S. ruminantium* 19 (Šprincová a kol., 2005). Okrem toho detegovali sme limitovanú homológiu aj s viacerými plazmidmi *S. ruminantium* na krátkom úseku v mieste lokalizácie SRSR elementov (*Selenomonas Ruminantium Sequence Repeats*) (Nakamura a kol., 1999). Tento výsledok poukazuje na vysokú pravdepodobnosť výmeny resp. získania funkčnej *rep*-génovej kazety mechanizmom rekombinácie.

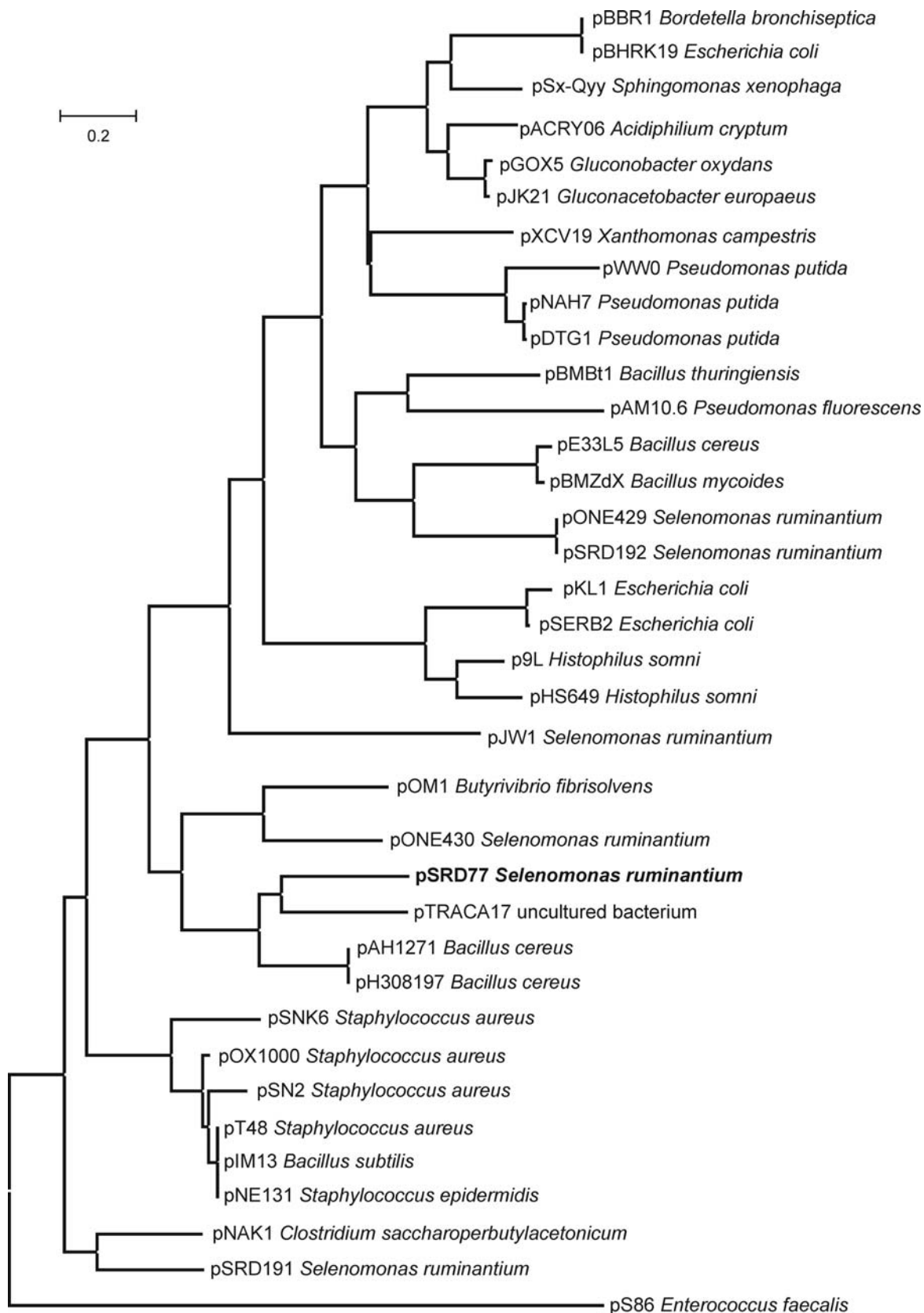
ÚVOD

Plazmidy izolované z Gram-negatívnej bachorovej baktérie *Selenomonas ruminantium* sú väčšinou malé, kryptické plazmidy, replikujúce sa mechanizmom valivej kružnice (*rolling circle replication*, RCR) a ich replikačné proteíny patria do RepL rodiny replikačných proteínov. Ich ďalšou charakteristickou črtou je prítomnosť krátkych, vysoko konzervovaných sekvencií na ich genóme, z ktorých tzv. SRSR elementy sú najznámejšie a najrozšírenejšie. Keďže všetky tieto sekvencie sú vysoko konzervované, pripisuje sa im istý biologický význam, ktorý však doposiaľ nebol experimentálne potvrdený. Predpokladá sa, že tieto oblasti by mohli predstavovať akési „rekombinačné horúce miesta“, prostredníctvom ktorých by mohlo dôjsť k výmene resp. presunu kompletných génových kaziet rekombinačnými mechanizmami. Podobne aj dvojica plazmidov pSRD191 (Šprincová a kol., 2005) a pSRD192 (Ivan a kol., 2006), izolovaná a čiastočne charakterizovaná na našom ústave, zdieľa krátke, homologické sekvencie obklopujúce gén pre replikačný proteín. Takáto genetická organizácia by mohla umožňovať prenos celých *rep*-génových kaziet pomocou rekombinácie. Vychádzajúc z tohto predpokladu navrhli sme PCR priméry na základe detegovanej homológie, ktoré amplifikujú *rep* gén a príslušné oblasti a študovali sme význam homologických oblastí v procese rekombinácie.

MATERIÁL A METÓDY

Kultivácia a izolácia DNA. Bakteriálny kmeň *S. ruminantium* 77 sme kultivovali anaeróbne v selektívnom M10 médiu podľa Tiwari a kol. (1969) pri 37 °C. Celkovú DNA sme izolovali metódou neutrálnej lýzy pomocou SDS a následnej extrakcie chloroformom (Pospiech a Neumann, 1995). Rekombinantnú plazmidovú DNA sme izolovali metódou alkalického lýzy.

PCR amplifikácia. Ako templát v PCR reakciách sme použili totálnu DNA kmeňa *S. ruminantium* 77. Teplotno-časový profil PCR reakcie pozostával z iniciačnej denaturácie pri 95 °C počas 3 minút, z 35 cyklov s nasledujúcimi parametrami: denaturácia (95 °C, 45 s); annealing (54-60 °C, 45 s); elongácia (72 °C, 45 s) a záverečnej elongácie 10 min pri 72 °C. Použili sme priméry SRDrecF (5'-TCTCGAAAATGGGGCGCAGC-3') a SRDrecR (5'-TTTGAGAMACTCATAAGTGCGCATTC-3'). Inverznú PCR sme uskutočňovali pomocou primérov Sru77INV F (5'-AAGACCCTAAGCCTGAAAACG-3') a Sru77INV R (5'-ATTAAAGTCTGTGTATCGGCTCTG-3').



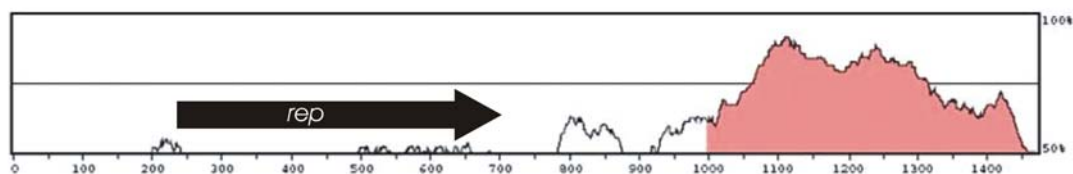
Obr. 1. Fylogenetické porovnanie príbuznosti Rep proteínu plazmidu pSRD77 s ostatnými členmi RepL rodiny replikačných proteínov.

Reakčné podmienky inverznej PCR boli nasledujúce: po iniciačnej denaturácii (95°C, 3 min) nasledovalo 35 cyklov s parametrami denaturácia (95°C, 2,5 min), annealing (55°C, 2,5 min) a extenzia (72°C, 2,5 min) a záverečná extenzia pri 72°C počas 10 minút.

Molekulárne klonovanie. Vybrané PCR amplikóny sme ligovali do plazmidového vektora pTZ57R/T (Fermentas, Litva) a touto rekombinantnou DNA sme transformovali kompetentné bunky *Escherichia coli* ER2267. Plazmidovú DNA z rekombinantov sme podrobili sekvenčnej analýze a získané nukleotidové sekvencie sme porovnávali s NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) databázou algoritmom BLAST (Altschul a kol., 1990). Párové porovnanie plazmidov sme urobili pomocou mVista servera dostupného cez www rozhranie (<http://genome.lbl.gov/vista>; Frazer a kol., 2004).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

PCR amplifikáciou a následnou sekvenčnou analýzou sme študovali možnú úlohu rekombinácie pri evolúcii plazmidov. Na podrobnú charakterizáciu sme vybrali PCR produkt o veľkosti 1160 bp získaný z kmeňa *S. ruminantium* 77 použitím SRDrec primérov amplifikujúcich *rep* gén a obklopujúcu oblasť. Sekvenčná analýza odhalila prítomnosť jedného otvoreného čítacieho rámca kódujúceho replikačný proteín, ktorý vykazoval najvyššiu podobnosť s replikačnými proteínmi z *Bacillus cereus* (60 %) a plazmidom pTRACA17 z nekultivovanej baktérie z ľudských *faeces* a bol len vzdialene podobný Rep proteínom zo *S. ruminantium* (Obr. 1). Z tohto porovnania vyplývalo, že študovaný PCR amplikón pochádza pravdepodobne z nateraz neznámeho plazmidu, v ďalšom kroku sme preto navrhli inverzné PCR priméry na základe už známej sekvencie fragmentu DNA, ktoré amplifikovali zvyšok plazmidu. Po PCR reakcii sme získali fragment o veľkosti približne 900 bp, ktorý sme tiež klonovali a podrobili sekvenčnej analýze. Porovnanie nukleotidovej sekvencie s GenBank databázou ukázalo, že tento PCR fragment vykazuje pozoruhodnú homológiu s plazmidom pSRD191 na úseku dlhom približne 530 bp nachádzajúcom sa *downstream* od génu pre replikačný proteín (Obr. 2). Okrem toho na krátkom úseku v tejto oblasti sme detegovali limitovanú homológiu aj s inými plazmidmi zo *S. ruminantium*, a to konkrétne s pONE429 a pONE430 (Nakamura a kol., 1999), pSRD192, pS23 (*GenBank* M86247) a pJJM1 (Z49917), ktorá sa na týchto plazmidoch nachádzala väčšinou v mieste lokalizácie SRSR elementov. Jednotlivé časti získanej nukleotidovej sekvencie plazmidu sme spojili pomocou programu BioEdit (Hall, 1999) a plazmid o veľkosti 1470 bp sme nazvali pSRD77.



Obr. 2. Párové porovnanie plazmidov pSRD77 a pSRD191. Lokalizácia génu pre replikačný proteín plazmidu pSRD77 je znázornená šípkou.

Replikácia RCR plazmidov, akými sú aj malé plazmidy Selenomonád, prebieha cez vysoko rekombinogénny jednovláknový DNA intermediát. Existujú priame dôkazy o tom, že takáto molekula výrazne zvyšuje rekombinačnú kapacitu plazmidov (Bron a kol., 1990), tým, že predstavuje substrát pre rôzne enzýmy interagujúce s DNA, ktoré môžu katalyzovať homologickú alebo nehomologickú rekombináciu, v dôsledku ktorého často vznikajú rôzne

typy štruktúrálnej nestability plazmidov. V našich predchádzajúcich experimentoch pri analýze viacerých *rep*-génových kazií zo *S. ruminantium* aj my sme zaznamenali vysokú frekvenciu genetickej nestability pSRD191- resp. pSRD192-podobných plazmidov (dáta neuvedené). Naše výsledky naznačujú, že SRSR elementy a ďalšie vysoko konzervované sekvencie na genómoch malých plazmidov *S. ruminantium* sa môžu podieľať na výmene génov pomocou rekombinácie.

POĎAKOVANIE

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Altschul S.F., Gish W., Myers E.W., Lipman D.J.: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215:403-410
- Frazer K.A., Pachter L., Poliakov A., Rubin E.M., Dubchak I.: VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32 (Web Server issue): 273-279
- Ivan J., Šprincová A., Javorský P., Pristaš P.: Spreading and mutability of *Selenomonas ruminantium* plasmids. *Folia Microbiol.* 2006; 51:283-5
- Nakamura M., Nagamine T., Ogata K., Tajima K., Aminov R.I., Benno Y.: Sequence analysis of small cryptic plasmids isolated from *Selenomonas ruminantium* S20. *Current Microbiol.* 1999; 38:107-112
- Pospiech A., Neumann B.: A versatile quick/prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 1995; 11:217-18
- Šprincová A., Javorský P., Pristaš P.: pSRD191, a new member of RepL replicating plasmid family from *Selenomonas ruminantium*. *Plasmid.* 2005; 54:39-47
- Tiwari A.D., Bryant M.P., Wolfe R.S.: Simple method for isolation of *Selenomonas ruminantium* and some nutritional characteristics of the species. *J. Dairy Sci.* 1969; 52:2054-6

DETEKCIA FRAGILNÝCH MIEST NA CHROMOZÓMOCH HOVÄDZIEHO DOBYTKA

Galdíková M., Šiviková K.

Katedra biológie a genetiky, UVL, Košice

ABSTRAKT

Chromozómové aberácie zistené v bunkách cicavcov sú považované za jeden z najvýznamnejších biologických markerov pre overenie genotoxického/karcinogénneho účinku chemických látok. V našej práci sme sa zamerali na stanovenie spontánnej a indukovanej hladiny chromozómových aberácií vystaveným pôsobeniu pozitívnym mutagénom. Konvenčnými cytogenetickými metódami sme potvrdili signifikantné zvýšenie hladiny chromozómových aberácií v bovinných periférnych lymfocytoch indukovaných pozitívnymi mutagénmi, etylmetylsulfonátom (EMS) a mitomycínom C (MMC). Fluorescenčná *in situ* hybridizácia je v porovnaní s konvenčnou technikou považovaná za senzitívnejšiu a menej prácnu metódu a je obzvlášť vhodná na detekciu stabilných chromozómových aberácií, ako sú translokácie. V našej práci sa nám doposiaľ nepodarilo detegovať žiadne translokácie.

ÚVOD

Stáda pasúcich sa hospodárskych zvierat sa pokladajú za obzvlášť vhodné biomarkery celkovej genotoxicity prostredia, pretože sú exponované environmentálnym genotoxínom, pričom tento kontakt nie je možné simulovať v laboratórnych podmienkach (Catalan a kol., 1995). Účinky genotoxických látok sa premietajú na zdravotný stav hospodárskych zvierat pomaly a nebadateľne, o to však závažnejšie, znížením plodnosti, zvýšením embryonálnej mortality, potratovosti, perinatálnej mortality a vyšším percentom vrodených vývinových chýb. Zhoršenie reprodukčných ukazovateľov v porovnaní s rovnakými kritériami toho istého plemena v ekologicky dostačujúcich podmienkach je jednou z najvhodnejších metód hodnotenia environmentálnej genotoxicity (Dianovský, 1994). Letálne génové mutácie, chromozómové prestavby v gamétach, poprípade prerušenie embryonálneho, či fetálneho vývinu indukované genotoxínmi spôsobuje mikroaborty a tým zníženie reálnej plodnosti. Chromozómové aberácie sú hlavnou príčinou predčasného prerušenia gravidity u hospodárskych zvierat (Vanroose a kol., 2000).

Základom genetickej prevencie je preventívny genotoxický program, ktorý zabraňuje šíreniu genotoxických zlúčenín v poľnohospodárstve a ich kumulácii v prostredí. Pre tento zámer sa využívajú mnohostupňové testy zahrňujúce základné kategórie- mutagenitu a karcinogenitu, poprípade teratogenitu (Albertini a kol., 2000).

Počas mnohých rokov sa na overenie genotoxických, resp. karcinogénnych účinkov chemických látok hodnotia génové mutácie a/alebo chromozómové aberácie. Obidva typy poškodení detegujú ireverzibilné zmeny v DNA, t.j. mutagénny, v prípade chromozómových aberácií tzv. klastogénny účinok látky a sú potvrdením skorých účinkov genotoxických karcinogénov.

Fragilné miesta predstavujú normálnu súčasť chromozómovej štruktúry (Glover, 2006) a prednostne sú miestom vzniku gapov alebo zlomov pri čiastočnom prerušení syntézy DNA (Arlt a kol., 2006).

V našej práci sme sa zamerali na detekciu stabilných chromozómových aberácií použitím celochromozómových sond u hovädzieho dobytká po expozícii pozitívnymi mutagénmi.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente bola použitá krv dvoch klinicky zdravých donorov hovädzieho dobytká. Krv bola odobratá sterilne z *vena jugularis* do sterilných heparinizovaných injekčných striekačiek a kultivovaná počas 72 hodín pri 38 °C v 5 ml kultivačného média RPMI 1640 s obsahom L-

glutamínu a 15 μ mol HEPES (Sigma, St. Louis, MO, USA). Kultivačné médium bolo doplnené boviným fetálnym sérom (15%) (BOFES, Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA), antibiotikami (penicilín 250 U/ml a streptomycínom 250 μ g.ml⁻¹ a fytohemaglutinínom (PHA, 180 μ g.ml⁻¹ Welcome, Dartford, England). Etylmetylsulfonát (Sigma, St. Louis, MO, USA) v koncentrácii 250 μ g.ml⁻¹ a mitomycín 0,4 μ mol.l⁻¹ boli pridané na posledných 48 a 24 hodín kultivácie. Hodinu a pol pred koncom kultivácie bol do média pridaný kolchicín o finálnej koncentrácii 5 μ g.ml⁻¹. Suspenzia buniek bola kvapkaná na čisté podložné sklička a preparáty boli ofarbené Giemsom. Štruktúrové aberácie boli hodnotené v 100 metafázach pri 100 násobnom zväčšení. Ako štruktúrové aberácie boli vyhodnocované chromozómové a chromatidové zlomy, chromatidové a chromozómové výmeny. Gapy boli zaznamenané, ale nezahrnuté medzi aberácie.

Preparáty na FISH boli pripravené konvenčnou cytogenetickou metódou. DNA chromozómov bola pri 72 °C počas 2 minút (70% formamid/2xSSC, pH=7,0) a dehydratovaná v 70%, 80% a 95% etanole. Na vizualizáciu aberácií boli použité celochromozómové fluorescenčne značené sondy pre boviné chromozómy 1, 5 a 7 (BOS 1-SO, BOS 5-SG a BOS 7-SO, Výskumný Ústav Veterinárneho Lékařství, Brno, Česká republika). Po denaturovaní sondy v hybridizačnej zmesi pri 72 °C počas 10 minút nasledovala predhybridizácia pri 37 °C 90 minút. Po celonočnej hybridizácii boli preparáty premyté v 2xSSC (2 x 5 min, 37°C), 50% formamide v 2xSSC (2 x 5 min, 42°C), 0.1xSSC (2 x 5 min, 42°C), a TNT (Tris-NaCl-Tween 20 buffer) (2 x 5 min, 37°C). Preparáty boli farbené DAPI/Antifade (4', 6'-diamo-2-fenolindol, Q-BIOgene, UK). Výsledky hybridizácie boli vyhodnocované pomocou PAINT systému (Tucker a kol., 1995) a zaznamenané pod fluorescenčným mikroskopom Nikon (Labophot 2A/2) pomocou duálnych filtrov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky konvenčnej chromozómovej analýzy sú zhrnuté v tabuľke 1. V porovnaní s kontrolnou skupinou sme zaznamenali štatisticky významné zvýšenie v prípade chromatidových aberácií indukovaných pozitívnymi mutagénmi. V našom pokuse sme doposiaľ nezaznamenali translokácie u žiadnej z exponovanej skupín. Súvisí to s dosiaľ nedostatočným počtom vyhodnotených buniek ako aj so skutočnosťou, že v našom experimente boli použité len 3 sondy.

V laboratórnych podmienkach sa pre overenie experimentálnych podmienok *in vitro* používajú pozitívne mutagény, mitomycín C a etylmetylsulfonát, ktoré sú súčasťou kompletného testovacieho protokolu. Pre porovnanie indukovaných frekvencií po expozícii pozitívnych mutagénov je potrebné zistiť spontánnu úroveň translokácií u zdravých jedincov vystavených len bežnej dávke klastogénnych/mutagénnych substancií z prostredia. Řezáčová a kol. (2003) publikovali len prednávkou tieto údaje u hospodárskych zvierat. Hodnoty indukovaných translokácií môžu slúžiť ako vhodný marker pri určovaní dopadu chronickej expozície činiteľov vonkajšieho prostredia. Vzhľadom na to, že pre hospodárske zvieratá je dostupný len limitovaný počet sond, porovnanie získaných hodnôt translokácií z jednotlivých laboratórií je náročné. Výsledky z každého laboratória vyžadujú korekciu na celý genóm a pre vyhodnocovanie aberácií musia byť zaistené rovnaké kritériá.

Mitomycín C (MMC), ako prírodné antitumorové antibiotikum, patrí medzi cytotoxické liečivá používané v rámci chemoterapie pri liečbe rozličných druhov karcinómov. V testoch genotoxicity je zahrnutý ako pozitívna kontrola pre overenie laboratórnych podmienok MN a SCE *in vitro*. Cytotoxicita MMC spočíva primárne v tvorbe adícií báz a krížových väzieb v rámci vlákien DNA a indukcii SCE (Schlade-Bartušiak a kol., 2002).

Tab. 1. Indukcia chromozómových aberácií v bovinných periférnych lymfocytoch po pôsobení pozitívnych mutagénov.

Dose	Types of chromosomal aberration					% breaks (\pm SD)	% aberrat. cells	% MI	
	G	CB	IB	CE	IE				
Donor 1									
Control	6	1	-	-	-	1.0 \pm 0.10	1.0 \pm 0.10	7.8	
		Treatment for 24 h							
EMS (250 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)	14	12	-	5	2	26.0 \pm 0.64***	16.0 \pm 0.37***	4.6**	
MMC	14	5	-	-	-	5.0 \pm 0.045 ^a	5.0 \pm 0.045 ^a	6.9 ^a	
		Treatment for 48 h							
EMS (250 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)	4	3	-	-	-	3.0 \pm 0.17 ^a	3.0 \pm 0.17 ^a	7.2 ^a	
MMC	13	12	1	-	-	14.0 \pm 0.40***	12.0 \pm 0.32**	4.9**	
Donor 2									
Control	2	1	-	-	-	1.0 \pm 0.10	1.0 \pm 0.10	7.7	
		Treatment for 24 h							
EMS(250 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)	7	20	-	9	-	38.0 \pm 0.79***	24.0 \pm 0.43***	3.5***	
MMC	5	9	-	-	-	9.0 \pm 0.28**	9.0 \pm 0.28**	6.6 ^a	
		Treatment for 48 h							
EMS(250 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)	4	7	-	-	-	7.0 \pm 0.25*	7.0 \pm 0.25*	6.5 ^a	
MMC	8	16	-	1	-	18.0 \pm 0.43***	16.0 \pm 0.37***	4.4**	

*, **, *** - štatistická významnosť (P<0.05, P<0.01, P<0.001, χ^2 test)

a- štatisticky nevýznamné údaje

CB, IB- chromatidové, izochromatidové zlomy, CE, IE- chromatidové, izochromatidové výmeny

G- gapy, nezahrnuté do štatistických údajov

Etylmetylsulfonát (EMS) je považovaný za genotoxický karcinogén. EMS ako alkylačná substancia sa značne používala a stále aj používa na štúdium toxicity, vyplývajúcej z etylácie makromolekúl tkanív, obzvlášť DNA. EMS je používaný ako pozitívna kontrola pri detekcii chromozómových aberácií *in vitro*. V literatúre je však popísaných len niekoľko prác zaoberajúcich sa detekciou translokácií po expozícii pozitívnymi mutagénmi (Ellard a kol., 1996; Satoh a kol., 2002; Abdel- Halim a kol., 2005). Údaje u zvierat sú ešte zriedkavejšie alebo úplne chýbajú.

Chromozómové aberácie predstavujú biologický marker expozície klastogénov a náchylnosti k rozvoju rakovinových ochorení. Sú uznané ako hodnotný cytogenetický biomarker efektu, pravdepodobne ako jediný z cytogenetických biomarkerov, ktorý je medzinárodne štandardizovaný a potvrdený (Carrano a Natarajan, 1988; Albertini a kol., 2000).

Celochromozómové farbenie (WCP) má všestranné využitie, ktoré je spojené s jej schopnosťou detekcie chromozómových aberácií. Uplatňuje sa v klinickej cytogenetike, kde slúži na objasnenie translokácií a inzercií nejednoznačných pri bandovacej technike, ďalej v biodozimetrii po *in vivo* expozícii (napr. ionizačným žiarením) a pri *in vitro* štúdiách pri osvetľovaní základného biologického mechanizmu indukcie aberácií rozličnými klastogénmi (Tucker a kol., 1995).

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená grantmi VEGA Ministerstva školstva a vedy SR (č. 1/4322/07; 1/4394/07), Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0010-07 a Národným referenčným laboratóriom pre pesticídy na Univerzite veterinárskeho lekárstva v Košiciach.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abdel-Halim HI, Natarajan AT, Mullenders LHF, Boei JJWA. Mitomycin C- induced pairing of heterochromatin reflects of DNA repair and chromatid exchange formation. *Journal of Cell Science*. 2005; 118: 1757- 1767.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat.Res.*2000; 463: 111–172.
- Arlt MF, Durkin SG, Ragland RL, Glover TW. Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA Repair*, 2006;5: 1126–1135.
- Carrano AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat. Res.* 1988; 204: 379- 406.
- Catalan J, Moreno C, Arruga MV. Sister- chromatid exchanges in cattle: breed, sex and Budr dose effects. *Mutat. Res.* 1995; 331: 205- 211.
- Dianovský J. Perspektívy veterinárnej medicíny v oblasti genotoxickej prevencie. *Slovenský veterinársky časopis*.1994; 19: 46-9.
- Ellard S, Toper S, Stemp G, Parry EM, Wilcox P, Parry JM. A comparison of conventional metaphase analysis of Giemsa-stained chromosomes with multi-colour fluorescence in situ hybridization analysis to detect chromosome aberrations induced by daunomycin . *Mutagenesis*. 1996; 11: 537-546.
- Glover TW. Common fragile sites. *Cancer Letters*.2006;232:4-12.
- Řezáčová O, Kubíčková S, Černohorská H, Rubeš J. Comparison of spontaneous background genomic aberration frequencies among cattle, pig and humans using dual- colored FISH. *Chromosome Research*. 2003; 11: 715- 724.
- Satoh T, Hatanaka M, Yamamoto K, Kuro-o M, Sofuni T. Application of mFISH for the analysis of chemically-induced chromosomal aberrations: a model for the formation of triradial chromosomes. *Mutat. Res.* 2002; 504: 57- 65.
- Schlade-Bartusiak K, Stembalska-Kozłowska A, Bernady M, Kudyba M, Sasiadek M. Analysis of adaptive response to bleomycin and mitomycin C. *Mutat. Res.* 2002; 513: 75-81.
- Tucker JD, Morgan WF, Awa AA, Bauchinger M, Blakey D, Cornforth MN, Littlefield LG, Natarajan AT, Shasserre C. A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenet. Cell Genet.* 1995; 68: 211- 221.

VÝSKYT VZDUŠNÝCH MIKROORGANIZMOV V BIOAEROSÓLE V OKOLÍ ČISTIARNE ODPADOVÝCH VÔD

Gregová G., Venglovský J., Ondrašovičová O., Sasáková N., Laktičová K., Kišová J.
Katedra hygieny chovu zvierat a životného prostredia, UVL Košice

ABSTRAKT

Biologické nebezpečenstvo vo forme inhalácie vzdušných mikroorganizmov predstavujú prevádzky živočíšnej, rastlinnej výroby a spracovania odpadov z nich.

Čistiarne odpadových vôd sú na jednej strane dôležitým krokom v ochrane životného prostredia a zlepšení kvality našich tokov. Avšak na strane druhej pri ich činnosti dochádza k uvoľňovaniu množstva mikroorganizmov do okolitého ovzdušia a k tvorbe potenciálne nebezpečného bioaerosólu. Cieľom našej práce bolo zistiť miesta s najväčšou koncentráciou vzdušných mikroorganizmov v súvislosti so sezónnymi vplyvmi a identifikovať zdravotné riziká v prevádzke čistiarní odpadových vôd a jej okolí.

ÚVOD

Bioaerosól je disperzná sústava pozostávajúca z biotických a abiotických zložiek, medzi ktoré patria aj baktérie, vírusy, huby, protozoá, mykotoxíny, endotoxíny, prachové častice a iné (Cox a Wathes, 1995).

Vznik, zánik a rozširovanie bioaerosólu sú závislé od biotických faktorov, ktoré vplyvajú na životaschopnosť organizmov a od abiotických faktorov, ktoré riadia uvoľňovanie, transport a disperziu mikroorganizmov (Chudoba a kol., 1991). V pracovnom prostredí čistiarne odpadových vôd sú ovplyvnené mechanickými, fyzikálnymi a chemickými procesmi čistenia, pri ktorých dochádza k aerácii, premiestňovaniu, tvorbe bublín a špliechaniu vody (Ondrašovič a kol., 1996). Tieto čistiace procesy sú zamerané na odstraňovanie, inaktiváciu patogénov a parazitov, súčasne sa však mikroorganizmy môžu dostať do vzduchu daného pracovného prostredia (Michels, 2001).

Podmienky prostredia významne ovplyvňujú koncentráciu mikroorganizmov v ovzduší čistiarne. Na prežívanie mikroorganizmov vo vzduchu vplyvajú faktory ako teplota, relatívna vlhkosť, prúdenie vzduchu, ročné obdobie, časť dňa, slnečné žiarenie, veľkosť častíc a iné (Handley a Webster, 1995)

MATERIÁL A METODIKA

Na meranie bioaerosólu bol v pokuse použitý prístroj MAS-100 *Eco*. Je to vysokovýkonný prístroj, využívajúci princíp Andersenovho aeroskopu, ktorý nasáva vzduch cez perforovanú platničku. Prúd vzduchu s časticami je nasmerovaný na štandardnú Petriho misku s Ø 90 mm, obsahujúcu agar. Meraný objem vzduchu bol 2, 5, 10 a 20 litrov. Po expozícii sa platne dali inkubovať. Endoagar, mäsopeptónový agar pri teplote 37°C počas 24 hodín a saboraaudov agar pri izbovej teplote počas 4 dní. Po uplynutí doby inkubácie boli odčítané porastené kolónie, následne upravené pomocou korekčných tabuliek a prepočítané na m³.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V pokuse sme stanovovali koncentrácie mikroorganizmov v prostredí čistiarne odpadových vôd počas zimy a leta. Výsledky boli dané do súvislosti s relatívnou vlhkosťou vzduchu, teplotou prostredia a hodnotili sme vplyv týchto fyzikálnych ukazovateľov a sezónnych vplyvov na hladinu vzdušného bioaerosólu.

Výsledky zistené počas leta boli značne zvýšené oproti zimnému obdobiu, čo súvisí so zvýšenou hodnotou teploty a znížením relatívnej vlhkosti (tab.1, tab.2).

Najväčšia koncentrácia mikroorganizmov bola v prvej fáze čistenia odpadových vôd, čiže pri hrubom predčistení na hradliciach, jemnom predčistení na lapačoch piesku a na sitách. Počty mikroorganizmov zistené na prítoku sú ukazovateľom znečistenia odpadových vôd v danej

zbernej lokalite a počet vzdušných mikroorganizmov je výrazne ovplyvnený smerom vetra a vzdialenosťou odberového miesta od vodnej hladiny na prítoku. Zvýšená vlhkosť vzduchu (v dôsledku zvýšenej aerácie, miešania a špliechania) a dostatok organických látok v oštrenej vode predstavujú ideálne podmienky pre prežívanie mikroorganizmov v bioaerosóle v tomto prostredí. Pri sedimentačných, aktivačných nádržiach a pri odvodňovaní kalov boli hodnoty mikroorganizmov nižšie, čo súvisí s ich predchádzajúcim spracovaním odpadových vôd. Merania vo vonkajšom prostredí môžu podstatne ovplyvniť aj poveternostné podmienky.

Tab. 1. Hodnoty meraní bioaerosólu v čistiarni odpadových vôd počas leta.

Miesto odberu	Teplota	Relatívna vlhkosť	CPM KTJ/m ³	KB KTJ/m ³	Plesne KTJ/m ³	Kvasinky KTJ/m ³
Prítok	26°C	40%	5,35·10 ³	0,45·10 ³	34,5·10 ³	0,4·10 ³
Hrubé predčistenie (von)	26,5°C	49%	4·10 ³	0	30,7·10 ³	0,2·10 ³
Hrubé predčistenie (dnu)	25°C	45%	13,7·10 ³	0,8·10 ³	17,8·10 ³	3·10 ³
Pašalov merný žľab	26,5°C	45%	6·10 ³	3,5·10 ³	44·10 ³	1,7·10 ³
Jemné predčistenie (dnu)	25,3°C	46,2%	22·10 ³	0,1·10 ³	22·10 ³	2,05·10 ³
Lapač piesku	24,4°C	45,9%	87,5·10 ³	17,83·10 ³	52·10 ³	3,6·10 ³
Sedimentačná nádrž	27,2°C	44,5%	2,5·10 ³	0	341·10 ³	5·10 ³
Odvodňovanie kalov	25,6°C	45,6%	8,5·10 ³	0,5·10 ³	50·10 ³	1,5·10 ³

CPM - celkový počet mikroorganizmov

KB - koliformné baktérie

KTJ – kolónie tvoriace jednotky

V závislosti od zdroja, disperzného mechanizmu vo vzduchu a prevládajúcich podmienok prostredia sa mení jeho zloženie, veľkosť a koncentrácia mikrobiálneho znečistenia. Vyššie riziko bioaerosólu je v menších miestnostiach, s nedostatočnou ventiláciou, kde prostredie poskytuje podmienky pre rast a prežívanie mikroorganizmov v bioaerosóle (Seltzer, 1994).

V uzavretých priestoroch čistiarne boli zistené vyššie hodnoty bioaerosólu, hlavne tam kde dochádzalo k aerácii alebo premiestňovaniu vody pri súčasnej nedostatočnej výmene vzduchu. Existuje tu potenciálne riziko vystavenia pracovníkov zvýšenej hladine bioaerosólu. Bolo zistené, že pracovníci čistiarní majú zvýšený výskyt ochorení priamo súvisiacich s ich vystavovaním sa bioaerosólu (Melbostad a kol., 1994). Jeho pôsobenie na zdravie ľudí a zvierat závisí od druhu, rastových podmienok a od životaschopnosti vyskytujúcich sa mikroorganizmov, preto predstavuje zdravotné riziko pre osoby, ktoré pracujú v čistiarni odpadových vôd, alebo žijú v jej okolí (Brandi a Amagliani, 2000).

Tab. 2. Hodnoty meraní bioaerosólu v čistiarni odpadových vôd počas zimy.

Miesto odberu	Teplota	Relatívna vlhkosť	CPM KTJ/m ³	KB KTJ/m ³	Plesne KTJ/m ³	Kvasinky KTJ/m ³
Prítok	0,9°C	68,2%	0,72·10 ³	0,23·10 ³	0,3·10 ³	0,3·10 ³
Hrubé predčistenie (von)	0,3°C	71,5%	1,4·10 ³	0	0,1·10 ³	0,2·10 ³
Hrubé predčistenie (dnu)	3,5°C	73,7%	7,7·10 ³	2,3·10 ³	0	0,86·10 ³
Paršalov merný žľab	1,0°C	71,9%	3,6·10 ³	3,3·10 ³	0,2·10 ³	0,6·10 ³
Lapač piesku	0,3°C	80,5%	12,3·10 ³	7,1·10 ³	0	1,45·10 ³
Sediment. nádrž	1,6°C	69,7%	0,65·10 ³	0,1·10 ³	0,2·10 ³	0,1·10 ³
Aktivačná nádrž	1,6°C	73,9%	0,3·10 ³	0	0	0,5·10 ³
Odvodňovanie kalov	3,5°C	76,9%	1,2·10 ³	0,1·10 ³	0,2·10 ³	0

CPM - celkový počet mikroorganizmov

KB - koliformné baktérie

KTJ – kolónie tvoriace jednotky

POĎAKOVANIE

Práca vznikla za finančnej podpory grantu VEGA 1/4390/07.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Brandi, G., Sisti, M., Amagliani, G. Evaluation of the environmental impact of microbial aerosols generated by wastewater treatment plants utilising different aeration systems. *Journal of Applied Microbiology*. 2000; 88: 845-852.
- Cox, C.S., Wathes, C.M. *Bioaerosols Handbook*. Lewis Publishers. CRC Press LLC. Boca Raton, USA, 1995; 621.
- Handley, B.A., Webster, A.J.F. Some factors affecting the airborne survival of bacteria outdoors. *Journal of Applied bacteriology*. 1995; 79: 368-378.
- Chudoba, J., Dohányos, M., Wanner, J. *Biologické čistení odpadních vod*. SNTL Nakladatelství technické literatury, Praha, 1991.
- Melbostad, E., Eduard, W., Skogstad, A., Sandven, P., Lassen, J., Sostrand, P., Heldal, K. Exposure to bacterial aerosols and work-related symptoms in sewage workers. *American Journal of Industrial Medicine*. 1994; 25: 59-63.
- Michels, CH.D. *Bioaerosol Levels at Feedlots and an Indoor Wastewater Treatment Headworks*, A Thesis Submitted to the Faculty of graduate studies in partial fulfillment of the requirements of the degree of master of science department of civil engineering Calgary, Alberta, 2001.
- Ondrašovič, M., Para, Ľ., Ondrašovičová, O., Vargová, M., Kočišová, A. *Veterinárna starostlivosť o životné prostredie*, Košice, 1996; 15-21.
- Sellers, R.F., Parker, J. Airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Hygiene*. 1969; 67: 671-677.

POROVNANIE VÝSKYTU NIEKTORÝCH POLYMORFIZMOV V PROTEÍN KÓDUJÚCEJ OBLASTI PRIÓNOVÉHO PROTEÍNU MEDZI ZDRAVÝM A BSE POSTIHNUTÝM HOVÄDZÍM DOBYTKOM

Hreško S.¹, Mojžiš M.², Tkáčiková Ľ.¹

¹ Katedra mikrobiológie a imunológie, Ústav imunológie, UVL, Košice

² Štátny veterinárny ústav, Zvolen

ABSTRAKT

Vplyv polymorfizmov v proteín kódujúcej oblasti *PrP* génu na vnímavosť jedincov voči prionózam je známy u oviec, myši aj ľudí. Podobnú súvislosť u hovädzieho dobytku naznačujú len experimentálne štúdie na transgénnych myšiach. Cieľom tejto práce bolo pomocou metód molekulárnej genetiky (PCR, RFLP) porovnať výskyt známych polymorfizmov v počte oktapeptidových repetícií a tichej zámeny nukleotidu v kodóne 192 v skupine BSE postihnutých jedincov oproti kontrolnej skupine zdravých zvierat. Výsledky analýzy nepreukázali žiadne štatisticky významné rozdiely v distribúcii alel alebo genotypov sledovaných polymorfizmov medzi vyšetrenými skupinami vzoriek.

ÚVOD

Bovinná špongioformná encefalopátia (BSE) patrí do skupiny neurodegeneratívnych ochorení, označovaných ako prionózy. Infekčným agensom je konformačne pozmenená molekula celulárneho proteínu (*PrP^C*), známa tiež ako prión (Prusiner, 1982). Vnímavosť a inkubačná doba prionóz je ovplyvňovaná polymorfizmami v géne, kódujúcom *PrP^C* (Prusiner, 1991) u oviec (Goldmann a kol., 1990), myši (Westaway a kol., 1994) a ľudí (Collinge a kol., 1991). U hovädzieho dobytku nebola zistená žiadna súvislosť medzi doteraz známymi polymorfizmami v proteín kódujúcej časti tohto génu a výskytom BSE (Hills a kol., 2003). Proteín kódujúca oblasť *PrP* génu hovädzieho dobytku obsahuje päť alebo šesť kópií úsekov DNA dlhých 24 alebo 27 nukleotidov, ktoré kódujú aminokyseliny Pro-Gln/His-Gly-(Gly)-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln (Goldman a kol., 1991). Možný vplyv počtu oktapeptidových repetícií voči infekcii BSE bol zistený len pri experimentálnych štúdiách na myšiach. Experimentálna infekcia BSE u transgénnych myši, ktoré niesli o jednu až štyri oktapeptidové repetície viac (7-10 namiesto 5 alebo 6), sa prejavila kratšou inkubačnou dobou a intenzívnejším priebehom oproti myšiam, nesúcim alely s piatimi alebo šiestimi repetíciami (Castilla a kol., 2004, 2005). V inej experimentálnej štúdi, Brun a kol. (2007) zaznamenali slabšiu vnímavosť voči infekcii BSE u transgénnych myši s piatimi repetíciami než u myši so šiestimi repetíciami. Goldmann a kol. (1991) zaznamenali tichú zmenu nukleotidu *AAC* → *AAT* v kodóne 192 proteín kódujúcej oblasti *PrP* génu hovädzieho dobytku, ktorá sa vyskytovala len na alele so šiestimi oktapeptidovými repetíciami. Cieľom práce bolo porovnať variácie v počte oktapeptidových repetícií a výskyt tichej zámeny nukleotidu v kodóne 192 medzi kontrolnou skupinou hovädzieho dobytku a skupinou zvierat, u ktorých bola potvrdená infekcia BSE.

MATERIÁL A METODIKA

Pre účel našej analýzy sme vyšetřili 18 vzoriek genomickej DNA pochádzajúcich zo zvierat, u ktorých bol Štátnym veterinárnym ústavom vo Zvolene potvrdený výskyt BSE a 215 vzoriek genomickej DNA pochádzajúcich zo zdravých zvierat. Vzorky DNA BSE - pozitívnych zvierat boli získané z tkanív pomocou High pure PCR template preparation kitu. Vzorky DNA kontrolných zvierat boli získané metódou izolácie z krvných leukocytov podľa Sambrook a kol. (1989). Sledované polymorfizmy sme analyzovali metódou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) a štiepením produktov pomocou reštrikčných enzýmov (RFLP). Na analýzu polymorfizmu v počte oktapeptidových repetícií bola pomocou nami navrhnutých primerov (Tab. 1.) použitá metóda *nested* PCR. V prvej reakcii boli pomocou primerov PrP-

CDS-F a PrP-CDS-R amplifikované 1256 bp / 1280 bp dlhé produkty, ktoré zahŕňali proteín kódujúcu oblasť PRNP génu hovädzieho dobytká. Tieto produkty boli použité ako templát v druhej PCR reakcii, pri ktorej boli pomocou primerov Tokt-F a Tokt-R amplifikované 555 bp / 579 bp dlhé produkty predstavujúce 5, resp. 6 oktapeptidových repetícií. Obe reakcie prebehli za podmienok iniciálnej denaturácie (94°C, 5 min), vlastnej amplifikácie (Tab. 1.) a finálnej extenzie (72°C, 10 min). Produkty prvej reakcie (1256 bp / 1280 bp) boli použité aj pri analýze prítomnosti tichej zámene nukleotidu v kodóne 192. Na analýzu bola použitá reštrikčná endonukleáza *HindII*, keďže oblasť kodónu 192 predstavuje štiepiace miesto pre tento enzým. Prítomnosť alely *AAC* bez zámene nukleotidu bola charakterizovaná vznikom reštrikčných fragmentov. V prípade alely so zámennou nukleotidu (*AAT*) k štiepeniu nedochádzalo. Všetky PCR produkty a reštrikčné fragmenty boli analyzované v 2 % agarózovom gély v 1x TAE tlmivom roztoku po ofarbení etídium-bromidom a vizualizácii pod UV lampou. Ako štandard molekulevej hmotnosti bol použitý 100 bp DNA ladder. Výsledky analýz sme štatisticky vyhodnotili pomocou χ^2 – testu a Fisherovho exaktného testu.

Tab. 1. Primery použité pri analýze

Primer	Nukleotidová sekvencia 5'-3'	Produkt	Podmienky PCR
PrP-CDS-F	<i>CTA GGG TCC CCA CAA GAA CAA G</i>	1280 bp	35x: 94°C, 1min.; 61,8°C, 1min.; 72°C, 1min.;
PrP-CDS-R	<i>ACG GGG CTG CAG GTA GAT A</i>		
Tokt-F	<i>TTT GTG GCC ATG TGG AGT GAC G</i>	579 bp / 555 bp	35x: 94°C, 1min.; 56,6°C, 1min.; 72°C, 1min.;
Tokt-R	<i>CCC CTT GGT GGT GGT GGT GA</i>		

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V oboch vyšetovaných skupinách sme zaznamenali prevažný výskyt homozygotných jedincov pre šesť oktapeptidových repetícií. Hoci bol tento genotyp v kontrolnej skupine zastúpený u 94,4 % jedincov oproti 88,9 % jedincov v skupine BSE postihnutých zvierat, štatistickou analýzou sme nezaznamenali žiadne významné rozdiely (Tab. 2.). Podobne pri analýze distribúcie alel sme nezaznamenali štatisticky významné rozdiely. Zo všetkých vyšetovaných zvierat ani u jedného jedinca nebol zaznamenaný homozygotný genotyp pre päť oktapeptidových repetícií.

Tab. 2. Frekvencie výskytov genotypov a alel vyšetrených polymorfizmov

Polymorfizmus	počet n	Frekvencia výskytu genotypov			Frekvencia výskytu alel		
		6/6	6/5	5/5	6	5	
Oktapeptidové repetície	kontrola	215	0,9442	0,0558	0,0	0,9721	0,0279
	BSE+	18	0,8889	0,1111	0,0	0,9444	0,0556
			ns, p = 0,2952			ns, p = 0,2953	
Polymorfizmus	počet n	Frekvencia výskytu genotypov			Frekvencia výskytu alel		
		<i>aac/aac</i>	<i>aac/aat</i>	<i>aat/aat</i>	<i>aac</i>	<i>aat</i>	
Kodón 192	kontrola	215	0,8232	0,1442	0,0326	0,8953	0,1047
	BSE+	18	0,7222	0,2778	0,0	0,8611	0,1389
			χ^2 analýza neplatná			ns, p = 0,7639	

ns = nesignifikantné

Pri analýze výskytu tichej zámery nukleotidu v kodóne 192 sme zaznamenali najvyšší výskyt alely *AAC* a homozygotného genotypu *AAC/AAC* v oboch vyšetrovaných skupinách (Tab. 2.). Výskyt homozygotného genotypu so zámernou nukleotidu (*AAT/AAT*) sme zaznamenali len v kontrolnej skupine zdravých zvierat. Rozdiely v distribúcii alel a genotypov neboli štatisticky významné. Alela *AAT* v kodóne 192 sa vyskytovala len u homozygotných jedincov pre šesť oktapeptidových repetícií. Všetky heterozygotné jedince v počte oktapeptidových repetícií mali homozygotný genotyp *AAC/AAC* v kodóne 192.

Vysoký výskyt alely so šiestimi oktapeptidovými repetíciami bol zaznamenaný viacerými štúdiami na hovädzom dobytku chovanom v Európe (Walawski a Czarnik, 2003) alebo v Ázii (Jeong a kol., 2005; Nakamitsu a kol., 2006). Jeong a kol. (2005) vo svojej štúdií na kórejskom dobytku Hanwoo analyzovali okrem polymorfizmu v počte oktapeptidových repetícií aj výskyt tichej zámery nukleotidu v kodóne 192. Výsledky boli porovnateľné s našimi, keďže všetky vyšetrované jedince tohto plemena boli homozygotné pre šesť oktapeptidových repetícií. Kodón 192 sa genotypovo vyskytoval najčastejšie v homozygotnej forme bez zámery nukleotidu. Napriek výsledkom experimentálnych štúdií a mnohým štúdiám na hovädzom dobytku, doposiaľ nebola zistená súvislosť medzi počtom oktapeptidových repetícií v *PrP* géne a vnímavosťou voči BSE u hovädzieho dobytku.

POĎAKOVANIE

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Brun A, Gutiérrez-Adán A, Castilla J, Pintado B, Díaz-San Segundo F, Cano MJ, Alamillo E, Espinosa JC, Torres JM. Reduced susceptibility to bovine spongiform encephalopathy prions in transgenic mice expressing a bovine PrP with five octapeptide repeats. *J Gen Virol.* 2007; 88(Pt 6):1842-9.
- Castilla J, Gutiérrez-Adán A, Brun A, Pintado B, Parra B, Ramírez MA, Salguero FJ, Díaz San Segundo F, Rábano A, Cano MJ, Torres JM. Different behavior toward bovine spongiform encephalopathy infection of bovine prion protein transgenic mice with one extra repeat octapeptide insert mutation. *J Neurosci.* 2004; 24(9):2156-64.
- Castilla J, Gutiérrez-Adán A, Brun A, Pintado B, Salguero FJ, Parra B, Segundo FD, Ramírez MA, Rábano A, Cano MJ, Torres JM. Transgenic mice expressing bovine *PrP* with a four extra repeat octapeptide insert mutation show a spontaneous, non-transmissible, neurodegenerative disease and an expedited course of BSE infection. *FEBS Lett.* 2005; 579(27):6237-46.
- Collinge J, Palmer MS, Dryden AJ. Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet.* 1991; 337(8755):1441-2.
- Goldmann W, Hunter N, Foster JD, Salbaum JM, Beyreuther K, Hope J. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(7):2476-80.
- Goldmann W, Hunter N, Martin T, Dawson M, Hope J. Different forms of the bovine *PrP* gene have five or six copies of a short, G-C-rich element within the protein-coding exon. *J. Gen. Virol.* 1991; 72(Pt1):201-4.
- Hills D, Schlaepfer J, Comincini S, MacLean I, Dolf G, Ferretti L, Olsaker I, Williams JL. Sequence variation in the bovine and ovine PRNP genes. *Anim Genet.* 2003; 34(3):183-90.
- Jeong BH, Sohn HJ, Lee JO, Kim NH, Kim JI, Lee SY, Cho IS, Joo YS, Carp RI, Kim YS. Polymorphisms of the prion protein gene (PRNP) in Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) and Holstein cattle. *Genes. Genet. Syst.* 2005; 80(4):303-8.
- 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.
- Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science.* 1991; 252(5012):1515-22.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989, 9.16.

- Walawski K, Czarnik U. Prion octapeptide-repeat polymorphism in Polish Black-and-White cattle. *J. Appl. Genet.* 2003; 44(2):191-5.
- Westaway D, Cooper C, Turner S, Da Costa M, Carlson GA, Prusiner SB. Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(14):6418-22.

AMINOKYSELINY A NIEKTORÉ METABOLITY V MOČI PACIENTOV S KARCINÓMOM OBLIČKY

Jalč P.¹, Kron I.¹, Valanský L.²

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie, klinickej biochémie a LABMED, a.s., Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

²Urologická klinika, Fakultná nemocnica UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Aminokyseliny sú dôležitými stavebnými jednotkami proteínov a tiež slúžia pre syntézu viacerých biologicky aktívnych zlúčenín. Zmeny vo vylučovaní aminokyselín ako aj ich metabolitov ako napríklad kreatinín, kyselina močová, močovina a amoniak môžu byť vyvolané aj zmenami v metabolizme proteínov a aminokyselín. V prípade rakovinového procesu v obličke môžeme predpokladať zásah do aminokyselinových rezerv ich využívaním pre svoj metabolizmus ako aj ich derivátov polyamínov, ktoré sú takisto nevyhnutné pre proliferáciu buniek nádoru. Vyšetřili sme 71 pacientov s karcinómom obličiek, 53 mužov a 18 žien, u ktorých sme sa zamerali na zmeny hladín aminokyselín, vrátane zmien pH moču, koncentrácie kreatinínu, kyseliny močovej, močoviny a amoniaku v prvom rannom moči pacientov s karcinómom obličky pred nefrektómiou a 7 dní po nefrektómii. Ako kontrolnú skupinu sme vyšetřili 43 zdravých dobrovoľníkov, 29 mužov a 14 žien. Zistili sme štatistickú významnosť rozdielu vo vylučovaní glycínu v moči pacientov pred a po nefrektómii. V porovnaní so zdravými pacienti s karcinómom obličky vykazovali výrazné zmeny vo vylučovaní glycínu, serínu, kyseliny glutámovej, valínu, leucínu. V prípade vylučovania glycínu a serínu dochádza k poklesu hodnôt v moči so zvyšujúcim sa štádiom karcinómu obličky v porovnaní s kontrolou. Korelačná analýza závislosti vylučovania metabolitov a aminokyselín od pH moču ukazuje na zmenu transportných mechanizmov glycínu, serínu, treonínu, alanínu, kyseliny glutámovej a ornitínu následkom rakovinového procesu.

ÚVOD

Karcinóm obličky (RCC - Renal Cell Carcinoma) tvorí asi 3% zhubných nádorov a 90-95% RCC nádorov vyrastá z obličky. CC sa vyskytuje u mužov približne dvojnásobne viac ako u žien, najčastejšie medzi 50 až 70 rokom života (Hornák 2003). Štatistika RCC ochorení je alarmujúca, pretože príznaky choroby sa objavujú takmer u tretiny ľudí až v diseminovanom štádiu. Priemerné 5 ročné prežívanie je 60%, pri metastatickom ochorení do 10% (Kashyap a kol., 2005).

Aj keď doteraz bolo veľké množstvo potenciálnych markerov testovaných na RCC v moči pacientov, zatiaľ sa žiaden efektívny marker neuplatnil v rutinej klinickej praxi. Zmeny koncentrácie aminokyselín a ich metabolitov v moči pred a po nefrektómii u pacientov s karcinómom obličky dosiaľ neboli sledované.

Aminokyseliny sú dôležitými stavebnými jednotkami proteínov a tiež slúžia pre syntézu celého radu dôležitých biologicky aktívnych zlúčenín. Dá sa predpokladať, že rakovinový proces môže zasiahnuť veľmi podstatne do aminokyselinových rezerv, ich využívaním pre svoj metabolizmus alebo zvýšeným využívaním ich derivátov, ako polyamínov dôležitých pre proliferáciu buniek. Tieto zmeny v koncentráciách aminokyselín sa môžu prejaviť aj v ich vylučovaní obličkami, a obzvlášť vtedy, ak karcinogénny proces je prítomný v obličke. Podobné zmeny môžeme očakávať aj ovplyvnením transportných mechanizmov aminokyselín pri ich reabsorpcii. Tieto zmeny sa môžu prejaviť dvoma spôsobmi: 1) poklesom vylučovania aminokyselín do moču z dôvodu zvýšenej syntézy nukleových kyselín (využitie glycínu, kyseliny asparágovej, kyseliny glutámovej) (John, 2005) a nových proteínov (všetky základné aminokyseliny), alebo využitia niektorých aminokyselín pre rast nádorov ako arginínu a asparagínu (John, 2005); 2) negatívny alebo pozitívny vplyv na transportéry aminokyselín, čo môže viesť k vzrastu alebo poklesu ich koncentrácií v moči pacientov s RCC.

MATERIÁL A METODIKA

Vyšetrované súbory

Počas našej štúdie sme vyšetrili 71 pacientov s karcinómom obličky (53 mužov a 18 žien) s priemerným vekom $59,5 \pm 10,7$ rokov hospitalizovaných na Urologickej klinike. 36 pacientov malo diagnostikované I. štádium karcinómu obličky, 24 pacientov II. štádium a 11 pacientov III. štádium. V prípade glycinu a serínu sme vyhodnotili štatistické rozdiely koncentrácií v moči zdravých dobrovoľníkov v porovnaní s pacientmi s karcinómom obličky v štádiách I-III. Prvý ranný moč bol odoberaný v deň chirurgickej liečby, ďalšia vzorka prvého ranného moču bola získaná na 7 deň po chirurgickej liečbe. Výsledky boli porovnané s kontrolnou skupinou 43 zdravých dobrovoľníkov (29 mužov a 14 žien) s priemerným vekom $39,6 \pm 12,9$ rokov, u ktorých bol odobratý prvý ranný moč jednorázovo.

Materiál a metodika

Ako materiál sme použili prvý ranný moč od pacientov a zdravých ľudí. Zmerali sme pH každej vzorky moča. Následne sme moč spracovali na stanovenie koncentrácie kyseliny močovej (BIO-LA-TEST UA), močoviny (BIO-LA-TEST UREA 200), kreatinínu (BIO-LA-TEST CREA 200) a amoniaku (BIO-LA-TEST) (všetky BIO-LA-TESTY z Lachemy, Brno). Koncentrácie aminokyselín boli stanovené v deproteinizovanom moči s 10% kyselinou sulfosalicylovou (Lachema, Brno) automatickým analyzátorom aminokyselín AAA 339-T (Mikrotechna, Praha). Analýzy aminokyselín sa zakladali na princípe delení látok ionexovou chromatografiou so spektrofotometrickou detekciou.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýza aminokyselín pozostávala z detekcie 22 aminokyselín štandardu: kyselina asparágová, kyselina glutámová, serín, treonín, prolín, cysteín, glycín, alanín, valín, metionín, izoleucín, leucín, tyrozín, fenylalanín, histidín, tryptofán, lyzín, arginín, citrulín, kyselina α -aminomaslová, ornitín a taurín.

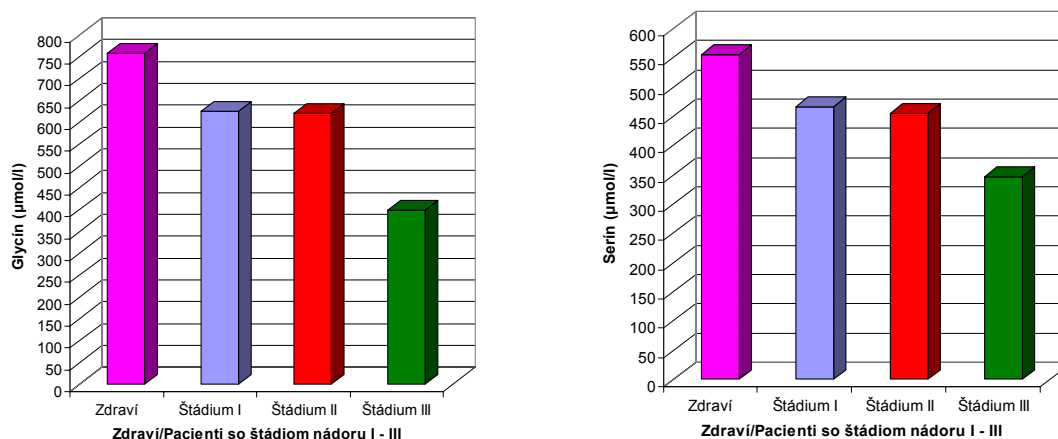
Z porovnania skupín pacientov s karcinómom obličky pred a po nefrektómii (tab.1) vyplýva štatisticky znížená hodnota koncentrácie glycinu ($P < 0,05$) v predoperačných vzorkách. Pri porovnaní hodnôt u pacientov a zdravých (tab.1) pozorujeme viac štatisticky významných rozdielov. Z údajov tabuľky môžeme takisto konštatovať štatistickú významnosť pre glycín ($P < 0,01$), ktorého hladina je výrazne nižšia u pacientov pred nefrektómiou oproti zdravým. Na druhej strane pozorujeme štatisticky vyššie hladiny kyseliny glutámovej ($P < 0,01$), valínu a leucínu ($P < 0,05$). Ostatné študované parametre sú štatisticky nevýznamné ku karcinogénnemu procesu v obličke.

Z rovnakého porovnania skupín, ale pri korekcii látok na vylučovaný kreatinín vyplýva výrazne štatisticky znížená hladina serínu/kreatinín ($P < 0,001$) a menej štatisticky znížené hladiny glycinu/kreatinín a alanínu/kreatinín ($P < 0,01$) v predoperačných vzorkách oproti pooperačným. Hladiny serínu a glycinu ($P < 0,05$) boli štatisticky nižšie u pacientov pred nefrektómiou v porovnaní s kontrolou zdravých. Ostatné študované parametre sú štatisticky nevýznamné ku karcinogénnemu procesu v obličke.

Tab. 1. Priemerné hodnoty (\pm štandardná odchylka) aminokyselín ($\mu\text{mol/l}$) u pacientov pred nefrektómiou štatisticky porovnané s parametrami pacientov 7 dní po nefrektómii a s parametrami kontrolnej skupiny zdravých ľudí.

Parameter	Pred oper. (PR.OP)	Po operácii (PO.OP)	Štat.význ. (PR.OP-PO.OP)	Zdraví (ZDR)	Štat.význ. (PR.OP-ZDR)
Glycín	591 \pm 290	710 \pm 338	P<0,05	758 \pm 349	P<0,01
Serín	444 \pm 248	501 \pm 227	n.s.	555 \pm 285	n.s.
Kys. glutámová	206 \pm 138	230 \pm 152	n.s.	134 \pm 68	P<0,01
Valín	162 \pm 108	170 \pm 101	n.s.	104 \pm 53	P<0,05
Leucín	81,2 \pm 42,2	76,4 \pm 36,0	n.s.	66 \pm 28	P<0,05

Z porovnania hodnôt glycínu a serínu kontrolnej skupiny zdravých ľudí s hodnotami pacientov pred nefrektómiou so štádiami karcinómu obličky I-III (obr.1) vyplýva, že v prípade glycínu ($P<0,05$) aj serínu (štatisticky nevýznamný) dochádza k poklesu hodnôt pri štádiách I a II u pacientov s karcinómom obličky v porovnaní s kontrolnou skupinou. Tento efekt sa zväčšuje oveľa viac pri štádiu III, kde hodnota glycínu klesá so štatistickou významnosťou $P<0,001$ a hodnota serínu klesá s $P<0,05$ v porovnaní s kontrolou. U pacientov po nefrektómii karcinómu obličky pri všetkých štádiách dochádza ku vzrastu hodnôt oboch látok na úroveň štatistickej nevýznamnosti v porovnaní s kontrolou.



Obr. 1. Priemerné hodnoty serínu a glycínu ($\mu\text{mol/l}$) zdravých dobrovoľníkov a pacientov s karcinómom obličky v štádiách I, II, III.

Podobný trend poklesu, respektíve nárastu hodnôt (aj po korekcii na kreatinín), či už so štatistickým alebo neštatistickým významom, nepozorujeme u žiadnych ďalších látok v závislosti od štádia nádoru.

Pri porovnávaní korelačných závislostí parametrov od pH medzi všetkými skupinami pozorujeme výrazný rozdiel v hodnotách korelačných koeficientov v predoperačnej skupine pacientov u glycínu ($P<0,01$), treonínu, serínu a alanínu ($P<0,05$), ktorých koncentrácie klesajú s pH prvého ranného moča, zatiaľ čo u pacientov po nefrektómii a kontrol naopak narastajú. Rovnaký charakter korelácií u týchto skupín, t.j. súbežný vzrast (alebo pokles) koncentrácie od pH prvého ranného moča sme pozorovali aj u kyseliny glutámovej a ornitínu, no s neštatistickou významnosťou.

Štatisticky významný rozdiel vo vzťahu ku karcinogénnemu procesu medzi skupinami pacientov (tab.1) bol zistený len pri vylučovaní glycínu (zníženie v predoperačnej vzorke). To potvrdzuje účasť glycínu na metabolizme rakovinových buniek, keďže jeho koncentrácia bola výrazne nižšia v moči pacientov pred nefrektómiou v porovnaní s pacientmi po odstránení nádoru a zdravými dobrovoľníkmi. To koreluje s poznatkom, že glycín je potrebný pre syntézu purínových báz za súčasnej vyššej syntézy nukleových kyselín v nádore. Podobne pozorujeme aj zníženie serínu v moči pacientov s karcinómom obličky no s neštatistickým významom. Glycín je obličkou vychytávaný, pričom môže byť navyše syntetizovaný zo serínu v prípade prítomnosti nádoru (Garibotto a kol., 1999). Naopak, štatisticky zvýšené hladiny kyseliny glutámovej, valínu a leucínu (tab.1) u pacientov pred nefrektómiou oproti zdravým vysvetľujú zníženú schopnosť tubulárnej reabsorpcie prostredníctvom ich transportérov vplyvom nádoru. Po korekcii vylučovania látok na kreatinín sa zvýraznil štatistický význam pre glycín, serín a alanín, kde sa ich koncentrácia znížila v predoperačných vzorkách oproti pooperačným. Zaujímavosťou je, že tieto hodnoty boli znížené aj bez prepočtu na kreatinín, aj keď v prípade serínu a alanínu neštatisticky, čo znamená, že hlavným faktorom zodpovedným za tieto zmeny je tu prítomnosť nádoru, ktorý ovplyvňuje vylučovanie kreatinínu, a nie renálna funkcia obličiek.

K zmenám vo vylučovaní glycínu a serínu následkom rakovinového procesu dochádza v závislosti od štádia nádoru, čo sme dokázali aj porovnaním s kontrolnou skupinou (obr.1). Zistili sme pokles týchto látok v moči so zvyšujúcim sa štádiom nádoru. To potvrdzuje fakt, že väčší počet nádorových buniek využíva viac glycínu pre syntézu nukleotidov, tým dochádza k jeho poklesu v moči. K poklesu serínu dochádza v stechiometrickom vzťahu k poklesu glycínu, pretože serín je využívaný na syntézu glycínu v prítomnosti nádoru (Garibotto a kol., 1999).

Korelačná analýza závislosti vylučovania metabolitov a aminokyselín od pH moču ukazuje na zmenu transportných mechanizmov následkom rakovinového procesu glycínu, serínu, treonínu, alanínu, kyseliny glutámovej a ornitínu. Zmeny sa prejavujú klesajúcou koncentráciou látok od narastajúceho pH moču, dochádza k zvýšenej reabsorpcii v skupine pacientov pred odstránením nádoru oproti kontrole a pacientom po nefrektómii, kde dochádza k zvýšeniu ich koncentrácie s pH prvého ranného moču, teda dochádza k zníženej reabsorpcii. Naša štúdia poukazuje na metabolické zmeny vyvolané karcinogénnym procesom, ktoré sa odrážajú v zmenách koncentracii vylučovaných látok.

POĎAKOVANIE

Téma sa riešila v rámci projektu VEGA 1/3369/06.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Garibotto G., Tessari P., Sacco P., Deferrari G. Amino acid metabolism, substrate availability and the control of protein dynamics in the human kidney. *J. Nephrol.* 1999; 12: 203-212

Horňák M. Včasná diagnostika nádorov urologickej lokalizácie. *Med. Monitor* 2003; 6: 12-14

John A.P. John Institute for cancer research: Kidney cancer 2005; <http://apjohncancerinstitute.org/kidneycancer.htm>

Kashyap M., Kumar A., Emelianenko N. Biochemical and molecular markers in renal cell carcinoma: An update and future prospects. *Biomarkers* 2005; 10(4): 258-294

VPLYV ZAHRIEVANIA MEDU NA OBSAH HYDROXYMETHYLFURFURALU

Kasperová J., Nagy J., Dičáková Z.

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

ABSTRAKT

5-hydroxymethylfurfural (HMF) je považovaný za dôležitý kvalitatívny parameter pre med a jeho maximálna hodnota je stanovená Potravinovým kódexom Slovenskej republiky (2004). Cieľom práce bolo sledovať zmeny obsahu HMF v mede po jeho zahrievaní a následnom skladovaní. Dva druhy medu kvetový a medovicový boli zahrievané vo vodnom kúpeli pri stabilnej teplote na 40, 50, 60, 70, 80, 95 °C po dobu 1, 5, 10, 15, 30, 60 a 90 minút. Následne bol med skladovaný pri izbovej teplote a sledovaný obsah HMF. Z výsledkov merania vyplýva, že obsah HMF v mede rastie úmerne s výškou použitej teploty a časom pôsobenia, pričom pri teplote 95 °C bol nárast od 50 % (1 minúta) do 607 % (90 minút). Pri teplote 40 °C bol nárast obsahu len nepatrný od 1,63 – 5,65 %, pri pôsobení teplôt 50 – 70 °C bol nárast od 4,01 až do 45,5 % a pri teplote 80 °C bol nárast niekoľkonásobne vyšší (až 152 %). U vzoriek medu medovicového bol pozorovaný vyšší nárast obsahu HMF; pri pôsobení teploty 95 °C 90 minút až 652 %, čo je dvojnásobok v porovnaní s kvetovým medom pri tých istých podmienkach. Pri skladovaní medu po tepelnom spracovaní dochádza k ďalšiemu zvyšovaniu obsahu HMF, a to v závislosti od dĺžky skladovania, výšky pôsobiacej teploty a dĺžky pôsobenia.

ÚVOD

Hydroxymethylfurfural (HMF) je látka, ktorá vzniká za určitých podmienok účinkom kyselín nachádzajúcich sa v mede na niektoré druhy cukrov. Zahrievaním medu sa tvorba HMF urýchľuje. Dlhodobým uskladnením medu pri nevhodnej teplote (napr. 30 °C) alebo zahriatím stúpa koncentrácia veľmi rýchlo. Z hygienického hľadiska zvýšený obsah HMF znamená, že ide o med horšej kvality, alebo dokonca falšovaný s prídavkom invertného cukru (Toporčák a kol., 1999). HMF je dôležitý a spoľahlivý indikátor zníženia kvality mnohých potravín, ktoré obsahujú cukry (Rattanathanalerk, 2005). HMF je dobre rozpustný vo vode a organických rozpúšťadlách. Za normálnej teploty je to pevná látka (bod topenia 31,5 °C), voňajúca po rumančeku. Stanovenie HMF v mede bolo zavedené začiatkom tohto storočia v súvislosti s prípadmi narušenia a falšovania medu lacným invertom pripravovaným obvykle kyslou hydrolýzou repného cukru (Boháček, 1994).

Obsah HMF sa zvyšuje postupne v kyslom roztoku medu vplyvom vysokej teploty a dĺžky skladovania. Viac sa však zvýši obsah HMF vplyvom vysokej teploty (White, 1992). Krátkodobý ohrev je menej škodlivý, ale HMF dosiahne vysoké hodnoty pri vysokej teplote alebo dlhšom čase (Tosi a kol., 2002).

Podľa Potravinového kódexu Slovenskej republiky (2004) má byť obsah HMF všeobecne okrem pekárskoho medu najviac 40 mg.kg⁻¹, medy s deklaroványm pôvodom z regiónov s tropickým podnebí a zmesi z takýchto druhov medov najviac 80 mg.kg⁻¹.

MATERIÁL A METODIKA

V experimentoch boli použité dva druhy medu – medovicový tekutý a kvetový skryštalizovaný s rozdielnym počiatočným obsahom HMF. Z každého druhu medu bolo navážené do vzorkovníc po 50 g medu. Tieto boli následne zahrievané vo vodnom kúpeli pri stabilnej teplote 40, 50, 60, 70, 80 a 95 °C po dobu 1, 5, 15, 30, 45, 60 a 90 minút. Následne boli tieto vzorky skladované pri izbovej teplote a vo vzorkách bol meraný obsah HMF ihneď po opracovaní, po 24 hodinách, 7 dňoch a 1 mesiaci skladovania.

Obsah hydroxymethylfurfuralu bol stanovovaný kvapalinovým chromatografom (HP 1050 S Hewlett Packard), pozostávajúci z kvartérnej pumpy, autosampléra, UV detektora Agilent 1500 a 3396 Integrátora. Vzorky boli pripravované podľa metódy IHC (HARMONIZED

METHOD OF THE INTERNATIONAL HONEY COMMISSION, 2002) a analyzované na kolóne Hypersil BDS 100x4 mm, 3µm, s úpravou v zložení mobilnej fázy, kde bola použitá zmes voda – acetonitril (90:10) a prietok 1 ml.min-1. Obsah HMF bol stanovený z hodnoty absorbancie vzorky pri 285 nm s použitím kalibračnej krivky zhotovenej zo štandardu HMF.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky hodnôt HMF vo vzorkách medu po zahrievaní a skladovaní sú uvedené v tabuľkách 1 - 6. Vo vzorkách medu došlo k zvýšeniu obsahu HMF vplyvom zahrievania v závislosti od výšky použitej teploty a času zahrievania. Bol pozorovaný postupný nárast hodnôt HMF v závislosti na použitej vyššej teplote a dĺžke zahrievania. Po 1 minúte zahrievania dochádza pri teplotách 40, 50, 60, 70 °C len k nepatrným zmenám ale pri teplote 80 °C dochádza k nárastu až o 50 % (1 minúta). Po 90 minútach zahrievania pri teplote 40 °C bol nárast HMF od 4 - 5,65 %. Pri teplotách 50, 60 a 70 °C sa obsah HMF zvýšil maximálne o 20 (med kvetový) až 45 % (med medovicový), ale už pri teplote 80 °C bol nárast HMF od 84 % (med kvetový) do 152 % (med medovicový) a pri teplote 95 °C bol nárast až o 307 % (med kvetový) a 652 % (med medovicový) oproti pôvodnej hodnote.

Pri následnom skladovaní medu pri izbovej teplote sa obsah HMF zvyšoval úmerne s časom skladovania a výškou použitej teploty. Najvyšší nárast nastal po mesiaci skladovania u vzoriek zahrievaných na 95 °C po dobu 90 minút, a to u medu kvetového o 31,8 % a u medu medovicového o 16,4 % v porovnaní s hodnotami nameranými ihneď po ohrievaní. Pričom v porovnaní s hodnotou vo vzorke medu, ktorá nebola zahrievaná došlo k nárastu až o 534,2 % (med kvetový) a 872,8 % (med medovicový). Pri skladovaní medu, ktorý nebol podrobený žiadnemu spracovaniu pri izbovej teplote nedochádza k výraznému zvýšeniu obsahu HMF. Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme usudzovať, že obsah nárast HMF je vyšší v mede medovicovom s nižším obsahom HMF. Nárast je zjavný hlavne od teplôt nad 70 °C. Pri následnom skladovaní medu po ohriatí dochádza k ďalšiemu zvyšovaniu obsahu HMF, a to v závislosti od dĺžky skladovania, to znamená, že čím je med dlhšie skladovaný, tým je jeho nárast HMF vyšší.

Turhan a kol., (2008) zistil, že pôsobenie teploty 90 °C po dobu 90 minút v kvetovom mede a 75 minút v medovicovom mede nespôsobuje signifikantné zvýšenie HMF a že tvorba HMF bola veľmi rozdielna v závislosti na pôvode medu. Ohe, ktorého cituje Boháček (1994) zisťoval zmeny obsahu HMF v mede repkovom, zmiešanom a medovicovom. Po 24 hodinách pri teplote 40 °C sa obsah HMF prakticky nezmenil, pri teplote 50 °C sa zvýšil o 20 - 50 % a pri teplote 60 °C bol nárast HMF o 200 - 370 % oproti pôvodnej hodnote.

Tab. 1. Zmeny obsahu HMF v mede po ohrievaní na 40 °C a skladovaní

40°C	Kvetový med				Medovicový med			
	ihneď	24 hod.	7 dní	1 mesiac	ihneď	24 hod.	7 dní	1 mesiac
bez zahriatia	20,57	20,58	20,49	20,65	13,46	13,53	13,48	13,5
1min.	21	22,42	22,44	22,57	13,68	11,77	14,38	15,53
5 min.	21,04	23,46	23,52	23,61	13,75	13,29	14,46	16,21
15 min.	21,09	23,76	23,95	23,58	13,84	14,04	16,24	16,39
30 min.	21,15	23,78	23,9	24,22	13,97	14,15	16,3	16,67
45 min.	21,25	25,23	25,54	26,14	14,05	14,83	16,59	16,83
60 min.	21,36	25,39	25,74	26,21	14,18	15,57	17,25	17,46
90 min.	21,39	26,95	26,98	30	14,22	16,17	17,56	18

Tab. 2. Zmeny obsahu HMF v mede po ohrievaní na 50 °C a skladovaní

	Kvetový med				Medovicový med			
50°C	ihneď	24 hod.	7 dní	1 mesiac	ihneď	24 hod.	7 dní	1 mesiac
bez zahriatia	20,57	20,58	20,49	20,65	13,46	13,53	13,48	13,5
1min.	22	22,05	22,33	22,36	14	14,84	15,46	17,19
5 min.	22,3	22,34	23,51	22,54	14,6	14,52	15,73	17,11
15 min.	22,8	22,89	23,69	22,85	15,2	15,8	16,02	21,17
30 min.	22,93	23,6	23,77	22,55	15,4	15,81	16,36	22,49
45 min.	23,16	24,09	25,03	25,21	15,6	16,36	16,77	23,02
60 min.	23,75	24,53	25,04	25,4	15,68	16,48	16,96	27,21
90 min.	23,87	26,13	23,51	31,1	16	16,96	17,31	29,39

Tab. 3. Zmeny obsahu HMF v mede po ohrievaní na 60 °C a skladovaní

	Kvetový med				Medovicový med			
60°C	ihneď	24 hod.	7 dní	1 mesiac	ihneď	24 hod.	7 dní	1 mesiac
bez zahriatia	20,57	20,58	20,49	20,65	13,46	13,53	13,48	13,5
1min.	22,65	23,39	23,83	26,31	14,2	14,72	16,62	18,43
5 min.	22,73	23,23	23,92	27,2	14,32	16,03	16,73	18,71
15 min.	22,85	23,23	23,32	28,13	14,46	16,49	16,99	19,32
30 min.	23,44	23,44	24,06	29,25	15,5	16,53	17,11	19,59
45 min.	23,5	23,55	23,98	31,62	16,6	17,36	17,18	22,06
60 min.	23,67	23,78	24,3	33,56	16,87	17,5	17,71	22,32
90 min.	24,7	24,92	25	36,08	17,4	19,06	19,36	23,2

Tab. 4. Zmeny obsahu HMF v mede po ohrievaní na 70 °C a skladovaní

	Kvetový med				Medovicový med			
70°C	ihneď	24 hod.	7 dní	1 mesiac	ihneď	24 hod.	7 dní	1 mesiac
bez zahriatia	20,57	20,58	20,49	20,65	13,46	13,53	13,48	13,5
1min.	22,32	22,48	22,47	23,27	15	15,52	15,72	21,89
5 min.	22,54	23,09	23,18	30,38	15,8	16,2	16,66	23,05
15 min.	22,9	23,39	24,32	30,3	16,4	16,76	16,8	24,24
30 min.	23,56	23,44	24,54	30,5	17,1	17,11	17,8	25,93
45 min.	23,78	23,84	24,52	33,72	17,5	17,53	18,61	26,53
60 min.	23,57	23,59	25,15	34,7	18,56	18,65	18,31	28,98
90 min.	24,76	24,82	25,92	36,56	19,56	19,05	18,5	29,58

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme usudzovať, že obsah HMF stúpa rýchlejšie v mede medovicovom aj napriek tomu, že na začiatku obsahoval nižšie koncentrácie HMF v porovnaní s kvetovým medom. Nárast hodnôt HMF je zjavný hlavne od teploty 70 °C. Pri

následnom skladovaní medu po ohriatí dochádza k ďalšiemu zvyšovaniu obsahu HMF, a to v závislosti od dĺžky skladovania.

Tab. 5. Zmeny obsahu HMF v mede po ohrievaní na 80 °C a skladovaní

80°C	Kvetový med				Medovicový med			
	ihneď	24 hod.	7 dní	1 mesiac	ihneď	24 hod.	7 dní	1 mesiac
bez zahriatia	20,57	20,58	20,49	20,65	13,46	13,53	13,48	13,5
1min.	30,5	32,96	32,49	32,54	20,4	22,81	24,09	25,42
5 min.	33,24	33,97	33,21	33,51	24,32	24,36	24,85	25,97
15 min.	34,92	34,27	38,79	38,82	25,34	25,31	25,43	26,04
30 min.	35,37	35,23	41,09	41,18	28,12	28,14	28,26	28,41
45 min.	36,34	36,51	41,32	41,38	28,52	28,54	28,63	28,69
60 min.	37,93	38,05	41,58	41,65	30,83	31,08	31,52	31,66
90 min.	37,97	38,68	45,22	45,33	33,96	34,32	35,07	34,99

Tab. 6. Zmeny obsahu HMF v mede po ohrievaní na 95 °C a skladovaní

95°C	Kvetový med				Medovicový med			
	ihneď	24 hod.	7 dní	1 mesiac	ihneď	24 hod.	7 dní	1 mesiac
bez zahriatia	20,57	20,58	20,49	20,65	13,46	13,53	13,48	13,5
1min.	31,35	30,18	32,51	33,76	24,6	25,11	25,14	31,15
5 min.	33,56	28,35	33,98	35,28	25,34	26,23	24,49	30,2
15 min.	34,97	34	35,3	38,72	26,28	29,82	28,61	33,7
30 min.	36,82	37,25	39,53	41,59	35,52	31,57	35,89	46
45 min.	51,63	50,42	62,24	67,84	40,16	54,92	56,26	64,76
60 min.	55,71	56,26	68,45	75,31	59,1	67,57	72,74	77,84
90 min.	83,72	87,12	107,5	150,32	101,24	110,6	111,34	117,83

POĎAKOVANIE

Spracovanie príspevku bolo podporené grantom VEGA MŠ SR č. 1/3499/06.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Boháček L.: HMF – významný parameter kvality medu. Včelár. L 18. 1994; 10: 52-53.
- Potravinový kódex Slovenskej republiky, č. 1188/2004-100, výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky, tretia časť, hlava IX upravujúca med.
- Rattanathalerk M., Chlewchan N., Srichumpoung W.: Effect of thermal processing on the duality loss of pineapple juice. Journal of Food Engineering. 66. 2005; 259-265.
- Toporčák J. a kol. Zdravotné včelárske vademecum. Štátna veterinárna správa Slovenskej republiky Bratislava. 1999.
- Tosi E., Ciapini M., Ré E., Lucero H. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content,. Food Chemistry. 2002; 77: 71-74.
- Turhan I., Tetik N., Karhan M., Gurel F., Tavukcuoglu R. H. Quality of honeys influenced by thermal treatment. LWT. 41. 2008; 1396-1399.
- White J. W. Honey. Advanced in food research. 24. 1992; 287-374

VPLYV DENZITY DIVIAČEJ POPULÁCIE NA VÝSKYT JEJ NAJČASTEJŠÍCH PARAZITÓZ

Kiš O., Ciberej J., Oberhauserová K., Maľová J.

Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach

ABSTRAKT

Denzita diviačej populácie je jedným z najvýznamnejších faktorov vplývajúcich na rozširovanie infekčných ale aj parazitárnych ochorení diviačej zveri. Nakoľko parazitárne infekcie často znižujú kondičný stav a oslabujú imunitný systém jedinca, majú veľký význam v patogenéze rôznych ochorení diviakov (najmä klasický mor ošípaných – KMO). Cieľom práce bolo porovnať prevalenciu najčastejších parazitóz diviačej zveri v oblastiach s rôznou denzitou jej populácie. V priebehu rokov 2007 – 2009 bolo vyšetrených 102 vzoriek pľúc a trusu z diviakov ulovených vo voľných poľovných revíroch oblastí s rôznou hustotou diviačej zveri. 60 vzoriek pochádzalo z okresov Rimavská Sobota, Poltár, Lučenec, Zvolen a Levice, patriacich do infikovanej oblasti vzhľadom k výskytu KMO. Z okresov, ktoré nepatria do infikovanej oblasti (Košice, Prešov, Humenné, Vranov Nad Topľov, Trebišov) sa získalo 42 vzoriek. Na základe helmintologickej pitvy pľúc a koprologického vyšetrenia trusu sa porovnával parazitostatus u diviačej zveri v jednotlivých oblastiach. Zistili sa vyššie hodnoty maximálnej intenzity infekcie pľúcnych nematódov rodu *Metastrongylus* vo vzorkách z oblastí z vyššou hustotou diviačej zveri. Koprologicky sa v týchto vzorkách našli vajíčka parazitov rodu: *Metastrongylus sp.* (100%), *Eimeria sp.* (81,1%), *Oesophagostomum sp.* (17,9%), druhov: *Ascaris suum* (5%) a *Trichuris suis* (3%). V oblastiach s nižšou denzitou diviačej populácie sa vyskytovali len rody: *Metastrongylus sp.* (91,2%), *Eimeria sp.* (67,4%) a *Oesophagostomum sp.* (9,6%).

ÚVOD

Diviak lesný (*Sus scrofa L.*) je stálym autochtóнным druhom fauny Slovenska a súčasne aj hospodársky významnou a poľovnícky veľmi atraktívnou zverou. V súčasnosti je rozšírená na celom území Slovenska. Najmenej jej je v otvorenej nížinnej poľnohospodárskej krajine juhozápadného a juhovýchodného Slovenska, kde sa zdržuje len vo vegetačnom období. Najvyššiu hustotu dosahuje u nás v pásme listnatých a zmiešaných lesov, ktoré sa tiahnu v západnej a strednej časti Slovenska medzi odlesnenou krajinou na juhu a ihličnatými, prevažne smrekovými, lesnými komplexmi na severe. V bučinách východného Slovenska je jej populačná hustota nižšia (Wolf, 1994; Hell a kol., 2005).

Diviak je veľmi prispôsobivý živočích so značnou ekologickou valenciou, to znamená, že sa dokáže úspešne vyrovnávať so zmenami jeho životného prostredia (Wolf, 1994). Je však známe, že diviacia zver najmä pri premnožení často hynie na infekčné choroby a trpí na rôzne parazitózy. Súvisí to aj s veľmi vyhraneným spoločenským, čriedovým spôsobom života, ako aj s tým, že obľubuje vlhké a bahnité miesta, kde sú dobré podmienky pre vývoj a životaschopnosť vývinových štádií parazitov alebo ich medzihostiteľov. Najviac citlivé na mnohé ochorenia sú najmä diviačatá, u ktorých môže dochádzať ku zníženiu prírastkov až k vysokej morbidite a mortalite (Hell a kol., 2005).

Najvýznamnejším ochorením diviačej zveri je klasický mor ošípaných (KMO). KMO je vírusového pôvodu, charakteristický vysokou mortalitou a možným zanesením do domácich chovov ošípaných (Hell a kol., 2005). Vývoj nákazovej situácie vo výskyte KMO na našom území ale aj v okolitých európskych krajinách poukazuje, že diviacia zver je trvalým zdrojom a rezervoárom vírusu v prostredí.

Na rozširovanie KMO u diviačej zveri vplýva najmä vysoká denzita a nežiaduce zmladzovanie diviačej populácie. Ďalšími faktormi sú imunitný a kondičný stav jedincov, ktoré môžu byť znižované vplyvom ochorení rôznej etiológie, najmä parazitóz. Medzi najčastejšie patrí metastrongylóza, spôsobená pľúcnyimi nematódami rodu *Metastrongylus*.

Vyznačuje sa vysokou prevalenciou, intenzitou invázie, klinickými príznakmi (najmä u mladých jedincov), nízkymi prírastkami, poruchami presrst'ovania, oslabením imunitného systému ale aj mortalitou.

MATERIÁL A METODIKA

Biologický materiál na vyšetrenia (pľúca s tracheou a vzorka trusu z rekta) bol získavaný v priebehu rokov 2007-2009 z pravidelného odstrelu diviačej zveri v dobe lovu podľa vyhlášky MPVŽ SSR č.172/75 Zb., v znení vyhlášky č. 231/97 Z. z. a č. 230/2001 Z. z. o ochrane a o čase, spôsobe a podmienkach lovu niektorých druhov zveri a podľa schváleného plánu lovu pre jednotlivé roky. Celkovo sa získalo 102 vzoriek, pričom 60 pochádzalo z diviakov ulovených v oblastiach s vysokou denzitou diviačej populácie (v okresoch patriacich do infikovanej oblasti vzhľadom ku KMO). Z okresov mimo infikovanej oblasti (oblasti s nižšou hustotou diviačej zveri) sa získalo 42 vzoriek.

Biologický materiál bol odoberaný priamo, užívateľmi poľovného revíru, zo spoločných ako aj individuálnych poľovačiek. Nakoľko najviac postihnutou skupinou sú diviačatá, vyšetované boli len vzorky z juvenilných jedincov (do 1 roka). Po vykonaní veľkého vývrhu boli pľúca a trachea oddelené od okolitého tkaniva a orgánov, uložené do silonových sáčkov a opatrené štítkom s údajmi: druh zveri, dátum odstrelu, vek, pohlavie, poradové číslo vzorky. V niektorých prípadoch boli pľúca zmrazované za účelom skladovania a neskoršej prepravy. Z príslušného jedinca bola priamo z rekta odobratá vzorka trusu.

Jednotlivé pľúcne laloky boli vyšetrené na prítomnosť pľúcnych červov rodu *Metastrongylus* neúplnou helmintologickou pitvou podľa Skrjabina nasledovne: pľúca sa rozstrihali podľa lalokov a oddelila sa trachea. Laloky boli rozstrihané po bronchoch a bronchioloch a parazity sa povyberali, premyli vo fyziologickom roztoku a preniesli pomocou preparačnej ihly do vopred pripravených a označených skúmaviek, kde boli fixované roztokom Barbagalu. Vzorky trusu boli vyšetrené koprologicky, konkrétne flotačnou metódou podľa Brezu (Laciak, 1987; Jurášek, Dubinský a kol., 1993).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky helmintologickej pitvy pľúc poukazujú na 100% prevalenciu pľúcnych červov rodu *Metastrongylus* vo vzorkách z oboch sledovaných oblastí (tabuľky 1 a 2). Rozdiel bol zaznamenaný v hodnotách intenzity infekcie (II). Kým v okresoch s vyššou hustotou diviačej zveri bola maximálna intenzita infekcie až 1033 exemplárov, v druhej skupine sa zistilo maximálne 302 metastrongylov. Ak je denzita diviačej populácie vysoká, dochádza k vylučovaniu vyššieho počtu vajíčok do prostredia a tým rastie riziko infekcie. Stupeň invadovanosti diviakov je ovplyvňovaný aj celým radom ekologických faktorov, ako sú : geografické, geomorfologické, klimatické a trofické podmienky biotopu, s ktorými priamo súvisí aj výskyt medzihostiteľov (dážďoviek). Vysoko úrodná, prekysličená, poľnohospodársky využívaná pôda a vlhké, bahnité miesta, ktoré diviačia zver obľubuje, vytvárajú vhodné podmienky pre prežívanie jednak vajíčok metastrongylov ale aj ich medzihostiteľov. K rozširovaniu parazitárnych ochorení prispieva aj nežiadúce zmladzovanie diviačej populácie, ktoré narúša jej sociálnu a vekovú štruktúru.

Vo vzorkách z infikovaných oblastí sa zistili nasledovné druhy metastrongylov: *Metastrongylus pudendotectus* (100%), *M. elongatus* (100%), *M. salmi* (87,6%), *M. confusus* (0,7%). V oblastiach s nižšou hustotou diviačej zveri bola prevalencia *M. salmi* len 39,4% a druh *M. confusus* sa vo vzorkách nenašiel (tabuľky 1 a 2).

Tab. 1. Prevalencia a intenzita infekcie pľúcnych nematódou rodu *Metastrongylus* vo vzorkách z oblastí s vysokou denzitou diviacej populácie (tvoriace infikovanú oblasť)

Okresy	Počet vzoriek	Počet pozitívnych	II (min - max)	M. pudendotectus	M. elongatus	M. salmi	M. confusus
Rimavská Sobota	30	30	115 - 1033	100%	100%	100%	3,3%
Poltár	12	12	103 - 705	100%	100%	66,7%	0%
Lučenec	7	7	225 - 437	100%	100%	71,4%	0%
Zvolen	6	6	93 - 887	100%	100%	100%	0%
Levice	5	5	179 - 623	100%	100%	100%	0%
Celkovo	60	60	93 - 1033	100%	100%	87,6%	0,7%

Tab. 2. Prevalencia a intenzita infekcie metastrongylov vo vzorkách z oblastí s nižšou hustotou diviacej zveri (okresy východného Slovenska)

Okresy	Počet vzoriek	Počet pozitívnych	II (min - max)	M. pudendotectus	M. elongatus	M. salmi	M. confusus
Košice	16	16	55 - 252	100%	100%	43,7%	0%
Prešov	12	12	101 - 302	100%	100%	33,3%	0%
Humenné	4	4	43 - 117	100%	100%	0%	0%
Vranov nad Topľou	5	5	93 - 269	100%	100%	80%	0%
Trebišov	5	5	73 - 257	100%	100%	40%	0%
Celkovo	42	42	43 - 302	100%	100%	39,4%	0%

Tab. 3. Prevalencia najčastejších parazitóz diviacej zveri stanovená koprologicky

Okresy	<i>Metastrongylus</i> sp.	<i>Eimeria</i> sp.	<i>Oesophagostomum</i> sp.	<i>Ascaris suum</i>	<i>Trichuris suis</i>
Rimavská Sobota	100%	73,3%	30%	16,7%	6,7%
Poltár	100%	66,7%	25%	8,3%	8,3%
Lučenec	100%	85,7%	14,3%	0%	0%
Zvolen	100%	100%	0%	0%	0%
Levice	100%	80%	20%	0%	0%
Celkovo	100%	81,1%	17,9%	5%	3%

Tab. 4. Prevalencia najčastejších parazitóz diviačej zveri stanovená koprologicky

Okresy	<i>Metastrongylus</i> sp.	<i>Eimeria</i> sp.	<i>Oesophagostomum</i> sp.	<i>Ascaris suum</i>	<i>Trichuris suis</i>
Košice	81,2%	43,7%	31,2%	0%	0%
Prešov	75%	58,3%	16,7%	0%	0%
Humenné	100%	75%	0%	0%	0%
Vranov nad Topľou	100%	60%	0%	0%	0%
Trebišov	100%	100%	0%	0%	0%
Celkovo	91,2%	67,4%	9,6%	0%	0%

Koprologickým vyšetrením trusu sa zistilo rozdielne zastúpenie parazitov vo vzorkách (tabuľky 3 a 4). V okresoch s vysokou hustotou diviačej zveri sa vyskytovali: *Metastrongylus* sp. (100%), *Eimeria* sp. (81,1%), *Oesophagostomum* sp. (17,9%), *Ascaris suum* (5%) a *Trichuris suis* (3%). Vzorky z okresov východného Slovenska boli pozitívne na: *Metastrongylus* sp. (91,2%), *Eimeria* sp. (67,4%) a *Oesophagostomum* sp. (9,6%). Prítomnosť vajíčok *A. suum* a *T. suis* sa nepotvrdila. *A. suum* sa na území SR vyskytuje skôr v domácich chovoch ošípaných ako u diviakov. Trichurióza je rozšírená kozmopolitne. Na území SR uvádzajú Hovorka a kol. (1993) 15,5% prevalenciu.

Výsledky parazitologických vyšetrení poukazujú na možný vplyv denzity diviačej populácie na jej parazitostatus. Vo vzorkách z oblastí s vysokou hustotou diviačej zveri sa zistili vyššie percentá celkovej prevalencie parazitov ako aj vyššie hodnoty intenzity infekcie. Koprologicky sa potvrdila prítomnosť vajíčok viacerých druhov parazitov ako vo vzorkách z vybraných okresov východného Slovenska. Je dôležité si uvedomiť že tak denzita ako aj parazitárne ochorenia značne ovplyvňujú šírenie a patogenitu vírusu KMO u diviačej zveri. Doterajší poľovnícky tlak na jej populáciu reprezentovaný odstrelom sa z pohľadu vývoja početných stavov prejavuje ako málo efektívny. Hlavným nedostatkom v tomto smere je predovšetkým nedocenený odstrel diviačat, čo okrem epizootologických rizík narúša jej sociálnu, vekovú a sexuálnu štruktúru (Chramazda a kol., 2008). Plán lovu by sa mal zostavovať tak, aby diviačatá tvorili okolo 75% ulovených jedincov. Teda najmä kontrolovaný lov a zodpovedný selektívny odstrel prispievajú k regulácii početnosti a vekovej skladby diviačej populácie.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom VEGA 1/ 4395 / 07.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Hell, P., Gašparik, J., Slamečka, J.: Diviačia zver: bilógia, chov a lov. PaRPRESS Bratislava, 2005, 177 s.
- Hovorka, I., Hovorka, J., Mituch, J.: Helminths of wild boar in the Tatra Mts. National Park. Folia venatoria, 1993, 23, p. 69 – 78.
- Chramazda, V., Garaj, P., Lebocký, T., Sokol, J., Rajský, D.: Poľovnícke obhospodarovanie diviačej zveri. Slovenský veterinársky časopis, 2008, 33, 1, s. 42 – 45.
- Jurášek, V., Dubinský, P. A Kol.: Veterinárna parazitológia. Príroda, a.s., Bratislava, 1993, 382s.
- Laciak, V.: *Metastrongylus confusus* vo svetle morfolologickej a fyziologickej analýzy. Kandidácka práca, Košice: HELÚ SAV, VŠV, 1987, 173s.
- Wolf, R.: Ekologie a etologie černej zvěře. Diviačia zver-súčasný stav, aktuálna zdravotná situácia, perspektívy chovu na Slovensku. Zbor. z konf., ŠVS SR, 1994, s. 17-26.

PRVÉ SKÚSENOSTI SO SURVEILLANCE MODRÉHO JAZYKA NA FARME HOVÄDZIEHO DOBYTKA A OVIEC

Lacková Z.¹, Bireš J.¹, Kočišová A.²

¹*Klinika prežúvavcov, UVL Košice*

²*Ústav parazitológie, UVL Košice*

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo získať primárne informácie o nálezovej situácii choroby modrého jazyka na Slovensku, sledovať výskyt pakomárikov, posúdiť ich úlohu ako vektora a sledovať potenciálny výskyt nákazy u prežúvavcov. Surveillance BT sa realizoval v období od mája 2008 do novembra 2008. Entomologické sledovanie pozostávalo z odchyty pakomárikov a ich zatriedenia podľa charakteristických znakov. Klinické vyšetrenie sa u zvierat robilo na základe bežnej obhliadky zvierat. Z hematologických a biochemických parametrov sme sledovali hodnoty hemoglobínu, erytrocytov, hematokritu, leukocytov, diferenciálneho krvného obrazu, aktivitu enzýmov, koncentráciu celkového bilirubínu, celkových bielkovín, albumínu, kreatinínu, celkových imunoglobulínov, močoviny, kyseliny beta-hydroxymaslovej, neesterifikovaných mastných kyselín, Ca, P, Fe, Cu, Zn. Vyšetrenie prítomnosti protilátok proti vírusu BT (vp 7 proteín) prebiehalo metódou ELISA. Potvrdili sme prítomnosť zástupcov pakomárikov rodu *Culicoides*, ktoré sú považované za vektorov BT, pričom dominuje Komplex *Obsoletus*. 61,1% odchytených pakomárikov na farme oviec a 90,1% na farme dojníc patrí do skupiny pakomárikov nepodielajúcich sa na prenose vírusu BT. Najvyšší počet pakomárikov bolo odchytených v druhej polovici júna a začiatkom júla, čomu zodpovedajú priaznivé klimatické podmienky. Pri klinickom a laboratórnom sledovaní neboli pozorované klinické symptómy resp. biochemické ukazovatele, ktoré by mali bezprostredný vzťah ku chorobe modrého jazyka. Diagnostikované odchýlky poukazovali na narušenie celkového metabolizmu v súvislosti s výskytom iných chorôb.

ÚVOD

Modrý jazyk – bluetongue je transmisívna orbivírusová choroba oviec a ostatných domácich a voľne žijúcich prežúvavcov. U HD a kôz ochorenie prebieha najčastejšie bez zjavných klinických symptómov, preto sú často významným zdrojom šírenia nákazy. Ochorenie okrem zdravotných a ekonomických strát obmedzuje národné a medzinárodné obchodovanie so živými zvieratami a ich produktmi. Pri opatrenia pri výskyte BT sa postupovalo na základe národnej, európskej a OIE legislatívy. Na Slovensku pri surveillance BT sa u domácich prežúvavcov doposiaľ nepotvrdila prítomnosť pôvodcu nákazy (Bireš a i., 2008, 2009a,b).

MATERIÁL A METODIKA

Surveillance modrého jazyka sa realizoval v období od mája 2008 do novembra 2008 na farme dojníc v Zemplínskej Teplici (202 m n. m.) a farme oviec v Poproči (356 m n. m.).

Entomologický prieskum sa zabezpečoval odchyty pakomárikov týždenne pomocou lapača hmyzu (model JW1212), ktorý bol inštalovaný v deň odchyty medzi 17. až 18. hodinou a odoberaný nasledujúci deň medzi 5. až 6. hodinou ráno. Samotný zber hmyzu prebiehal do plastovej nádoby podľa návodu výrobcu. Spracovanie vzoriek a samotná diagnostika bola robená na Ústave parazitológie UVL, metódou podľa Goffredo a Meiswinkel (2004), na druhové určovanie sa použil kľúč podľa Rawlings (1996).

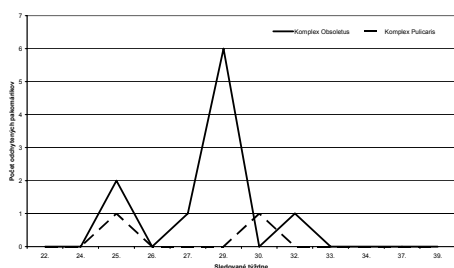
Klinické vyšetrenie hovädzieho dobytká a oviec sa robilo v mesačných intervaloch na základe bežnej obhliadky zvierat (klinická obhliadka stáda, klinické vyšetrenie chorých zvierat) a údajov privátneho veterinárneho lekára a chovateľa.

Laboratórne vyšetrenie sa realizovalo v mesačných intervaloch od 15 kusov hovädzieho dobytká (vysoko teľné jalovice, čiernostrakatý dobytok) a 15 kusov oviec (10 jariet, 5 plemenných baranov, merino). Z hematologických a biochemických parametrov sme

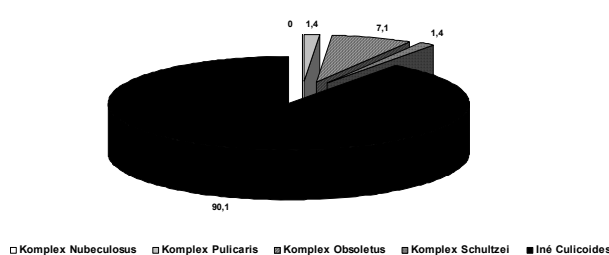
sledovali hodnoty Hb, Er, Htk, Le, diferenciálneho krvného obrazu, aktivitu enzýmov, koncentráciu celkového bilirubínu, celkových bielkovín, albumínu, kreatinínu, celkových imunoglobulínov, močoviny, kyseliny beta-hydroxymaslovej, NEMK, Ca, P, Fe, Cu, Zn. Vyšetrenie na protilátky proti vírusu BT (vp 7 proteín) prebiehalo v referenčnom laboratóriu Štátneho veterinárneho ústavu vo Zvolene ELISA metódou (ID VET Kit for detection of anti-VP7 antibodies by competitive ELISA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na farme Poproč bolo odchytených celkove 9754 pakomárikov (25,4 % Komplex Obsoletus, 10,8 % Komplex Pulicaris, 2,6 % Komplex Schultzei a 0,1 % Komplex Nubeculosus, 61,1 % tzv. „iné“ pakomáriky - *Culicoides* spp.)(obr.1). Najviac potencionalných vektorov – pakomárikov bolo odchytených v 25.-26. týždni, t.j. 18.-30. júna (graf 1).

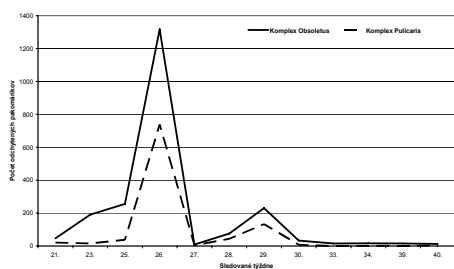


Graf 1. Sezónna dynamika pakomárikov na farme Zemplínska Teplica

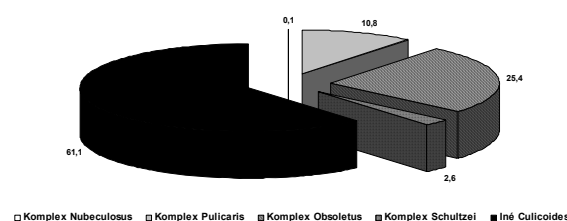


Obr. 1. Druhovú skladbu pakomárikov na farme Zemplínska Teplica

Na farme Zemplínska Teplica bolo odchytených len 141 ks pakomárikov (0 % Komplex Nubeculosus, 1,4 % Komplex Pulicaris, 1,4 % Komplex Schultzei, 7,1 % Komplex Obsoletus)(obr.2). Predpokladáme, že vrchol sezóny sa pohyboval v 25.-29. týždni odchyty, t.j. 16.6.-15.7.2008, avšak tieto zistenia nie sú vzhľadom na nízky počet odchytených pakomárikov relevantné (graf 2). To bolo pravdepodobne ovplyvnené samotným umiestnením lapača a možného negatívneho pôsobenia vzdušných vírov a prievanov. Neprítomnosť vektora sme na oboch farmách sme pozorovali na prelome septembra a októbra.



Graf 2. Sezónna dynamika pakomárikov na farme Poproč



Obr. 2. Druhovú skladbu pakomárikov na farme Poproč

Pri klinickom sledovaní hovädzieho dobytku a oviec sme nepozorovali klinické symptómy charakteristické pre zhubnú katarálnu horúčku. Klinické zmeny súviseli u dojnic s popôrodným obdobím (mastitída, metritída, syndróm uľahnutia, syndróm negatívnej energetickej bilancie, syndróm stučnenia, acidózy, atď.). U oviec sme z iných chorôb diagnostikovali chronické endo a ektoparazitózy, nákazlivú krívačku, mušec a mastitída. Výsledky biochemických vyšetrení sú uvedené v tabuľkách vo forme priemerných hodnôt (x) a smerodajnej odchýlky (sd). U dojnic sme zistili nárast NEMK pri 5. odbere (čo je viazané na popôrodné obdobie), CBI a CIg pri 4. a 5. odbere, sideropéniu pri 4. a 5. odbere,

hypokuprémia a hypozinkémia v priebehu celého sledovania (tab. 1). U oviec sme zistili nárast sérovej aktivity CPK a Clg pri 5. odbere a pokles kreatinínu pri všetkých odberoch a v priebehu celého pozorovania okrajová hypozinkémia a hypokuprémia (tab.2). Pri sérologickom vyšetrení sme nezistili prítomnosť protilátok voči vírusu modrého jazyka. Na základe negatívnych sérologických výsledkov sme nepokračovali vo virologickom vyšetrení.

Mesiac odberu		NEMK mmol/l	CBi μmol/l	Clg UZST	Fe μmol/l	Cu μmol/l	Zn μmol/l
RH		0,10 - 0,35	do 5,13	18-26	21,5 - 32,7	12,6 - 18,9	12,2 - 30,0
Máj n=15	x	5,053	5,053	25,23	27,17	9,087	11,25
	sd	1,085	1,085	4,558	3,468	2,542	2,269
Jún n=15	x	5,397	5,397	30,41	25,69	8,473	10,09
	sd	1,583	1,583	3,064	4,680	1,123	1,250
Júl n=15	x	5,491	5,491	27,23	23,51	9,333	12,60
	sd	2,967	2,967	5,032	4,304	0,748	3,053
August n=15	x	9,903	9,903	30,25	20,01	9,553	9,733
	sd	4,462	4,462	4,654	2,572	1,803	1,406
September n=15	x	8,165	8,165	30,84	18,80	11,27	9,867
	sd	3,461	3,461	5,074	4,487	1,892	0,6976

Tab. 1. Výsledky biochemických vyšetrení u dojníc

Mesiac odberu		CPK μkat/l	Clg UZST	Kreatinín μmol/l	Cu μmol/l	Zn μmol/l
RH		do 5,83	18-26	108 - 168	10 - 19	12,1 - 24,0
Máj n=15	x	4,385	31,33	98,33	10,65	11,01
	sd	1,399	4,793	19,42	1,709	2,327
Jún n=15	x	3,569	38,13	85,07	9,953	10,96
	sd	0,6545	3,206	11,30	1,881	1,310
Júl n=15	x	4,347	27,55	93,60	9,433	17,33
	sd	1,732	6,017	15,58	0,9147	2,659
August n=15	x	3,647	26,10	98,09	10,28	12,19
	sd	0,876	6,040	14,90	2,059	1,855
September n=15	x	4,871	29,49	104,9	12,87	11,42
	sd	1,500	6,009	15,87	1,234	1,856

Tab. 2. Výsledky biochemických vyšetrení u oviec

Doterajšie výsledky potvrdzujú prítomnosť zástupcov pakomárikov rodu *Culicoides* považovaných za vektorov choroby modrého jazyka, pričom dominuje Komplex *Obsoletus*. 61,1% odchytených pakomárikov na farme oviec a 90,1% na farme dojníc patrí do skupiny, ktoré sa podľa Goffredo, M. a Meiswinkel, R., (2004) nepodieľajú na prenose vírusu BT. Najvyšší počet pakomárikov bolo odchytených v druhej polovici júna a začiatkom júla, čomu zodpovedali priaznivé klimatické podmienky pre aktivitu pakomárikov od mája do septembra a pri predpokladanom globálnom otepľovaní je možné očakávať predlžovanie transmisívnej sezóny vektora aj na Slovensku.

Pri klinickom vyšetrení hovädzieho dobytku a oviec sme nediagnostikovali symptómy choroby modrého jazyka (Backx a i., 2007). V prípade výskytu klinickej manifestácie, tieto boli u hovädzieho dobytku viazané väčšinou na produkčné choroby v popôrodnom období a nedostatky vo výžive a u oviec na chronické parazitózy a nedostatky vo výžive. Vzhľadom na výskyt vektorov vírusu BT na oboch sledovaných farmách sa potvrdila potreba

klinického sledovania zvierat v chovateľských podmienkach ako neodmysliteľná súčasť surveillance choroby modrého jazyka v rámci včasnej diagnostiky, čo je aj v súlade so Smernicou Rady č. 2000/75/ES stanovujúcou špecifické ustanovenia pre kontrolu a likvidáciu katarálnej horúčky oviec- modrého jazyka a kódexom zdravia OIE pre suchozemské zvieratá (2004).

Pri laboratórnej analýze neboli pozorované zmeny charakteristické pre chorobu modrého jazyka. Diagnostikované odchýlky poukazovali na narušenie celkového metabolizmu v súvislosti s výskytom iných chorôb (produkčné choroby, parazitózy, nedostatky vo výžive, atď.). Vyšetrované biochemické markery odrážajú narušenie orgánových systémov postihnutých v priebehu infekcie vírusom BT, preto je potrebná ich diagnostika pre posúdenie celkového stavu infikovaných zvierat alebo v rámci včasnej diagnostiky.

Pri sérologickom vyšetrení nebola potvrdená počas celého sledovania prítomnosť protilátok voči žiadnemu sérotypu vírusu BT u hovädzieho dobytku a oviec. Z dôvodu prítomnosti pakomárikov na obidvoch farmách v transmisívnej sezóne je opodstatnené zabezpečiť kontinuálne sérologické analýzy zvierat ako neodmysliteľný prvok surveillance choroby modrého jazyka. Virologické vyšetrenia zvierat resp. vektora sa odporúča využiť len v prípade podozrenia na nákazu (prítomnosť protilátok, klinické príznaky, biochemické zmeny poukazujúce na infekciu vírusom modrého jazyka alebo v prípade presunu zvierat z oblastí s výskytom BT u domácich a voľne žijúcich prežúvavcov).

POĎAKOVANIE

Práca vznikla za podpory projektu AV 4/2041/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Backx A., Heutink R.G., Van Rooj E.M.A., Van Rijn P.A. Clinical signs of bluetongue virus serotype 8 infection in sheep and goats. *Veterinary Record*. 2007; 161:1-3.
- Bíreš J., Kočišová A., Mojžiš M., Pliešovský M., Petrovič, V. Surveillance of Bluetongue Virus in Domestic Ruminants in Territory of the Slovakia. Draft of Research Program. Magyar Allatorvosok Lapja. Supplement II. Oral and Poster Abstract- XXV World Buiatrics Congress. Budapest. Hungary. 2008; 130:94.
- Bíreš J., Lacková Z., Kočišová A., Mandelík R., Mojžiš M. Surveillance of febris catarrhalis ovium on sheep farm. 10th Jubilee Middle European Buiatrics Congress Košice. *Folia Veterinaria Supplementum II*. 3-6 June 2009 a; 221-225.
- Bíreš J., Lacková Z., Lešková L., Kočišová A., Vasil' M., Tinák M. Surveillance of blue tongue on dairy cattle farm. 10th Jubilee Middle European Buiatrics Congress Košice. *Folia Veterinaria Supplementum II*. 3-6 June 2009 b; 225-229.
- Goffredo M., Meiswinkel R. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Vet. Ital.* 2004; 40:260-265.
- Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, bird and bees). Chapter 2.1.9. Fifth Edition. 2004; OIE. Paris. 195-210.
- Rawlings P. A key, based on wing patterns of biting midges (genus *Culicoides* Latreille – Diptera: Ceratopogonidae) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies. *Graellsia*. 1996; 52:57-71.
- Smernica Rady č. 2000/75/ES z 20. novembra 2000 stanovujúca špecifické ustanovenia pre kontrolu a likvidáciu katarálnej horúčky oviec – modrého jazyka (Úradný vestník Európskych spoločenstiev L327, 22.12.2000, s. 74-83).

POROVNANIE FERMENTAČNÝCH A HYDROLYTICKÝCH AKTIVÍT VO FÉCES KOŇOVITÝCH A ŠIMPANZOV

Laho T.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Táto štúdia je zameraná na porovnanie fermentačnej kapacity féces a hydrolytickej aktivity protozoálnej frakcie vo féces u koňovitých zvierat – kôň Przewalský (*Equus ferus przewalskii*), somár ázijský (*Equus hemionus kulan*), zebra Chapmanova (*Equus quagga chapmanni*) a šimpanzov (*Pan troglodytes*) v podmienkach *in vitro*. Ako fermentačné substráty sme použili amorfnú celulózu (AC), lúčne seno (LS), pšeničnú slamu (PS), jačmenný šrot (JŠ) a xylan (XYL). Merali sme objem vyprodukovaného plynu, koncentráciu unikavých mastných kyselín (UMK) a stráviteľnosť substrátov (IVDMD) po 72 hod fermentácie. Zistili sme významné rozdiely medzi zvieratami v produkcii jednotlivých UMK, IVDMD a produkcii plynov ($P < 0,001$). Najlepšie boli fermentované XYL a JŠ substráty. PS a AC boli najhoršie fermentovateľné až nedegradovateľné substráty pre všetky druhy zvierat. Rozdiely vo fermentácii substrátov pripisujeme rozdielnemu zloženiu črevnej populácie. Hydrolytické aktivity sme stanovovali vo fekálnej protozoálnej frakcii šimpanzov a zebier. Na meranie aktivity karboxymetylcelulázy, xylanázy, α -amylázy a fruktanázy sme použili tieto substráty karboxymetylcelulózu, xylan, škrob a inulín. Šimpanzia protozoálna fekálna frakcia obsahovala iba jeden druh ciliát, *Troglodytella abrassarti*. V zebrej frakcii sa nachádzala zmesná protozoálna populácia typická pre čel'ad' koňovitých. Všetky sledované enzymatické aktivity boli pozitívne v zebrej frakcii, na rozdiel od šimpanza, kde fruktanázová aktivita nebola detekovaná. Výsledky ukázali, že fekálna protozoálna frakcia zebier a šimpanzov sa podieľa na trávení rastlinných štruktúrnych polysacharidov v hrubom čreve hostiteľa.

ÚVOD

Hrubé črevo, ktoré tvorí poslednú časť tráviaceho traktu u cicavcov, zohráva hlavne pre absorpčné schopnosti epitelu a mikrobiálnu fermentáciu aj napriek medzidruhovým anatomickým rozdielom, dôležitú úlohu pri trávení. Vo výžive zvierat je dôležité pochopiť úlohu črevnej mikroflóry. Výsledkom mikrobiálnej fermentácie v hrubom čreve sú unikavé mastné kyseliny (UMK) a plyn, čo je veľmi podobné fermentácii v bachore prežúvavcov. Koňovité sú typické bylinožravce s trávením v slepom a hrubom čreve. Primáty sú vo všeobecnosti charakterizované ako bylinožravce (Milton, 2003). Potrava voľne žijúcich šimpanzov pozostáva z 87-98 % rastlinnej potravy (Milton, 1999) a líši sa medzi jednotlivými populáciami, hoci u každej dominujú zrelé ovocné plody (Newton-Fisher, 1999). Napriek tomu, že fekálne mikróby nereprezentujú úplne mikrobiálne spoločenstvo slepého a hrubého čрева, fermentačné techniky s fekálnym inokulom (Váradyová a kol., 2000; 2005) predstavujú hodnotnú alternatívnu neinvazívnu metódu na aproximáciu fermentácie v slepom a hrubom čreve. Cieľom bolo porovnanie fermentačnej kapacity féces a hydrolytickej aktivity protozoálnej frakcie vo féces u koňovitých zvierat a šimpanzov v podmienkach *in vitro*.

MATERIÁL A METODIKA

Čerstvé féces použité v našom experimente bolo získané zo zoologických záhrad (Zoo Košice, Zoo Liberec) od nasledujúcich zvierat: kôň Przewalský (*Equus ferus przewalskii*), somár ázijský (*Equus hemionus kulan*), zebra Chapmanova (*Equus quagga chapmanni*), šimpanz učennivý (*Pan troglodytes*). Kone, kulany a zebry boli kŕmené zimnou kŕmnom dávkou pozostávajúcou (kg/kus a deň): mrkva 1; granule K (doplňková kŕmna zmes pre koňe) 0,65 (kone, kulany), 0,70 (zebry); seno 30 (kôň), 18 (kulan), 25 (zebra); siláž ad libitum (kone a kulany). Šimpanzy boli kŕmené diétou so zvýšenou vlákninou (Kišidayová a kol., 2009). Vzorky čerstvých féces zbierané po rannom kŕmení boli transportované do laboratória

v McDougallovom pufri a precedené cez štyri vrstvy gázy. Pomocou injekčnej striekačky bolo fekálne inokulum (10 ml) inokulované do predhriatych inkubačných NTS fľašiek (100 ml) s McDougallovým pufrom (25 ml) a s jedným typom substrátu (0,25 g). Boli použité tieto substráty: amorfná celulóza (AC), lúčne seno (LS), pšeničná slama (PS), jačmenný šrot (JŠ) a xylan (XYL). LS, PS a JŠ boli zomleté a preosiate cez sitá (0,15 - 0,4 mm). NTS-ky so substrátmi boli uložené do termostatu a inkubované 72 hodín pri teplote $39 \pm 0,5$ °C. Šesť NTS fľašiek bolo použitých pre každý substrát a šesť slúžilo ako kontrola (inokulum bez substrátu). Po 72 hod bol meraný objem vyprodukovaného plynu vo fermentačných fľašiach pomocou manometra (Váradyová a kol., 1998). Koncentrácia UMK bola analyzovaná na plynovom chromatografe Perkin – Elmer Clarus 500 (Perkin-Elmer, Inc., Shelton, CN, USA). Stráviteľnosť substrátov (IVDMD) bola vyrátaná z rozdielu váhy substrátu pred a po 72 hod inkubácií. Namerané hodnoty boli štatisticky vyhodnotené pomocou dvojcestnej analýzy variancie (GraphPad InStat, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) ako 6 x 4 faktoriálny dizajn, ktorý reprezentoval šesť substrátových skupín a fekálne inokulum zo štyroch druhov zvierat. Hydrolytické aktivity sme stanovovali v bezbunkovom sonikáte vo fekálnej protozoálnej frakcii šimpanzov a zebier. Šimpanzia protozoálna fekálna frakcia obsahovala iba jeden druh ciliát, *Troglyodytella abrassarti* (Profousová a kol., 2007). V zebrej frakcii sa nachádzala zmesná protozoálna populácia typická pre čeľaď koňovitých. Polysacharidová depolymerázová aktivita bola meraná ako produkcia redukujúcich cukrov uvoľnených z polysacharidového substrátu pri pH 7,0 a teplote 39 °C spektrofotometricky pomocou dinitrosalicylovej kyseliny (Miller, 1959). Na meranie aktivity karboxymetylcelulázy, xylanázy, α -amylázy a fruktanázy sme použili ako substráty karboxymetylcelulózu, xylan, škrob a inulín. Obsah proteínov v enzýmovom preparáte bol stanovený Bradfordovou metódou (Bradford, 1976). Výsledky boli spracované v programe Microsoft Excel.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Fermentačné parametre sú prezentované v tabuľke č.1. Významné rozdiely medzi zvieratami boli v produkcii individuálnych UMK, IVDMD a produkcii plynov ($P < 0,001$). Najlepšie boli fermentované XYL a JŠ substráty. PS a AC boli najhoršie fermentovateľné až nedegradovateľné substráty pre všetky štyri druhy zvierat. V porovnaní s fermentačnou kapacitou bachorovej tekutiny a fécies oviec bola fermentačná aktivita fécies koňovitých a šimpanzov pri AC podstatne nižšia (Váradyová a kol., 2005). Z testovaných vlákniin fekálne inokulá lepšie fermentovali hemicelulózu v podobe xylanu ako amorfnú celulózu. Fermentácia AC bola sledovaná z dôvodu zisťovania celulolytickej aktivity fermentačného média. Fermentácia PS ako zdroja hemicelulózy (16 %), celulózy (46 %) a lignínu (9 %) oproti kontrole mala malý vplyv na tvorbu jednotlivých UMK. Štatisticky významné rozdiely v UMK sme zaznamenali pri fermentácii JŠ pri všetkých zvieratách, čo poukazuje na významnú amylolytickú aktivitu ich črevného mikrobiómu. Produkcia plynu pri fermentácii AC a PS bola veľmi nízka pri všetkých koňovitých inokulách. Vysoká produkcia plynu v porovnaní s kontrolami bola zaznamenaná pri fermentácii substrátov u šimpanzov. Výsledky ukázali, že črevný mikrobióm sledovaných zvierat dobre fermentuje hemicelulolytické (xylan) a škrobové substráty (jačmenný šrot). Rozdiely vo fermentácii substrátov medzi jednotlivými koňovitými zvieratami je možné pripísať rôznemu zloženiu črevnej mikrobiálnej populácie a jej schopnosti adaptovať sa na diétu donorového zvierat'a.

Tab. 1. Produkcia UMK, plynu a IVDMD z féces po 72 hod fermentácie

Substrát	Féces	Mol %			Plyn	IVDMD
(S)	(F)	Acetát	Propionát	<i>n</i> -Butyrát	(ml/g)	(%)
AC	Kôň	75,9	14,6	8,47	0	0
	Kulan	47,0	47,6	4,52	0,5	0
	Zebra	66,7	18,0	8,23	13,2	0
	Šimpanz	57,4	18,5	16,2	100	5,1
PS	Kôň	76,9	14,6	7,79	12,0	14,0
	Kulan	74,2	13,4	11,8	0	4,78
	Zebra	N	N	N	N	N
	Šimpanz	58,3	18,7	15,2	96	5,3
LS	Kôň	78,2	13,7	7,33	34,0	27,7
	Kulan	69,1	24,7	3,92	62,0	47,8
	Zebra	76,8	14,8	5,88	73,3	43,8
	Šimpanz	57,6	18,6	16,4	178	25,0
JŠ	Kôň	55,2	29,8	14,2	98,7	75,5
	Kulan	51,7	34,8	8,06	105	78,2
	Zebra	58,6	36,5	3,62	146	74,6
	Šimpanz	51,6	19,7	22,4	375	83,8
XYL	Kôň	N	N	N	N	N
	Kulan	72,8	16,0	10,5	44,0	26,2
	Zebra	70,8	17,6	10,3	101	53,5
	Šimpanz	N	N	N	N	N
Kontrola	Kôň	76,8	11,0	6,43	0	-
	Kulan	76,3	15,8	5,63	7,6	-
	Zebra	56,3	12,5	15,7	11,0	-
	Šimpanz	58,2	18,5	15,5	100	-
SEM		1,7	0,9	0,6	0,5	0,4
	S	***	***	***	***	***
	F	***	***	***	***	***
	S x F	***	***	***	***	***

*** P<0.001; N, namerané

Hydrolytické aktivity sú prezentované v tabuľke č.2. Všetky sledované enzymatické aktivity boli pozitívne v zebrej frakcii, na rozdiel od šimpanza, kde fruktanázová aktivita nebola detekovaná. Výsledky ukázali, že fekálna protozoálna frakcia zebier a šimpanzov sa podieľa na trávení rastlinných štruktúrnych polysacharidov v hrubom čreve hostiteľa. Keďže ciliátová populácia zebry je zložená z viacerých druhov, je pravdepodobné, že niektoré z nich majú fruktanázovú aktivitu na rozdiel od šimpanzov, ktoré boli monofaunované. Okrem toho to môže byť aj prejavom potravinovej špecializácie a rozdielnosti medzi šimpanzmi a zebami. Veľký podiel potravy zebry tvoria trávy, ktoré sú bohaté na zásobné polysacharidy fruktany. Naproti tomu, potrava fruktivorných šimpanzov je chudobná na fruktany, preto sa možno domnievať, že sa nevysletovala ciliátová populácia schopná fermentovať fruktany. V porovnaní s bachorovými ciliátami je nameraná celulytická aktivita nižšia (Bera-Maillet a kol., 2005), podobne bola nižšia aj xylanázová aktivita zebry. Naproti tomu, u šimpanzov vysoká amylázová a xylanázová aktivita je porovnateľná s bachorovými ciliátami. Tieto pilotné výsledky ukazujú na to, že mutualistické ciliáty hrubého čreva sa môžu veľkou mierou podieľať na mikrobiálnej fermentácii a prispievať tak k výžive hostiteľa.

Tab.2. Hydrolytické aktivity protozoálnej frakcie vo fécies u šimpanzov a zebier

Protozoálna frakcia						
	šimpanz			zebra		
	Proteíny	Produkcia ^a	Aktivita ^b	Proteíny	Produkcia	Aktivita
Xylanáza	6,23 ± 0,70	21,96 ± 4,38	3,31 ± 0,60	1,48 ± 0,06	0,39 ± 0,11	0,26 ± 0,06
Celulóza	6,23 ± 0,70	6,96 ± 0,35	1,04 ± 0,08	1,48 ± 0,06	0,59 ± 0,24	0,40 ± 0,15
Amyláza	6,23 ± 0,70	26,85 ± 4,06	4,89 ± 0,41	1,48 ± 0,06	0,78 ± 0,001	0,53 ± 0,01
Fruktanáza	6,23 ± 0,70	0	0	1,48 ± 0,06	2,62 ± 0,11	1,77 ± 0,01

Hodnoty sú priemery ± SD;
Proteíny - mg/ml;
^aProdukcia redukujúcich cukrov - μmol/ml min
^bŠpecifická aktivita enzýmov - μmol/ml min mg proteínu

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV-SK-CZ-0086-07) a Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied (VEGA 2/0009/08). Ďakujeme vedeniu Zoo Košice a Zoo Liberec za umožnenie zberu materiálu a Dr. K.J. Petrželkovej a Ing. I. Profousovej za zber materiálu od šimpanzov v Zoo Liberec.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Béra-Maillet C., Devillard E., Cezette M., Jouany J.-P., Forano, E. Xylanases and carboxymethylcellulases of the rumen protozoa *Polyplastron multivesiculatum*, *Eudiplodinium maggii* and *Entodinium* sp. FEMS Microbiol. Lett. 2005; 244:149-156.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72:248-254.
- Kišidayová S., Váradyová Z., Pristaš P., Píknová M., Nigutová K., Petrželková K.J., Profousová I., Schovancová K., Kamler J., Modrý D. Effects of high- and low-fiber diets on fecal fermentation and fecal microbial populations of captive chimpanzees. Am. J. Primatol. 2009; 71:548-557.
- Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 1959; 31:426-428.
- Milton K. A hypothesis to explain the role of meat-eating in human evolution. Evol. Anthropol. 1999; 8:11-21.
- Milton K. The critical role played by animal source foods in human (Homo) evolution. J. Nutr. 2003; 133:3886S-3892S.
- Newton-Fisher N.E. The diet of chimpanzees in the Budongo Forest Reserve, Uganda. Afr. J. Ecol. 1999; 37:344-354.
- Profousová, I., Pomajbíková, K., Petrželková, K.J., Modrý, D. Entodiniomorph ciliates in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). In: Proceedings of 6th International Zoo and Wildlife Research Conference on Behavior, Physiology and Genetics. East, M. Hofer, H. (eds.), Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlin, Germany. 2007; 174.
- Váradyová Z., Zeleňák I., Siroka P. The comparison of *in vitro* fermentation kinetics estimated by three different methods. Arch. Anim. Nutr. 1998; 51:319-326.
- Váradyová Z., Zeleňák I., Siroka P. *In vitro* study of the rumen and hindgut fermentation of fibrous materials (meadow hay, beech sawdust, wheat straw) in sheep. Anim. Feed Sci. Technol. 2000; 83:127-138.
- Váradyová Z., Baran M., Zeleňák I. Comparison of two *in vitro* fermentation gas production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. Anim. Feed Sci. Technol. 2005;123:81-94.

VPLYV ODLÚČENIA MLÁĎAT OD MATKY NA NEUROGENÉZU V ROSTRÁLNEJ MIGRAČNEJ DRÁHE POTKANA

Lievajová K., Račková E., Martončíková M., Orendáčová J.

Neurobiologický ústav SAV, Košice

ABSTRAKT

Napriek tomu, že pretrvávajúce neurogenézy v subventrikulárnej zóne a rostrálnej migračnej dráhe (RMS) cicavcov bolo dokázané, vonkajšie faktory, ktoré ovplyvňujú tento proces sú väčšinou neznáme. Cieľom našej práce bolo sledovať účinok odlúčenia mláďat od matky na proliferáciu, diferenciáciu a odumieranie buniek v RMS potkana. Odlúčenie mláďat od matky, dobre popísaný model ranného postnatálneho stresu u hlodavcov, sme použili ako model čuchovej deprivácie. Naše výsledky naznačujú, že stresujúce zážitky počas ranného obdobia života výrazne pozmeňujú normálny vývoj buniek v RMS a spôsobujú významný pokles počtu proliferujúcich buniek, významný nárast odumierania buniek a ovplyvňujú aj počet a maturáciu nitrergických buniek v RMS.

ÚVOD

Subventrikulárna zóna (SVZ) laterálnych mozgových komôr je jedným z miest, kde dochádza k neurogenéze aj v postnatálnom období. Bunky, ktoré vznikajú v SVZ migrujú cez sieť tangenciálnej dráhy – označovanej ako rostrálna migračná dráha (RMS) do dreňovej časti bulbus olfactorius (BO), kde dochádza k ich diferenciácii na zrelé interneuróny (Luskin, 1993). Migrujúce bunky vytvárajú reťazce, ktoré sú obalené zvláštnym typom astrocytov. Bolo dokázané, že bunky SVZ si počas migrácie pozdĺž RMS zachovávajú schopnosť deliť sa, a tiež že určitý počet týchto buniek počas migrácie zahynie prirodzenou bunkovou smrťou (Brunjes a kol., 1996). Napriek tomu, že neurogenéza prebieha v mozgu nepretržite po celý život, môže byť ovplyvňovaná množstvom rôznych vonkajších faktorov (ionizujúce žiarenie, elektromagnetické žiarenie, čuchová deprivácia). Vonkajšie faktory, ktoré sú zapojené do regulácie postnatálnej neurogenézy sú v súčasnosti predmetom intenzívneho bádania. Proliferácia a migrácia neuronálnych prekursorov sú kontrolované aj celým radom signálnych molekúl. Najnovšie dôkazy potvrdzujú, že veľký vplyv na neurogenézu v dospelosti má signálna molekula oxidu dusnatého (nitric oxide – NO) (Moreno-López a kol., 2004).

V RMS potkana v prvom mesiaci po narodení pokračujú výrazné vývojové zmeny. Prelomové obdobie predstavuje koniec prvého postnatálneho týždňa, kedy v RMS dochádza k značným morfológickým zmenám. Na siedmy deň po narodení počet proliferujúcich buniek v RMS veľmi výrazne poklesne a od štrnásteho postnatálneho dňa si množstvo deliacich sa buniek zachováva stúpajúcu tendenciu. U dvadsaťosemdňových potkanov dosiahne počet BrdU pozitívnych buniek úroveň novorodených zvierat (Martončíková a kol., 2006). Astroglia v RMS sa začína objavovať po prvom postnatálnom týždni (Law a kol., 1999). Prvé, NO produkujúce bunky v RMS boli zachytené na desiaty postnatálny deň (Račková a kol., 2003). Na základe týchto poznatkov sme sa v našom experimente zamerali na sledovanie účinku odlúčenia mláďat od matky počas prvého mesiaca po narodení.

MATERIÁL A METODIKA

V experimentoch boli použité potkany kmeňa Wistar albino. Na vyvolanie čuchovej deprivácie sme použili model odlúčenia mláďat od matky. Mláďatá boli od prvého postnatálneho dňa (P1) do štrnásteho postnatálneho dňa (P14) alebo do dvadsiatehoprvého dňa (P21) denne oddelené od svojich matiek po dobu 180 minút. Najprv sme vybrali samice a potom sme preložili mláďatá do plastikovej nádoby, ktorú sme umiestnili do inkubátora pri teplote zhodnej s hodnotami nameranými v hniezde. Po uplynutí 180 minút boli mláďatá

vrátené do pôvodnej kletky k samici. Kontrolné zvieratá boli chované v rovnakých podmienkach bez separácie od matky.

Podľa trvania odlúčenia od matky a doby prežívania sme zvieratá rozdelili do štyroch experimentálnych skupín: 1. skupina – P7 (odlúčenie od matky po dobu jeden týždeň), 2. skupina - P14 (odlúčenie od matky po dobu dvoch týždňov), 3. skupina – P21 (odlúčenie od matky po dobu troch týždňov), 4. skupina – P28 (odlúčenie od matky po dobu troch týždňov, nasledované týždňovým prežívaním).

Po skončení oddeľovania od matky sme experimentálnym aj kontrolným zvieratám i.p. injikovali značkovač proliferujúcich buniek brómdeoxyuridín – BrdU (50mg/kg telesnej hmotnosti). Po dvojhodinovom prežívaní sme zvieratá v hlbokoj narkóze (zmes xylazínu a ketamínu) transkardiálne prepláchli najprv fyziologickým roztokom a následne 4% paraformaldehydrom. Nasledujúci deň sme mozgy vybrali z lebiiek a preložili do kryoprotektívneho roztoku (30% roztok sacharózy). Po skončení kryoprotekcie sme mozgy pomocou kryostatu nakrájali na 40 µm hrubé sagitálne rezy, ktoré sme uložili do nádobiek s 0.1 M PBS. Tieto rezy sme následne spracovali imunohistochemickou metódou pre značenie proliferujúcich buniek (využívajúcim anti BrdU protilátku). Ďalej sme použili histochemické metódy na identifikáciu nitrergických buniek (NADPH-diaforázové farbenie) a odumierajúcich buniek (fluorescenčné farbivo Fluoro-Jade C). Mozgy rovnako starých kontrolných zvierat boli spracované podobným spôsobom.

Pomocou svetelného mikroskopu (Olympus BX51) sme zhotovili mikrofotografie jednotlivých rezov a počet apoptotických a nitrergických buniek sme analyzovali programom Image Tool. Proliferujúce bunky sme počítali pomocou programu Disector individuálne v jednotlivých anatomických častiach RMS (vertikálne rameno, ohyb a horizontálne rameno). Rozdiely v počtoch proliferujúcich, nitrergických ako aj apoptotických buniek medzi experimentálnymi a kontrolnými zvieratami sme štatisticky hodnotili pomocou Tukey – Kramer testu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Viaceré experimenty potvrdili, že opakované odlúčenie od matky počas prvých dvoch - troch týždňov života má za následok dlhotrvajúce zmeny týkajúce sa endokrinného, behaviorálneho a mozgového vývoja (Francis a Meaney, 1999). Naše výsledky naznačujú, že relatívne krátky interval pôsobenia čuchovej deprivácie (jeden týždeň), ako aj dlhodobejšia čuchová deprivácia (dva až tri týždne) môžu výrazne ovplyvniť jednotlivé procesy neurogenézy.

Predchádzajúca štúdia z nášho pracoviska ukázala, že intenzita proliferácie buniek v RMS intaktného potkana sa počas prvého postnatálneho mesiaca výrazne mení (Martončíková a kol., 2006). V našom experimente sme, po ukončení odlúčenia mláďat od matky zaznamenali signifikantný pokles počtu BrdU pozitívnych buniek vo všetkých častiach RMS u všetkých štyroch experimentálnych skupín.

Aby sme získali detailnejšie informácie o rozsahu diferenciácie, rozdelili sme RMS pozdĺž kaudálno-rostrálnej osi na tri časti: vertikálne rameno, ohyb a horizontálne rameno. Je zaujímavé, že pokles počtu proliferujúcich buniek bol najvýraznejší v kaudálnej časti RMS (vo vertikálnom ramene a ohybe), teda v tých častiach RMS, kde je pri fyziologických podmienkach počet proliferujúcich buniek najvyšší. V horizontálnom ramene bol počet deliacich sa buniek tiež redukovaný v porovnaní s kontrolami, ale tento pokles nebol signifikantný. Predpokladáme, že rôzna odpoveď jednotlivých anatomických častí RMS na čuchovú depriváciu je spôsobená vyššou citlivosťou tých častí RMS, kde je za fyziologických podmienok najvyššia proliferácia.

Oddeľovanie mláďat od matky spôsobilo výrazné zmeny aj v odumieraní buniek. Po sedemdnovej čuchovej deprivácii, počet Fluoro Jade-C pozitívnych buniek u P7 zvierat sa v porovnaní s kontrolami štatisticky signifikantne zvýšil v priebehu celej RMS. Dvojtýždňová

separácia (P14 potkany) nespôsobila signifikantný nárast počtu Fluoro Jade-C pozitívnych buniek, no trojtýždňová separácia (P21 potkany) indukovala výrazné zvýšenie množstva odumierajúcich buniek v porovnaní s kontrolami a tento signifikantný nárast pretrvával aj týždeň po skončení separácie (P28 potkany). Tieto nálezy naznačujú, že čuchové vnemy môžu modulovať aj rovnováhu medzi tvorbou a elimináciou progenitorových buniek.

V našej predchádzajúcej práci sme ukázali, že v RMS kontrolných zvierat sa prvé NADPH-d-pozitívne bunky objavili až po prvom postnatálnom týždni, konkrétne na desiaty deň po narodení (Račková a kol., 2003). Čuchová deprivácia indukovala skorší výskyt buniek produkujúcich NO v migračnej dráhe. Bipolárne NADPH-d-pozitívne bunky s krátkymi výbežkami sme sledovali v RMS P7 experimentálnych potkanov. Morfológický obraz a počet týchto buniek boli podobné ako u P10 kontrolných zvierat. Analýzou mozgov kontrolných zvierat sme zistili, že počet buniek produkujúcich NO v RMS vekom postupne narastá. Po čuchovej deprivácii bola distribúcia nitrergických buniek v priebehu RMS podobná ako u kontrolných zvierat, avšak počet týchto buniek u experimentálnych zvierat narástol u P14, P21 ako aj u P28 potkanov. Tento rozdiel bol štatisticky významný na konci senzorickej deprivácie (P21) v porovnaní s rovnako starými kontrolnými potkanmi. Úloha NO v neurogenéze vyplýva najmä z jeho antiproliferačného účinku na mnohé typy buniek. Negatívny vplyv NO na proliferáciu bol potvrdený v neuroproliferatívnych oblastiach mozgu dospelých cicavcov *in vivo* (Moreno-Lopez a kol., 2004) aj *in vitro* (Matarredona a kol., 2004). Naše pozorovania ukázali, že ranná senzorickej deprivácia indukuje zvýšenú tvorbu NO, čo sekundárne môže pôsobiť antiproliferačne.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla s finančnou podporou grantov VEGA: 2/0147/09; 2/0058/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Brunjes PC, Armstrong AM: Apoptosis in the rostral migratory stream of the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res* 1996; 30: 219-22.
- Francis DD, Meaney MJ: Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol.* 1999; 9:128-34.
- Law AK, Pencea V, Buck CR, Luskin MB: Neurogenesis and neuronal migration in the neonatal rat forebrain anterior subventricular zone do not require GFAP-positive astrocytes. *Dev Biol.* 1999; 216:622-34.
- Luskin MB: Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 1993; 11:173-89.
- Martončíková M, Račková E, Orendáčová J: The number of proliferating cells in the rostral migratory stream of rat during the first postnatal month. *Cell Mol Neurobiol.* 2006; 26:1453-61.
- Matarredona ER, Murillo-Carretero M, Moreno-López B, Estrada C: Nitric oxide synthesis inhibition increases proliferation of neural precursors isolated from the postnatal mouse subventricular zone. *Brain Res.* 2004; 995:274-84.
- Moreno-López B, Romero-Grimaldi C, Noval JA, Murillo-Carretero M, Matarredona ER, Estrada C: Nitric oxide is a physiological inhibitor of neurogenesis in the adult mouse subventricular zone and olfactory bulb. *J Neurosci.* 2004; 24:85-95.
- Ráčková E, Orendáčová J, Martončíková M, Vanický I: NADPH-diaphorase positivity in the rostral migratory stream of the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003; 146:131-4.

PREŽÍVANIE VYBRANÝCH PROBIOTICKÝCH MIKROORGANIZMOV V JOGURTOCH POČAS SKLADOVANIA

Lovayová V., Burdová O.

Univerzita veterinárskeho lekárstva Košice, Ústav hygieny a technológie mlieka

ABSTRAKT

Štúdia hodnotila prežívanie *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* v jogurtoch počas ich skladovania. Jogurty boli inkubované pri 43 °C 3,5 h. a skladované pri teplote 4 °C. Vo vzorkách sa sledovali zmeny kyslosti (pH a °SH) a mikrobiologické vlastnosti jogurtov, ktoré sa vyhodnocovali na 1, 3, 7, 14 a 21 deň skladovania. Experimenty boli vykonávané od apríla 2008 do januára 2009. Výsledky poukazujú na podstatné rozdiely medzi rôznymi typmi probiotických baktérií. Použitá technológia výroby jogurtov v laboratórnych podmienkach sa ukázala ako správna a vhodná pre rozmnožovanie probiotických mikroorganizmov. Pri mikrobiologickej analýze sa zistilo, že došlo k nárastu počtov použitých probiotických kmeňov baktérií. Počty *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* sa zvyšovali z $0,3 \times 10^9$ KTJ / g na $1,7 \times 10^9$ KTJ / g v prvých 7 dňoch nezávisle na ročnom období. Počty baktérii *Lactobacillus acidophilus* sa zvyšovali z $0,8 \times 10^9$ KTJ / g na $5,5 \times 10^9$ KTJ / g počas 7 dní skladovania v priebehu štyroch ročných období. Štatistická významnosť bola medzi klesajúcim pH a zvyšujúcimi sa počtami jednotlivých druhov baktérií v sledovaných vzorkách.

ÚVOD

V posledných rokoch je venovaná značná pozornosť možnosti zlepšenia zdravotného stavu človeka úpravou črevnej mikroflóry. Všeobecným trendom je príklon k zdravej výžive. Probiotické potraviny, vrátane mliečnych výrobkov, hrajú významnú úlohu v ľudskej výžive. Najskôr boli probiotické potraviny definované ako „potraviny obsahujúce živé mikroorganizmy, ktoré aktívne zlepšujú zdravie a udržiavajú v rovnováhe mikroflóru čreva“ (Fuller, 1991). V súčasnej dobe sú probiotické potraviny vymedzené ako „produkty, ktoré obsahujú mikrobiálne bunky, alebo ich časti, a majú blahodarný vplyv na zdravie hostiteľa“. Pri výrobe sa osvedčili najmä baktérie rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Enterococcus*. Celosvetovo je predávaných viac než 100 rôznych probiotických výrobkov. Spotreba potravín obsahujúcich *Lactobacillus acidophilus* a bifidobaktérií je pozorne sledovaná. K zaisteniu zlepšenia zdravia je podstatné, aby probiotické potraviny vyhovovali nárokom minimálnej koncentrácie probiotík 10^6 KTJ/ g produktu aj na konci doby spotreby. Na životnosť probiotických kultúr vo fermentovanom mlieku pôsobí rada faktorov, najmä výsledná kyslosť produktu, dostupnosť živín, rozpustnosť a možnosť permeácie kyslíka cez obal výrobku. Stabilita probiotických kultúr vo výrobkoch je dôležitým problémom, na ktorý je zameraná hlavná pozornosť.

MATERIÁL A METODIKA

V práci sa analyzovalo 320 vzoriek bielych jogurtov vyrobených z kravského mlieka s rozdielnym počtom somatických buniek. Analyzovali sa vzorky bieleho jogurtu technologicky vyrobeného v laboratórnych podmienkach. Vzorky sa hodnotili po dobu jedného mesiaca, päť krát v danom mesiaci. Analyzovaná bola vždy trojica vzoriek u každého typu vzoriek.

V surovom kravskom mlieku sa stanovovali nasledovné parametre: tuk, beztuková sušina, hustota, bielkoviny, obsah vody, teplota (°C), pH a vodivosť pomocou infračerveného analyzátoru - Ekomilk (Bulharsko). Počty somatických buniek boli stanovené na Fossomaticu 90. Rezíduá inhibičných látok boli zisťované pomocou DELVO testu, ktorého princípom je rast mikrobiálneho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*.

Kultivácia celkového počtu mikroorganizmov v surovom kravskom mlieku sa previedla na štandardnom agare PCA - Plate Count Agar (Hi Media) pričom bola použitá metóda počítania kolónií na tuhom kultivačnom médiu pri teplote 30°C po dobu 72 hod.

Na vyšetrenie koliformných baktérií sa použil Endov agar (Hi Media). Použitá bola metóda počítania kolónií na tuhom kultivačnom médiu po inkubácii vzoriek pri teplote 37°C po dobu 24-48 hod.

Pre stanovenie počtu mikroorganizmov rodu *Lactobacillus acidophilus* bola použitá pôda M 641 *Lactobacillus* MRS Agar (Hi Media) so selektívnym činidlom. Živné pôdy boli inokulované pri teplote 37 °C po dobu 3 dní za anaeróbných podmienok.

Pre stanovenie počtu mikroorganizmov rodu *Bifidobacterium* bola použitá pôda M 1396 *Bifidobacterium* Agar (Hi Media). Vzorky boli inokulované v termostate za pridania vyvíjača a indikátora anaerobiózy obrátené hore dnom. Po uzavretí anaerostatu sa inkubovalo v termostate pri 37 °C po dobu 3 dní za anaeróbných podmienok.

Pri mikrobiologickom hodnotení vzoriek experimentálne vyrobených jogurtov (vzorka A, vzorka B) sa v týždenných intervaloch sledovalo prežívanie životaschopných probiotických baktérií.

Zistené hodnoty boli spracované do tabuliek a grafov pomocou programu Microsoft Excel. Pre zistenie štatistickej významnosti bol použitý párový T-test presných pravdepodobností (GaphPad Prism 5).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počty somatických buniek a mikroorganizmov v surovom kravskom mlieku použitom na výrobu jogurtov sú uvedené v Tab. 1. Najvyššie počty somatických buniek boli pozorované v surovom mlieku v letnom období (1 633 00/ml). Koliformné baktérie boli zistené v minimálnej hodnote 6280/ml v surovom mlieku počas zimného obdobia.

Tab. 1. Somatické bunky a mikroorganizmy v surovom kravskom mlieku použitom na výrobu jogurtov

Ročné obdobie	Somatické bunky/ml	Celkový počet mikroorganizmov/ml	Koliformné baktérie/ml
Jar	286 000	45 000	19 600
Leto	1 633 000	65 900	10 000
Jeseň	360 000	32 600	8 300
Zima	156 000	51 200	6 280

Rezíduá inhibičných látok neboli zistené v žiadnej vzorke surového kravského mlieka odobratej z mlieka používaného na výrobu jogurtov za laboratórnych podmienok.

V priebehu skladovania jogurtov došlo k celkovému poklesu pH. Počiatočné pH (deň 0) sa pohybovalo medzi 4,1 a 4,75 s priemerom 4,45 a konečné pH sa pohybovalo v rozmedzí 3,8 až 4,6, s priemerom 4,25. Významný rozdiel bol zistený ($p < 0,05$) pri pH medzi jogurtmi obsahujúcimi *Lactobacillus acidophilus* (vzorka A) a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (vzorka B).

Životaschopnosť *Lactobacillus acidophilus* bola vyššia, keď pH jogurtov sa pohybovala medzi 4,1 a 4,8 počas skladovania pri teplote 4 °C.

Titračná kyslosť sa významne zvyšovala ($p < 0,05$) na 21 deň skladovania. Pri porovnaní vzoriek jogurtov s *Lactobacillus acidophilus* medzi sezónami boli zistené výrazné rozdiely medzi jarným vs. letným obdobím ($p < 0,05$), jarným vs. jesenným ($p < 0,01$) a jarným vs. zimným ($p < 0,01$). V jogurtoch s *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* boli zistené významné rozdiely len medzi letom vs. zima ($p < 0,05$). Zdá sa, že tieto zmeny mohli byť spojené s kvalitou surového kravského mlieka, a to najmä s počtom somatických buniek.

V jarnom období v priebehu skladovania priemerné počty životaschopných buniek *Lactobacillus acidophilus* klesli z $2,3 \times 10^9$ KTJ / g (0 deň) na $2,2 \times 10^9$ KTJ / g (21 deň), zatiaľ čo *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* sa znížil z $0,4 \times 10^9$ KTJ / g (0 deň) na $0,1 \times 10^9$ KTJ / g (21 deň) (Tab. 2). Možno konštatovať, že všetky skladované jogurty s probiotickou kultúrou *Lactobacillus acidophilus* obsahovali na konci experimentu (21 deň) životaschopné mikroorganizmy rádovo 10^9 KTJ / g. Maximálny priemerný počet životaschopných mikroorganizmov *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* bol pozorovaný na 7 deň skladovania ($5,5 \times 10^9$ KTJ / g, $1,7 \times 10^9$ KTJ / g,) (Tab. 2).

Tab. 2. Počty probiotických kultúr na 1, 3, 7, 14 a 21 deň skladovania, počas štyroch ročných období

Jogurty								
Dni	<i>s Lactobacillus acidophilus</i>				<i>s Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>			
	jar	leto	jeseň	zima	jar	leto	jeseň	zima
1	2.3×10^9	1.6×10^9	0.8×10^9	0.1×10^9	0.4×10^9	0.3×10^9	0.7×10^9	0.3×10^9
3	5.2×10^9	1.8×10^9	1.1×10^9	0.4×10^9	0.8×10^9	0.4×10^9	1.1×10^9	0.6×10^9
7	5.5×10^9	2.5×10^9	3.4×10^9	1.1×10^9	1.7×10^9	0.6×10^9	1.2×10^9	1.1×10^9
14	4.1×10^9	0.5×10^9	1.6×10^9	0.9×10^9	0.8×10^9	0.5×10^9	0.5×10^9	0.8×10^9
21	2.2×10^9	0.4×10^9	0.8×10^9	0.6×10^9	0.1×10^9	0.1×10^9	0.2×10^9	0.4×10^9

Cieľom práce bolo zisťovanie prežívania vybraných probiotických mikroorganizmov u technologicky vyrobených jogurtov v laboratórnych podmienkach počas skladovania. Vo vzorkách jogurtov sa sledovali zmeny mikrobiologickej kvality so zameraním na rody *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactic*, acidita formou titračnej a aktívnej kyslosti. V priebehu skladovania aktívna kyslosť u všetkých vzoriek mala mierne klesajúcu tendenciu. Titračná kyslosť sa zvyšovala, ale na 7. a 14. deň boli zaznamenané výkyvy v priemere o $9,5$ °SH.

Z mikrobiologického hľadiska sme zaznamenali vyšší nárast baktérií rodu *Lactobacillus acidophilus* počas sledovaných období. Kvantitatívne zastúpenie *Lactobacillus acidophilus* na konci skladovania odpovedalo množstvo probiotických baktérií pre dosiahnutie terapeutického minima. Pričom počty rodu *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactic* boli rádovo o $2,0 \cdot 10^9$ v 1/g nižšie oproti počtom rodu *Lactobacillus acidophilus*.

POĎAKOVANIE

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

Fuller, R. (1991) Probiotics in human medicine. Gut, 32, 439-442.

FYZIKÁLNO-CHEMICKÉ ZMENY V MÄSE BAŽANTOV POĽOVNÝCH (*PHASIANUS COLCHICUS*) POČAS ZRECIEHO PROCESU

Mačanga J., Koréneková B., Nagy J.

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

ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo sledovať a porovnať dynamiku kyseliny mliečnej, kyseliny fosforečnej a hodnoty pH počas 14-dňového zrecieho procesu v prsnej a stehennej svalovine bažantov poľovných (*Phasianus colchicus*), ktoré boli zabitú vykrvením, vyháčkované a do analýzy skladované v chladničke pri 4°C. Koncentrácie jednotlivých kyselín sme monitorovali pomocou Elektroforetického analyzátoru EA102 (Villa Labeco, SR) a pH sme merali na pH-metri (InoLab WTW 720). Výsledky získane elektroforetickou analýzou sme vyhodnocovali v programe ITPPpro 32. Zistili sme, že hodnoty pH sa počas zrecieho procesu výrazne nemenili. V prsnej svalovine bola hodnota pH v 1. deň 5,77; v 7. deň 5,80 a v 14. deň 5,83. Hodnoty pH v stehennej svalovine boli nasledovné: v 1. deň 5,93; v 7. deň 5,99 a v 14. deň 6,03. Koncentrácia kyseliny mliečnej do 7. dňa zrecieho procesu stúpala, pričom výraznejší vzostup bol v prsnej svalovine. Aj u kyseliny fosforečnej sme do 7. dňa pozorovali nárast množstva v oboch svalovinách, pričom štatisticky významný vzostup koncentrácie bol v stehennej svalovine ($p \leq 0,01$). Následne do 14. dňa zrecieho procesu koncentrácie oboch kyselín klesali. Štatisticky významný pokles sme zaznamenali u kyseliny mliečnej v prsnej svalovine ($p \leq 0,05$). Pri porovnaní množstva jednotlivých kyselín a hodnoty pH v prsnej a stehennej svalovine sme pozorovali výrazné rozdiely. Vyššie koncentrácie kyselín počas zrecieho procesu boli v prsnej svalovine, kým hodnota pH bola vyššia v stehennej svalovine.

ÚVOD

Zrenie mäsa je dlhodobý biochemický proces po zabití zvierat, ktorého súčasťou je pokračovanie enzymatickej aktivity svaloviny bez prístupu vzduchu a premena samotnej svaloviny na mäso. Metabolické produkty látkovej premeny pri procese zrenia mäsa zostávajú vo svalovine a podieľajú sa na formovaní senzorických vlastností mäsa (Čuboň a kol., 2004). Jedná sa hlavne o kyselinu mliečnu a kyselinu fosforečnú, prípadne iné kyseliny, ktoré spôsobujú zníženie hodnoty pH (Šimek a kol., 2002). Mnoho mikroorganizmov pri nízkych hodnotách pH nepreživa alebo aspoň dochádza k výraznému spomaleniu ich delenia. Dostatočné okyslenie mäsa poskytuje určitú ochranu pred baktériami (Winkelmayer a kol., 2005). Keďže zrecí proces je dôležitý pre výslednú kvalitu zveriny, sledovali sme koncentráciu kyseliny mliečnej, kyseliny fosforečnej a hodnotu pH počas jeho priebehu.

MATERIÁL A METODIKA

V Účelovom zariadení pre chov a choroby zveri, rýb a včiel v Rozhanovciach bolo 9 kusov bažantov poľovných (*Phasianus colchicus*) zabitých vykrvením. Po vyháčkovaní boli rozdelené do 3 skupín po 3 kusoch a následne bez odstránenia peria skladované v chladničke pri 4°C. Teplota počas experimentu bola monitorovaná pomocou prístroja testo 175. Z jednotlivých skupín bažantov boli odoberané vzorky prsnej a stehennej svaloviny (z prvej skupiny 24 hodín po zabití, z druhej skupiny v 7. deň a z tretej skupiny v 14. deň po zabití). Vzorky sme zhomogenizovali a na analýzu sme navážili 10g. Sledované analyty sme získali extrakciou z vodného výluhu. Po zmeraní pH pomocou pH-metra (InoLab WTW 720) sme výluh 100 násobne zriedili. Takto nariadené vzorky sme aplikovali do Elektroforetického analyzátoru EA102 (Villa Labeco, SR) s vodivostným detektorom. Ako vodiaci elektrolyt bol použitý 10mM HCL, β -alanín a 0,1% mHEC a zakončujúci elektrolyt 5mM kyselina kaprónová a 5mM TRIS. Výsledky z elektroforetického analyzátoru boli vyhodnotené pomocou počítačového programu ITPPpro 32 a štatisticky analyzované v programe Microsoft

Excel 2007 použitím Studentovho *t*-testu, korelačného koeficientu a ďalších variačno-štatistických charakteristík: aritmetický priemer, smerodajná odchýlka.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

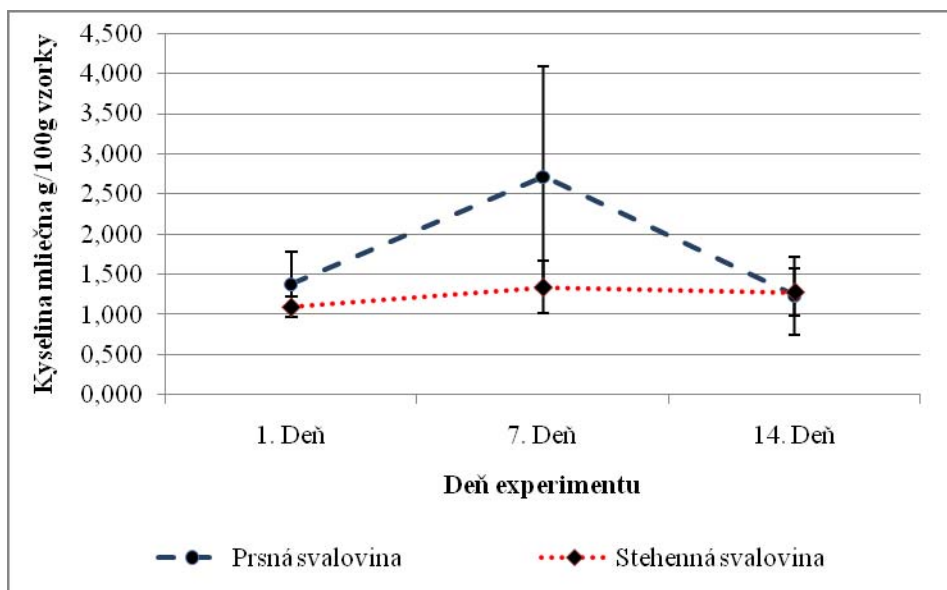
Počas 14-dňového zrecieho procesu sa koncentrácia kyseliny mliečnej menila nasledovne (graf 1). V prsnej svalovine 24 hodín po zabití bola koncentrácia kyseliny mliečnej $1,379 \pm 0,406$ g/100g vzorky. Počas siedmych dní stúpila na hodnotu $2,713 \pm 1,381$ g/100g vzorky. V 14. deň zrecieho procesu sme zaznamenali štatisticky významné zníženie koncentrácie kyseliny mliečnej $p \leq 0,05$ ($1,237 \pm 0,482$ g/100g vzorky). Hodnota korelačného koeficientu bola -0,906.

Rovnakú dynamiku sme pozorovali aj v stehennej svalovine, kde koncentrácia kyseliny mliečnej dosiahla nasledovné hodnoty: 1. deň $1,094 \pm 0,128$; 7. deň $1,341 \pm 0,327$; 14. deň $1,281 \pm 0,298$.

Dynamika kyseliny mliečnej v celom časovom intervale zrecieho procesu v mäse odráža kvantitatívnu premenu glykogénu na kyselinu mliečnu. V počiatkovej fáze je jej nárast najvýraznejší (KOPŘIVA a kol., 1992).

Z dosiahnutých výsledkov je zrejme, že medzi prsnou a stehennou svalovinou sú rozdiely v koncentrácii kyseliny mliečnej. Štatisticky významný rozdiel sme zaznamenali v 7. deň zrecieho procesu ($p \leq 0,05$). Vyššie hodnoty a výraznejšiu dynamiku tvorby kyseliny mliečnej v prsnej svalovine než v stehennej je možné vysvetliť tým, že prsná svalovina obsahuje väčšie množstvo glykogénu (Balsyte a kol., 1998).

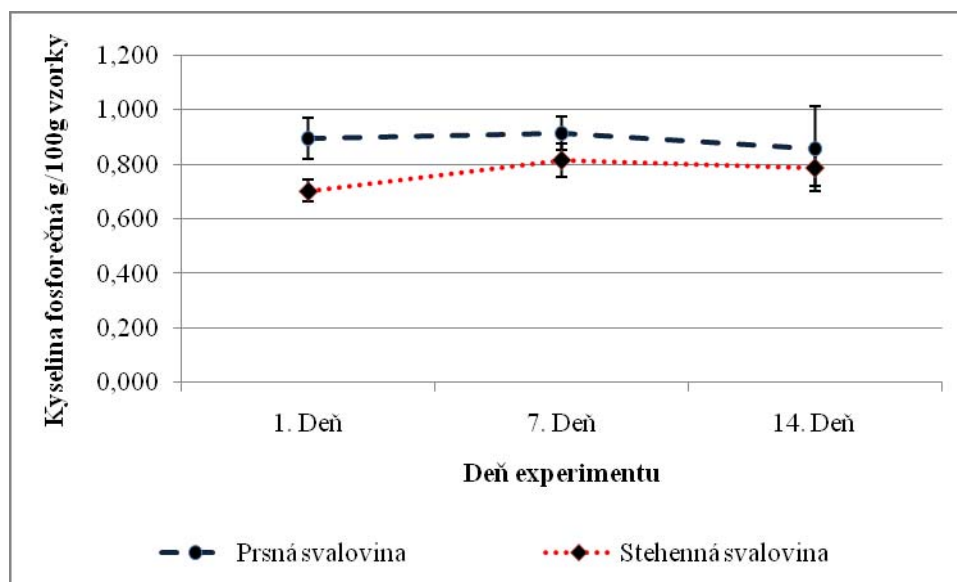
Graf 1. Dynamika kyseliny mliečnej v prsnej a stehennej svalovine bažantov počas zrecieho procesu



Množstvo kyseliny fosforečnej v prsnej aj v stehennej svalovine, podobne ako u kyseliny mliečnej, do 7. dňa zrecieho procesu stúpalo (graf 2). Štatisticky významný vzostup koncentrácie sme pozorovali v stehennej svalovine ($p \leq 0,01$). Následne do 14. dňa množstvo kyseliny fosforečnej v oboch svalovinách mierne klesalo. Kyselina fosforečná vo svalovine vzniká z energeticky bohatých fosfátov pri odbúravaní glykogénu na kyselinu mliečnu (Winkelmayer a kol., 2005), preto je možné, že jej obsah závisí od množstva glykogénu pred zabitím zvierat.

Koncentrácia kyseliny fosforečnej v prsnej svalovine je počas celého obdobia zrecieho procesu väčšia než v stehennej svalovine. Štatisticky významný rozdiel sme zaznamenali v 1. deň ($p \leq 0,05$) a v 7. deň ($p \leq 0,01$).

Graf 2. Dynamika kyseliny fosforečnej v prsnej a stehennej svalovine bažantov počas zrecieho procesu



Pri sledovaní hodnoty pH počas zrecieho procesu (tab. 1) sme medzi jednotlivými dňami nezaznamenali výrazné rozdiely čo sa zhoduje s výsledkami Paulsena a kol., (2008). Naproti tomu sme však zistili štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými svalovinami. V stehennej svalovine boli počas celého monitorovaného obdobia vyššie hodnoty pH než v prsnej svalovine (1. deň - $p \leq 0,001$; 7. deň - $p \leq 0,001$). Naše výsledky sú porovnateľné s výsledkami Richtera a kol. (1992) a Paulsena a kol. (2008).

Tab. 1. Hodnoty pH v prsnej a stehennej svalovine bažantov počas zrecieho procesu

Svalovina	Deň experimentu		
	1.	7.	14.
Prsná	$5,77 \pm 0,07$	$5,80 \pm 0,04$	$5,83 \pm 0,23$
Stehenná	$5,93 \pm 0,04$	$5,99 \pm 0,08$	$6,03 \pm 0,18$

Počas zrecieho procesu svalovina podlieha rade biochemických zmien a mení sa na mäso. Výsledkom týchto zmien sú zlepšené organoleptické a technologické vlastnosti mäsa a taktiež je zabezpečená určitá ochrana pred mikroorganizmami, čím sa predlžuje údržnosť mäsa. Medzi najdôležitejšie biochemické zmeny, ktoré prebiehajú po zabití zvierat radíme odbúravanie glykogénu a energeticky bohatých fosfátov, výsledkom čoho je vznik kyseliny mliečnej, kyseliny fosforečnej a s tým súvisiaca zmena hodnoty pH. Na základe našich meraní môžeme skonštatovať, že dynamika oboch kyselín mala charakteristický priebeh. Hodnota pH sa počas zrecieho procesu výrazne nemenila. Je to spôsobené pravdepodobne tým, že svalovina bažantov obsahuje relatívne málo glykogénu a tak množstvo vzniknutej kyseliny mliečnej, ktorá ovplyvňuje pH v najväčšej miere, nebolo postačujúce na to, aby zmeny pH boli výraznejšie.

POĎAKOVANIE

Spracovanie príspevku bolo podporené projektom VEGA 1/0403/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Balsyte G, Turek P, Nagy J, Cabadaj R. Vplyv teploty na dynamiku tvorby kyseliny mliečnej v mäse hydiny. In: Zborník prednášok a posterov z konferencie Hygiena alimentorum XIX. Košice 26.-28.10.1998; 25-26. ISBN 80-7148-028-2
- Čuboň J, Haščík P, Mojto J, Kačániová M, Vagač V, Košťalová D, Pavličová S. Vplyv mliečnanu sodného na mikrobiologické, fyzikálne a zmyslové vlastnosti hovädzieho mäsa. Acta fytotechnica et zootechnica 2004; 3: 62-66.
- Paulsen P, Nagy J, Popelka P, Ledecký V, Marcinčák S, Pipová M, Smulders F J M, Hofbauer P, Lazar P, Dičaková Z. Influence of storage conditions and shotshell wounding on the hygienic condition of hunted, unviscerated pheasant (*Phasianus colchicus*). Poultry science 2008; 87, 191-195.
- Richter G, Ochrimenko C, Gruhn K. Zusammensetzung und Qualitätsparameter von Perlhühnern, Fasanen, Tauben, Cairina und Kaninchen. Nahrung 1992; 36, 543-550.
- Šimek J, Vorlová L, Steinhauser L. Jakostní odchylky masa a jejich identifikace. Maso 2002; 4, 24-27.
- Winkelmayer R, Lebersorger P, Zedka H F, Forejtek P, Vodňanský M, Večerek V, Malena M, Nagy J, Lazar P. Hygiena zvěřiny. Středoevropský institut ekologie zvěře Wien-Brno-Nitra, 2005; 168s.

DETEKCIA KOMPLEMENT BLOKUJÚCICH PROTEÍNOV FRANCISELLA SPP.

Mađar M., Bhide M.

Katedra mikrobiológie a imunológie, Ústav imunológie, Laboratórium biomedicínskej mikrobiológie a imunológie

ABSTRAKT

Prežívanie franciselly v krvnom riečisku po uštipnutí infikovaným kliešťom je podmienené schopnosťou baktérie odolávať imunitným mechanizmom hostiteľa. Veľa mechanizmov s ktorými *Francisella* bojuje proti vrodenej imunitnému systému je neznámych. Komplementový systém patrí k mechanizmom vrodenej imunity a pozostáva z množstva zložiek ktorých interakciou sa spúšťajú jednotlivé komplementové kaskády, ktorých výsledkom je lýza bakteriálnych patogénov. Cieľom práce je detailnejšie štúdium proteín - proteín interakcií medzi hostiteľským komplementovým systémom a proteínmi *Franciscella LVS, holarctica, novicida*. Pomocou proteomických metód vieme určiť konkrétne proteíny ktorými vie *Francisella* viazať faktory ktoré regulujú až zastavujú komplementové kaskády. Medzi tieto regulačné faktory patria aj C4BP a C1inhibitor. V tejto práci sme dokázali väzbu týchto regulačných proteínov na proteíny franciselly troch poddruhov a tým schopnosť franciselly za pomoci týchto faktorov odolávať komplementom sprostredkovanému zabitiu a lýze.

ÚVOD

Francisella tularensis (Ft) je vysoko infekčná Gram-negatívna, fakultatívne intracelulárna baktéria, ktorá je pôvodcom tularémie. Tularémia je transmisívne zoonózne ochorenie, ktoré prenášajú kliešte rodu *Ixodes, Dermacentor, Haemaphysalis* a muchy *Chrysops discalis*. Najvýraznejším symptómom pre tularémiu je lymfadenopathia, ale vyskytuje sa aj v iných formách v závislosti na mieste vstupu a infekčnosti jednotlivých poddruhov. Invadujúce mechanizmy *Franciselly* nie sú úplne známe (Mariathasan a kol., 2005). Štúdie o *Ft* vonkajších membránových proteínoch ukazujú množstvo proteínov z toho 16 imunogénnych proteínov na jej povrchu (Pal, TolC-A, PilQ, SilC, FtaG, TolC-B, FopA, Mip, YapH-LVS, Cht1, Tul4-A, Tul4-B, LamB (Hubalek a kol., 2003). SrfA, SecY, LolC sú vnútorné membránové proteíny *Ft*. EF-Tu a IglA sú *Ft* cytoplazmatické proteíny (Huntley a kol., 2007). O-špecifický polysacharid chráni bakteriálne bunky pred komplementovou lýzou (Cowley a kol., 2000). Cieľom práce je prostredníctvom hľadania proteínov, ktoré sa podieľajú na viazaní regulačných faktorov, docieľiť definovanie faktorov virulencie s neskorším využitím pri tvorbe vakcín.

MATERIÁL METODIKA

Príprava proteínov

Izoláty *Francisella tularensis LVS a novicida* boli získané z Chorvátska a kmeň *Francisella holarctica* bol získaný z Maďarska. Izoláty boli kultivované na čokoládovom agare pri teplote 33°C po dobu 3-5 dní. Baktérie boli zozbierané do PBS, potom boli premyté dva krát, sonifikované a následne boli lyzované prečistené pomocou 2D Clean Up kitu (Invitrogen). Vzorky boli separované na 12% polyakrylamidovom gély (Invitrogen) pomocou neredukujúcej PAGE (120 V, 2 h). Proteíny boli prenesené na nitrocelulózovú membránu (30V, 1 hod) (Invitrogen).

Far-Western blotting

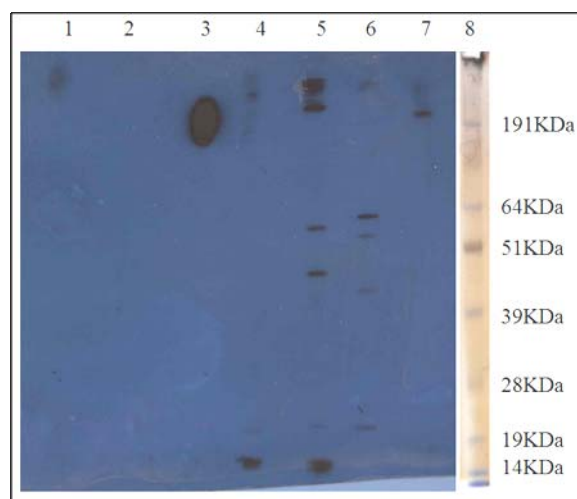
Nitrocelulózové membrány boli blokovane 2 hod v TBS pufri obsahujúcom 3% skim milk. Následne boli membrány inkubované v ľudskom sére (ako zdroj C4BP a C1inh.) riedenom

1:4 v TBS s 0,5% skim milk po dobu 1:30 hod. Membrány boli premyte dva krat TTBS s 0.05% Tween. Následne boli membrány inkubovane s primárnymi protilátkami proti C4bp (Santa-cruz biotechnologie) alebo C1inh (Santa-cruz biotechnologie) obe v riedení 1:500 v TBS s 1,5% TBS skim milk 2hod pri izbovej teplote. Membrány boli premyte dva krat TTBS s 0.05% Tween. Následne boli membrány inkubované so sekundárnou protilátkou proteín G-HRP riedenou 1:30000 (v TBS + 1,5% skim milk) po dobu 1hod. Ďalej boli membrány premyte v TTBS Skim milk 7x po 5min a následne boli inkubované 7min v chemiluminiscenčnom substráte (ECL substrate, Pierce). Chemiluminiscenčné signály boli detegované na RTG film s expozičným časom 2-20 min. Počas Far-western blottingu boli pripravené relevantné negatívne kontroly pre sérum, primárnu protilátku a sekundárnu protilátku.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

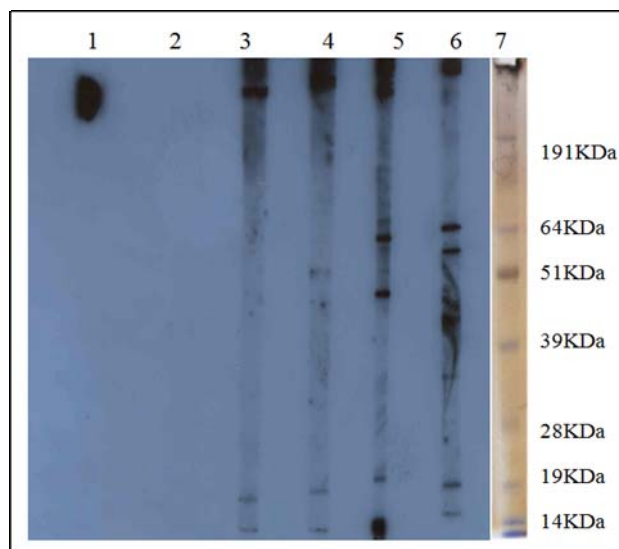
Podarilo sa nám detegovať skupinu proteínov ktoré sa líšia v rámci izolátov svojou molekulovou hmotnosťou a množstvom (Obr. 1, 2). Proteíny *Francisella tularensis* LVS veľkosti ~191,~59,~45 a~14 kDa majú výraznú afinitu k C4BP. Proteíny *Francisella novicida* o veľkosti ~64,~57 a ~42, kDa a proteín *Francisella holarctica* o veľkosti 191KDa má tiež afinitu k tomuto regulačnému faktoru. Proteíny *Francisella tularensis* LVS veľkosti ~60,~49 a ~14kDa majú výraznú afinitu k C1inh, Proteíny *Francisella novicida* o veľkosti ~64,~60,~19 a ~14, kDa a proteín *Francisella holarctica* o veľkosti ~51,~19 a~14, kDa má tiež afinitu k tomuto regulačnému faktoru. Pomocou negatívnych kontrol sme určili že nedochádza k nešpecifickým väzbám v rámci Far-western blottingu v prípade naviazania sa sekundárnej značenej protilátky priamo na proteíny Franciselly alebo naviazanie primárnej na membrány u ktoré neboli proteíny v kontakte so sérovými regulačnými faktormi komplementu. Výsledok možno považovať za vysoko špecifický s novým prínosom v rámci vysvetlenia faktorov patogenity zo strany Franciselly. *Francisella* využíva mechanizmus na naviazanie faktoru H a tým k formovaniu inaktívnej formy C3b, tiež zvanej iC3b ktorá blokuje tvorbu MAC (Ben Nasr a Klimpel, 2008). Avšak konkrétny proteín ktorý viaže tento Faktor H nebol určený. Pravdepodobne je expresovaných aj veľa ďalších proteínov so schopnosťou viazať iné regulačné faktory komplementu. Z našich výsledkov vyplýva, že *Francisella tularensis* LVS, *holarctica*, *novicida* disponujú proteínmi ktoré im napomáhajú v invadovaní do organizmu, aké štruktúry a vlastnosti majú tieto proteíny nám ukáže až detailnejšia analýza na MALDI TOF a ďalšie potrebné proteomické štúdie.

Obr. 1. Proteíny *Francisella LVS*, *novicida*, *holarctica* interagujúce s C4BP



1-negatívna kontrola bez primárnej protilátky, 2-negatívna kontrola bez sekundárnej protilátky, 3-pozitívna kontrola, 4-negatívna kontrola bez séra, 5-proteíny *Francisella LVS*, 6- proteíny *Francisella novicida*, 7-proteíny *Francisella holarctica*, 8-marker

Obr. 2. Proteíny *Francisella LVS*, *novicida*, *holarctica* interagujúce s C1inh



1-pozitívna kontrola, 2-negatívna kontrola bez séra, 3-negatívna kontrola bez primárnej protilátky, 4-proteíny *Francisella holarctica*, 5-proteíny *Francisella LVS*, 6-proteíny *Francisella novicida*, 7-marker

POĎAKOVANIE

Výskum bol podporovaný z grantových prostriedkov - VEGA- 1/0621/09, 1/0608/09.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ben Nasr, A., Klimpel, G.R., 2008, Subversion of complement activation at the bacterial surface promotes serum resistance and opsonophagocytosis of *Francisella tularensis*. *J Leukoc Biol* 84, 77-85.
- Cowley, S.C., Gray, C.J., Nano, F.E., 2000, Isolation and characterization of *Francisella novicida* mutants defective in lipopolysaccharide biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* 182, 63-67.
- Hubalek, M., Hernychova, L., Havlasova, J., Kasalova, I., Neubauerova, V., Stulik, J., Macela, A., Lundqvist, M., Larsson, P., 2003, Towards proteome database of *Francisella tularensis*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 787, 149-177.
- Huntley, J.F., Conley, P.G., Hagman, K.E., Norgard, M.V., 2007, Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins. *J Bacteriol* 189, 561-574.
- Mariathasan, S., Weiss, D.S., Dixit, V.M., Monack, D.M., 2005, Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/caspase-1 axis. *J Exp Med* 202, 1043-1049.

DETEKCIA *ENCEPHALITOOZON CUNICULI* U NOVÉHO HOSTITEĽA SOKOLA LOVECKÉHO (*FALCO RUSTICOLUS*)

Malčeková B.¹, Valenčáková, A.¹, Luptáková L.¹, Molnár L.²

¹Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVL, Košice

²Klinika vtákov, exotických a voľne žijúcich zvierat, UVL, Košice

ABSTRAKT

V ostatných rokoch sa vo väčšej miere objavujú patogénne druhy rodu *Encephalitozoon* aj u zástupcov triedy vtákov. V našej práci je opísaný laboratórny dôkaz *Encephalitozoon cuniculi* u nového hostiteľa sokola loveckého (*Falco rusticolus*) so suspektnou mikrosporidiózou. Vzorky trusu piatich sokolov sme vyšetrili na prítomnosť mikrosporidiálnych spór mikroskopickými a molekulovými analýzami. U všetkých piatich sokolov sa mikroskopicky dokázala prítomnosť spór v truse v rôznej koncentrácii. Všetky vzorky sme analyzovali pomocou polymerázovej reťazovej reakcie na priamy dôkaz parazita s použitím nešpecifických aj špecifických primerov. U dvoch sokolov sa potvrdil druh *Encephalitozoon cuniculi*, čo predstavuje objavenie nového hostiteľského druhu tohto parazita.

ÚVOD

Mikrosporídie sú jednobunkové, oportúnne parazity, ktoré sú blízke ríši húb (Fungi). Predstavujú mimoriadne rozmanitú skupinu, zahŕňajúcu viac ako 1200 druhov, parazitujúcu v širokom spektre stavovcov a bezstavovcov vrátane ľudí. Zo štyroch najbežnejších humánnych mikrosporidiálnych druhov sa najčastejšie u vtákov vyskytuje *Encephalitozoon hellem* (*E. hellem*; Haro a kol., 2005; Slodkovicz-Kowalska a kol., 2006) a v ojedinelých prípadoch sa objavili *Enterocytozoon bieneusi* (*Ent. bieneusi*; Haro a kol., 2005) a *Encephalitozoon intestinalis* (*E. intestinalis*; Haro a kol., 2005; Slodkovicz-Kowalska a kol., 2006). Prítomnosť spór *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*) u vtákov sa potvrdila len v troch zaznamenaných prípadoch, a to dva prípady u kurčiat (*Gallus gallus*; Rettz, 1993; Rettz, 1994) a jeden u korely chochlatej (*Nymphicus hollandicus*; Kašičková a kol., 2008).

E. cuniculi je jeden z najčastejšie diagnostikovaných druhov mikrosporídií prevažne u cicavcov (Štefkovič a kol., 1999). Je pôvodcom encephalitozoonózy, chronického, zvyčajne asymptomaticky prebiehajúceho ochorenia, ktoré postihuje hlavne centrálny nervový systém, tráviacu, dýchaciu a vylučovaciu sústavu. Ak je množenie parazita a imunitná odpoveď hostiteľa v rovnováhe nedochádza k manifestácii ochorenia a klinické príznaky sa objavujú až v prípade imunosupresie hostiteľského organizmu (Bálent a kol., 1995).

Naším cieľom bolo laboratórne vyšetriť 5 sokolov loveckých so suspektnou mikrosporidiózou a to priamou vizualizáciou spór v truse vtákov a potvrdenie infekčného agens metódou PCR použitím nešpecifických primerov pre kmeň *Microsporidia* a aj špecifických primerov pre druhy rodu *Encephalitozoon* (*E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. hellem*) a rodu *Enterocytozoon* (*Ent. bieneusi*).

MATERIÁL A METODIKA

Zvieratá: Vzorky trusu sa získali na Klinike vtákov, exotických a voľne žijúcich zvierat UVM v Košiciach, kde bol trus odobratý piatim sokolom loveckým (*Falco rusticolus*) s klinickými príznakmi poukazujúcimi na mikrosporidiózu, ktorí pochádzali zo súkromného chovu. Trus bol do doby vyšetrenia uložený v chladničke pri 4°C.

Spracovanie trusu: Trus bol spracovaný éterovou extrakciou podľa postupu publikovaného Van Goolom a kol. (1990). Takto spracované vzorky boli uložené v chladničke pri 4°C.

Mikroskopické analýzy: Na detekciu mikrosporídiových spór sa použila metodika farbenia spór optickým zjasňovačom Rylux (Vávra a kol., 1993) s následnou mikroskopickou

analýzou na fluorescenčnom mikroskope ZEISS JENALUMAR s 405-490 nm excitačným filtrom, 510 nm farebnými lúčmi a 550 nm bariérovým filtrom pre zelenú fluorescenciu.

Molekulové analýzy: DNA izolácia: Spóry suspendované v 1ml destilovanej vody boli podrobené mechanickej mikrovlnnej disrupcii 3 krát po 20 sekúnd (Valenčáková a kol., 2005). Pre extrakciu DNA sa použil komerčný izolačný kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) a postup bol dodržaný podľa inštrukcií výrobcu.

PCR amplifikácia: Na amplifikáciu oblastí rRNA génov veľkej (LSU rRNA) a malej ribozómovej podjednotky RNA (SSU rRNA) a ITS oblasti sme použili nešpecifické primery: forward primer 530F (5'-GTG CCA GCA GCC GCG G-3') v SSU rRNA a reverse primer 580R (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') v LSU rRNA (Weiss a kol., 1994).

Na celkový objem 50 µl sa napipetovalo 5 µl 10 x PCR Buffru, 1,5 µl MgCl₂ (50 mM), 1 µl dNTP (10 mM), 1 µl z každého z primerov (25 pmol/µl), 0,25 µl Taq DNA polymerázy (5 U/µl) a 5 µl templátu. PCR reakcia prebehla v termocykleri Techne Genius v programe: iniciálna denaturácia 5 min pri 95°C, potom nasledovalo 29 cyklov, 95°C 1 min, 55°C 1min a 72°C 1 min a finálna terminácia trvala 10 min pri 72°C.

Na druhové určenie mikrosporídií sa postupovalo podľa publikácie Valenčáková a kol. (2005) so špecifickými primerovými párami ECUNF a ECUNR, SINTF a SINTR, EHELF a EHELRL na druhy rodu *Encephalitozoon* (*E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. hellem*) a primerový pár EBIEF1 a EBIER1 pre *Ent. bienewisi*.

PCR produkty boli analyzované použitím elektroforézy v 1% agarózovom géle ofarbenom etídiom-bromidom a pozorované pod UV lampou. Veľkosti fragmentov amplifikovaných produktov sme porovnali so štandardom 100 bp DN Ladder, ktorý obsahoval fragmenty známej veľkosti.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vzorok trusu získané od sokolov loveckých boli mikroskopickou a molekulovou analýzou vyšetrené na prítomnosť mikrosporídií.

Mikroskopickou analýzou sa vo všetkých piatich vzorkách dokázala prítomnosť jasne fluoreskujúcich oválnych útvarov veľkosti 1,5 x 3 µm, ktoré sú charakteristické pre kmeň *Microsporidia*. Po vykonaní klasickej PCR metódy s použitím nešpecifických a špecifických primerov sa potvrdila prítomnosť spór *E. cuniculi* v dvoch vzorkách, čo mohlo byť spôsobené nízkou koncentráciou spór v ostatných vzorkách trusu (Notermans a kol., 2005). Primerový pár vytvoril fragment veľkosti okolo 1350 bp charakteristický pre *E. intestinalis*, *E. cuniculi* a *E. hellem*. Pozitívna reakcia bola zaznamenaná pri druhovo-špecifických primeroch ECUNR a ECUNF (*E. cuniculi*), kde sa vizualizoval fragment o veľkosti 550 bp.

Na základe dostupných informácií sa doteraz u vtákov objavil vo viacerých prípadoch len *E. hellem*, ale v ostatných rokoch sa ojedinele zaznamenala prítomnosť aj *E. intestinalis* a *Ent. bienewisi*. V deväťdesiatych rokoch Reetz zachytil prítomnosť spór *E. cuniculi* u kurčiat (*Gallus gallus*). Počas krátkeho obdobia, u štyroch 10-mesačných kurčiat sa rozvinuli nešpecifické klinické príznaky zahŕňajúce apatiu, mierne hnačky a stratu hmotnosti. Imunohistochemickými metódami bola zistená prítomnosť mikrosporídií, pravdepodobne *E. cuniculi*. Ďalšími vyšetreniami sa potvrdila prítomnosť mikrosporídií aj vo vzorkách od kohúta a deviatich sliepok (Reetz, 1993).

V roku 1994 Reetz vyšetroval 100 embryí kurčiat na prítomnosť prirodzene sa vyskytujúcej infekcie *E. cuniculi*. Dve embryá boli mŕtve a ďalšie sa utratili v osemdesiatom dni života. *E. cuniculi* sa našiel asi v 40% embryí, avšak aj toto vyšetrenie bolo založené na imunohistochemických metódach, pričom problém týchto metód je, že sú nedostačujúce pri druhovej diferenciacii, keďže spóry rodu *Encephalitozoon spp.* sú morfológicky rozlíšiteľné iba elektrónovou mikroskopiou alebo analýzou DNA (Reetz, 1994).

V roku 2008 sa Kašíčková a kol. zamerali na skriningové vyšetrenie prítomnosti humánných mikrosporídií u rôznych druhov vtákov chovaných v zajatí a vtákov voľne žijúcich v Českej republike (n=123). Polymerázovou reťazovou reakciou a následným sekvenovaním zistili vo vzorkách trusu patogén *E. cuniculi* genotypu III u korely chochlatej (*Nymphicus hollandicus*), ktorá predstavuje nový vtáči hostiteľský druh dokázaný PCR metódou.

Na základe doterajších údajov sa u dravcov, konkrétne sokolov identifikoval jedine *Ent. bienersi*. V tomto prípade zo 137 sokolov sa u 6 vtákov dokázali spóry *Ent. bienersi* PCR metódou a následným sekvenovaním sa určil genotyp D. Müller a kol. (2008) sa domnievali, že sokoly sa infikovali od holubov žijúcich v rovnakej farme, kde sa holuby používali ako potrava pre sokolov. Prítomnosť spór *Ent. bienersi* u holubov potvrdili viacerí autori (Haro a kol., 2005; Bart a kol., 2008). Jednou z ďalších zdrojov infekcie môže byť aj voda vodných nádrží a jazier, ktorá je znečistená trusom vodného vtáctva bohatého na mikrosporidiové spóry čo opísal kolektív Slodkovicz-Kowalska a kol. (2006).

Spóry *E. cuniculi* sú vysoko odolné v environmentálnom prostredí hlavne vo vode a dokážu prežiť aj niekoľko mesiacov až rokov, takže priamy kontakt zvierat alebo ľudí nie je potrebný na infikovanie nového hostiteľa. Okrem vodného zdroja infekcie sa sokoly môžu infikovať aj vzduchom prostredníctvom spór prítomných v aerosólovej forme z vysušeného trusu vo voliérach.

Encefalitozoonóza spôsobená *E. cuniculi* predstavuje nové parazitárne ochorenie u sokolov. Zoonotický potenciál *E. cuniculi* bol potvrdený viacerými autormi (Mathis a kol., 2005), čo by malo byť brané do úvahy u sokoliarov žijúcich v úzkom kontakte so svojimi sokolmi, keďže je tu riziko prenosu infekcie.

V našej práci sme prvýkrát u sokola loveckého (*Falco rusticolus*) dokázali prítomnosť mikrosporídie *E. cuniculi* použitím nešpecifických primerov a špecifických primerov.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola riešená v rámci grantových projektov VEGA MŠ SR No. 1/4384/07, No. 1/0263/09 and No. 1/0412/09.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bálent P, Kolodzieyski L, Hipíková V. Encefalitozoonóza – aktuálne ochorenie králikov aj na Slovensku. Slov. vet. čas. 1995; 20(2):81-83.
- Bart A, Wentink-Bonnema E M, Heddema E R, Buijs J, van Gool T. Frequent occurrence of human-associated microsporidia in fecal droppings of urban pigeons in amsterdam, the Netherlands. Applied and environmental microbiology. 2008; 74(22):7056-8.
- van Gool T, Hollister W S, Schattenkerk W E, Van den Bergh Weerman M A, Terpstra W J, van Ketel R J, Reiss P, Canning E U. Diagnosis of *Enterocytozoon bienersi* microsporidiosis in AIDS patients by recovery of spores from faeces. Lancet. 1990; 336(8716):697-8.
- Haro M, Izquierdo F, Henriques-Gil N, Andrés I, Alonso F, Fenoy S, del Aguila C. First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. Applied and environmental microbiology. 2005; 71(6):3153-7.
- Kasickova D, Sak B, Kvac M, Ditrich O. Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host-cockateel (*Nymphicus hollandicus*) using molecular methods. Par. Res. 2007; 101:1685-1688.
- Mathis A, Rainer W, Deplazes P. Zoonotic potential of the Microsporidia. Clinical Microbiology Reviews. 2005; 18(3):423-445.
- Müller M G, Kinne J, Schuster R K, Walochnik J. Outbreak of microsporidiosis caused by *Enterocytozoon bienersi* in falcons. Veterinary parasitology. 2008; 152(1-2):67-78.
- Notermans D W, Peek R, de Jong M D, Wentink-Bonnema E M, Boom R, van Gool T. Detection and identification of *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon* species in stool and urine specimens by PCR and differential hybridization. J Clin. Microbiol. 2005; 43(2):610-614.
- Reetz J. Naturally-acquired microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) infections in hens. Tierarztl Prax. 1993; 21:429-435.

- Reetz J. Natural transmission of microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) by way of the chicken egg. Tierarztl Prax. 1994; 22:147-150.
- Slodkowicz-Kowalska A, Graczyk T K, Tamang L, Jedrzejewski S, Nowosad A, Zduniak P, Solarczyk P, Girouard A S, Majewska A C. Microsporidian species known to infect humans are present in aquatic birds: implications for transmission via water? Appl Environ Microbiol. 2006; 72:4540-4544.
- Štefkovič M, Halánová M, Bálent P, Horváth M, Levkutová M, Hipíková V, el Naas A, Jurčina A. Súčasná možnosť diagnostiky encefalitozoonózy u zvierat. I. In: Infort. 1999; 6(1):38-40.
- Valenčáková A, Bálent P, Novotný F, Číslaková L. Application of specific primers in the diagnosis of *Encephalitozoon* spp. Ann Agric Environ Med. 2005; 12:1-3.
- Vávra J, Dahbiová R, Hollister W S, Canning E U. Staining of microsporidian spores by optical brighteners with remarks on the use of brighteners for the diagnosis of AIDS associated human microsporidiosis. Folia parasitologica. 1993; 40(4):267-72.
- Weiss L M, Zhu X, Cali A, Tanowitz H B, Wittner M. Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny. Folia Parasitol. 1994; 41:81-90.

VÝSKYT RIZIKOVÝCH PRVKOV U VOĽNE ŽIJÚCEJ ZVERI

Maľová J., Ciberej J., Oberhauserová K., Kiš O.

Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, UVL, Košice

Katedra výživy, dijetiky a chovu zvierat, UVL, Košice

ABSTRAKT

Ťažké kovy sú environmentálne polutanty, ktoré majú nebezpečný toxický účinok na organizmus zvierat a človeka. Cirkulujú medzi biotickými a abiotickými zložkami v prírodnom prostredí ako sú napríklad aj niektoré oblasti Slovenska. Cieľom práce bolo stanovenie koncentrácií rizikových prvkov (ortuť, kadmium, olovo, arzén, chróm, nikel, meď) v parenchymatóznych orgánoch zajacov poľných (*Lepus europaeus*) a diviakov lesných (*Sus scrofa*) a porovnať ich s platnými limitmi uvedenými v Potravinovom kódexe SR, aby sme získali väčší prehľad o hladinách cudzorodých látok a prieniku kontaminantov u vybraných druhov poľovnej a voľne žijúcej zveri. Okrem získaných podkladov sa získa aj širšia databáza údajov o produktoch živočíšneho pôvodu.

Orgány (pečeň, pľúca, sval) sme získavali z poľovačiek v sezóne r. 2007, 2008, prípadne z uhynutých zvierat v oblasti južného Zemplína. Obsahy sledovaných prvkov boli analyzované na atómovom absorpčnom spektrometri vykonané v akreditovanom laboratóriu ŠVPÚ v Košiciach. Najvyššie koncentrácie boli stanovené v dvoch vzorkách zajacov – v pľúcach (olovo - 2,414 mg/kg) a v srdcovom svale (nikel - 1,083 mg/kg) a v troch vzorkách diviakov – v pečeni (kadmium - 0,574 mg/kg; 0,503 mg/kg a nikel - 0,872 mg/kg).

ÚVOD

Monitoring rizikových prvkov každý rok zahŕňa sledovanie možnej kontaminácie potravín, krmív a surovín určených k ich výrobe, vrátane biomonitoringu. Zároveň sú sledované i zložky prostredia, ktoré túto kontamináciu môžu spôsobiť alebo ovplyvniť a ktorá rastie úmerne s intenzifikáciou a chemizáciou priemyselnej a poľnohospodárskej výroby.

Voľne žijúca zver na rozdiel od hospodárskych zvierat je vystavená vplyvom vonkajšieho prostredia počas celého roka. Respiračnou cestou zo vzduchu a jednak príjmom kontaminovaného krmiva dochádza k zvýšenej kumulácii rizikových prvkov v orgánoch a tkanivách (Kováč a kol. 2005). Na minimalizovanie ich výskytu v potravinách sú potrebné osobitné opatrenia v celom potravinovom reťazci. K úspešnému posúdeniu senzorickej kvality mäsa je potrebná tiež určitá skúsenosť poznania vlastností skúmaného objektu, ktorú môžeme hodnotiť z dvoch pohľadov - z pohľadu legislatívy a z pohľadu spotrebiteľského, pričom však väčší dôraz sa kladie na zisťovanie malých rozdielov organoleptických vlastností (Príbela a kol., 2001).

Naším cieľom je získanie prehľadu o hladinách cudzorodých látok a prieniku kontaminantov u vybraných druhov poľovnej a voľne žijúcej zveri. Okrem získaných podkladov sa získa aj širšia databáza údajov o produktoch živočíšneho pôvodu.

MATERIÁL A METODIKA

V práci sme sa zamerali na sledovanie prítomnosti koncentrácie ortute, kadmia, arzenu, olova, chrómu, niklu a medi kumulovaných v organizme zajaca poľného a diviaka lesného v odobratých parenchymatóznych orgánoch - pečeni, pľúcach a vo svalovine srdca v oblasti južného Zemplína. Orgány zajacov a diviakov sme získavali z poľovačiek v sezóne r. 2007, 2008, prípadne z uhynutých zvierat. Vybraté boli orgány bez patologických zmien, ktoré neboli zasiahnuté brokmi. Obsahy sledovaných prvkov boli analyzované na atómovom absorpčnom spektrometri na priame stanovenie ortute (AMA), s grafitovou kvetou na stanovenie kadmia, olova, arzenu, chrómu, niklu (AASG) a s plameňom na stanovenie medi (AASF), vykonané v akreditovanom laboratóriu ŠVPÚ v Košiciach.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zistené hodnoty obsahu rizikových prvkov (chemických prvkov) sme porovnali s platnými limitmi, ktoré sú uvedené v 10. hlave, druhej časti Potravinového kódexu SR (PK SR, 1995, Výnos 18558/2006). Stanovené koncentrácie vo vzorkách sú uvedené v tabuľke 1, 2.

Tab. 1. Prehľad hladín stanovovaných rizikových prvkov u voľne žijúcich zajacov v oblasti južného Zemplína

<i>Stanovovaný prvok (mg/kg)</i>								
<i>Vzorka č./materiál</i>	<i>ortuť</i>	<i>kadmium</i>	<i>olovo</i>	<i>arzén</i>	<i>chróm</i>	<i>nikel</i>	<i>meď</i>	
1	srdce	<0,002	0,001	0,044	<0,030	0,120	0,059	2,200
2	srdce	<0,002	0,001	0,026	<0,030	0,087	0,059	2,086
3	srdce	<0,002	0,003	0,044	<0,030	0,147	0,293	2,396
4	srdce	<0,002	0,004	0,038	<0,030	0,143	0,062	2,382
5	srdce	<0,002	0,002	0,047	<0,030	0,182	↑ 1,083	2,460
6	srdce	<0,002	0,003	0,046	<0,030	0,168	0,106	2,399
7	srdce	0,001	0,001	0,049	0,004	0,048	0,091	1,332
8	srdce	0,001	0,001	0,011	<0,002	0,055	0,059	1,223
9	srdce	0,001	0,001	0,017	0,002	0,028	0,127	0,918
10	pečeň	<0,002	0,151	0,109	<0,030	0,109	0,340	2,429
11	pečeň	<0,002	0,089	0,062	<0,030	0,177	0,087	2,069
12	pečeň	0,002	0,019	0,088	<0,030	0,176	0,095	2,310
13	pečeň	0,003	0,240	0,060	<0,030	0,105	0,034	1,845
14	pečeň	<0,002	0,033	0,045	<0,030	0,076	0,050	2,378
15	pečeň	0,005	0,029	0,065	<0,030	0,146	0,069	2,227
16	pečeň	0,027	0,026	0,051	<0,001	-	-	1,897
17	pečeň	0,030	0,032	0,057	0,008	-	-	2,283
18	pečeň	0,066	0,128	0,088	<0,001	-	-	3,433
19	pečeň	0,012	0,053	0,044	<0,001	-	-	1,840
20	pečeň	0,060	0,230	0,028	<0,001	-	-	1,553
21	pečeň	0,012	0,015	0,087	<0,001	-	-	2,087
22	pečeň	0,035	0,184	0,064	<0,001	-	-	1,573
23	pečeň	0,003	0,018	0,067	<0,001	-	-	1,398
24	pľúca	-	-	0,043	-	-	-	-
25	pľúca	-	-	0,060	-	-	-	-
26	pľúca	-	-	0,052	-	-	-	-
27	pľúca	-	-	0,119	-	-	-	-
28	pľúca	-	-	↑ 2,414	-	-	-	-
29	pľúca	-	-	0,036	-	-	-	-
30	pľúca	-	-	0,056	-	-	-	-

Tab. 2. Prehľad hladín stanovovaných rizikových prvkov u diviakov v oblasti južného Zemplína

<i>Rok 2008 Vzorka č./ materiál</i>										
<i>Stanovovaný prvok (mg/kg)</i>	<i>1 sval</i>	<i>2 sval</i>	<i>3 sval</i>	<i>4 sval</i>	<i>5 sval</i>	<i>6 pečeň</i>	<i>7 pečeň</i>	<i>8 pečeň</i>	<i>9 pečeň</i>	<i>10 pečeň</i>
<i>Cd</i>	0,030	0,026	0,025	0,032	0,024	↑ 0,574	0,456	0,451	0,398	↑ 0,503
<i>Pb</i>	0,058	<0,001	0,054	0,049	0,056	0,149	0,106	0,122	0,110	0,136
<i>Cu</i>	0,220	0,102	0,276	0,229	0,175	1,294	0,937	0,524	0,474	0,881
<i>Hg</i>	0,002	0,002	0,010	0,002	0,002	0,008	0,008	0,034	0,005	0,028
<i>As</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>Cr</i>	0,101	0,081	0,011	0,094	0,040	0,404	0,113	0,138	0,122	0,205
<i>Ni</i>	0,118	0,145	0,115	0,117	0,113	0,349	0,191	↑ 0,872	0,170	0,241

Pri porovnaní zistených výsledkov s platnými limitmi sme zistili u zajacov prekročenie v dvoch prípadoch. Zvýšená hladina olova bola v pľúcach (2,414 mg/kg) u vzorky číslo 28 a niklu v srdci (1,083 mg/kg) u vzorky číslo 5, v ktorej bol limit mierne prekročený. Stanovené koncentrácie v ostatných vzorkách sú uvedené v tabuľke 1.

U diviakov sme zistili prekročenie v troch prípadoch. bola zvýšená hladina Cd v pečeni u vzorky číslo 6 (0,574 mg/kg) a u vzorky číslo 10 (0,503 mg/kg), v ktorej bol limit mierne prekročený a tiež hladina Ni v pečeni u vzorky číslo 8 (0,872 mg/kg).

Uvádzané výsledky za r. 2008 nesignalizujú zlú situáciu a nebol preukázaný vzostupný trend v danej oblasti. Výsledky poukazujú, že koncentrácie rizikových prvkov u zajacov a diviakov v sledovanej oblasti sa pohybujú v rámci noriem.

Z výsledkov analýz vyplýva, že päť vzoriek zo štyridsať vykázali hladiny nad povolený hygienický limit. Výrazne sa znížil obsah kadmia, olova, meďi oproti predchádzajúcim rokom. Predpokladáme, že pokles intenzívnej poľnohospodárskej výroby a používanie bezolovnatých pohonných hmôt prispeli k zníženiu cudzorodých látok v orgánoch diviacej zveri, čo môže priaznivo vplyvať na ich zdravotný stav a reprodukciu.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom VEGA 1/4395/07.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Kováč, G., Jesenská, M., Seidel, H., Nagy, O., Húska, M., Link, R.: Koncentrácia kadmia, arzenu a olova vo vybraných tkanivách jelenej a diviacej zveri. Rizikové faktory potravinového reťazca V. – 2005; Nitra, s. 157-161.

Príbela, A., Maľa, P., Sabolová, G., Turek, P., Máté, D., Baranová, M., Nagy, J.: Senzorické hodnotenie potravinárskych surovín, aditívnych látok a výrobkov. IVVL, Košice, 2001; s. 104-106, ISBN 80-968464-6-9.

Potravinový kódex SR, 1995, Výnos 18558/2006-SL z 11.9.2006

JE TOTÁLNA ISCHÉMIA MOZGU SKUTOČNE TOTÁLNOU ISCHÉMIOU?

Maženský D.¹, Petrovová E.¹, Luptáková L.²

¹Ústav anatómie, UVL, Košice

²Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVL, Košice

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo zistiť, či ligáciou veľkých ciev sa dokáže skutočne navodiť totálna ischémia mozgu. Sledovali sme morfológické variácie v odstupe a priebehu *a. vertebralis* ako jednej z ciev podieľajúcich sa na krvnom zásobovaní mozgu. Štúdium sme vykonávali na päťdesiatich dospelých králikoch plemena novozélandsky biely králik. Pripravili sme korozívne preparáty arteriálneho systému pomocou Duracrylu Dental[®]. Zistili sme nepravidelnosť v odstupe a priebehu *a. vertebralis*. Celkovo obojstranne variabilný odstup *a. vertebralis* sme zaznamenali v 12 % prípadov. Na základe našich výsledkov môžeme konštatovať, že ligáciou veľkých ciev t.j. *truncus brachiocephalicus* a *a. subclavia sinistra* nemusí byť navodená úplná ischémia mozgu.

ÚVOD

Ischémia je miestna nedokrvenosť tkaniva alebo orgánu, ktorá vedie k ich poškodeniu až odumretiu. Jej podstatou je nedostatok kyslíka a živín v tkanive spojený s hromadením odpadových produktov (Vokurka a Hugo, 2006). Chirurgicky navodená totálna ischémia mozgu je objektom skúmania vzniknutých patologických zmien nervového tkaniva CNS ako aj účinku rôznych látok na takto zmenené tkanivo.

Truncus brachiocephalicus a *a. subclavia sinistra* sú samostatnými vetvami vznikajúcimi z *arcus aortae*. *Truncus brachiocephalicus* sa končí rozdelením na *truncus bicaroticus*, ktorý tvorí v podstate jeho priame pokračovanie a na *a. subclavia dextra*. Z *truncus bicaroticus* odstupujú obojstranné *aa. carotes communes*, ktoré sú hlavnými tepnami zásobujúcimi krvou podstatnú časť hlavy.

Druhou tepnou podieľajúcou sa na krvení mozgu je *a. vertebralis*, ktorá je vetvou *a. subclavia*. Z hrudníkovej dutiny vychádza cez *apertura thoracis cranialis*. Následne cez *foramen transversarium* šiesteho krčného stavca vstupuje do *canalis transversarius* krčných stavcov, v ktorom pokračuje kraniálnym smerom. Jej *rr. spinales* vyživujú krčnú miechu. Cez *foramen vertebrale laterale atlantis* sa dostávajú obojstranné *aa. vertebrales* do miechového kanála, na dne ktorého sa spájajú do jednotnej *a. basilaris*. *A. basilaris* sa zúčastňuje na formovaní *circulus arteriosus cerebri*.

V našej práci sme sa študovali odstup *a. vertebralis* na korozívnych preparátoch ako jednej z ciev podieľajúcich sa na krvnom zásobovaní mozgu.

MATERIÁL A METÓDY

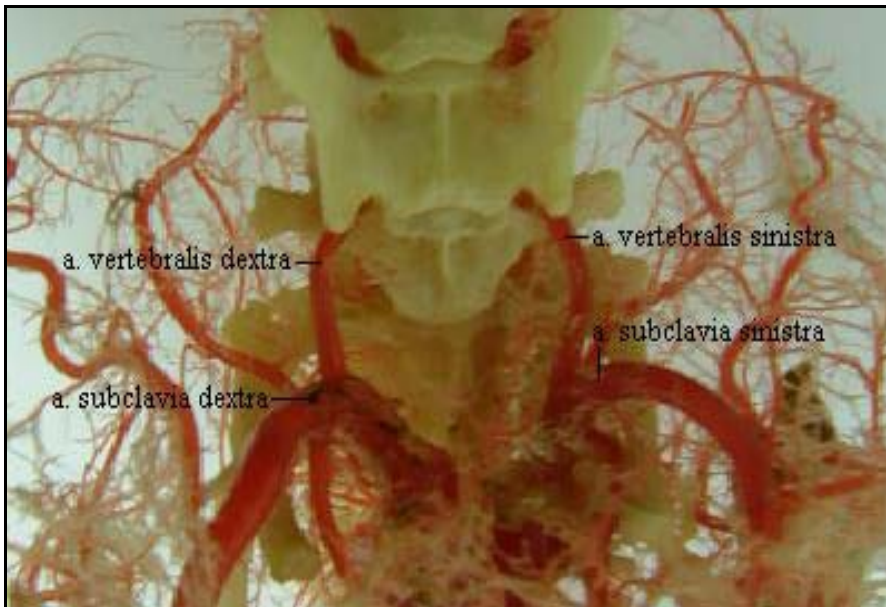
Na štúdium bolo použitých päťdesiat zdravých králikov plemena novozélandsky biely králik oboch pohlaví vážiacich 2.5-3 kg. Zvieratá boli anestetizované inhalačne pomocou éteru. Následne po vypreparovaní ľavej srdcovej komory bol perfúzaný arteriálny systém fyziologickým roztokom. Za účelom prevedenia kvalitného nástreku a odtoku perfúzneho média bola otvorená pravá predsieň. Ako nástreková látka bol použitý Duracryl Dental[®]. Macerácia bola vykonaná v 2-4 % roztoku KOH po dobu 2-3 dní. V práci bola použitá posledná veterinárna anatomická nomenklatúra.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

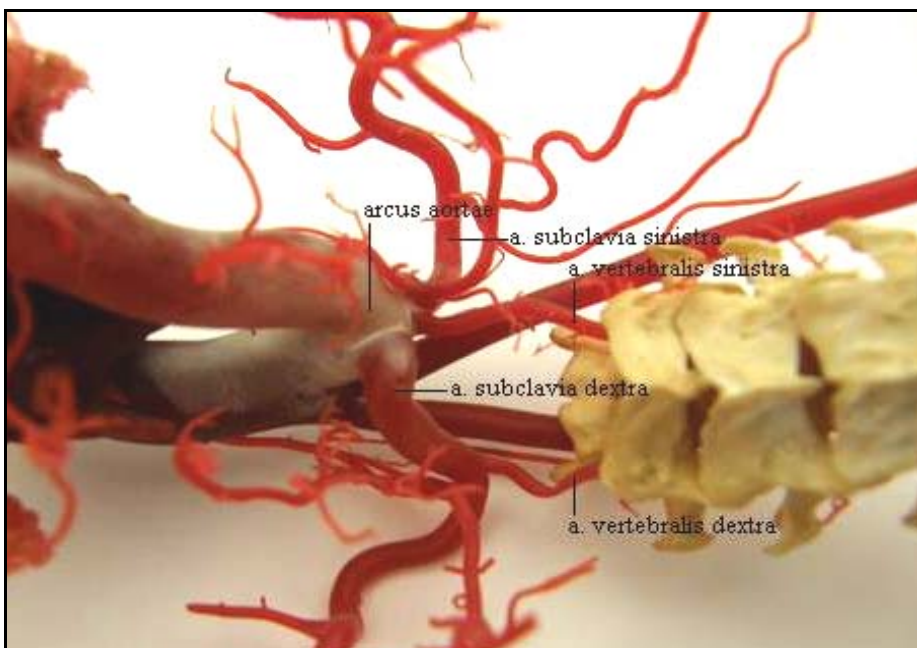
V 86 % odstupovala *a. vertebralis sinistra* priamo z *a. subclavia sinistra*. V 10 % odstupovala z *arcus aortae* ako samostatná vetva a v 4 % odstupovala spoločným odstupovým kmeňom s *a. scapularis descendens* z *arcus aortae*. *A. vertebralis dextra* v 98 % odstupovala z *a.*

subclavia dextra. V jednom prípade sme zistili *a. vertebralis dextra* v dvojnásobnom počte s dvoma rôznymi odstupmi. *A. vertebralis dextra I* odstupuje z *a. subclavia dextra* a *a. vertebralis dextra II* zo spoločného odstupového kmeňa s *a. cervicalis superficialis*, ktorý odstupuje z *a. carotis communis dextra*. Po krátkom priebehu sa spájajú do jednotnej cievy medzi piatym a šiestym krčným stavcom, ktorá vstupuje do *canalis transversarius* krčných stavcov v úrovni piateho krčného stavca. Celkovo variabilný odstup *a. vertebralis* sme zaznamenali v 12 % prípadov.

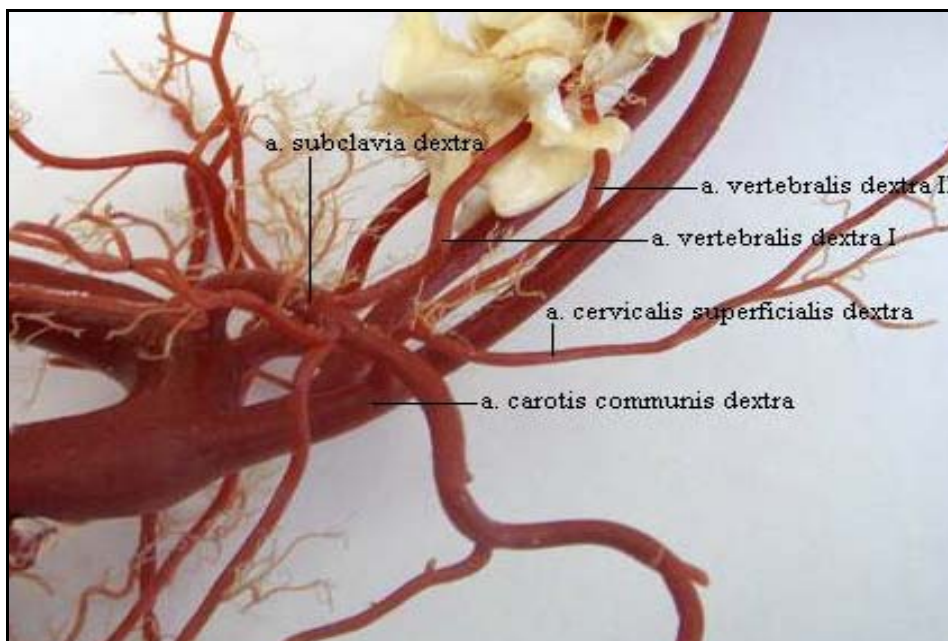
Obr. 1. Typický odstup *aa. vertebrales* z *aa. subclaviae*



Obr. 2. Odstup *a. vertebralis sinistra* z *arcus aortae*



Obr. 3. Dva *aa. vertebrales dextrae* s dvoma rôznymi odstupmi a ich spojenie do jednej cievy



Doposiaľ bolo v literatúre zmieňované len o takmer uniformnom odstupe *a. vertebralis* z *a. subclavia* (Nejedlý, 1967; Popesko a kol., 1990). Bola publikovaná len jedna práca opisujúca variabilitu v odstupe *a. vertebralis dextra*, ktorá odstupovala spoločným kmeňom s *a. cervicalis superficialis* z *a. carotis communis dextra* až v 7 % prípadov (Vdoviaková, 2007). Prác zaoberajúcich sa totálnou ischémiou mozgu u kráľika a iných laboratórnych zvierat s následným patologickými a patofyziologickými zmenami, ako aj vplyvu rôznych chemických látok bolo publikovaných mnohonásobne viac.

Vynára sa tu však otázka o správnom spôsobe vykonávanie totálnej ischémie mozgu. Najčastejšie bola vykonávaná ligáciou veľkých ciev: *truncus brachiocephalicus* a *a. subclavia sinistra* v mieste ich odstupe (Pluta, 1987; Hossmann, 1998; Iwama a kol., 2000). Harukuni a kol. (2006) taktiež uvádza ligáciu *truncus brachiocephalicus* a *a. subclavia sinistra* ako jednu z možností navodenia totálnej ischémie u mozgu. Avšak takýto spôsob navodenia totálnej ischémie vedie k dosiahnutiu nie úplnej, ale iba čiastočnej ischémie mozgu. Aj keď tieto práce boli vykonávané na určitom štatistickom súbore môže to viesť k skresleným výsledkom, ktorých pravdepodobnosť je aspoň 12 %, čo je zhodné s atypickým odstupom *a. vertebralis*. Z toho vyplýva potreba vykonávať túto ligáciu pred terminálnym vstupom magistralnej cievy alebo ciev do cieľeného orgánu v tomto prípade mozgu. Druhým spôsobom je detailná preparácia uvedených ciev za účelom vylúčenia abnormalít v ich odstupe ak sa vykonáva ligácia v mieste ich odstupe.

Týmto sme sa snažili poukázať na potrebu detailných znalostí krvenia u laboratórnych zvierat. To napomôže k dosiahnutiu objektívnejších výsledkov pri vykonávaní nespočetného množstva pokusov na laboratórnych zvieratách.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Harukuni I, Bhardwaj A. Mechanisms of Brain Injury after Global Cerebral Ischemia. *Neurol Clin.* 2006; 24:1-21.
- Hossmann K A. Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovascular Research.* 1998; 39(1):106-120.

- Iwama H, Akama Y, Tase C. Global brain ischemia produced by clamping left subclavian artery and bicarotid trunk in the rabbit. *Am J of Emerg Med.* 2000; 18(1):31-35.
- Nejedlý K. *Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat.* Praha: SPN; 1965:465.
- Pluta R. Resuscitation of the rabbit brain after acute complete ischemia lasting up to one hour: pathophysiological and pathomorphological observations. *Resuscitation* 1987; 15(4):267-287.
- Popesko P. *Atlas anatomie malých laboratorních zvířat.* Bratislava: Príroda; 1990:26.
- Vdoviaková K. Morfologické variácie truncus costocervicalis sinister, arteria intercostalis suprema sinistra, arteria cervicalis superficialis dextra u králíka. *Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu 2.* 2007:120-122.
- Vokurka M, Hugo J. *Velký lékařský slovník.* Praha: Maxdorf; 2006:386.

KOMPARÁCIA HOMOLOGICKÝCH ÚSEKOV GENÓMU ZVIERAT METÓDOU FISH A G-PRŮŽKOVANIA

Mesarč M., Dianovský J.

Katedra biológie a genetiky, UVL, Košice

ABSTRAKT

Štandardná analýza chromozómov domácich zvierat bola vo všeobecnosti veľmi ťažká a náročná. Napr. všetky autozómy hovädzieho dobytku, kozy a psa, ako aj väčšina autozómov u oviec a 36 autozómov u koňa či 12 autozómov u ošípanej sú akrocentrické, sú podobnej veľkosti, a tak konvenčnými metódami je obtiažne ich medzi sebou rozoznať. Táto skutočnosť limitovala využitie veterinárnej cytogenetiky až do zavedenia prúžkovacích metód a hlavne fluorescenčnej *in situ* hybridizácie – FISH. Cieľom tohoto experimentu je porovnať homologické úseky genómu príbuzných zvierat pomocou fluorescenčne značených sond po predchádzajúcom opracovaní preparátov trypsínom.

ÚVOD

Informácie o vzájomných vzťahoch karyotypov rôznych druhov sú základným predpokladom pre poznanie ich fylogeny a rekonštrukciu karyotypu ich spoločného predka (Chowdary a kol., 1998). Pre tento účel boli v minulosti používané prúžkovacie techniky chromozómov v rôznom štádiu ich kondenzácie. Tieto metódy umožnili vizualizovať jasné a jednoznačné karyotypy, ktoré boli následne štandardizované (Ford a kol., 1980; CSKDP, 1988; ISCND, 1990; CSKBB, 1994; Switonski a kol., 1996; Texas Nomenclature, 1996; ISCNH, 1997; ISCND, 2001; Hayes a kol., 2002).

Prúžkovacie techniky boli najskôr vyvinuté na identifikáciu ľudských chromozómov a neskôr adaptované na ďalšie druhy cicavcov. Prvé porovnanie chromozómových G pruhov medzi prežúvavcami boli prezentované Evansom a kol. (1973). Tento autor našiel za pomoci pruhov homologické úseky medzi chromozómami hovädzieho dobytku, ovce a kozy a potvrdil tak Wursterovu a Benirschkého hypotézu (1968) o spoločnom predkovi všetkých prežúvavcov (Iannuzzi a kol., 1995). Niektoré chromozómy sú malé a pri štandardnom postupe prúžkovania nedávajú dostatočný počet pruhov pre ich identifikáciu. Z toho dôvodu boli vyvinuté tzv. vysoko rozlišovacie prúžkovacie techniky, ktoré umožňujú v karyotype identifikovať od 400 až do 1260 pruhov. Takéto rozlíšenie viedlo ku vzniku mikrocytogenetiky.

V 80-tych rokoch minulého storočia bola vyvinutá ďalšia dokonalejšia metóda identifikácie chromozómov - fluorescenčná *in situ* hybridizácia. Zatiaľ čo bežnými prúžkovacími technikami možno identifikovať oblasti o veľkosti 2000-3000kb, pri použití fluorescenčných sond detekujeme oblasti menšie ako 0,5kb (McNeil a kol., 2000). Princípom FISH techniky pozostávajúcej z niekoľkých krokov je hybridizácia fluorescenčne značenej sondy s cieľovým miestom na chromozóme. SONDY používané pri FISH sú vysoko špecifické pre určitú DNA sekvenciu a podľa cieľového miesta ich naviazania rozlišujeme štyri základné typy sond: satelitné, celochromozómové, genómové a sondy pre unikátne sekvencie.

V priebehu evolúcie sa od spoločného predka na jeho potomkov a príbuzné druhy prenášajú časti genómu v podobe homologických sekvencií genetického materiálu. Medzidruhová *in situ* hybridizácia umožňuje študovať evolúciu karyotypu a genómu. Táto technika sa označuje ako ZOO FISH. Použitie ZOO FISH odhalilo nasledujúce skutočnosti. Vo filogenéze došlo k zachovaniu celých chromozómov, veľkých chromozómových blokov alebo k zachovaniu synténnych spojení u príbuzných druhov (Robinson a kol., 2006).

Táto práca prináša pohľad na techniky, ktorými možno odhaľovať u príbuzných druhov homologické časti chromozómov. Medzi takéto techniky patrí fluorescenčná *in situ* hybridizácia a prúžkovacie techniky.

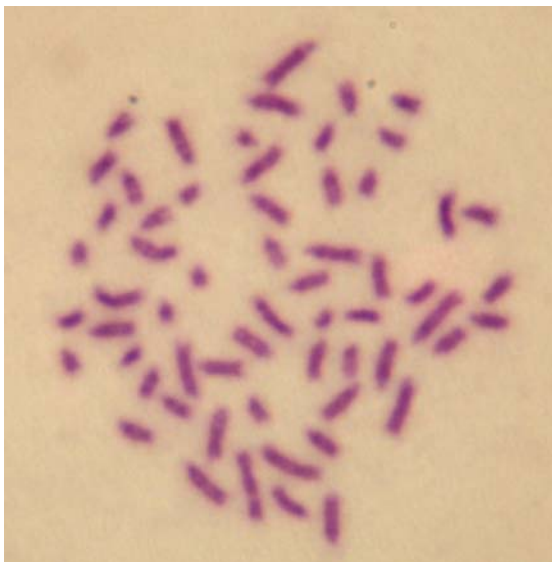
MATERIÁL A METODIKA

K pokusu bola použitá krv mladého hovädzieho dobytku (*Bos taurus*, $2n=60$), ktorá bola kultivovaná pri 37°C počas 72 hodín. 90 minút pred ukončením kultivácie bol do média pridaný kolchicín, čím stúpol v bunkovej kultúre počet buniek zablokovaných v štádiu metafázy. Pred G-pruhovaním sa vopred pripravené preparáty nechali týždeň stáť pri izbovej teplote. Na pruhovanie sa použil 4°C , 0,01% trypsín po dobu 90 sekúnd. Následne sa preparát premyl v Sörensovom pufrí (pH 6,8) a bol ofarbený 5% roztokom Giemsovho farbiva po dobu 8 minút. G-prúžky na vybraných metafázach boli potom odfotografované pri stonásobnom zväčšení.

Po ofarbení preparátu v alkoholovej rade bola vykonaná fluorescenčná *in situ* hybridizácia podľa modifikovaného protokolu. Pod fluorescenčným mikroskopom boli opätovne odfotografované metafázy, na ktorých boli predtým G-pruhy.

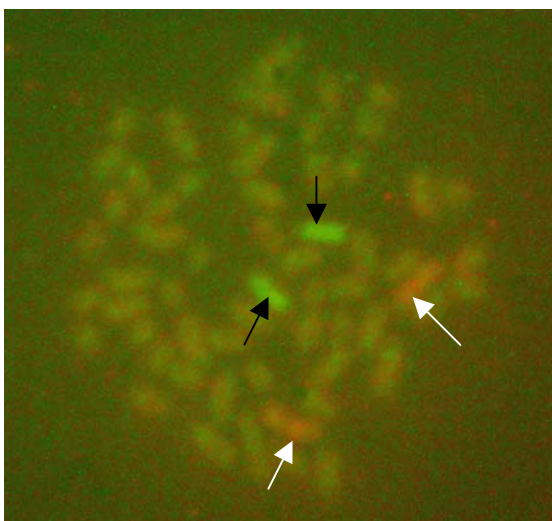
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na metafázických chromozómoch hovädzieho dobytku (*Bos taurus*, $2n=60$) sme vykonali G-prúžkovanie (obr.1). Metafázy dobrej kvality boli odfotografované a následne po ofarbení preparátov bola vykonaná fluorescenčná *in situ* hybridizácia (obr.2) podľa upraveného protokolu, pretože je veľa kritických bodov, ktoré sa vyskytnú počas aplikácie sondy na pred-



Obr.1.

G-pruhy na metafázických chromozómoch hovädzieho dobytku.



Obr.2.

FISH na metafázických chromozómoch hovädzieho dobytku. Červenou je označený chromozóm č.1 (biela šípka), zelenou je označený chromozóm č.2 (čierna šípka).

tým pruhované chromozómy (Gerdes a kol.,1997). Hybridizačná zmes pozostávala z dvoch sond na prvý a piaty chromozóm. Náš ZOO-FISH experiment je však zatiaľ obmedzený len na jeden druh zvierat, preto máme len minimum informácií týkajúcich sa homologických úsekov s inými príbuznými druhmi. Experiment bude rozšírený o ďalšie vybrané prežúvavce, ovce a kozy, na chromozómy ktorých budú hybridizované sondy hovädzieho dobytku a následne sa porovnajú homologické časti genómu u týchto zvierat.

FISH technika a klasické prúžkovacie techniky sú výhodnými a presnými metódami pri mapovaní génov a budú aj naďalej základnými nástrojmi cytogenetickej analýzy.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná grantmi VEGA Ministerstva školstva a vedy SR (č. 1/4322/07, 1/4394/07), Agentúrou na podporu výskumu a vývoja SR na základe zmluvy č. APVV-0010-07 a Národným referenčným laboratóriom pre pesticídy na UVL v Košiciach.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- CSKBB. Committee for the standardized karyotype of river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n=50), (L. Iannuzzi, coordinator). *Cytogenet Cell Genet.* 1994; 67:102-113.
- CSKDP. Committee for the standardized karyotype of the domestic pig (Gustavsson I., co-ordinator). *Hereditas.* 1988; 109:151-157.
- Evans H.J., Buckland R.A., Sumner A.T. Chromosome homology and heterochromatin in goat, sheep and ox studied by banding techniques. *Chromosoma.* 1973; 42:383-402.
- Ford C.E., Pollock D.L., Gustavsson I. Proceedings of the first international conference for the standardization of banded karyotypes of domestic animals. *Hereditas.* 1980; 92:145-162
- Gerdes A.M., Pandis N., Bomme L., Dietrich C.U., Teixeira M.R., Bardi G., Heim S. Fluorescence *in situ* hybridization of old G-banded and mounted chromosome preparations. *Cancer Genet Cytogenet.* 1997. 98:9-15
- Hayes H., Rogel-Gaillard C., Zijlstra C., De Hann N.A., Urien C., Bourgeaux N. Establishment of an R-banded rabbit karyotype nomenclature by FISH localization of 23 chromosome-specific genes on both G- and R-banded chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 2002; 98:199-205.
- Chowdary B.P., Raudsepp T., Fronicke L., Sherthan H. Emerging patterns of comparative genome organisation in some mammalian species as revealed by ZOO-FISH. *Genome Res.* 1998; 8:577-589.
- Iannuzzi L., Di Meo G.P. Chromosomal evolution in bovids: a comparison of cattle, sheep and goat G- and R-banded chromosomes and cytogenetic divergences among cattle, goat and river buffalo sex chromosomes. *Chromosome Research.* 1995; 3:291-299.
- ISCNDA. International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals (Di Bernardino D., Hayes H., Fries R., Long S., eds). *Cytogenet Cell Genet.* 1990; 53:65-79.
- ISCNDB. International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids. Di Bernardino D., Di Meo G.P., Gallagher D.S., Hayes H., Iannuzzi L. (co-ordinators) eds. *Cytogenet Cell Genet.* 2001; 92:283-299.
- ISCNH. International System for Cytogenetic Nomenclature of the Domestic Horse. Bowling A.T., Breen M., Chowdary B.P., Hirota K., Lear T., Millon L.V., Ponce de Leon F.A., Raudsepp T., Stranzinger G. (Committee). *Chromosome Res.* 1997; 5:433-443.
- McNeil T., Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. [online]. 14.Sept.2000
- Robinson T.J., Ruiz-Herrera A., Fronicke L. Dissecting the mammalian genome-new insights into chromosomal evolution. *Trends in genetics.* 2006, 22: 297-301
- Switonski M., Reimann N., Bosma A.A., Long S., Bartnitzke S., Pienkowska A. Report on the progress of standardization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype. *Chromosome Res.*1996; 4:306-309.
- Texas Nomenclature. Standardization of cattle karyotype nomenclature: report of the committee for the standardization of the cattle karyotype (Popescu C.P., Long S., Riggs P., Womack J., Schmutz S., Fries R., Gallagher D., eds). *Cytogenet Cell Genet.* 1996; 74:259-261.
- Wurster D.H., Benirschke K. Chromosome studies in the superfamily Bovidae. *Chromosoma.* 1968; 25: 152-171.

DIVERZITA ČREVNÝCH HELMINTOV SLÍŽA SEVERNÉHO (*BARBATULA BARBATULA*) NA RIEKE OLŠAVA

Mihok T.¹, Košuthová L.¹, Košuth P.¹, Koščo J.², Kočišová A.¹, Ševc J.²

¹Katedra výživy, dietiky a chovu zvierat, Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice

²Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied Prešovskej univerzity v Prešove, Ul. 17. novembra, 080 16 Prešov

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo zistiť pomocou štandardných parazitologických vyšetrení prehľad o druhovej diverzite helmintov a zdokumentovať možný výskyt nových parazitohostiteľských vzťahov slíža severného (*Barbatula barbatula*).

V období od januára do decembra 2008 bolo vyšetrených z rieky Olšava helmintologickou pitvou 177 rýb slíža severného z troch lokalít (Opiná, Bidovce a Nižná Myšľa) a bolo získaných 552 črevných helmintov, ktoré patria k piatim druhom a trom triedam.

ÚVOD

Slíž severný uprednostňuje chladnejšie, čistejšie prostredie, vyhýba sa kalným vodám, je veľmi citlivý na znečistenie a nízku hladinu kyslíka vo vode, preto ich prítomnosť v riekach môže byť chápaná ako náznak dobrej kvality vody. Živí sa malými kôrovcami, larvami hmyzu a bentosom. Dorastá do veľkosti 10-16 cm. Telo má hladké, kožovité, bez šupín, tvar pretiahnutý, smerom k chvostu sa zužuje, pri konci je laterálne sploštené. Na rozdiel od iných plžovitých rybiek, nemá na hlave pod okom vztýčený trň. Má 3 páry ústnych fúzov, 2 páry horných, 1 pár na dolnej čeľusti. Typická je pigmentácia po celom povrchu tela. Na hlave sú škrvnky menšie, neurčitých tvarov, akoby zliate dokopy. Na tele sú pigmentové kresby výrazné, väčšie, v podobe špecifických, miestami prerušovaných pásikov (Baruš a kol., 1995). U slíža severného bolo doposiaľ zistených a popísaných 32 druhov helmintov. Najväčšie zastúpenie majú podtrieda Digenea a trieda Nematóda s 10 druhmi, nasleduje podtrieda Monogena so 7 druhmi, trieda Acantocephala so 4 druhmi a trieda Cestóda s 1 druhom.

Rieka Olšava je posledný väčší prítok Hornádu na našom území, pred jeho ústím do Maďarska. Do Hornádu ústi z ľavej strany, medzi Nižnou Myšľou a Ždaňou. Odvodňuje západné svahy Slanských vrchov. Do Hornádu sa vlieva po 52 km toku v nadmorskej výške 180 m n. m. Na lokalite Opiná (r. km 39,5) tečie Olšava ako prirodzený členitý tok v pásme listnatého lesa. Lokalita Bidovce (r. km 22,5) sa vyznačuje početnými meandrami. V mieste lovu do Olšavy ústi pravostranný prítok Trstianka a odtokový kanál z blízkeho rybníka. Lokalita Nižná Myšľa (r. km 0,5) bola prelovená pri cestnom moste za obcou Nižná Myšľa (Koščo a Košuth 2002).

V predloženej práci sú prezentované výsledky helmintologického prieskumu zamerané na druhovú skladbu helmintov, prevalenciu a intenzitu invadovanosti spomínaného druhu.

MATERIÁL A METODIKA

V roku 2008 sa uskutočnili na rieke Olšava tri ichtyologické prieskumy (jarný, letný a jesenný). Ryby slíža severného boli následne transportované v 15 litrových vedrách s vodou z miesta odlovu. Počas transportu bola voda prevzdušňovaná. Po prevoze sa uskutočnila parazitologická pitva zameraná na črevné helminty. Celkovo bolo vyšetrených helmintologickou pitvou 177 rýb slíža severného z troch lokalít (Opiná, Bidovce a Nižná Myšľa). Ryby boli omráčené úderom do hlavy a usmrtené prerušením miechy. Od každej ryby sa zaznamenala celková dĺžka, dĺžka tela, hmotnosť, odobrali sa gonády, šupiny, zaznamenalo sa pohlavie. Izolácia parazitov z čreva hostiteľa sa uskutočnila pri miernom

zvážení (pod preparačným mikroskopom) za použitia preparačných ihiel a pinziet. Po izolácii endohelmitov nasledovala ich fixácia.

Plathelminy, pásomnice (Cestoda) a motolice (Digenea), izolované z čreva rýb boli fixované horúcim 4% formaldehydom. Po 2-3 týždňoch sa helminty prekladali do 70 % etylalkoholu, v ktorom boli dlhodobo uskladnené. Hlístovce (Nematoda) sa spracovávali podľa postupov tak, ako ich uvádza Moravec (1994). Nematódy sa po izolácii z čreva hostiteľa očistili a ponechali niekoľko minút vo fyziologickom roztoku relaxovať. Na ich konzerváciu sa použil horúci 4% formaldehyd. Po niekoľkotýždňovej fixácii sa nematódy, rovnako ako plathelminy, prekladali do 70 % etylalkoholu. Háčikohlavce (Acanthocephala) po vypreparovaní z črevnej steny boli ponechané cez noc vo vode pri teplote 4 °C a následne boli fixované v 70 % etylalkohole. Na determináciu helmintov sa použil kľúč podľa Moravec (2004) a Ergens a Lom (1970).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výšetrením hostiteľa bolo nájdených a determinovaných 5 druhov črevných parazitov a celkovo bolo získaných 552 črevných endohelmitov. Na základe uskutočnených meraní a prítomnosti typických znakov prislúchajúcich danému druhu, boli determinované u slíža severného nematóda: *Rabdochona* sp. s prevalenciou 27,8% (51/177) s maximálnou intenzitou infekcie 16 parazitov. Trematódy *Allocreadium isoporum* s prevalenciou 0,57% (1/177), *Crepidostomum farionis* s prevalenciou 10,7% (19/177) s maximálnou intenzitou infekcie do 14 parazitov. Akantocéfaly *Pomphorhynchus laevis* s prevalenciou 45,7% (81/177) s maximálnou intenzitou infekcie do 17 parazitov a *Acanthocephalus anguillae* s prevalenciou 2,25% (4/177). Zoznam črevných parazitov slíža severného je uvedený v tab.č. 1.

Tab.1. Prehľad črevných helmintov slíža severného z vyšetovaných lokalít

	Opiná	Bidovce	Nižná Myšľa	Spolu
Trematoda	27,5 %	-	1,6 %	11,3 %
<i>Allocreadium isoporum</i>	-	-	1,6 %	0,57 %
<i>Crepidostomum farionis</i>	27,5 %	-	-	10,7 %
Nematoda	73,9 %	-	-	28,8 %
<i>Rhabdochona</i> sp.	73,9 %	-	-	27,8 %
Acantocephala	8,7 %	69,5 %	69,3 %	45,7 %
<i>Pomphorhynchus laevis</i>	8,7	69,5 %	69,3 %	45,7 %
<i>Acanthocephalus anguillae</i>	-	2,2 %	4,8 %	2,25 %

Výskum parazitofauny slíža severného na rieke Olšava sa uskutočnil na jar, v lete a na jeseň v roku 2008. Celkovo bolo odlovených a vyšetrených helmintologickou pitvou 177 jedincov a nájdených 552 črevných helmintov ktoré patria k 5 druhom a 3 triedam. Predkladaná práca bola zameraná na druhovú skladbu helmintov, prevalenciu a intenzitu invadovanosti spomínaného druhu.

POĎAKOVANIE

Práca bola finančne podporená grantom VEGA č. 1/0718/08 a APVV – 0154-07.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Baruš a kol.: Fauna ČR a SR. Mihulovci – Petromyzontes a Ryby – Osteichthyes (2). Academia, Praha, 1995: 698 s.
- Ergens R, Lom J.: Původci parazitárních nemocí ryb. Academia, Praha, 1970: 373 s.
- Koščo, J., Košuth, P.: Diverzita ichtyofauny rieky Olšavy. *Biodiverzita ichtyofauny ČR* (IV), 2002: 99-104
- Moravec F.: Parasitic Nematodes of Freshwater Fishes of Europe. Academia, Praha, 1994: 473 pp.

MONITORING AKTUÁLNYCH OHNÍSK VÝSKYTU PEČEŇOVÝCH TREMATODÓZ (č. *Fasciolidae*) V BIOTOPOCH SLOVENSKA V ROKOCH 2008 - 2009

Oberhauserová K.¹, Špakulová M.², Maľová J.¹, Kiš O.¹

¹Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, UVL, Košice

²Parazitologický ústav, SAV, Košice

ABSTRAKT

Pečeňové trematódy č. *Fasciolidae* sú na Slovensku aktuálnou témou najmä z dôvodu recentného výskytu *Fascioloides magna* u jeleňovitých (č. *Cervidae*) v podunajskej oblasti. Aktuálny prehľad výskytu *Fasciola hepatica* na našom území chýba, a preto naším cieľom je vám v tejto práci priblížiť sledovanie výskytu aktuálnych (rok 2008 - 2009) ohnísk pečeňových trematód (č. *Fasciolidae*) v našich prírodných podmienkach. Na tento účel bola použitá helmintologická pitva pečeni prežúvavcov zdieľajúcich spoločné pastviny (jelenia zver a hovädzi dobytok). Výsledky pitiev potvrdili existujúce, už popísané, ohnisko fascioloidózy v okrese Dunajská Streda s prevalenciou 80 % (stredná II = 8). Fasciolóza bola zistená v hornatých oblastiach okresov Námestovo, Tvrdošín, Brezno a Bardejov (stredná II = 20,9). Predpokladáme, že tento výskyt je dôvodom stúpajúcej tendencie tvorby zamokrených plôch v týchto oblastiach v dôsledku globálnych klimatických zmien.

ÚVOD

Pečeňové trematódy sú parazitózy, ktoré sa týkajú prednostne prežúvavcov, ale aj iných druhov zvierat a človeka. Konkrétne motolice čeľade *Fasciolidae* zahŕňajú v našich prírodných podmienkach druhy *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 a *Fascioloides magna* (Bassi, 1875). Na našom území je pečeňová trematódóza aktuálnou témou najmä u jeleňovitých (č. *Cervidae*) z dôvodu recentného výskytu trematóda *F. magna* na južnom Slovensku. Ten je v súčasnosti hrozbou pre populácie najmä srnčej zveri. Je schopný pri nekontrolovanom šírení redukovať populácie týchto cervidov nad únosnú mieru. Problematika výskytu *F. magna* je u nás už skoro dve desaťročia podrobne skúmaná a popisovaná (Rajský a kol., 1994; Špakulová a kol., 2003; Rajský a kol., 2002 a 2006). Ide o druh parazita obligátne sa vyskytujúci u jeleňovitých, ku nám introdukovaný, pôvodne americký, pričom invázie nepôvodných druhov parazitov sú pri súčasných globálnych klimatických zmenách veľkým problémom. Iná situácia je u nás s pečeňovými trematódami *F. hepatica*. Ide o parazita primárne domácich prežúvavcov. *F. hepatica* sa vyskytuje a zaznamenáva najmä u hovädzieho dobytku a oviec. Možnosť jej výskytu však existuje aj u voľne žijúcich prežúvavcov a na našom území bola v minulosti len sporadicky popisovaná. V poslednej dobe nebol podobný prieskum vykonávaný.

Pečeňové trematódy ako biohelminty sú závislé na účasti medzihostiteľov vo svojom vývinovom cykle. V našich podmienkach je medzihostiteľom čeľade *Fasciolidae* sladkovodný ulitník *Galba truncatula* z čeľade *Lymnaeidae* (Chroust, 2001). *Galba truncatula* žije predovšetkým v plytkých vodách, do 10 – 15 cm hĺbky, aj keď sa nájde aj v 30 cm hlbkej tečúcej vode. Podľa Muirsona (2004) sú najvhodnejšie biotopy pre množenie sa medzihostiteľských ulitníkov čeľade *Lymnaeidae* habitaty jazier, rybníkov, kanálov a priesakov podzemných vôd. Výskyt prírodných ohnísk pečeňových trematódov je teda priamo viazaný na biotopy sladkovodných ulitníkov. Cringoli a Rinaldi (2003) potvrdili, že prítomnosť vodného prostredia v areáloch chovov prežúvavcov predstavuje rizikový faktor v prenose pečeňových motolíc.

Táto práca bola realizovaná ako prvá etapa monitoringu výskytu pečeňových trematód u jeleňovitých na Slovensku. V rámci jeho cieľov je primárnym krokom vytypovať a overiť ohniská výskytu pečeňových motolíc u prežúvavej raticovej zveri na Slovensku,

s prihliadnutím na geomorfologické, klimatické a ekologicko-hospodárske podmienky jednotlivých oblastí a na doterajšie údaje o výskyte týchto parazitov v SR. Po vyšetrení 385 vzoriek trusu jeleňovitých z rôznych lokalít Slovenska s negatívnym nálezom bola pre sprasnenie výsledkov zvolená metóda úplnej helmintologickej pitvy pečeni. Pre vysledovanie ohnisk výskytu ulitníkov *G. truncatula* infikovaných pečeňovými trematódmi boli vyšetřované pečene tých druhov prežúvavcov, ktoré sú pre dané motolice primárnym hostiteľom.

MATERIÁL A METODIKA

Na parazitologické vyšetřenie boli použité pečene voľne žijúcich a hospodárskych prežúvavcov (jelenia zver a hovädzí dobytok). Desať kusov pečeni jeleňov (*Cervus elaphus* L.) boli získané ihneď po selektívnom odstrelе v poľovnom revíri PZ „Šuľany“ Bodíky a PZ „Malý Ostrov“ Vojka nad Váhom počas poľovníckej sezóny (september 2008), následne boli priamo v terénnych podmienkach v čerstvom stave vypitvané orgánovou helmintologickou pitvou. Pečene hovädzieho dobytká boli získané ako suspektne pozitívne na fasciolózu priamo z bitúnkov (okresy Bardejov, Námestovo, Tvrdošín, Brezno), v chladenom stave transportované na pracovisko Ústavu pre chov a choroby zveri a rýb, kde boli následne v čo najkratšom čase vypitvané helmintologickou pitvou. Celkovo to bolo 8 kusov pečeni hovädzieho dobytká. Počas helmintologických pitiev boli vedené pitevné protokoly pod evidenčnými číslami. Podrobne boli zaznamenané patologické lézie. Získané jedince motolíc (*F. magna*, *F. hepatica*) boli druhovo identifikované podľa typických morfológických znakov, prepláchnuté vo fyziologickom roztoku, zafixované v 96%-nom etanole pre ďalšie použitie na DNA analýzu (biogeografické štúdie) a z ich počtu bola stanovená intenzita infekcie (II) jednotlivých pečeni. Nález jednotlivých potvrdených ohnisk bol zaznamenaný do mapy Slovenska. Tiež bola použitá metóda opakovaného premývania pečeňových cýst a žľčovodov fyziologickým roztokom kvôli získaniu koncentrátu fasciolidných vajíčok. Ten bude následne použitý na experimentálne porovnanie citlivosti rôznych odpublikovaných koprologických techník za účelom čo najviac zefektívniť cieľový koprologický skrining pečeňových trematodóz u jeleňovitých. Koncentrát získaných vajíčok bude tiež použitý na experimentálnu druhovú diferenciaciu morfológicky identických fasciolidných vajíčok pomocou PCR analýzy.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Helmintologickou pitvou pečeni jelenej zveri ulovenej v povodí Dunaja bola zistená 80 %-ná prevalencia fascioloidózy (*F. magna*) s minimálnou intenzitou infekcie 2 červy a maximálnou intenzitou infekcie 28 červov. Stredná intenzita infekcie bola 8 (tab. 1 a 2).

Tab. 1. Výsledky helmintologickej pitvy pečeni jelenej zveri z okresu Dunajská Streda (rok 2008)

Protokolárne číslo pečene	Nález pečeňových trematódov	Intenzita infekcie (II)
1/08	<i>Fascioloides magna</i>	4
2/08	<i>Fascioloides magna</i>	2
3/08	<i>Fascioloides magna</i>	28
4/08	<i>Fascioloides magna</i>	5
5/08	<i>Fascioloides magna</i>	15
6/08	negatívne	-
7/08	<i>Fascioloides magna</i>	2
8/08	<i>Fascioloides magna</i>	-
9/08	<i>Fascioloides magna</i>	2
10/08	negatívne	6

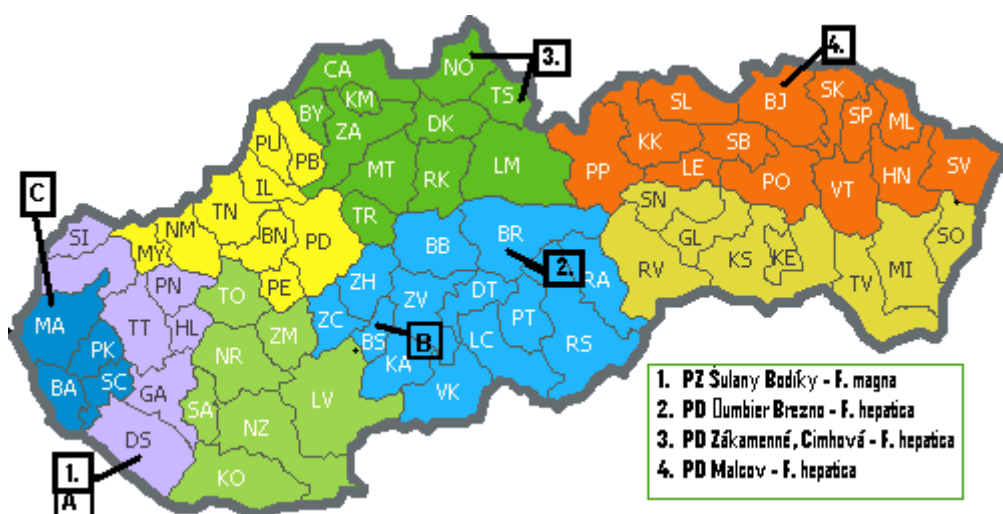
Tab. 2. Prevalencia a intenzita infekcie fascioloidózy (*F. magna*) v okresoch Dunajská Streda v roku 2008

Počet vyšetrených pečení	Počet pozitívnych pečení	Prevalencia (%)	II _{min.-max.}	Stredná II
10	8	80	2 - 28	8

Výsledky helmintologickej pitvy pečení hovädzieho dobytká z rôznych okresov dokázali prítomnosť prírodného ohniska fasciolózy (*F. hepatica*) v okresoch Bardejov, Námestovo, Tvrdošín a Brezno (tab. 3). Minimálna intenzita infekcie bola 10, maximálna 44, stredná 20,9.

Tab. 3. Výsledky helmintologickej pitvy pečení hovädzieho dobytká z cielene vytypovaných lokalít Slovenska (rok 2009)

Protokolárne číslo pečene	Lokalita	Nález pečenných trematódov	Intenzita infekcie (II)
1/009	PD Malcov, okr. Bardejov	<i>Fasciola hepatica</i>	10
2/09	PD Malcov, okr. Bardejov	<i>Fasciola hepatica</i>	44
3/09	PD Ďumbier, okr. Brezno	<i>Fasciola hepatica</i>	20
4/09	PD Ďumbier, okr. Brezno	<i>Fasciola hepatica</i>	28
5/09	PD Čimhová, okr. Tvrdošín	<i>Fasciola hepatica</i>	14
6/09	PD Zákamenné, okr. Námestovo	<i>Fasciola hepatica</i>	10
7/09	PD Zákamenné, okr. Námestovo	<i>Fasciola hepatica</i>	23
8/09	PD Zákamenné, okr. Námestovo	<i>Fasciola hepatica</i>	18



Obr.1. Prehľad aktuálnych (1.- 4.) a doteraz publikovaných (A, B, C) prírodných ohnisk výskytu pečenných trematódóz (č. *Fasciolidae*) v okresoch SR

V okresoch Prievidza, Žiar nad Hronom, Zvolen, Banská Bystrica a Lučenec Farkaš (1990) parazitologicky vyšetřil spolu 287 kusov jelenej zveri, pričom výskyt motolíc čeľade *Fasciolidae* nepotvrdil. Taktiež Mituch a kol. (1992) prieskumom helmintofauny raticovej zveri vo Vysokých Tatrách nepreukázal prítomnosť tejto pečennej trematódózy. V Banskobystrickom kraji, konkrétne v chránenej poľovnej oblasti Sitno (obr.1, B), však už bola potvrdená fasciolóza u jelenej zveri (Farkaš a kol., 1993), čím môžeme predpokladať výskyt tohto ochorenia vo viacerých okresoch kraja ako len v okrese Brezno. Štátna veterinárna a potravinová správa SR v roku 2002 realizovala monitoring poľovnej zveri a rýb

v Slovenskej republike, súčasťou ktorého bolo aj koprologické vyšetrenie srnčej a jelenej zveri vo vybraných lokalitách (okres Dunajská Streda, Topoľčany, Trnava, Žiar nad Hronom, Poprad, Trebišov, Michalovce, Spišská Nová Ves). Výskyt pečeňovej trematodózy sa však ani v jednom prípade u spomínaných cervidov nezaznamenal (Košťuzký a kol., 2002). Rovnako vo Výročných správach ŠVPÚ od roku 2004 sa neuvádza ani jedna pozitívna vzorka.

Výsledky tejto práce potvrdili známe ohnisko fascioloidózy (*F. magna*) v okrese Dunajská Streda (obr.1, A), ktoré bolo prvýkrát popísané v roku 1988 po úhyne jelenice na stavenisku prírodného kanála Vodného diela Gabčíkovo (Rajský a kol., 1994). Rajský a kol. (2006) však už publikovali aj nové ohnisko fascioloidózy v okresoch pozdĺž toku rieky Moravy (obr.1, C).

Výsledky tejto práce sú čiastkové a pre jej komplexnosť je potrebné pokračovať v systematickom monitoringu ohnísk pečeňových trematodóz na Slovensku. Táto práca potvrdila už od roku 1988 evidované ohnisko fascioloidózy v povodí Dunaja (okres Dunajská Streda). Je zaujímavé, že aktuálne zistené ohniská fasciolózy boli potvrdené v lokalitách, ktoré sú charakteristické ako oblasti s hornatým reliéfom, čo sa nezhoduje so známym poznatkom o zvýšenom výskyte fasciolózy v nížinatých oblastiach, najmä v povodiach tokov a na brehoch vodných plôch. Výskyt fasciolózy v týchto oblastiach je možné pripísať súčasne stále frekventovanejším záplavovým situáciám aj v horských a podhorských oblastiach v dôsledku globálnych klimatických zmien. To spôsobuje zvýšenú úroveň zamokrenosti biotopov, čo prispieva k zvýšenému výskytu medzihostiteľských slimákov *Galba truncatula* v daných lokalitách a možnosti prenosu pečeňových trematodóz.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom VEGA 1/4395/07.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Chroust K. Parazitární choroby spárkaté zvěře. Myslivecké listy I. 2001; 1:23–24.
- Cringoli G, Rinaldi L. Water as risk factor for helminthiasis in domestic ruminants in the central and southern Italy and zoonotic risk. Ann Ig. 2003; 15 (4 Suppl 1):43-6.
- Farkaš J, Findo S, Stanovský M, Pataky T. Present state of the helminthofauna of red deer and roe deer in the protected hunting regions of Sitno a Poľana Mountains. Folia Venatoria. 1993; 23:61–68.
- Farkaš J. Invasion cycle of the most important helminths of red deer in conditions of Central Slovakia. Folia Venatoria. 1990; 20:41–52.
- Košťuzký J, Rajzák P, Breyl I, Hajduk J. Monitoring voľne žijúcej zveri a rýb v Slovenskej republike. Správa za rok 2002, ŠVPS SR, 2002:pp. 21.
- Mituch J, Hovorka J, Hovorka I., Világiová I. Helminty srnca a jeleňa hôrneho vo Vysokých Tatrách. Folia Venatoria. 1992; 22:47–52.
- Muirson D. Liver fluke disease and the liver fluke snail. Farmnote. 2004; 40: ISSN 0726-934X.
- Rajský D, Čorba J, Várady M, Špakulová M, Cabadaj R. Control of fascioloidosis (*Fascioloides magna* Bassi 1875) in red deer and roe deer. Helminthologia. 2002;39:67–70.
- Rajský D, Dubinský P, Krupicer I, Sabo R, Sokol J. Výskyt propagačných štádií *Fascioloides magna* a iných helmintov vo fekáliách jelenej zveri z okresov hraničiacich s riekami Dunaj a Morava. Slovenský Veterinársky Časopis. 2006; 31 (3):177–180.
- Rajský D, Patus A, Bukovjan K. Prvý nález *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) na Slovensku. Slovenský Veterinársky Časopis. 1994; 19:29–30.
- Špakulová M, Rajský D, Sokol J, Vodňanský M. Giant liver fluke (*Fascioloides magna*), an important liver parasite of ruminants. Parpress, Bratislava, 2003:61 pp.

SYNTÉZA A SEPARÁCIA STRIEBORNÝCH NANOČASTÍČ POKRYTÝCH GLUTATIÓNOM

Peregrinová A.¹, Antalík M.^{1,2}

¹Katedra biochémie, UPJŠ, Košice

²Ústav experimentálnej fyziky, SAV, Košice

ABSTRAKT

Ušľachtilé kovové nanomateriály s priemerom 1 – 100 nm sú tvorené anorganickým kryštálovým jadrom, ktoré je zvyčajne obalené vrstvou organických ligandov. Tieto ligandové molekuly regulujú rast častíc počas syntézy a tiež stabilizujú častice v roztoku proti agregácii. Vlastnosti častíc určuje okrem jadra nanoobjektu aj ich povrch. Pri hocijakom type použitom na prípravu nanočastíc vznikajú viac menej heterogénne objekty, u ktorých sú rozdielne atomárne zloženia ako aj geometrické usporiadania jednotlivých atómov. Naším cieľom bolo nasyntetizovať strieborné častice pokryté s glutatiónom, aby sme dosiahli čo najnižšiu disperzitu nasyntetizovaných nanoobjektov. Syntéza strieborných nanočastíc prebiehala v metanolovom roztoku v ľadovom vodnom kúpeli. Pri syntéze sme používali rôzne pomery GSH ku striebru. Vlastnosti nanočastíc výrazne závisia od veľkosti, tvaru a zloženia, tak dôležitou úlohou pri charakterizácii ale aj pri aplikácii, je separácia zmesi nanočastíc (Negishi a kol., 2005). Ako sme ukázali pomocou PAGE (Obr. 1), pomer GSH k striebru ovplyvňuje veľkosť a disperzitu pripravených nanoobjektov. Týmto štúdiom chceme prispieť k pochopeniu vplyvu veľkosti a tvaru jadra strieborných nanočastíc pokrytých glutatiónom a ďalej determinovať ich presnú chemickú štruktúru za účelom štúdia interakcií týchto nanočastíc s biomakromolekulami.

ÚVOD

Chémia kovových nanočastíc, hlavne ušľachtilých kovov, sa intenzívne študuje. Prvým krokom je príprava kvalitných a stabilných nanočastíc. Zvyčajne sú pripravené redukciou odpovedajúcej kovovej soli v prítomnosti vhodnej ochrannej skupiny, ktorá predchádza agregácii. Ušľachtilé kovové nanomateriály boli nasyntetizované použitím rôznych metód zahŕňajúc tvrdý templát, tzv. suchou cestou a syntézu v roztoku, tzv. mokrou cestou (Goia a kol., 1998).

Napriek obrovskému počtu publikácií v oblasti nanočastíc v súčasnosti, syntéze monodisperzných častíc bola v predchádzajúcom období venovaná relatívne malá pozornosť. Vo väčšine prípadov sa charakterizácia nasyntetizovaného nanobjektu zastavila na definovaní jeho veľkosti v určitom rozmerovom pásme pomocou elektrónového mikroskopu. Táto úroveň je však v súčasnosti nedostatočná. Preto niektoré vedecké tímy použili separačné metódy na izolovanie čistých frakcií nanočastíc ako sú chromatografia, centrifugácia, dialýza a elektroforéza. Ako najperspektívnejšia sa ukázala elektroforéza nanočastíc obsahujúcich kovalentne modifikovaný povrch s látkami obsahujúcimi skupiny s nábojom. Takto sa napríklad Negishimu a kol. podarilo u nanočastíc obsahujúcich na povrchu glutatión izolovať objekty líšiace sa o jeden atóm zlata, prípadne jeden povrchovo naviazaný glutatión (Negishi Y, 2005). Jednou zo zaujímavých vlastností ušľachtilých nanočastíc pokrytých tiolmi je ich vysoká farebnosť a fluorescencia, využívajú sa ako náhrady fluorescenčných sond v rôznych biologických aplikáciách (Schultz a kol., 2000). Veľkosť a tvar týchto nanočastíc je dôležitá, pretože biocídny účinok sa zdá byť závislý práve od veľkosti nanoobjektu. Schmid nedávno ukázal, že klastre Au₅₅ (1nm) efektívne interagujú s DNA a majú potenciál využitia ako protirakovinové činidlá (Schmid a kol., 2003). Kvalitná syntéza, čo najmenej disperzných nanočastíc, separácia pomocou PAGE a elúcia a následná dialýza, to sú techniky ktorými môžeme získať monodisperzné nanočastice.

MATERIÁL A METODIKA

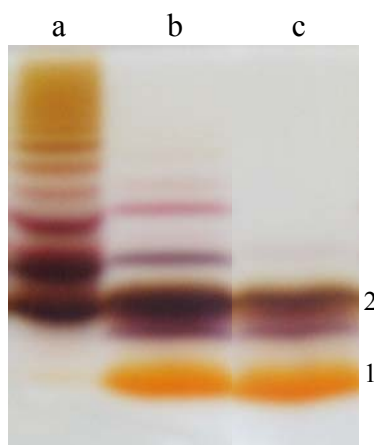
Na prípravu nanočastíc boli použité tieto chemikálie: Glutatión v redukovanej forme (GSH $M_w = 307$), Metanol (99.9 %) a Dietyléter boli zakúpené od Sigma-Aldrich. Dusičnan strieborný bol dodaný z Acros a Borohydrid sodný bol zakúpený od Fluka. Chemikálie na PAGE elektroforézu: Akrylamid, Bis-akrylamid, glycerol, glycín a Tris boli zakúpené od Sigma-Aldrich.

Redukciou AgNO_3 s čerstvo pripraveným NaBH_4 v prítomnosti glutatiónu sme pripravili strieborné nanočastice veľkosti 1-2 nm. Nanočastice boli syntetizované v týchto pomeroch GSH k Ag: 0,5:1; 2:1; 3:1. Syntéza strieborných nanočastíc pokrytých molekulami glutatiónu sa uskutočnila v jednofázovom systéme nasledovne: Do metanolového roztoku (27 ml) AgNO_3 (8,8 mM) bol pridaný GSH (v rôznych pomeroch k AgNO_3). Zmes bola chladená v ľadovom kúpeli. Zmes za mierneho sa miešania v priebehu 30 minút sa zmení na zakalenú bielu suspenziu. Potom sa rýchlo pridá čerstvo pripravený vodný roztok NaBH_4 (7,5 ml, 0,2 M) za silného miešania. Suspenzia sa nechá reagovať ďalšiu hodinu. Výsledný precipitát je zozbieraný a premýva sa metanolom následne sa centrifuguje, aby sa odstránili zvyšky reaktantov. Nakoniec je precipitát usušený a získané Ag nanočastice majú podobu tmavohnedého prášku.

PAGE experiment bol uskutočnený pomocou vertikálnej elektroforéznej jednotky. Separačný polyakrylamidový gél bol 30% a bol pufrovaný na $\text{pH} = 8,8$ pomocou Tris-HCl. Elučný tlmivý roztok pozostával z roztoku glycínu a Tris. Pripravené Ag:GSH klastre boli rozpustené v 5% vodnom roztoku glycerolu v koncentrácii 3 mg/ml. Vzorky boli eluované 8 hodín pri konštantnom napätí 150 V.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pripravené nanočastice v prášku uchovávané pri teplote 4°C sú stabilné aj niekoľko mesiacov. Strieborné nanočastice pokryté GSH sú výborne rozpustné vo vodných roztokoch. Strieborné nanočastice pokryté glutatiónom sú v alkalickom pH záporne nabité a preto môžu byť separované podľa ich veľkosti a náboja pomocou PAGE. Obr. 1. ukazuje fotografiu gélu po separácii. Obr. 1.a ukazuje oddelené frakcie nanočastíc GSH:Ag 0,5:1. Tieto častice ukázali najvyššiu disperzitu (9 okom viditeľných frakcií) ako aj najväčšiu veľkosť nanočastíc. Obr. 1.b je fotografia nanočastíc GSH:Ag 2:1. Na tomto obrázku možno jasne odlíšiť 7 rôznych frakcií, pričom dve z nich sú dominantné a to oranžová (1) a hnedá (2).



Obr. 1. Fotografia PAGE gélu Ag nanočastíc pokrytých GSH v pomere GSH:Ag a) 0,5:1; b) 2:1, c) 3:1.

Obr. 1.c poskytuje fotografiu Ag nanočastíc pripravených v pomere GSH:Ag 3:1. Tieto častice sú najmenej disperzné, dajú sa rozlíšiť 4 okom viditeľné frakcie, z ktorých sú takisto dve dominantné, oranžová (1) a hnedá (2). Tieto nanočastice vykazujú podobnosť s nanočasticami GSH:Ag 2:1 vo farbe aj v rozložení prvých štyroch frakcií. Ako je vidieť na Obr. 1 všetky pripravené nanočastice obsahujú hnedú frakciu (v riadku označenom 2), ale iba nanočastice GSH:Ag 2:1 a 3:1 obsahujú aj dominantnú oranžovú frakciu. Najmenej disperzné častice sú nanočastice nasynetizované v pomere GSH:Ag 3:1. Takisto tieto nanočastice majú ostro ohraničené frakcie, čo možno využiť pri ďalšom skúmaní týchto strieborných nanočastíc, napr. skúmanie optických vlastností jednotlivých frakcií. Z vyššie uvedeného vyplýva, že na následné skúmanie a používanie v aplikáciach sú najvhodnejšie strieborné nanočastice nasynetizované v pomere GSH:Ag 3:1, no ak chceme pracovať s vybranými frakciami, možno použiť aj syntézu nanočastíc, kde GSH:Ag sú v pomere 2:1.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená týmito vedeckými grantmi: VVGS PF21/2009/CH, VEGA č. 0038 a ESF č. 26220120021.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Negishi Y, Nobusada K and Tsukuda T. Glutathione-Protected Gold Clusters Revisited: Bridging the Gap between Gold(I)-Thiolate Complexes and Thiolate-Protected Gold Nanocrystals. *Journal of American Chemical Society* 2005; 127:5261-70.
- Goia DV and Matijevic E. Preparation of monodispersed metal particles. *New Journal of Chemistry* 1998; 1203-15.
- Schmid G, Liu YP, Meyer-Zaika W, Franzka S, Tsoli M, Kuhn H. DNA based assembly of Metal nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* 2003; 42:2853-2857.
- Schultz S, Smith DR, Mock JJ, Schultz DA. Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* FIELD 2000; 97:996-1001.

ENTEROKOKY AKO POTENCIALNI TVORCOVIA BIOGÉNNYCH AMÍNŮV V OVČÍCH SYROCH

Pořáková L.¹, Trivedi K.²

¹Ústav hygieny a technológie mlieka, Univerzita veterinárskeho lekárstva Košice

²Ústav hygieny a technológie mlieka, Veterinárni a farmaceutická univerzita Brno

ABSTRAKT

V tejto štúdií sa skúmali Enterococci rastúce na Slanetz-Bartley agare pochádzajúce zo syrov vyrobených z ovčieho mlieka. Identifikované Gram pozitívne, katalo- negatívne bacily patrili k dvom druhom *Enterococcus* spp. (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*). Celkovo sa izolovalo 17 kmeňov rodu *Enterococcus* spp., ktoré sa identifikovali použitím multiplexovej PCR metódy. U izolovaných a identifikovaných kmeňoch (88,24 % *E. faecalis*, 5,88 % *E. faecium*, 5,88 % *Enterococcus* spp.: *E. faecalis* (70,58 %), *E. faecium* (5,88 %) a *Enterococcus* spp. (5,88 %) izolované zo syrov z ovčieho mlieka a 17,64 % kmeňov *E. faecalis* (17,65 %) izolovaných z bryndze) sa ďalej študovala prítomnosť tyrdc-génu kodujúceho tvorbu tyramínu. Prítomnosť tyrdc-génu bola potvrdená u 16 izolátov zo 17 *Enterococcus* spp.. Tj. *E. faecalis* 68,75 %, *E. faecium* 6,25 %, *Enterococcus* spp. 6,25 % zo syrov vyrobených z ovčieho mlieka a *E. faecalis* 18,75 % z bryndze. Rovnaké výsledky sa dosiahli aj pri dôkaze produkcii tyramínu u izolovaných kmeňoch v médiu podľa Majjala (1993).

ÚVOD

Foulquié Moreno a kol. (2006), Ogier a Serror (2009) uvádzajú, že enterokoky tvoria dominantnú mikroflórou v tradičných fermentovaných syroch vyrobených zo surového mlieka. V týchto výrobkoch zohrávajú dôležitú úlohu v rozvoji charakteristických organoleptických vlastností finálnych výrobkov, a to pôsobením svojej proteolytickej aktivity a tvorbou diacetylu v priebehu citrátového metabolizmu (Centeno a kol., 1999; Sarantinopoulous a kol., 2001a; Sarantinopoulous a kol., 2001b; Foulquié Moreno a kol., 2006). Na druhej strane, ale negatívnym aspektom enterokokov prítomných v syroch je ich možná schopnosť produkovať biogénne amíny (Gardin a kol., 2001; Connil, 2002; Giraffa, 2002; Roig-Sagués a kol., 2002; Komprda a kol., 2008). Toxikologicky najvýznamnejšími biogénnymi amínmi sú histamín, tyramín, putrescín a kadaverín (Silla-Santos, 1996). Základnými podmienkami pre vznik tyramínu je prítomnosť voľnej aminokyseliny tyrozínu v substráte (potravine), prítomnosť mikroorganizmov s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmienky pre rast a množenie mikroorganizmov (Shalaby, 1996).

Vzhľadom na zvyšujúcu sa popularitu konzumácie syrov vyrobených z ovčieho mlieka vrátane bryndze, cieľom našej práce bolo izolovať z týchto výrobkov kmene rodu *Enterococcus*, prostredníctvom multiplexovej PCR metódy previesť rodovú, druhovú identifikáciu, prítomnosť tyrdc-génu kodujúceho tvorbu tyramínu a u potvrdených a izolovaných kmeňov zistiť produkciu tyramínu v médiu podľa Majjala (1993).

MATERIÁL A METODIKA

Na mikrobiologické vyšetrenie sa použilo 10 vzoriek syrov vyrobených z ovčieho mlieka, a to 8 druhov nezrejúcich ovčích syrov od troch rôznych výrobcov a 2 druhov bryndze od dvoch rôznych výrobcov. Vzorky syrov boli zakúpené v obchodnej sieti v Košiciach. Vzorky sa spracovali štandardnými mikrobiologickými metódami.

Baktérie rodu *Enterococcus* spp. izolované zo vzoriek ovčích syrov a bryndze boli kultivované na selektívnom diagnostickom médiu Slanetz–Bartley (Himedia,) pri teplote 37°C po dobu 24 hod. Príslušnosť k rodu *Enterococcus* spp. sa potvrdzovala rastom na Bile

Esculine agar (Himedia) pri teplote 37°C po 24 hod., na krvnom agare a pozitívnym PYRA-testom (Pliva-Lachema). Izoláty z krvného agaru boli konzervované v glycerínovom médiu. Z izolovaných kmeňov sa izolovala DNA pomocou CHELEXU 100%. Pomocou multiplexovej PCR metódy podľa Coton and Coton (2005) sa previedla rodová, druhová identifikácia a prítomnosť *tyrdc*- génu kódujúceho tvorbu tyramínu. Následne sa uskutočnila produkcia tyramínu v médiu podľa Maijala (1993) pri teplote 15°C a 6°C. Produkcia tyramínu sa hodnotila po 24, 72 a 94 hod. inkubácie.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na zistenie schopnosti produkcie tyramínu sa použilo 20 izolovaných kmeňov, t.j. štyri kmene z bryndze a 16 kmeňov z ovčích syrov. Pomocou multiplexovej PCR bolo identifikovaných 17 izolátov ako *Enterococcus* spp., a to *E. faecalis* 70,58% (n = 12), *E. faecium* 5,88% (n = 1), *Enterococcus* spp. 5,88 % (n = 1) z ovčích syrov a z bryndze sa identifikoval *E. faecalis* (17,65%, n = 3). Z celkového počtu izolátov enterokokov, bolo 16 kmeňov (94,11 %) pozitívnych na prítomnosť *tyrdc*-génu kódujúceho tvorbu tyramínu, a to v ovčích syrov *E. faecalis* 68,75% (n = 11), *E. faecium* 6,25% (n = 1), *Enterococcus* spp. 6,25% (n = 1) v bryndziach *E. faecalis* 18,75 % (n = 3) a 1 kmeň (6,25 %) bol označený negatívne, konkrétne *E. faecalis* pochádzajúci z ovčieho syra. Rovnaké výsledky sa dosiahli pri dôkaze produkcie tyramínu v médiu podľa Maijala (1993). Tyramínová produkcia bola detegovateľná už po 24 hod. pri teplote 15°C rovnako, ako aj pri teplote 6°C, čo predstavuje teplotu skladovateľnosti výrobkov vyrobených z ovčieho mlieka. Podobné výsledky uvádzajú Trivedi a Karpíšková (2008), ktorí zistili, že 90% kmeňov enterokokov izolovaných z mliečnych výrobkov malo schopnosť produkovať tyramín, pričom dominantnú časť tvorili kmene *E. faecalis* (85,7 %).

Uvedené výsledky poukazujú na vysokú aktivitu enterokokov pri produkcii tyramínu. Netreba zabúdať, že v syroch sa môžu vyskytovať okrem žiaducich mikroorganizmov, ktoré pozitívne ovplyvňujú vlastnosti syra a hrajú významnú úlohu pri výrobe a zrení syrov, aj nežiaduce mikroorganizmy, ktoré môžu negatívne ovplyvniť vlastnosti syra poprípade ho úplne znehodnotiť (Beresford a kol., 2001). Medzi žiaduce mikroorganizmy patria baktérie mliečneho kvasenia (BMK), tvoriacu dominantnú mikroflóru u všetkých typoch syrov a hrajú významnú úlohu pri vytváraní požadovaných vlastností syra. Zvláštnu skupinu BMK tvoria tzv. NSLAB (non-starter lactic acid bacteria = nezakysové baktérie mliečneho kvasenia), ktoré sa do syra dostávajú z iných zdrojov než zo zakysových kultúr (Depouilly a kol., 2004). Do tejto skupiny patria aj enterokoky, ktoré sa vyznačujú tepelnou rezistenciou, čo vysvetľuje ich prítomnosť v syroch vyrobených z pasterizovaného mlieka, do ktorého sa môžu dostať ako prídavná mikroflóra ak sa používa napr. „artisan cheese“ štartovacia kultúra alebo ako náhodná mikroflóra z prostredia, ktorá kontaminuje post-pasterizačný proces (Giraffa, 2003).

Na Slovensku sú najvyššie prípustné limity stanovené len pre histamín v rybách, a pre tyramín v tvrdých syroch (200 mg · kg⁻¹) (Potravinový kódex SR, 2004). Obsahy biogénnych amínov v iných potravinách nie sú limitované.

Vzhľadom na zistené skutočnosti, je potrebné venovať tejto problematike náležitú pozornosť.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla za podpory VEGA SR č. 1/0638/09; VZ MŠMT MSM 6215712402.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Beresford, T.P.; Fitzimons, N.A.; N. L. Brennan.; Cogan, T.M.: Recent advances in cheese Microbiol. Int. Dairy J., 11, 2001, 259-274.
- Centeno, J. A., Menendez, S., Hermida, M., Rodriguez-Otero, J. L.: Effect of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. Int. J. Food Microbiol., 48, 1999, 97–111.

- Connil, N., Le Breton, Y., Dousset, X., Auffray, Y., Rince, A., & Prevost, H. Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2002, 3537–3544.
- Coton, E., Coton, M.: Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine- producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 63, 2005, 296- 304.
- Depouilly, A.; Dufrene, F.; Beuvier, E.; Berthier, F.: Genotypic characterisation of the dynamics of the lactic acid bacterial population of Comté cheese. *Lait*, 84, 2004, 155-167.
- Gardin, F., Martuscelli, M., Caruso, M. C., Galgano, F., Crudele, M. A., Favati, F., et al.: Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 2001,105–117.
- Giraffa, G.: Enterococci from food. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 2002, 163-171.
- Giraffa, G.: Functionality of enterococci in dairy products. *Int.J. Food Microbiol.*, 88, 2003, 215-222.
- Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L.: The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.*, 106, 2006, 1–24.
- Komprda, T., Burdychová, R., Dohnal, V., Cwíková, O., Sládková, P., Dvořáčková, H.: Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. *Food Microbiology*, 25, 2008, 219–227.
- Trivedi, K.; Karpíšková, R.: Detection of amino acid decarboxylase activity of enterococci from various dairy products. X KMVP konference VFU, Brno, 2008, 10–14.
- Majjala, R.: Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology*, 17, 1993, 40- 43.
- Ogier, J. C., Serror, P.: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 2009 (in press).
- Roig-Sagués, A. X., Molina, A. P., Hernández-Herrero, M. M.: Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Research and Technology*, 215, 2002, 96–100.
- Sarantinopoulos, P.; Andrighetto, A.; Georgalaki, M.D.; Rea, M.C.; Lombardi, A.; Cogan, T.M.; Kalantzopoulos G., Tsakalidou, E.: Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. Dairy J.*, 11, 2001, 621–647.
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E.. Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2001, 5482–5487.
- SHALABY, A. R.: Significance of biogenic amines in food safety and human health. *Food Res. Int.*, 29,1996, 675 – 690.
- SILLA-SANTOS, M. H.: Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 29, 1996, 213 – 231.
- Teuber, M.; Perreten, V.; Wirsching, F.: Antibiotikumresistente Bakterien: eine neue Dimension in der Lebensmittelmikrobiologie. *Lebensm.-Technol.*, 29,1996, 182–199.

VLASTNOSTI DIMETYLAMINOCHALKÓNŮV A ICH SYNTETICKÝCH ANALÓGOV

Poškrobová M., Tomečková V., Guzy J.

Ústav lekárskej chémie, biochémie, klinickej biochémie a LABMED a.s., LF UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

V našej práci sme študovali dimetylaminochalkón, jeho absorpčné a fluorescenčné spektrálne vlastnosti. Túto známú fluorescenčnú látku –chalkón (1) sme porovnávali s vlastnosťami novosyntetizovaných chalkónových cyklických analógov s rastúcim reťazcom (-indanómom (2), -tetralómom (3) a -benzosuberómom (4) s dimetylamino skupinou (a) v para polohe v rôzne polárnych rozpúšťadlách, ktorá dáva týmto látkam fluorescenčné vlastnosti.

Zistili sme, že s rastúcim reťazcom daných látok klesá ich rozpustnosť v polárnych rozpúšťadlách, ako sa aj znižujú ich fluorescenčné schopnosti. Vo vodnom prostredí sú tieto látky zle rozpustné, nestabilné, vplyvom vody dochádza k zhášaniu ich fluorescencie.

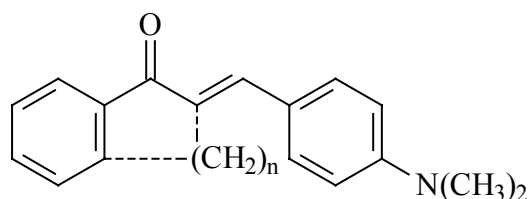
Zistili sme, že tieto látky sú vo vodnom prostredí stabilizované v prítomnosti proteínov a lipidov, a preto sme ich aplikovali na model mitochondrií izolovaných z pečene potkana. Keďže skúmané látky sú známe aj svojou protirakovinovou aktivitou, ktorá rastie v poradí rastúceho reťazca, skúmali sme vplyv týchto látok aj na respiráciu a fosforyláciu mitochondrií. Naše predbežné výsledky ukazujú možný protirakovinový mechanizmus cyklického analógu (4a), ktorý súčasne zvyšuje mitochondriálnu respiráciu a fosforyláciu. Pozoruhodný je aj protikladný účinok cyklického analógu (2a), ktorý inhiboval mitochondriálnu respiráciu a fosforyláciu a indukuje apoptózu tumorových buniek pravdepodobne pomocou vyčerpania energie vo forme ATP.

ÚVOD

Chalkóny sú prírodné medziprodukty biosynthetickej cesty flavonoidov (Perjesi a kol., 2000), polyfenolových látok, ktoré sú veľkej miere rozšírené v rastlinnej ríši (Middleton a kol., 2000). V súčasnosti existuje aj mnoho syntetických chalkónov, ktoré majú protirakovinové vlastnosti. Cieľom organických chemikov je vytvoriť taký derivát alebo cyklický analóg, ktorý bude mať najlepšie protirakovinové vlastnosti.

Cytotoxicita jednotlivých derivátov chalkónov sa mení v závislosti od funkčnej povahy a polohy substituentov, ktoré majú značný vplyv na priestorovú a elektrónovú štruktúru týchto derivátov (Perjesi a kol., 1999). Zmeny v štruktúre, hlavne zmena vo veľkosti cykloalifatického kruhu a zavedenie substituentov do *orto* polôh arylových kruhov má veľký vplyv na ich biologickú aktivitu.

Protirakovinové vlastnosti u syntetických látok na základe chemickej štruktúry skeletu rastú v poradí chalkóny (1), indanóny (2), tetralóny (3) a benzosuberóny (4). Toto rozdelenie je založené na odlišnej veľkosti cyklického kruhu vo vnútri molekuly. Chalkóny predstavujú základnú štruktúru. Indanóny majú jednu -CH₂- skupinu v cykle (n = 1), tetralóny dve (n = 2) a benzosuberóny tri skupiny (n = 3) (Dimmock a kol., 1999).



1) n = 0, 2) n = 1, 3) n = 2, 4) n = 3

Tieto zlúčeniny sú konjugované molekuly, dostatočne flexibilné na to, aby mohli vytvárať množstvo konformácií (Baas a Cerfontain, 1977). Experimentálne bolo dokázané, že benzosuberóny majú vyššiu cytotoxicitu ako ostatné deriváty (Dimmock a kol., 1999).

Pri biologickom testovaní prírodných i syntetických chalkónov bolo u rôznych derivátoch zistené široké spektrum biologických účinkov, napríklad antioxidačné, antibakteriálne (Prasad a kol., 2008), antituberkulózne (Lin a kol., 2002), antineoplastické (Perjési a kol., 2000) účinky.

Cieľom tejto práce bolo zistiť základné spektrálne a fluorescenčné vlastnosti týchto látok v rôzne polárnych rozpúšťadlách, ako aj vo vodnom prostredí. Po výbere vhodného rozpúšťadla sme sa zmerali na aplikáciu týchto látok na model mitochondrií izolovaných z pečene potkana vo vodnom prostredí respiračného média a sukcinátu, kde sme sledovali biologický vplyv (E-2-(4'-dimethylamino)-1-chalkónu (1a) a jeho syntetických cyklických analógov (E-2-(4'-dimethylamino)-1-indanónu (2a), E-2-(4'-dimethylamino)-1-tetralónu (3a), E-2-(4'-dimethylamino)-1-benzosuberónu (4a).

MATERIÁL A METODIKA

V práci sme použili pečene potkanov - samičiek rodu Wistar. Z pečene sme izolovali mitochondrie podľa Johnsona a Lardyho (1967), ktoré boli chladené v rozdrvenom ľade. Izolované mitochondrie sme rozdelili do dvoch skupín (kontrolnej a experimentálnej). Proteíny sme stanovili podľa Lowryho v modifikácii Hartreeho (1972).

Príprava vzoriek chalkónov a ich cyklických syntetických analógov

Jednotlivé skúmané látky (1a – 4a) boli rozpustené v toluéne, chloroforme, dimetylsulfoxide (DMSO), etanole na výslednú koncentráciu (10^{-5}) mol / l tesne pred použitím a boli uložené v tme. Zmes vybraného rozpúšťadla s vodou (DMSO/voda) bola pripravená vždy tesne pred meraním.

Absorpčná a fluorescenčná spektroskopia

Absorpčné spektrá sme namerali na Bio UV spektrofotometri Varian Carry 50. Fluorescenčné emisné spektrá boli merané na spektrofotometri POLYTEC SIM Aminco Bowman , Séria 2, za použitia vhodnej excitačnej vlnovej dĺžky, ktorú sme určili s prislúchajúceho maxima absorpčného spektra. Vplyv vody bol meraný pri konštantnom nastavení excitačnej a emisnej vlnovej dĺžky. Všetky merania sme uskutočnili v kremennej kvete s hrúbkou 10 mm, pri teplote $t = 20^{\circ}\text{C}$.

Respirácia mitochondrií

Spotrebu kyslíka v mitochondriách sme sledovali v respiračnom médiu, ktoré obsahovalo (K_2HPO_4 , $c = 0,3$ mol/l; KH_2PO_4 , $c = 0,3$ mol/l; KCl , $c = 0,08$ mol/l; TRIS HCl , $c = 0,015$ mol/l; MgCl_2 , $c = 6$ mmol/l; EDTA , $c = 0,78$ mol/l; redistilovaná voda) po pridaní substrátu (sukcinát, $c = 0,5$ mol/l).

V mitochondriách sme sledovali respiráciu (stav 4, bez prídavku ADP) a fosforyláciu (stav 3, s prídavkom ADP, $c = 0,01$ mol/l) potenciometricky za použitia elektródy Clarkovho typu (WTW OXI 325, Germany). Zo stavu 4 a 3 sme vypočítali respiračný kontrolný pomer (RKP).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Skúmané chalkóny (1a - 4a) sú žlté kryštály s nízkou rozpustnosťou vo vode. Naším zámerom bolo ukázať základný spektrálny charakter nových syntetických analógov chalkónov v porovnaní s jednoduchou molekulou už známeho dimetylaminochalkónu.

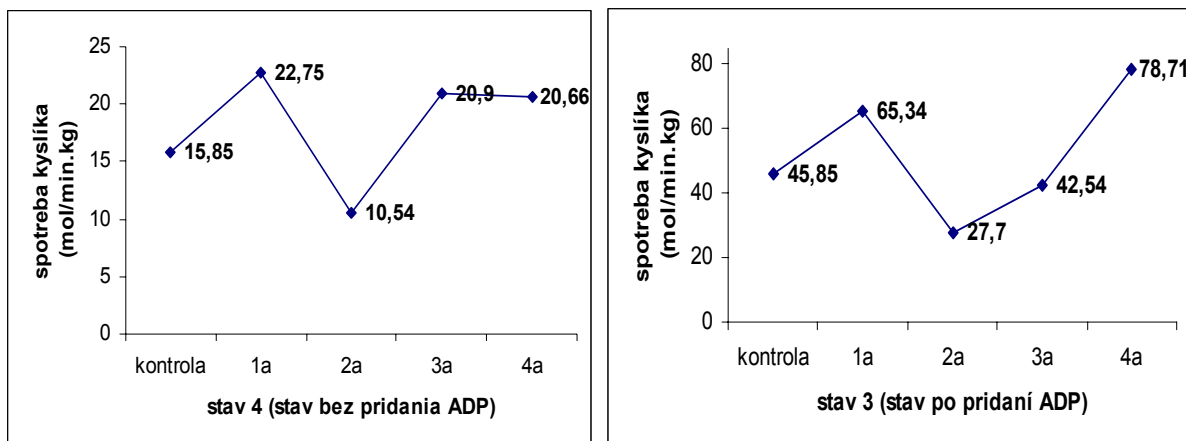
Nami skúmané látky majú široké absorpčné spektrá v ultrafialovej a viditeľnej oblasti. Absorpčné maximá všetkých skúmaných zlúčenín mali batochrómny posun v polárnych rozpúšťadlách. Najviac fluorescenčné boli látky (1a) a (2a) v chloroforme a DMSO, čo potvrdili aj merania kvantových výťažkov (Gularyan a kol., 2005).

Najväčší Stokesov posun (rozdiel medzi emisným a excitačným maximom) mali skúmané látky v DMSO, ako aj kvantový výťažok, takže v ďalšom experimente sme sa rozhodli skúmať vplyv vody na látky rozpustené v DMSO. Zistili sme, že fluorescencia molekuly (1a), známej ako chemiluminiscenčný senzor detekujúci vodu (Urano a kol., 1999; Kuznetsov a kol., 2003), bola najviac zhasaná v prítomnosti vody v porovnaní s látkami (2a - 4a).

Zhášanie fluorescencie skúmaných molekúl v prítomnosti vody by mohlo byť aj výsledkom tvorby intramolekulárnych vodíkových väzieb medzi atómami dusíka a kyslíka dimetylamino skupiny (Sorokovoi a kol., 1972; Dobretsov a kol., 1977).

Po týchto zisteniach sme sa rozhodli rozpúšťať dané látky v DMSO, tesne pred meraním ich pridávať do respiračného média so substrátom sukcinátom a aplikovať dané látky na model mitochondrií.

Porovnaním experimentálnej skupiny mitochondrií s kontrolnou, sme zistili zvýšenie respiračného kontrolného pomeru (RKP) po aplikácii látky (4a), kým látky (1a), (2a), (3a) RKP znižovali (Obr.1). Po pridaní (3a) sme zistili signifikantný nárast v respiračnom stave 4, ale pokles fosforylácie v stave 3. Mitochondriálna respirácia a fosforylácia (stav 4 a 3) sa signifikantne zvyšovali po pridaní (1a), (4a), ale oba tieto stavy boli po pridaní (2a) signifikantne znížené (Obr. 1).



Obr. 1. Mitochondriálna respirácia (stav 4) a fosforylácia (stav 3)

Predpokladáme signifikantný efekt niektorých syntetických analógov chalkónov na mitochondriálnu funkciu.

Naše predbežné výsledky ukazujú možný protirakovinový mechanizmus cyklického analógu (4a), ktorý súčasne zvyšuje mitochondriálnu respiráciu a fosforyláciu, kým naopak cyklický analóg (2a) inhibuje mitochondriálnu respiráciu a fosforyláciu pomocou indukcie apoptózy v tumorových bunkách, pravdepodobne pomocou vyčerpania energie vo forme ATP ako pozoroval Xu a kol., (2005).

POĎAKOVANIE

Realizáciu tejto práce podporila grantová agentúra VEGA 1/0624/08 „Štúdium vzťahu štruktúry a účinku chalkónov na mitochondrie“ (prof. Ing. J.Guzy, CSc).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Baas P, Cerfontain H. Conformational study on some β -phenyl- α , β -unsaturated ketones. *Tetrahedron*.1977; 33(12):1509 – 1511
- Dimmock J.R, Kandepu N.M, Nazarali A.J, Kowalchuk T.P, Motaganahalli N, Quail J W, Mykytiuk P.A, Audette G.F, Prasad L, Perjési P, Allen T.M, Santos CH.L, Szydłowski J, Clercq E, Balzarini J. Conformational and Quantitative Structure – Activity Relationship Study of Cytotoxic 2-Arylidenebenzocycloalkanones. *J. Med. Chem.* 1999; 42:1358 – 1366
- Dobretsov G.E, Petrov V.A, Mishijev V.E, Klebanov G.I, Vladimirov Yu.A. 4-Dimethylaminochalcone and 3-methoxybenzanthrone as fluorescent probes to study biomembranes. I. Spectral characteristics. *Studia Biophys.* 1977; 65(2):91 – 98
- Gularyan S.K, Dobretsov G.E, Sarkisov O.M, Gostev F.E, Svetlichny V.Yu. The lipophilic fluorescent probe 4-dimethylaminochalcone: factors responsible for the fluorescent yield. *Biofizika.* 2005; 50(5):780 – 786
- Hartree R.F. Determination of protein. A modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 1972; 48:422 – 427
- Johnson D, Lardy H. Isolation of liver or kidney mitochondria. *Methods in Enzymology.* 1967; 10:94 – 96
- Kuznetsov P.E, Usanov A.D, Ramazanov A.K, Usanov D.A, Panasenko V.I. Chemical systems for indication of the effect of a magnetic field on water. *Biomeditsinske Tekhnologii i Radioelektronika.* 2003; 1:45 – 48
- Lin Y, Zhou Y, Flavin M. T, Zhou L, Nie W, Chen F. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2002; 10(8):2795 – 2802
- Middleton E.J.R, Kandaswami CH, Theoharides T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 2000; 52:673 - 751
- Perjési P, Nusser T, Tarczay G, Sohár P. E-2-Benzylidenebenzocycloalkanones synthesis, stereostructure and NMR spectroscopic investigation. *J Mol Struct.* 1999; 479:13 – 19
- Perjési P, Bayer Z, Ember I. Effect of E-2-(4-Methoxybenzylidene)-1-benzosuberone on the 7,12-Dimethylbenz [α] anthracene – Induced Onco/Suppressor Gene Action in Vivo I: A 24 – hour Experiment. *Anticancer Research.* 2000; 20:475 – 482
- Prasad Y.R, Kumar P.P, Kumar P.R, Rao A.S. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New Chalcones of 2-Acetyl Pyridine. *E-Journal of Chemistry.* 2008; 5(1):144 – 148
- Sorokovoi V.I, Dobretsov G.E, Petrov V.A, Nikitina A.N, Vladimirov Yu.A. Dimethylaminochalcone as a luminiscent dye sensitive to conformational changes in protein. *Doklady Akademii Nauk SSSR.* 1972; 206(2):500 – 502
- Urano T, Nagao T, Takada A, Itoh H. Photosensitization mechanisms in photopolymer coating film containing photoinitiators sensitized by aminochalcone-type dye for computer-to-photopolymer plate. *Polymers for Advanced Technologies.* 1999; 10(4):244 – 250
- Xu R, Pelicano H, Zhou Y, Carew J, Feng Li, Bhalla K.N, Keating M.J, Huang P. Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells: A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia. *Cancer Research.* 2005; 65:613 - 621

PROTEOMICKÁ CHARAKTERIZÁCIA RECEPTOR-LIGANDOV, KTORÉ UMOŽŇUJÚ PRESTUP PATOGENOV CEZ HEMATOENCEFALICKÚ BARIÉRU SO ZAMERANÍM NA NEUROBORELIÓZU

Pulzová L., Bhide M.

Katedra mikrobiológie a imunológie, Ústav imunológie, Laboratórium biomedicínskej mikrobiológie a imunológie

ABSTRAKT

Borrelia burgdorferi (B.b.) je pôvodcom Lymfskej choroby (LCh), najčastejšej kliešťami prenášanej zoonózy na severnej pologuli. Neurologická manifestácia LCh u ľudí je pripisovaná penetrácii hematoencefalickej bariéry (HEB) a následnej invázii spirochét do centrálného nervového systému. Poznanie proteín-proteín interakcií medzi HEB proteínmi a proteínmi borélií je nevyhnutné pre pochopenie mechanizmu prechodu borélií do mozgu. Cieľom predkladanej práce je izolácia týchto proteínov (zo strany HEB aj zo strany patogéna) a ich následná charakterizácia. Proteíny z celobunkových lyzátov *Borrelia garinii* (PBi, neuroinváziivny kmeň) a *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (SKT2, kmeň spôsobujúci kožnú formu LCh) sme rozdelili na polyakrylamidovom géli na základe ich veľkosti pomocou metódy SDS PAGE. V ďalšom kroku sme ich preniesli na nitrocelulózovú membránu a hybridizovali s lyzátom endoteliálnych buniek HEB. Naviazané proteíny sme z membrány odstránili pomocou Stripping pufru a tieto proteíny sme podrobili ďalšej SDS PAGE. Po ofarbení striebrom sme pozorovali, že PBi má schopnosť viazať proteíny HEB, čo potvrdzuje jej neuroinváziivny charakter. Pri SKT2 sme touto metódou schopnosť viazať proteíny nepotvrdili, čo však túto schopnosť nevylučuje.

ÚVOD

Lymfská choroba je zoonóznym ochorením, ktoré prenášajú kliešte rodu *Ixodes* (všetky vývojové štádia) (Matuschka *a kol.*, 1992). Pôvodcom je *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B.b.* s. l.), ktorá bola prvýkrát popísaná v roku 1982 Burgdorferom *a kol.* (Burgdorfer *a kol.*, 1984). *B. b.* s. l. môžeme rozdeliť na tri pre ľudí patogénne genospecies: *Borrelia garinii*, *Borrelia* sensu stricto a *Borrelia afzelii* (van Dam *a kol.*, 1993). Klinické príznaky LCh závisia od lokalizácie spirochét v hostiteľskom organizme (Balmelli *a Piffaretti*, 1995). *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (SKT2) vyvoláva artritídy (Balmelli *a Piffaretti*, 1995). *Borrelia garinii* (PBi) je dobre známa svojim neuroinváziivným charakterom (Buscha *kol.*, 1996).

Boreliálna infekcia je komplexným procesom, ktorý začína presunom spirochét z čreva kliešťa do jeho slinných žliaz počas sania krvi na hostiteľovi (Rupprecht *a kol.*, 2008). *B.b.* následne preniká do kože, kde spôsobuje lokálnu infekciu – erythema migrans a ďalej sa šíri z miesta vniknutia do mnohých orgánov (srdce, kĺby, centrálny nervový systém) pomocou krvného toku alebo pozdĺž iných štruktúr ako sú napríklad periférne nervy a lymfatické cievy. Neurologické príznaky môžeme pripísať penetrácii HEB a invázii centrálného nervového systému neuroinváziivnými spirochétami (Grab *a kol.*, 2005). Je stále vecou debát ako borélie prechádza cez hematoencefalickú bariéru (HEB). Niektorí autori predpokladajú, že prechod spirochét prebieha paracelulárne (medzi endoteliálnymi bunkami) na miestach medzibunkových spojení (Grab *a kol.*, 2005), zatiaľ čo ostatní sú naklonení transcelulárnemu spôsobu prechodu (Comstock *a kol.*, 1989). Mechanizmus prestupu nie je dodnes do detailov objasnený, avšak prítomnosť borélií v cerebrospinálnej tekutine bola potvrdená pomocou kultivačných metód aj PCR (Pfister *a kol.*, 1994, Wilske *a kol.*, 2007).

MATERIÁL A METODIKA

Kmeň PBi a SKT2 sme kultivovali v BSK II médiu pri 37°C. Proteíny borélií boli získané sonikáciou celých buniek. Následne boli lyzáty prečistené pomocou 2D Clean Up kitu (Invitrogen), separované na jednojamkovom 12% polyakrylamidovom gély (Invitrogen) pomocou neredukujúcej SDS PAGE elektroforézy (120 V) a prenesené na nitrocelulóзовú membránu (70 V, 1 hod) (Invitrogen) (Obr. 1). Nešpecificky viažuce miesta na membráne sme blokovali albumínom (frakcia V.) (Sigma-Aldrich) v TBS (Tris Buffer Saline) po dobu 1 hod pri izbovej teplote. Membrány boli inkubované spolu s lyzátom buniek HEB v TBS po dobu 2 hod pri izbovej teplote a za neustáleho premiešavania. Nenaviazané proteíny HEB sme vymyli roztokom TTBS (Tris buffer saline plus Tween 20) 3x po dobu 1 min. Naviazané proteíny sme odstránili z proteínov borélií viazaných na membrány pomocou Stripping pufri (Thermo) po dobu 15 min pri izbovej teplote za neustáleho premiešavania. Tento postup sme opakovali 4x. Proteíny v Stripping pufri sme uchovali a skoncentrovali 5x na objem 500 µl. Následne sme ich prečistili metódou TCA/Acetón (Trichloroacetic acid) a ďalej sme ich separovali pomocou neredukujúcej SDS PAGE. Gél sme pre zviditeľnenie proteínov ofarbili striebrom (Bio-Rad) (Obr. 2) po dobu 15 minút. Získané prúžky sme vyrezali z gélu a uskladnili v -80°C pre ďalšiu analýzu (MALDI TOF TOF).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Borélia disponuje rôznymi mechanizmami, ktoré jej umožňujú uniknúť pred hostiteľským imunitným systémom, vrátane regulácie imunogénnych povrchových proteínov, inaktivácie efektorových mechanizmov a ukrývanie sa v menej dostupných kompartmentoch ako je napríklad extracelulárna matrix, ktorá je imunologicky privilegovaným miestom (Rupprecht a kol., 2008). Súčasný štúdie objasňujú prechod borélií cez vrstvu endoteliálnych buniek periférnej vaskulatury. Spirochéty adherujú na endotélium na medzibunkových spojeniach pričom interagujú s endotéliom po celej svojej dĺžke (Norman a kol., 2008). Medzibunkové spojenia sa preto javia ako hlavné miesto, kde prebieha extravazácia borelií.

Dodnes bolo identifikovaných 18 kandidátskych adhezívnych molekúl u spirochéty *Borrelia burgdorferi* sensu lato zúčastňujúcich sa na adhezii v periférnej vaskulature (Norman a kol., 2008). Pravdepodobne je expresovaných aj veľa ďalších proteínov s takouto schopnosťou. Taktiež bolo identifikovaných aj päť CRASP proteínov, ktoré interagujú s komplementovú kaskádu regulujúcim proteínom faktorom H, s faktor H podobným proteínom a s faktor H príbuzným proteínom (Haupt a kol., 2007). Ich prípadná spoluúčasť na adhezii v periférnej vaskulature a ani pri prechode HEB nie je potvrdená. Dodnes nie je popísaný presný proces penetrácie HEB boréliami. Predpokladáme, že ďalšie proteín : proteín interakcie ako tie, ktoré sa podieľajú na penetrácii periférnou vaskulaturou, sú potrebné a hrajú významnú úlohu počas penetrácie HEB.

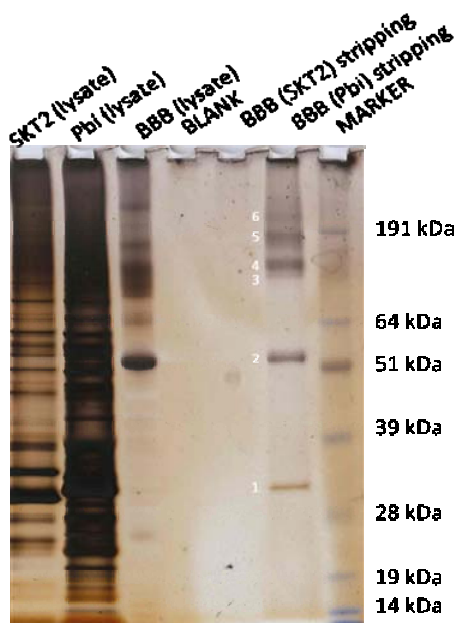
Adhézia spirochét ku vrstve endoteliálnych buniek je dôležitým krokom pri prechode HEB (Szczepanski a Benach, 1991). Naše výsledky poukazujú na schopnosť PBi viazať proteíny expresované na povrchu týchto buniek. Podarilo sa nám detegovať šesť takýchto proteínov (Obr. 2), pričom však ich počet môže byť vyšší (low abundant proteins). Z našich výsledkov vyplýva, že PBi dokáže adherovať k endotéliu HEB, z čoho môžeme usudzovať, že PBi je schopná penetrovať cez HEB.

SKT2 je schopná prechádzať cez vrstvu endoteliálnych buniek v periférnej vaskulature (Comstock a Thomas, 1989). Napriek podobnosti týchto buniek s bunkami HEB sme nezistili schopnosť viazať bariérové proteíny. Z čoho môžeme usudzovať, že SKT2 nie je schopná adherovať na endotélium a penetrovať cez HEB.

Obr. 1. Proteíny *B. garinii* (PBi) po SDS PAGE a transfere na nitrocelulózovú membránu



Obr. 2. Proteíny separované na polyakrylamidovom gély pomocou neredukujúcej SDS PAGE a ofarbené striebrom



1,2,3,4,5,6 –proteíny HEB reagujúce s PBi

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Balmelli T, Piffaretti JC. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Res Microbiol.* 1995; 146: 329-340.
- Burgdorfer W. Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J Biol Med.* 1984; 57: 515-520.
- Busch U, Hizo-Teufel C, Boehmer R, Fingerle V, Nitschko H, Wilske B, Preac-Mursic V. Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*)

- identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 1072-1078.
- Comstock LE, Thomas DD. (1989) Penetration of endothelial cell monolayers by *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 1989; 57: 1626-1628.
- Grab DJ, Perides G, Dumler JS. *Borrelia burgdorferi*, host-derived proteases, and the blood-brain barrier. *Infect Immun.* 2005; 73: 1014-1022.
- Haupt K, Kraiczy P, Wallich R, Brade V, Skerka C, Zipfel PF. Binding of human factor H-related protein 1 to serum-resistant *Borrelia burgdorferi* is mediated by borrelial complement regulator-acquiring surface proteins. *J Infect Dis.* 2007; 196: 124-133.
- Matuschka FR, Fischer P, Heiler M, Blumcke S, Spielman A. Stage-associated risk of transmission of the Lyme disease spirochete by European Ixodes ticks. *Parasitol Res.* 1992; 78: 695-698.
- Norman MU, Moriarty TJ, Dresser AR, Millen B, Kubes P, Chaconas G. Molecular mechanisms involved in vascular interactions of the Lyme disease pathogen in a living host. *PLoS Pathog.* 2008; 4: e1000169.
- Pfister HW, Wilske B, Weber K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. *Lancet.* 1994; 343: 1013-1016.
- Rupprecht TA, Koedel U, Fingerle V, Pfister HW. The pathogenesis of lyme neuroborreliosis: from infection to inflammation. *Mol Med.* 2008; 14: 205-212.
- Szczepanski A, Benach JL. Lyme borreliosis: host responses to *Borrelia burgdorferi*. *Microbiol Rev.* 1991; 55: 21-34.
- van Dam AP, Kuiper H, Vos K. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis.* 1993; 17: 708-717.
- Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007; 49: 13-21.

STANOVENIE CITLIVOSTI STAFYLOKOKOV IZOLOVANÝCH Z MÄSA RÝB VOČI VYBRANÝM ANTIBIOTIKÁM POMOCOU DVOCH MIKROBIOLOGICKÝCH METÓD

Regecová I., Pipová M., Jevinová P., Popelka P., Máté D.

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

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo stanoviť citlivosť koagulázo-negatívnych stafylokokových izolátov z mäsa dvoch druhov morských rýb (*Theragra chalcogramma* a *Scomber scombrus*) voči štyrom antibiotikám (erytromycín, tetracyklín, ampicilín, gentamicín), a to s použitím diskovej difúznej metódy podľa Kirby-Bauera a agarovej dilučnej metódy. Pri difúznej metóde sa použili komerčne vyrábané disky so známymi koncentraciami antibiotík (OXOID, Veľká Británia). Pri stanovení minimálnych inhibičných koncentrácií (MIC) boli použité testovacie platne s výslednými koncentraciami erytromycínu 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; mg.l⁻¹; tetracyklínu 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mg.l⁻¹; ampicilínu 0,25; 0,5; 1,0 mg.l⁻¹ a gentamicínu 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mg.l⁻¹. Získané výsledky boli vyhodnotené podľa kritérií stanovených CLSI (NCCLS) pre diskový difúzny test a pre mikrodilučnú metódu (CLSI, 2006b). Zo sumarizácie dosiahnutých výsledkov vyplýva, že u stafylokokových izolátov bola obidvomi mikrobiologickými metódami najčastejšie potvrdená rezistencia voči ampicilínu a naopak najväčšia citlivosť bola zaznamenaná voči gentamicínu. Takmer u polovice stafylokokových izolátov bola obidvomi metódami preukázaná súčasná rezistencia na viac ako jedno testované antibiotikum.

ÚVOD

Rezistencia voči používaným antibiotikám sa stáva v poslednom období veľkým problémom tak v humánnej ako aj vo veterinárnej medicíne. Pravidelný nárast antibiotickej rezistencie sa každoročne zaznamenáva u mnohých bakteriálnych druhov, vrátane zástupcov rodu *Staphylococcus*. Rezistentné baktérie sa môžu bez problémov šíriť priamo alebo nepriamo zo zvierat na ľudí a naopak. Jednou z významných ciest prenosu bakteriálnej antibiotickej rezistencie medzi živočíšnou a ľudskou populáciou je potravinový reťazec. Baktérie rezistentné na niektoré antibiotiká sa s potravou dostávajú do zažívacieho traktu konzumenta, kde môžu túto vlastnosť prenášať na celý rad doposiaľ citlivých baktérií.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky na mikrobiologické vyšetrenie boli odobraté zo svaloviny 9 vzoriek mrazených filiet z Mraziarní Poprad s.r.o. – z toho 5 filiet pochádzalo z mrazenej aljašskej tresky (*Theragra chalcogramma*) a 4 z mrazenej atlantickej makrely (*Scomber scombrus*). Odber vzoriek na mikrobiologické vyšetrenie sa vykonal v súlade s požiadavkami STN ISO 3100-2; základná suspenzia a ďalšie desaťnásobné riedenia sa pripravili podľa pokynov STN ISO 6887. Z odobratých vzoriek sa stafylokoky izolovali v zmysle pokynov STN ISO 6888-1. Všetky izoláty stafylokokov sa podrobili skúmkavkovej plazmokoagulázovej skúške (STAFYLO PK, IMUNA, Šarišské Michaľany).

Citlivosť jednotlivých izoaltov stafylokokov na vybrané antibiotiká sa zisťovala diskovou difúznou metódou podľa Kirby-Bauera (CLSI, 2006a), pričom sa použili komerčne vyrábané disky (OXOID, Veľká Británia) so známymi koncentraciami antibiotík. Pri stanovení minimálnych inhibičných koncentrácií (MIC) agarovou dilučnou metódou boli použité testovacie platne s nasledovnými výslednými koncentraciami erytromycínu 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; mg.l⁻¹; tetracyklínu 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mg.l⁻¹; ampicilínu 0,25; 0,5; 1,0 mg.l⁻¹ a gentamicínu 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 mg.l⁻¹. Výsledky boli vyhodnotené podľa interpretačných kritérií stanovených CLSI (NCCLS) pre diskový difúzny test a pre mikrodilučnú metódu

(CLSI, 2006b), na základe ktorých boli jednotlivé izoláty zaradené medzi citlivé (C), intermediárne citlivé (I) alebo rezistentné (R).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kultivačným mikrobiologickým vyšetrením vzoriek mrazených filiet dvoch druhov morských rýb sa získalo spolu 55 izolátov stafylokokov. Všetky izoláty boli na základe výsledkov skúmvkovej plazmokoagulázovej skúšky koagulázo-negatívne.

Tab. 1. Prehľad počtu citlivých (C), intermediárne citlivých (I) a rezistentných (R) izolátov stafylokokov z mrazených filiet aliašskej tresky voči vybraným antibiotikám

Antibiotikum	Diskový difúzny test			Agarová dilučná metóda		
	R	I	C	R	I	C
Tetracyklín	12	1	17	4	3	13
Erytromycín	12	10	8	22	8	0
Ampicilín	10	0	20	27	0	3
Gentamicín	0	3	27	0	3	27

Ako vyplýva z tabuľky 1, pri stanovení citlivosti 30 stafylokokových izolátov z mrazených filiet aliašskej tresky pomocou diskového difúzneho testu bola potvrdená rezistencia na tetracyklín a erytromycín u 12 kmeňov, na ampicilín u 10 kmeňov. Pri stanovení citlivosti pomocou agarovej dilučnej metódy bola potvrdená rezistencia na erytromycín u 22 kmeňov, na tetracyklín u 4 kmeňov a na ampicilín u 27 kmeňov. Rezistencia voči gentamicínu nebola u uvedenej skupiny stafylokokových izolátov potvrdená ani v jednom prípade.

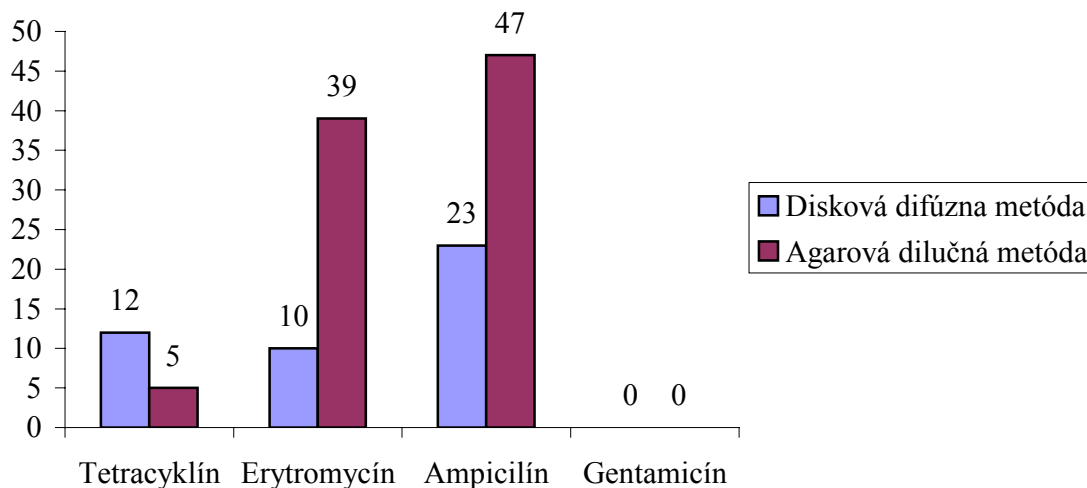
Tab. 2. Prehľad počtu citlivých (C), intermediárne citlivých (I) a rezistentných (R) izolátov stafylokokov z mrazených filiet atlantickej makrely voči vybraným antibiotikám

Antibiotikum	Diskový difúzny test			Agarová dilučná metóda		
	R	I	C	R	I	C
Tetracyklín	0	1	24	1	5	19
Erytromycín	8	7	10	18	6	1
Ampicilín	13	0	12	20	0	5
Gentamicín	0	0	25	0	0	25

Pri stanovení citlivosti 25 stafylokokových izolátov z mäsa mrazenej atlantickej makrely pomocou diskového difúzneho testu bola potvrdená rezistencia na erytromycín u 8 kmeňov, na ampicilín u 13 kmeňov, ale ani v jednom prípade sa nepotvrdila rezistencia voči ampicilínu a gentamicínu. Pri stanovení citlivosti pomocou agarovej dilučnej metódy bola potvrdená rezistencia na erytromycín u 18 kmeňov, na tetracyklín u 1 kmeňa a na ampicilín u 20 kmeňov. Ani v jednom prípade sa nepotvrdila rezistencia voči gentamicínu (Tab. 2).

Na základe uvedených výsledkov možno konštatovať, že z celkového počtu 55 stafylokokových izolátov z mäsa dvoch druhov mrazených morských rýb bola diskovou difúznou metódou potvrdená rezistencia na ampicilín u 23 kmeňov, na tetracyklín u 27 kmeňov, na erytromycín u 10 kmeňov. Pri stanovení citlivosti pomocou agarovej dilučnej metódy, bola potvrdená rezistencia na ampicilín u 47 kmeňov, na erytromycín u 39 kmeňov a na tetracyklín u 5 kmeňov (Graf 1). Okrem uvedených výsledkov, u 24 kmeňov testovaných diskovou difúznou metódou a u 31 kmeňov testovaných dilučnou metódou bola potvrdená rezistencia na viac ako jedno testované antibiotikum.

Graf 1 Počty stafylokokových izolátov z mrazených filiet morských rýb rezistentných voči vybraným antibiotikám (n = 55)



Na základe sumarizácie dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že u stafylokokových izolátov z mrazených filiet dvoch druhov morských rýb bola diskovou difúznou metódou a tiež agarovou dilučnou metódou najčastejšie zaznamenaná rezistencia na ampicilín a naopak ani u jedného izoátu nebola potvrdená rezistencia na gentamicín. Približne u polovice stafylokokových izolátov bola taktiež obidvoma mikrobiologickými metódami preukázaná súčasná rezistencia na viac ako jedno testované antibiotikum.

Ako vyplýva z výsledkov získaných použitím dvoch mikrobiologických metód, u stafylokokových izolátov zo vzoriek mäsa dvoch druhov morských rýb hodnotených v zmysle kritérií CLSI (2006b) sa prejavila najväčšia rezistencia na ampicilín a bola preukázaná aj súčasná rezistencia na viac ako jedno antibiotikum. Na uvedené skutočnosti poukazujú viacerí autori, podľa ktorých percentuálny podiel výskytu rezistencie a multirezistencie na uvedené antibiotiká je na poprednom mieste, hoci testované stafylokokové izoláty pochádzajú z iných komodít, ako tie, ktoré boli predmetom tejto štúdie.

KASZANYITZKY a kol. (2001) testovali v Maďarsku 806 stafylokokových kmeňov izolovaných z človeka, potravín a rôznych druhov zvierat. Vo svojej práci uvádzajú, že zo 428 stafylokokových kmeňov izolovaných z potravín živočíšneho pôvodu 7 % vykazovalo rezistenciu na erytromycín a 13 % na tetracyklín.

V štúdií BARDOŇA a kol. (2007) sa u kmeňov *Staphylococcus* spp. izolovaných z potravín živočíšneho pôvodu a z potravinových zvierat potvrdila značná rezistencia na tetracyklín (22,6 %) a erytromycín (19 %). U jedného koagulázo-negatívneho kmeňa *Staphylococcus* spp. s rezistenciou voči erytromycínu bol zároveň preukázaný inducibilný typ rezistencie aj voči klyndamicínu.

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať, že rezistencia bakteriálnych kmeňov voči antibiotikám bola a stále je aktuálnym problémom. Preto pre zamedzenie jej šírenia je potrebné dodržiavať preventívne opatrenia v hygiene prostredia, dbať na racionálne užívanie antibiotík a antibiotickú rezistenciu neustále monitorovať.

POĎAKOVANIE

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore z grantovej úlohy VEGA 1/0661/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bardoň J., Kolář M., Schlegelová J., Vágnerová I., Koukalová D., Petrželová J. Rezistence vůči antimikrobiálním látkám u kmenů *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. izolovaných z potravin živočišného původu. *Veterinářství* 2007; 57: 260-3.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. CLSI document M2-A9 (9th ed.). Wayne, PA, USA, 2006a: 35 s.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th Informational Supplement. CLSI document M100-S16. Wayne, PA, USA, 2006b, 92 s.
- Kaszanyitzky E.J., Jánosi Sz., Egyed Zs., Ágost G., Semjén G. Antibiotic resistance of staphylococci from humans, food and different animal species according to data of the hungarian resistance monitoring system in 2001. *Acta Veterinaria Hungarica* 2003; 51: 451-4.
- STN ISO 3100-2. Mäso a mäsové výrobky. Odber vzoriek a príprava analytických vzoriek. Časť 2: Príprava analytických vzoriek na mikrobiologické skúšanie. SÚTN Bratislava, 1999.
- STN ISO 6887. Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na prípravu riedení pri mikrobiologickom skúšaní. SÚTN Bratislava, 1997.
- STN EN ISO 6888-1. Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda stanovenia počtu koagulázopozitívnych stafylokokov. Časť 1: Metóda s použitím Bairdovho-Parkerovho agarového média. SÚTN Bratislava, 2001.

BIOINFORMATICKÁ ANALÝZA PROFÁGOVÝCH ENDOLYZÍNŮV A IM PODOBNÝCH PROTEÍNŮV Z RADU *LACTOBACILLALES*

Serenčová L.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Endolyzíny, ako hydrolázy bakteriálnych bunkových stien fágového pôvodu, schopné degradovať peptidoglykán v bakteriálnych bunkových stenách, sú v súčasnosti značne študovanou triedou enzýmov. Vďaka ich úzkej cieľovej špecificite a nízkej pravdepodobnosti vzniku rezistencie sa uvažuje o možnostiach ich terapeutického využitia, ako alternatívy klasických antibiotík.

V našej práci sme študovali výskyt endolyzínových a im podobných génov v genómoch baktérií patriacich do radu *Lactobacillales*. S využitím bioinformatických programov sme porovnávali a analyzovali proteínové sekvencie katalytických a cell wall binding (CWB) domén týchto enzýmov, ich fylogenetickú príbuznosť a sledovali sme preferencie ich konkrétnych kombinácií a prípadný výskyt prirodzeného „domain shufflingu“. Existencia tohto javu sa vo vybranej skupine enzýmov potvrdila len v obmedzenej miere, z čoho usudzujeme, že trendom v prírode je distribúcia „osvedčených“ kombinácií katalytických a CWB domén endolyzínových génov ako celkov.

ÚVOD

Hydrolázy bakteriálnych bunkových stien predstavujú rozsiahlu skupinu enzýmov rôzneho pôvodu, ktorých substrátom je najdôležitejšia zložka bunkových stien baktérií – peptidoglykán. Prirodzeným dôsledkom ich pôsobenia je rozrušenie bunkovej steny a lýza bakteriálnych buniek. Jedným zo zdrojov týchto enzýmov je genóm bakteriofágov, ktoré ich exprimujú v hostiteľskej bunke za účelom uvoľnenia fágového potomstva (Nigutová a kol., 2008). Podskupina hydroláz kódovaná fágmi nesie názov endolyzíny. Tieto enzýmy – ako aj väčšina ostatných peptidoglykánových hydroláz – pozostávajú z minimálne dvoch domén. N-terminálna doména je väčšinou katalytická, zabezpečuje enzymatickú aktivitu, zatiaľ čo C-terminálna doména umožňuje väzbu enzýmu k bunkovej stene („cell wall binding domain“, CWB doména) (Loessner, 2005). Endolyzínové a im podobné gény možno nájsť aj v genómoch baktérií, či už ako dôsledok prítomnosti profágov, alebo ako ich pozostatok. Jednou z vlastností endolyzínov je ich úzka cieľová špecificita. Už malé množstvá purifikovaných rekombinantných endolyzínov pridané do bakteriálnej kultúry spôsobujú bezprostrednú lýzu buniek (Fischetti, 2005). Správne zvolený endolyzín tak dokáže eliminovať patogény, bez narušenia normálnej bakteriálnej mikroflóry. V našej práci sme sa zamerali na štúdium endolyzínov z radu *Lactobacillales* – skupinu Gram-pozitívnych, laktát produkujúcich a v prírode všadeprítomných baktérií (Lauková, 1993). Tieto baktérie sú bežnou súčasťou prirodzenej mikroflóry slizníc živočíchov a človeka, no kvôli nadmernému používaniu antibiotík dochádza v poslednej dobe k vzrastu počtu antibioticky-rezistentných kmeňov, spôsobujúcich závažné infekcie (Štovčík a kol., 2007), potenciálne zvládnuteľné práve pomocou peptidoglykánových hydroláz, vrátane endolyzínov. Bioinformatickou analýzou dostupných proteínových sekvencií endolyzínov sme sledovali prirodzené trendy vo vzájomných kombináciách jednotlivých domén a prípadnú existenciu prirodzeného „domain shufflingu“.

MATERIÁL A METODIKA

V databáze <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> sme vyhľadali dostupné proteínové sekvencie endolyzínov a im podobných génov z radu *Lactobacillales*. Algoritmom blastp sme sekvencie porovnali s ostatnými sekvenciami dostupnými v databáze a určili ich doménovú štruktúru.

Zo všetkých sekvencií sme vybrali tie, u ktorých bol známy typ katalytickej, ako aj CWB domény. Fylogenetickou analýzou pomocou programu MEGA 4 (Tamura a kol., 2007), metódou maximum parsimony, sme skonštruovali dva fylogenetické stromy vybraných endolýzínov, zvlášť podľa sekvencií ich katalytických a CWB domén. Tieto stromy sme následne porovnali, s cieľom overiť mieru odlišností, ktorá je úmerná intenzite prirodzeného „domain shufflingu“.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Doménová štruktúra peptidoglykánových hydroláz predstavuje potenciál pre konštruovanie nových rekombinantných enzýmov s umelo vytvorenými kombináciami katalytických a CWB domén (umelý „domain shuffling“). Týmto spôsobom možno pripraviť enzýmy so želanou cieľovou špecifitou (zabezpečenou CWB doménou) a s konkrétnym typom enzymatickej aktivity, zacielenej na vybraný typ chemických väzieb v peptidoglykáne (Croux a kol., 1993; Sanz a kol., 1996). V našej práci sme analyzovali vybrané proteínové sekvencie endolýzínov a im podobných génov z radu *Lactobacillales* (dáta dostupné k 17.2.2009), sledovali sme typ katalytickej a CWB domény (tabuľka 1). Následne sme sekvencie samostatných domén podrobili fylogenetickej analýze. Výsledné fylogenetické stromy sme vzájomne porovnali pospájaním katalytických a CWB domén spoločne reprezentujúcich jeden proteín (obrázok 1). Výsledky naznačujú, že miera príbuznosti katalytických domén jednotlivých proteínov vo väčšine prípadov zodpovedá miere príbuznosti ich CWB domén (približne rovnobežné spojnice clusterov jednotlivých stromov), aj keď existujú výnimky. Možno teda povedať, že trendom v prírode je distribúcia endolýzínových génov ako celkov a prirodzený „domain shuffling“ sa v ich prípade vyskytuje len v obmedzenej miere. Napriek tomu však umelý „domain shuffling“ možno pokladať za nepostrádateľnú metódu v enzýmovom inžinierstve.

POĎAKOVANIE

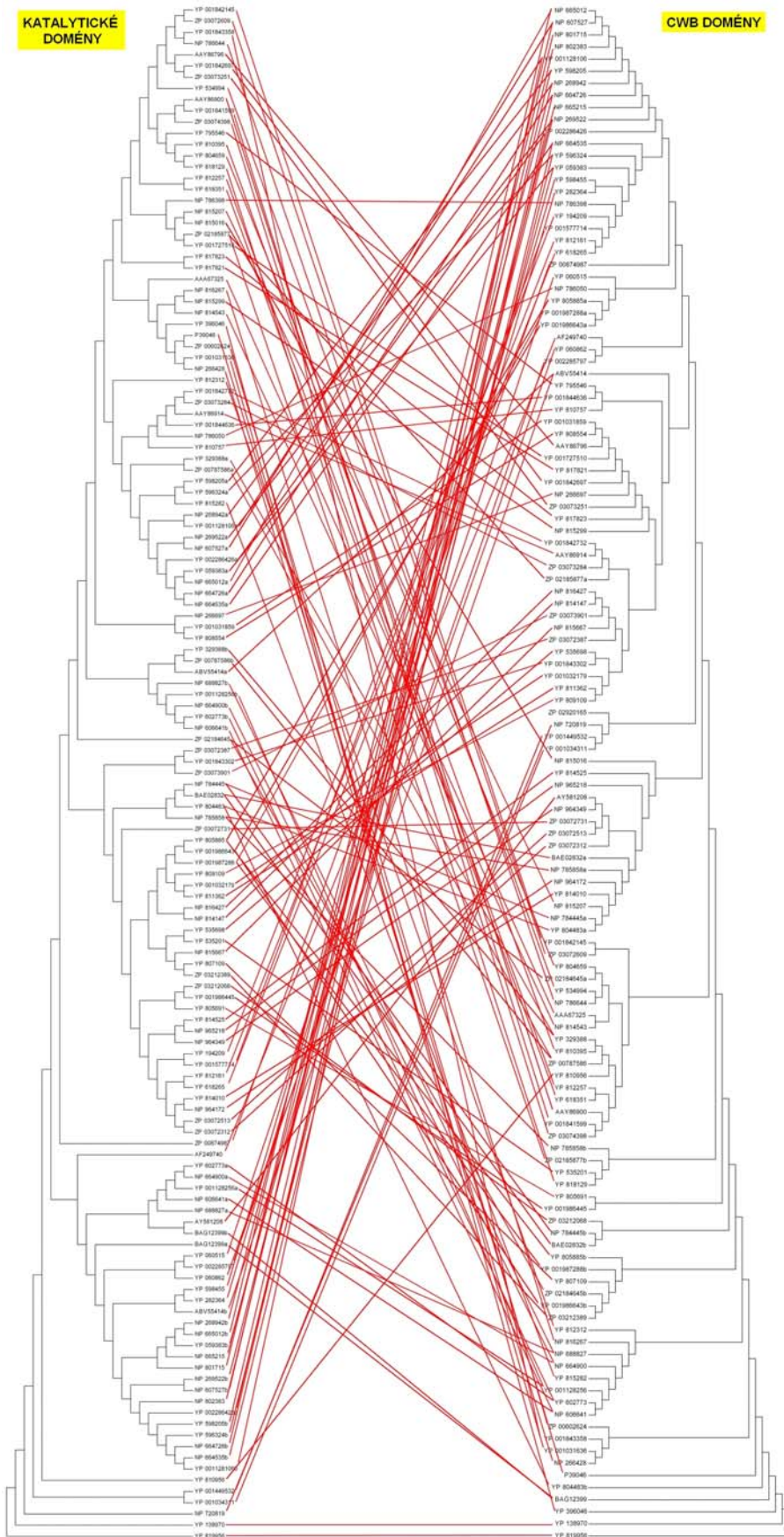
Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0586-07 a Vedeckou grantovou agentúrou VEGA - grant č. 2/0006/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Croux, C., Ronda, C., López, R., García, J. L. Interchange of functional domains switches enzyme specificity: construction of a chimeric pneumococcal-clostridial cell wall lytic enzyme. *Mol Microbiol.* 1993, 9(5): 1019-1025.
- Fischetti, V. A. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol.* 2005,13(10): 491-496.
- Lauková, A. Enterococci and staphylococci isolates from rumen of fallow deers and their antimicrobial activity. *New Microbiol.* 1993, 16(4): 351-357.
- Loessner, M. J. Bacteriophage endolysins-current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol.* 2005, 8(4): 480-487.
- Nigutová, K., Styriak, I., Javorský, P., Pristas, P. Partial characterization of *Enterococcus faecalis* bacteriophage F4. *Folia Microbiol (Praha).* 2008, 53(3): 234-236.
- Sanz, J. M., García, P., García, J. L. Construction of a multifunctional pneumococcal murein hydrolase by module assembly. *Eur J Biochem.* 1996, 235(3): 601-605.
- Štovčík, V., Javorský, P., Pristaš, P. Antibiotic resistance patterns and resistance genes in enterococci isolated from sheep gastrointestinal tract in Slovakia. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2008, 52: 53-57.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007, 24(8): 1596-1599.

ID	doménnv katalytická	CWB	ID	doménnv katalytická	CWB
AY581208	Amidase 5	SH3_5	NP_664900	Amidase 5	Cpl-7
AAA67325	Glucosaminidase	LysM		Glucosaminidase	
P39046	Glucosaminidase	LysM	NP_664726	Glucosaminidase	SH3_5
ZP_00602624	Glucosaminidase	LysM		CHAP (amidase)	
NP_814543	Glucosaminidase	LysM	NP_664535	Glucosaminidase	SH3_5
BAG12399	Lysozyme like			CHAP (amidase)	
	Amidase 5	SH3_5		Glucosaminidase	
NP_816427	GH25 muramidase	LysM	NP_665012	CHAP (amidase)	SH3_5
NP_815667	GH25 muramidase	LysM	YP_282364	CHAP (amidase)	SH3_5
NP_815207	Amidase 2	SH3_5		Glucosaminidase	
NP_815016	Amidase 2	SH3_5	NP_607527	CHAP (amidase)	SH3_5
NP_814147	GH25 muramidase	LysM		Amidase 5	
NP_816267	Glucosaminidase	LysM	NP_606641	Glucosaminidase	Cpl-7
NP_815299	Glucosaminidase	LysM		Glucosaminidase	
YP_194209	GH25 muramidase	SLAP	YP_596324	CHAP (amidase)	SH3_5
YP_795546	endopeptidase	LysM		Glucosaminidase	
YP_807109	GH25 muramidase	LysM	YP_002286426	CHAP (amidase)	SH3_5
YP_805885	GH25 muramidase	SH3_5		CHAP (amidase)	
YP_805691	GH25 muramidase	LysM	YP_002285797	CHAP (amidase)	SH3_5
YP_001987288	GH25 muramidase	SH3_5	NP_802383	CHAP (amidase)	SH3_5
		LysM	NP_801715	CHAP (amidase)	SH3_5
YP_001986643	GH25 muramidase	SH3_5	YP_001128106	Glucosaminidase	SH3_5
		LysM		CHAP (amidase)	
YP_812257	endopeptidase	LysM	YP_001128256	Amidase 5	Cpl-7
YP_812161	GH25 muramidase	SLAP		Glucosaminidase	
YP_812312	Glucosaminidase	SLAP	YP_001034311	CHAP (amidase)	LysM
YP_815282	GH25 muramidase	Cpl-7	YP_817823	SCP bacterial (peptidase)	LysM
YP_814525	GH25 muramidase	SH3_5	YP_818129	endopeptidase	LysM
YP_814010	GH25 muramidase	SH3_5	YP_817821	SCP bacterial (peptidase)	LysM
YP_001577714	GH25 muramidase	SLAP	YP_810956	CHAP (amidase)	LysM
NP_965218	GH25 muramidase	SH3_5	YP_810757	Glucosaminidase	LysM
NP_964349	GH25 muramidase	SH3_5	YP_810395	endopeptidase	LysM
NP_784445	GH25 muramidase	SH3_5	ZP_02185877	Amidase_2	LysM
		LysM			PG_binding_1
NP_785858	GH25 muramidase	SH3_5	ABV55414	Amidase 3	LysM
		LysM		CHAP (amidase)	
NP_786050	Glucosaminidase	SH3_5	ZP_03072731	GH25 muramidase	SH3_5
NP_786398	GH25 muramidase	SH3_5	ZP_00874987	CHAP (amidase)	LysM
YP_001842732	Glucosaminidase	LysM		Glucosaminidase	
YP_396046	Glucosaminidase	LysM	ZP_00787586	Amidase 3	LysM
YP_535698	GH25 muramidase	LysM		Amidase_3	
YP_535201	GH25 muramidase	LysM	ZP_02184645		LysM
YP_804659	endopeptidase	LysM			PG_binding_1
YP_804483	GH25 muramidase	SH3_5	BAE02832	GH25 muramidase	SH3_5
		LysM			LysM
YP_001032179	GH25 muramidase	LysM	ZP_03212389	GH25 muramidase	LysM
YP_001031859	Glucosaminidase	LysM	AAV86914	Glucosaminidase	LysM
YP_001031636	Glucosaminidase	LysM	ZP_03073284	Glucosaminidase	LysM
YP_808554	Glucosaminidase	LysM	YP_534994	endopeptidase	LysM
YP_811362	GH25 muramidase	LysM	ZP_03073901	GH25 muramidase	LysM
YP_809109	GH25 muramidase	LysM	ZP_03072387	GH25 muramidase	LysM
NP_266697	Glucosaminidase	LysM	YP_001843302	GH25 muramidase	LysM
NP_688827	Amidase 5	Cpl-7	NP_266428	Glucosaminidase	LysM
	Glucosaminidase		AAV86900	endopeptidase	LysM
YP_329388	Glucosaminidase	LysM	YP_001841599	endopeptidase	LysM
	Amidase 3		YP_618351	endopeptidase	LysM
YP_001449532	CHAP (amidase)	LysM	ZP_03074398	endopeptidase	LysM
YP_598455	CHAP (amidase)	SH3_5	YP_001727510	SCP bacterial (peptidase)	LysM
NP_268942	Glucosaminidase	SH3_5	AAV86796	endopeptidase	LysM
	CHAP (amidase)		YP_001842697	endopeptidase	LysM
NP_269522	Glucosaminidase	SH3_5	YP_001844636	endopeptidase	LysM
	CHAP (amidase)		ZP_03212068	GH25 muramidase	LysM
YP_598205	Glucosaminidase	SH3_5	YP_618265	GH25 muramidase	SLAP
	CHAP (amidase)		ZP_03073251	endopeptidase	LysM
NP_665215	CHAP (amidase)	SH3_5	ZP_03072609	endopeptidase	LysM
YP_060862	CHAP (amidase)	SH3_5	ZP_03072513	GH25 muramidase	SH3_5
YP_060515	CHAP (amidase)	SH3_5	ZP_03072312	GH25 muramidase	SH3_5
YP_059383	Glucosaminidase	SH3_5	YP_001844636	Glucosaminidase	LysM
	CHAP (amidase)		YP_001843358	endopeptidase	LysM
YP_602773	Amidase 5	Cpl-7	NP_138970	CHAP (amidase)	LysM
	Glucosaminidase		NP_964172	GH25 muramidase	SH3_5
YP_819956	CHAP (amidase)	LysM	NP_786644	endopeptidase	LysM
			NP_720819	CHAP (amidase)	LysM
			YP_001986445	GH25 muramidase	LysM
			ZP_02920165	CHAP (amidase)	LysM

Tab. 1. Doménová štruktúra peptidoglykánových hydroláz z radu *Lactobacillales*.



Obr. 1. Vzájomné porovnanie fylogenetických stromov katalytických a CWB domén vybraných endolýzínov z radu *Lactobacillales*.

PREKVAPUJÚCO VYSOKÁ VARIABILITA TREPONÉM V BACHORE PREŽŮVAVCOV

Sikorová L.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Variabilita treponém sa študovala analýzou sekvencií získaných z 16S rRNA génových bánk z celkovej DNA z bachorovej šťavy ovce a kravy. Fylogenetickou analýzou príbuzností sa získané 16S rRNA sekvencie treponém klasifikovali do 15 fylotypov, z ktorých len jediný je príbuzný doteraz známemu druhu bachorových treponém *T. bryanti*. Všetky ostatné získané sekvencie predstavujú pravdepodobne nové, doteraz nepopísané druhy treponém z bachora prežúvavcov. Pozorovala sa významná druhová špecificita treponém, keď len dva fylotypy sa pozorovali u oboch druhov prežúvavcov.

ÚVOD

Bachorový ekosystém, ktorý je tvorený populáciou rôznorodých mikroorganizmov sa dostal do popredia vedeckého záujmu hlavne z hľadiska získavania poznatkov o jednotlivých mikroorganizmoch, s možnosťou ich využitia v poľnohospodárskom výrobe. K doteraz známym bachorovým treponémam ako *T. bryantii* (Stanton a Canale-Parola, 1980) a *T. saccharophilum* (Paster a Canale-Parola, 1985) pribudli v poslednom čase nové druhy bachorových treponém ako *T. ziolecki* (Piknová a kol., 2008), *Treponema S a T* (Piknová a kol., 2006), ktorých úloha ani výskyt v bachore prežúvavcov nie je podrobne známa. Spomenuté druhy bachorových treponém disponujú siedmimi typmi restrično- modifikačných systémov II typu, ktoré plnia obrannú funkciu proti bakteriofágovej infekcii (Piknová a kol., 2005).

Cieľom tejto práce bolo rozšíriť poznatky o výskyte a zastúpení jednotlivých treponém v bachorovom ekosystéme.

MATERIÁL A METODIKA

Príprava 16S rDNA génových bánk

Z totálnych DNA, ktoré sa získali izoláciou z bachorovej šťavy ovce a kravy (Pospiech a Neumann, 1995) sa amplifikovali 16S rRNA amplikóny pomocou treponema špecifických primerov TrepC90R (5'-GTTACGACTTCACCCTCCT-3') a Trep1500F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') (Siqueira a kol., 2005) za nasledujúcich podmienok: úvodná denaturácia (2 min., 94°C), 30 amplifikačných cyklov pozostávajúcich z denaturácie (45 s, 94°C), annealingu (45 s, 60°C), extenzie (90 s, 72°C) a záverečnej extenzie (15 min., 72°C). PCR produkty o veľkosti 1500 bp sa klonovali do pTZ57R/T vektora (*Fermentas*). Získané rekombinantné plazmidy sa izolovali (Miniprep, *Sigma*) a sekvenčne analyzovali.

Fylogenetická analýza 16S rRNA sekvencií treponém.

Získané 16S rRNA sekvencie sa identifikovali pomocou RDP databázy (Maidak a kol., 1997) a následne analyzovali algoritmom BlastN NCBI databázy (<http://www.ncbi.nih.gov/>). Fylogenetický strom 16S rRNA sekvencií treponém sa konštruoval použitím NJ (Neighbour-Joining) metódy zo softwarového programu MEGA4 (Tamura a kol., 2007).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Variabilita treponém sa študovala fylogenetickou analýzou 16S rRNA sekvencií treponém získaných prípravou génových bánk z bachorovej šťavy ovce a kravy, teda s použitím nekultivačného prístupu. Použitím treponema špecifických primerov sa z totálnej DNA ovce a kravy amplifikovali PCR amplikóny o veľkosti 1500 bp a následne klonovali. Z celkového

počtu viac než 300 analyzovaných klonov 24 obsahovalo 16S rRNA sekvencie, pričom 13 sekvencií pochádzalo z bachorového obsahu ovce a 11 sekvencií z bachorového obsahu kravy. Pomocou RDP databázy bolo 19 sekvencií klasifikovaných do rodu *Treponema* a 5 sekvencií do rodu *Spirochaeta*. Pri štúdiu fylogenetickú príbuznosti sa na začlenenie do fylotypu použila hranica podobnosti 97 %. Fylogenetická príbuznosť získaných sekvencií s doteraz známymi sekvenciami treponém je uvedená v Tab.1 a Obr. 1.

Tab.1. BlastN analýza 16S rRNA sekvencií treponém získaných zo 16S rDNA génových bánk prežúvavcov.

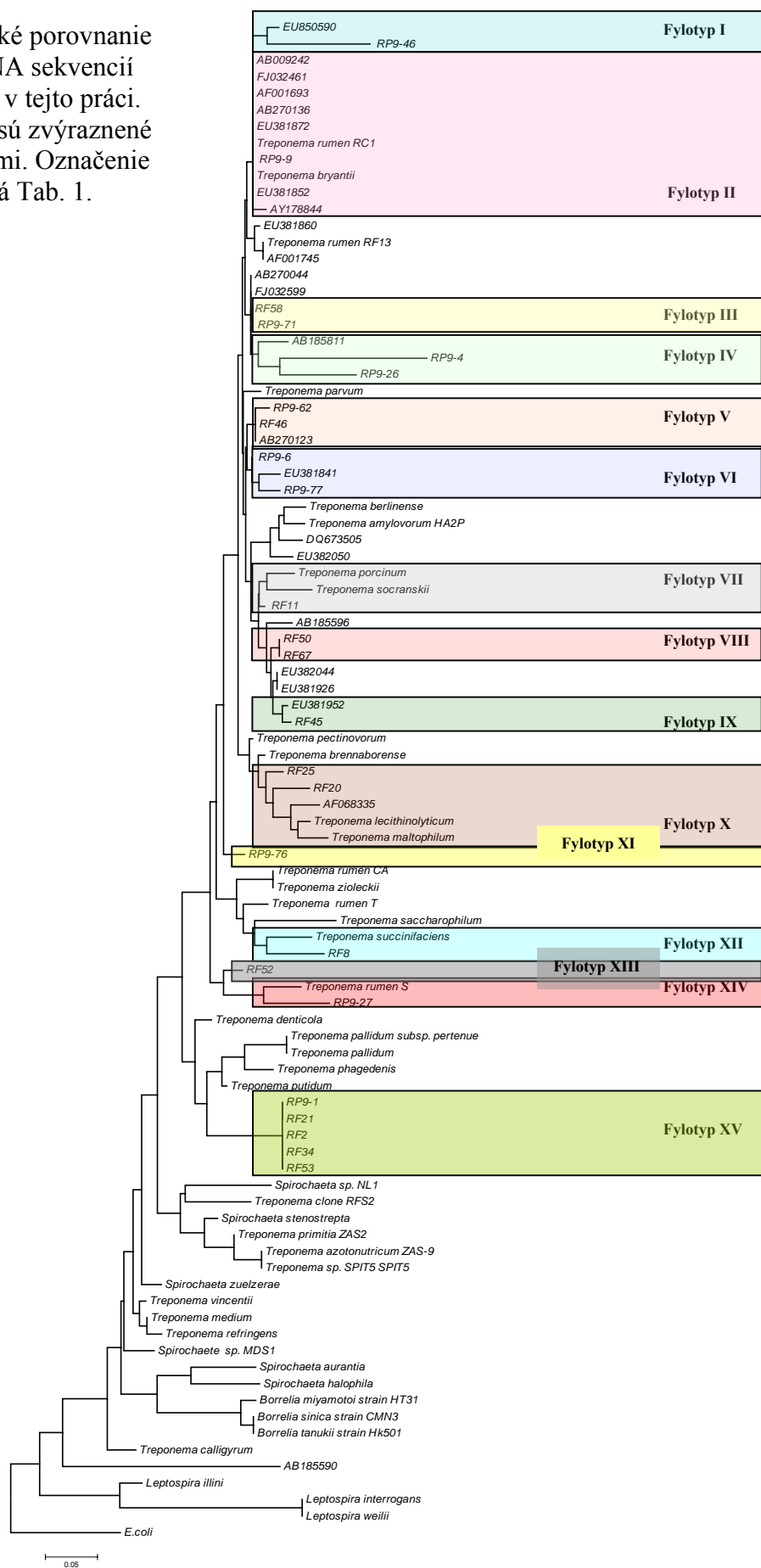
Fylotyp	BlastN 16S rRNA sekvencií treponém (% podobnosť)	Hostiteľ (celkový počet sekvencií)	
		ovca (13)	krava (11)
		počet sekvencií vo fylotype	
I	<i>Treponema bryantii</i> (92 %)	-	1
II	<i>Treponema bryantii</i> (91 %)	-	1
III	<i>Treponema bryantii</i> (96 %)	-	1
IV	<i>Treponema bryantii</i> (93 %)	-	2
V	<i>Treponema bryantii</i> (97 %)	1	1
VI	<i>Treponema bryantii</i> (96 %)	-	2
VII	<i>Treponema bryantii</i> (92 %)	1	-
VIII	<i>Treponema bryantii</i> (91 %)	2	-
IX	<i>Treponema bryantii</i> (91 %)	1	-
X	<i>Treponema zioleckii</i> (90 %)	2	-
XI	<i>Treponema bryantii</i> (91 %)	-	1
XII	<i>Treponema socranskii</i> (85 %)	1	-
XIII	<i>Treponema zioleckii</i> (89 %)	1	-
XIV	<i>Treponema zioleckii</i> (87 %)	-	1
XV	<i>Spirochaeta</i> sp. Grapes TMA14 (90 %)	4	1

Prevažná väčšina nami získaných sekvencií (58,3 %) sa vzdialene podobá najdlhšie známemu druhu bachorových treponém *T. bryantii*. Výskyt *T. bryantii* podobných sekvencií je však významne vyšší u kravy (81 %) ako u ovce (38 %). Či je tento rozdiel spôsobený hostiteľskou špecificitou, alebo rozdielmi v type prijímanej potravy, prípadne kombináciou oboch javov nie je v tejto chvíli zrejmé. Vo všeobecnosti sa pozorovala významná hostiteľská špecificita treponém, keď z 15 fylotypov sú len dva spoločné pre oba druhy študované druhy prežúvavcov (Tab. 1). Významné rozdiely sa pozorovali aj vo výskyte organizmov podobných spirochéte *Spirochaeta* sp. Grapes TMA14, ktoré sa vyskytujú oveľa častejšie u ovce (31 %) ako u kravy (9 %). V bachorovom obsahu ovce predstavujú tieto mikroorganizmy dokonca najčastejšie sa vyskytujúce treponémam podobné organizmy.

Aj keď prevažná časť získaných sekvencií je viac alebo menej príbuzná sekvencii *T. bryantii*, len jediný z 15 fylotypov vykazuje podobnosť 16S rRNA sekvencií na úrovni minimálne 97% a teda pravdepodobne patrí do druhu *T. bryantii*. Všetky ostatné získané sekvencie predstavujú pravdepodobne nové, doteraz nepopísané druhy treponém z bachora prežúvavcov.

Druhovú špecificitu, ktorá bola zaznamenaná u väčšiny získaných sekvencií treponém poukazuje na fakt, že variabilita treponém v bachore prežúvavcov je oveľa väčšia ako sa predpokladalo.

Obr. 1. Fylogenetické porovnanie príbuznosti 16S rRNA sekvencií treponém získaných v tejto práci. Jednotlivé fylotypy sú zvýraznené farebnými obdĺžnikmi. Označenie fylotypov zodpovedá Tab. 1.



Jedným z vysvetlení tohto javu môže byť aj použitie treponema špecifických primérov v PCR reakcii. Vo všetkých doteraz existujúcich prácach analyzujúcich zloženie mikrobiálneho ekosystému bachora sa totiž použili univerzálne eubakteriálne priméry (Ozutsumi a kol., 2005). Berúc do úvahy pozorovanú hosťiteľskú špecificitu treponém a celkový počet druhov prežúvavcov, môže byť množstvo treponém vyskytujúcich sa v bachore neočakávane vysoké. Pre overenie tohto javu sú však potrebné ďalšie štúdie o variabilite, výskyte a zastúpení treponém v bachorovom ekosystéme prežúvavcov.

POĎAKOVANIE

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Maidak B L, Olsen G J, Larsen N, Overbeek R, McCaughey M J, Woese C R. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 1997; 25: 109-111.
- Ozutsumi Y, Tajima K, Takenaka A, Itabashi H. The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005; 69: 499-506.
- Paster B J, Canale-Parola E. *Treponema saccharophilum* sp. nov., a Large Pectinolytic Spirochete from the Bovine Rumen. *Appl Environ Microbiol.* 1985; 2: 212-219.
- Piknová M, Javorský P, Pristaš P. Multiple restriction-modification systems are present in rumen treponemes. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 251: 99-103.
- Piknová M, Javorský P, Guczynska W, Kasperowicz A, Michalowski T, Pristaš P. New Species of Rumen Treponemes. *Folia Microbiol.* 2006; 51: 303-305.
- Piknová M, Guczynska W, Miltko R, Javorsky P, Kasperowicz A, Michalowski T, Pristas P. *Treponema zioleckii* sp. nov., a novel fructan-utilizing species of rumen treponemes. *FEMS Microbiol Lett.* 2008; 289: 166-172.
- Pospiech A, Neumann B.: A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 1995; 11: 217.
- 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.
- Sikorová L, Piknová M, Javorský P, Pristaš P. Genome organization of the *Treponema zioleckii*. *Folia Microbiol.* 2008; 53: 246-248.
- Stanton T B, Canale-Parola E. *Treponema bryantii* sp. nov. a rumen spirochete that interacts with celullolytic bacteria. *Arch Microbiol.* 1980; 2: 145-156.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kuma S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007; 24: 1596-1599.

SLEDOVANIE VPLYVU ZEARALENONU A ADSORBENTOV NA IMUNITNÉ PARAMETRE V PERIFÉRNEJ KRVI BROJLEROVÝCH KURČIAT

Slaminková Z.¹, Revajová V.¹, Leng L.², Levkut M. st.¹

¹Ústav patologickej anatómie, UVL, Košice

²Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

V pokuse bol študovaný efekt prídavku adsorbentov lignínu a β -D glukánu v diéte kurčiat s obsahom a bez obsahu mykotoxínov, predstavujúcich potenciálny risk pre zdravie zvierat a ľudí. Do pokusu bolo zahrnutých 60 kusov brojlerových kurčiat, rozdelených do 6 skupín. Kurčatá boli počas 4 týždňov kŕmené diétou s prídavkom mykotoxínov a adsorbentov. Vo veku 4 týždňov boli odoberané vzorky krvi na vyšetrenie bieleho krvného obrazu, funkciu fagocytov a fenotypizáciu lymfocytov.

ÚVOD

Zearalenon s jeho uterotrofným a estrogénnym účinkom, produkovaný *F. graminearum*, *F. culorum*, *F. crookwellence*, *F. equiseti* a *F. semitectum*, je najrozšírenejším fuzáriovým mykotoxínom v poľnohospodárskych produktoch. Často sa nachádza v kukurici vo vysokých koncentráciách, s čím súvisí jeho zvýšená prítomnosť v kŕmnych zmesiach skrmovaných hydine. Na Slovensku sledovaný výskyt v kŕmnych zmesiach pre kurčatá preukázal jeho najčastejšiu prítomnosť v kombinácii s DON, T-2 a HT-2 toxínmi. Za účelom obmedzenia alebo eliminácie účinku mykotoxínov sú študované aplikácie rôznych adsorbentov, či už organického alebo anorganického pôvodu.

Medzi často používané adsorbenty okrem aktívneho uhlia patrí tiež lignín a β -D glukán. Lignín je chemická zlúčenina, pochádzajúca z dreva. Je integrálnou súčasťou sekundárnych bunkových stien rastlín. Nie je natravovaný enzýmami cicavcov a iných zvierat. Bolo zistené, že lignín môže odstrániť až 60% chrómu z vodného roztokov. Popísané sú aj jeho antibakteriálne vlastnosti v čreve (Košíková a Sláviková, 1998) a taktiež čiastočná absorpcia trichotecénov (Košíková a Sláviková, 2009). β -D glukán je štruktúrny komplex homopolymérov glukózy, obvyčajne izolovaný z húb, pšenice, chalúh a kvasníc (Vetvička a kol., 2008). Má vysokú biologickú aktivitu, stimuluje fagocytózu, syntézu a uvoľňovanie IL-1, IL-6 TNF- α (Vetvička a kol., 2007), zvyšuje hodnoty B lymfocytov produkujúcich IgM a IgG protilátky, zvyšuje hematopoézu, ďalej zohráva úlohu v prevencii poškodenia histiocytov, inhibícii myšacích a ľudských nádorov prsníka, vrátane karcinómu pečene a melanómu (Chen a kol., 2009).

MATERIÁL A METODIKA

Zvieratá a diéty. Brojlerové kurčatá plemena Ross 308, oboch pohlaví, v počte 60 kusov, boli rozdelené do 6 skupín po 10 kusov: NK – negatívna kontrola, PK+D – pozitívna kontrola s β -D-glukánom, PK+L – pozitívna kontrola s lignínom, Zea – kontaminovaná diéta, Zea+D – kontaminovaná diéta s β -D-glukánom, Zea + L - kontaminovaná diéta s lignínom. Brojlerové kurčatá boli kŕmené kŕmnom zmesou HYD 01 BR1 s obsahom mykotoxínov (Tab. 1) počas 4 týždňov.

Odber vzoriek. Vo veku 4 týždňov boli kurčatá usmrtené anestézou a intrakardiálnou punkciou krvi odobratej do heparínu.

Biely krvný obraz. Počítanie celkového počtu leukocytov bolo vykonané rutinnou laboratórnou metódou. Diferenciálny krvný obraz bol hodnotený svetelným mikroskopom po ofarbení krvných náterov Hemacolorom (Merck, Nemecko).

Funkcia fagocytov. Komerčný kit pre stanovenie fagocytárnej aktivity (PHAGOTEST) fy ORPEGENPharma (Nemecko) bol použitý pre meranie prietokovou cytometriou.

Fenotipizácia lymfocytov. Priama imunoflorescenčná metóda a prietoková cytometria boli použité pre meranie subpopulácií lymfocytov v periférnej krvi. Značené monoklonové myšacie antikuracie protilátky CD4, CD8 a IgG firmy SouthernBiotech (USA) boli použité pre fenotypizáciu lymfocytov.

Tab. 1. Obsah mykotoxínov a ergosterolu v kontrolnej a experimentálnych skupinách brojlerov (koncentrácie v mg.kg⁻¹)

Experimentálne skupiny	DON	ZEA	Celkové aflatoxíny	OTA	Ergosterol
Negatívna kontrola	0,28	0,005	0,00	0,0003	8,6
Pozitívna kontrola (Lignín, 0,5%)	0,28	0,005	0,00	0,0003	8,6
Pozitívna kontrola (β-D-glukán, 0,2%)	0,28	0,005	0,00	0,0003	8,6
Kontaminovaná diéta	0,27	7,9	0,00	0,0003	36,9
Kontaminovaná diéta + doplnok Lignín 0,5%	0,27	7,9	0,00	0,0003	36,9
Kontaminovaná diéta + β-D-glukán, 0,2%	0,27	7,9	0,00	0,0003	36,9

DON = deoxynivalenol; ZEA = zearalenón; OTA = ochratoxín A

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vyšetrenie celkového počtu leukocytov ($1 \cdot 10^9 \cdot l^{-1}$) preukázalo najvyššie hodnoty v skupine Zea (27,2) so signifikanciou $P < 0,05$ oproti NK (20,7) skupine. Najnižšie hodnoty boli v skupine PK+L so signifikanciou oproti Zea+L $P < 0,05$. Pri absolútnom počte heterofilov boli najvyššie hodnoty zistené v skupine Zea+D (3,3) so signifikanciou $P < 0,05$ oproti NK (2,0). Hodnoty v skupine Zea (2,9) boli signifikantné $P < 0,001$ oproti skupine Zea+L (1,8).

Najvyššie hodnoty absolútnych počtov lymfocytov boli determinované v skupine Zea (23,8) so signifikanciou $P < 0,05$ oproti NK skupine (18,2). Vyššie hodnoty boli pozorované aj v skupine PK+D (20,9) so signifikanciou $P < 0,05$ oproti skupine PK+L (15,5). Podobná situácia bola zaznamenaná v skupine Zea+L (22,7) so signifikanciou $P < 0,001$ oproti skupine PK+L (15,5).

Pri meraní absolútného počtu monocytov došlo k nesignifikantnému poklesu hodnôt v skupinách PK+L (0,2) a Zea+D (0,2) v porovnaní s NK.

V hodnotách absolútného počtu eozinofilov došlo k nesignifikantnému zvýšeniu hodnôt u všetkých pokusných skupín (0,3, 0,3, 0,4, 0,4, 0,3) oproti NK (0,2).

V absolútnom počte CD4 lymfocytov boli najvyššie hodnoty zistené v skupinách Zea (5,8) a Zea+L (5,7), bez signifikancie.

Hodnoty pri absolútnom počte CD8 lymfocytov boli najvyššie v skupine Zea (4,0). Signifikantné zvýšenie ($P < 0,05$) bolo zistené v skupine Zea+L (3,7) oproti skupine PK+L (2,4).

Podobná situácia bola zaznamenaná aj v hodnotách absolútného počtu IgG lymfocytov, kde došlo k štatisticky významnému ($P < 0,05$) zvýšeniu hodnôt v skupine Zea (1,2) oproti skupine Zea+D (0,5). Zvýšené hodnoty skupiny Zea boli zistené aj oproti NK, avšak bez štatistickej významnosti. V skupine Zea+L (0,8) boli zistené zvýšené, aj keď nesignifikantné hodnoty oproti skupine PK+L (0,3).

Hodnoty percenta fagocytárnej aktivity a indexu fagocytárnej aktivity preukázali štatisticky nevýznamné zvýšenie hodnôt v skupine Zea oproti NK a nesignifikantný pokles hodnôt v skupinách PK+D, PK+L a Zea+L v porovnaní s NK.

Kontaminácia diéty kurčiat mykotoxínmi viedla v periférnej krvi k výraznejším zmenám v skupine Zea, kde došlo ku zvýšeniu hodnôt absolútnych počtov Lc, He, a Ly. V absolútnom

počte eozinofilov hodnoty preukázali štatisticky nevýznamný nárast vo všetkých pokusných skupinách oproti NK (0,2), taktiež nesignifikantný nárast hodnôt bol zaznamenaný v skupine Zea (0,4) oproti skupine Zea+L (0,3). Štatisticky nevýznamný nárast hodnôt bol zaznamenaný aj v skupine Zea+D (0,4) oproti PK+D (0,3). Trichotecény stimulujú alebo supresujú imunitné funkcie v závislosti na dávke, frekvencii expozície a načasovaní funkčných imunitných testov (Pestka a kol., 2004).

V meraní funkcie fagocytov bolo zaznamenané štatisticky nevýznamné zvýšenie v skupine Zea s obsahom $7,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ tohto mykotoxínu oproti kontrolnej skupine, z čoho vyplýva, že pri takejto dávke došlo k aktivovaniu fagocytárnej aktivity. Rovnaká situácia nastala aj pri indexe fagocytárnej aktivity. β -D-glukán a jeho deriváty sú známe ako imunostimulátory, stimulujú hematopoetické bunky, aktivujú Ly, makrofágy, NK bunky, Tc a B bunky (Lin a kol., 2004). Podľa Vetvičku a kol.(2007) β -Dglukán má efekt na slezinové Ly, zatiaľ čo slezinové makrofágy nepreukazujú zmeny. Hodnoty CD4 a CD8 preukázali nárast už v 1. a 2. deň podávania tohto adsorbentu, kým hodnoty CD19 pozitívnych buniek sa signifikantne zvýšili na 3. a 4. deň. V našom pokuse nedošlo k štatisticky významným zmenám v pokusných skupinách oproti negatívnej kontrole. Taktiež Vetvička a kol. (2008) popísal výrazné zvýšenie počtu IgM a IgG protilátok u myši 28 dní po podávaní diéty s obsahom β -D-glukánu, v našom pokuse však došlo k zníženiu týchto protilátok.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná projektom VEGA 1/3498/06, APVT-51-004804, VEGA 1/0044/08 a APVV-399-07.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Chen X., Xu X., Zhang L., Kennedy J. Flexible chain conformation of (1-3) β -D glucan from *Poria cocos sclerotium* in NaOH/urea aqueous solution. *Carbohydrate polymers*. 2009; 75:586-91
- Košíková B., Sláviková E. Inhibition of the yeast growth by lignin biopolymers and related compounds. *Wood Research*. 1998; 43:13-9
- Košíková B., Sláviková E., Labaj J. Affinity of lignin preparations towards genotoxic compounds. *BioResources*. 2009; 4:72-9
- Lin H., She Yh., Cassileth B.R., Sirotnak F. Maitake β -D glucan MD fraction enhances bone marrow colony formation and reduces doxorubicin toxicity in vitro. *Int Immunopharmacol*. 2004; 4:91-9
- Pestka J.J., Zhou H.R., Moon Y., Chung Y.J. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecens: unravelling and paradox. *Toxicol. Lett*. 2004; 153:61-73
- Vetvicka V, Dvorak B., Vetvickova J., Richter J., Krizan J., Sima P., Yvin J. Orally administered marine (1-3) β - D glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *Int J Biol Macromol*. 2007; 40:291-8
- Vetvicka V., Vetvickova J., Frank J., Yvin J. Enhancing effects of biological response modifier β -1,3 glucansulfate PS3 on immune reactions. *Biomed Pharmacother*. 2008; 62:283-8

PRODUKCIA A VYUŽITIE ŽIVÍN U BROJLEROVÝCH KURČIAT PRI POUŽITÍ RÔZNYCH ADITÍV

Šamudovská A., Demeterová M.

Katedra výživy, diätetiky a chovu zvierat, UVL, Košice

ABSTRAKT

V pokuse bol sledovaný vplyv prídavku prírodných humínových látok (skupina HL) a humátu sodného (skupina HNa) v množstve 5 g/kg (1. – 2. týždeň) a 7 g/kg krmiva (3. – 6. týždeň) a vplyv prídavku 0,2 % acidifikujúceho prípravku (skupina AL) do pitnej vody na produkčné ukazovatele, využitie živín a exkréciu dusíkatých látok. Vo finálnej hmotnosti neboli zaznamenané štatisticky významné rozdiely medzi skupinami, pričom najvyššia bola v skupine HL (K 2476.6 g, AL 2465.5 g, HL 2527.6 g, HNa 2481.5 g). V skupine AL a HNa boli zistené signifikantne vyššie ($P < 0.01$, $P < 0.001$) a v skupine HL signifikantne nižšie ($P < 0.001$) hodnoty konverzie krmiva, dusíkatých látok a metabolizovateľnej energie ako v kontrolnej skupine. Najvyššia hodnota indexu efektívnosti výkrmu bola zaznamenaná v skupine HL ($P < 0.001$) a najnižšia v skupine HNa. Vo všetkých pokusných skupinách bol v 5. týždni zistený signifikantne nižší obsah dusíkatých látok v sušine trusu ($P < 0.001$, $P < 0.05$) a v skupine HL aj signifikantne vyšší obsah sušiny v truse ako v kontrolnej skupine ($P < 0.001$).

ÚVOD

Acidifikátory a humínové látky patria do skupiny špecificky účinných látok, ktoré sa pridávajú do krmiva alebo vody za účelom zvýšenia stráviteľnosti živín, úžitkovosti zvierat, kvality živočíšnych produktov a zníženia negatívneho dopadu chovu hospodárskych zvierat na životné prostredie, pričom nesmú mať škodlivý účinok na zdravie zvierat a ľudí, životné prostredie a pozmeňovať vlastnosti živočíšnych produktov (Regulation (EC) No 1831/2003). Využitie špecificky účinných látok vo výžive zvierat vzrástlo hlavne po zákaze používania antibiotík ako stimulátorov rastu v roku 2006. Ako acidifikátory sa najčastejšie používajú organické kyseliny a ich soli, ktorých hlavným účinkom je zníženie pH krmiva, žalúdočného obsahu a inhibícia patogénnych mikroorganizmov v tráviacom trakte (Dhawale, 2005). V mnohých štúdiách bolo zistené po prídavku acidifikujúcich látok do diéty kurčiat a ošpaných zvýšenie produkcie (Overland a kol., 2000; Lückstädt a kol., 2004; Abdel-Fattah a kol., 2008) a zníženie mortality (Daskiran a kol., 2004). Produkciu stimulujúci účinok bol zaznamenaný aj u humínových látok (Kocabagli a kol., 2002; El-Husseiny a kol., 2008). Sú to prírodné organické zlúčeniny vznikajúce rozkladom rastlinných a živočíšnych zvyškov (Stevenson, 1994). Aj keď nie je ešte presne známe ako podporujú rast, predpokladá sa, že zvyšujú využitie živín prostredníctvom svojich chelátových vlastností (Kocabagli a kol., 2002). Cieľom tejto práce bolo v experimentálnych podmienkach pri modelovom kŕmnom pokuse na brojlerových kurčatách sledovať vplyv prídavku prírodných humínových látok a humátu sodného do kŕmnych zmesí a acidifikujúceho prípravku do pitnej vody na produkčné ukazovatele, využitie živín a exkréciu dusíkatých látok.

MATERIÁL A METODIKA

Do pokusu bolo zaradených 200 jednodňových nesexovaných kurčiat úžitkového hybridu ROSS 308, ktoré boli náhodne rozdelené do štyroch skupín (kontrolnej a troch pokusných, $n = 50$) a umiestnené na hlbokjej podstielke pri dodržaní štandardných podmienok prostredia. Kurčatá boli v priebehu pokusu kŕmené kompletnými kŕmnymi zmesami na báze kukurice, sójového extrahovaného šrotu a pšenice podľa rastových fáz (HYD-01 1. – 2. týždeň, HYD-02 3. – 5. týždeň a HYD-03 6. týždeň) ad libitum. Tieto kŕmne zmesi neobsahovali antibiotické stimulátory rastu a kokcidostatiká. V prvej pokusnej skupine (AL) bola do pitnej

vody pridaná acidifikujúca látka (Schaumacid Drink – zmes: kyselina askorbová, lignosulfónová, mliečna, mravčan a propionát amónny) v koncentrácii 0,2 % počas celého pokusného obdobia. V druhej pokusnej skupine (HL) boli k uvedeným kŕmnyim zmesiam pridané na úkor pšenice prírodné humínové látky (organické kyseliny 68 %, humínové kyseliny 48 %, minerálne látky 17 %) a v tretej pokusnej skupine (HNa) humát sodný v množstve 5 g/kg krmiva v prvej a 7 g/kg krmiva v druhej a tretej fáze výkrmu. Hmotnosť kurčiat a spotreba krmiva boli zaznamenávané v týždňových intervaloch. Trus na stanovenie obsahu sušiny a dusíkatých látok bol odobratý v 2. a 5. týždni pokusu. Index efektívnosti výkrmu (IEV) bol vypočítaný podľa vzorca: $IEV = ((\text{Hmotnosť v kg}_x (100 - \% \text{ úhynu})) / (\text{Vek v dňoch}_x \text{ konverzia krmiva})) \times 100$

Obsah živín v jednotlivých kŕmnych zmesiach (sušina (S), dusíkaté látky (NL), tuk, hrubá vláknina (HV) a popoloviny) a obsah sušiny a dusíkatých látok v truse bol stanovený priamo analytickými metódami podľa Výnosu MP SR č. 2145/2004-100 a obsah metabolizovateľnej energie (ME) v kŕmnych zmesiach bol vypočítaný podľa Výnosu MP SR č. 39/1/2002-100 (Tab. 1.). Získané výsledky boli zhodnotené štatisticky (ANOVA).

Tab. 1. Obsah živín v kŕmnych zmesiach použitých v jednotlivých fázach pokusu.

	1. – 2. týždeň			3. – 5. týždeň			6. týždeň		
	K+AL	HL	HNa	K+AL	HL	HNa	K+AL	HL	HNa
Sušina (g)	896,9	895,6	898,3	900,2	898,0	897,0	893,9	896,6	905,8
NL (g.kg ⁻¹ S)	249,9	251,2	249,4	230,5	225,6	232,1	218,7	214,6	221,9
Tuk (g.kg ⁻¹ S)	70,1	69,5	72,3	71,9	69,7	69,0	80,3	81,8	78,3
HV (g.kg ⁻¹ S)	36,7	37,1	40,2	44,3	42,3	37,2	42,6	36,3	38,3
Popol (g.kg ⁻¹ S)	82,3	81,7	73,7	66,9	68,9	66,3	66,0	70,8	68,6
ME (MJ.kg ⁻¹ S)	13,3	13,3	13,3	13,3	13,3	13,4	13,5	13,5	13,5

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Údaje o hmotnosti kurčiat, prírastkoch hmotnosti, konverzii krmiva, dusíkatých látok a metabolizovateľnej energie sú uvedené v tabuľke 2. Na začiatku tohto pokusu neboli zaznamenané významné rozdiely v počiatkovej hmotnosti kurčiat medzi skupinami. Na 42. deň pokusu bola zaznamenaná v skupine s prídavkom prírodných humínových látok a humátu sodného vyššia (o 2.06 %, 0.20 %) a v skupine s prídavkom acidifikujúcej látky nižšia finálna hmotnosť (o 0.45 %) ako v kontrolnej skupine (K). Rozdiely medzi skupinami neboli štatisticky významné. Podobné výsledky boli zaznamenané aj pri hodnotení prírastkov hmotnosti za celé sledované obdobie. V skupine HL a HNa boli zistené vyššie a v skupine AL nižšie prírastky ako v kontrolnej skupine. Najvyšší prírastok bol zaznamenaný v skupine HL, čo predstavuje 2.12 %, 2.62 % a 1.88 % rozdiel oproti kontrolnej, AL a HNa skupine. Za celé sledované obdobie boli zistené v skupine AL a HNa signifikantne vyššie ($P < 0.01$, $P < 0.001$) a v skupine HL signifikantne nižšie ($P < 0.001$) hodnoty konverzie krmiva, NL a ME ako v kontrolnej skupine. Vyšší prírastok s lepšou konverziou krmiva, NL a ME v skupine HL poukazujú na lepšie využitie živín.

Podobne ako v našej štúdií, ovplyvnenie produkcie acidifikujúcim prípravkom nebolo zistené aj v štúdiách iných autorov (Watkins a kol., 2004; Abd El-Hakim a kol., 2009; Biggs a Parsons, 2008). Vieira a kol. (2008), ktorí podávali brojlerovým kurčatám diétu obohatenú o zmes kyseliny mliečnej, octovej, fosforečnej a maslovej, zaznamenali zvýšenie hmotnosti kurčiat na 21. deň pokusu, ale na 42. deň rozdiely oproti kontrolnej skupine neboli významné. Vyššie prírastky a lepšiu konverziu krmiva po prídavku humínových látok (Farmagulator) do diéty kurčiat (v 0.25 % a 0.125 % koncentrácii) zaznamenali aj El-Husseiny a kol. (2008).

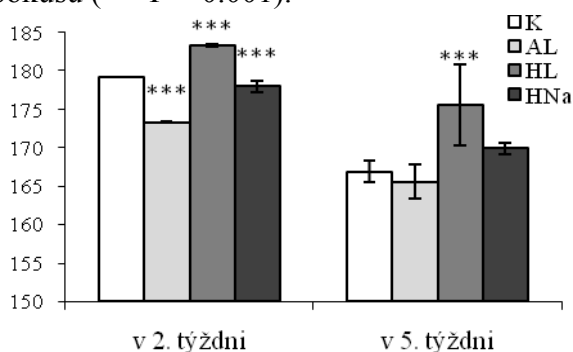
Tab. 2. Priemerná finálna hmotnosť (g/ks), prírastoky hmotnosti (g/ks), konverzia krmiva (kg/kg prírastku), dusíkatých látok (NL) (g/kg prírastku) a metabolizovateľnej energie (ME) (MJ/kg prírastku) a index efektívnosti výkrmu (IEV) po 42 dňoch pokusu (\pm SEM).

	Kontrola	AL	HL	HNa
Fin. hmotnosť	2476.6 \pm 74.7	2465.5 \pm 57.0	2527.6 \pm 68.8	2481.5 \pm 80.6
Prírastky	2435.1	2423.3	2486.8	2440.8
Konverzia krmiva	1.77 \pm 0.010 ^a	1.82 \pm 0.003 ^b	1.69 \pm 0.006 ^c	1.86 \pm 0.006 ^c
Konverzia NL	363.2 \pm 2.2 ^a	372.3 \pm 0.6 ^b	340.2 \pm 1.2 ^c	385.4 \pm 1.3 ^c
Konverzia ME	21.2 \pm 0.13 ^a	21.8 \pm 0.04 ^b	20.2 \pm 0.07 ^c	22.5 \pm 0.07 ^c
IEV	319.7 \pm 1.9 ^a	323.2 \pm 0.6	342.7 \pm 1.2 ^c	317.4 \pm 1.0

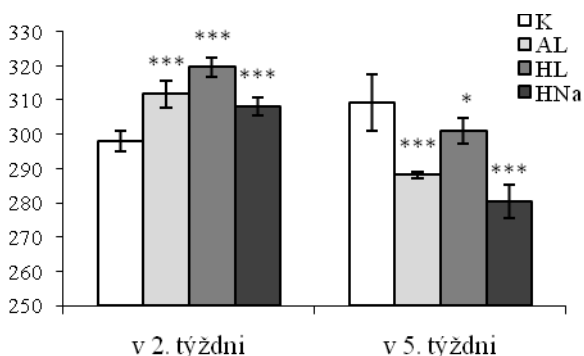
^{ab} P < 0.01; ^{ac} P < 0.001

V priebehu celého pokusu bola v skupine AL a HNa zaznamenaná nižšia mortalita (0 %) ako v kontrolnej (4.08 %) a HL skupine (4.00 %). V dôsledku nižšej mortality v AL skupine a intenzívnejšieho rastu a lepšej konverzii krmiva v HL skupine bola v oboch týchto skupinách zaznamenaná vyššia technická úžitkovosť vyjadrená IEV ako v kontrolnej skupine (Tabuľka 2.). Štatisticky významný rozdiel bol zaznamenaný medzi kontrolnou a HL skupinou (P < 0.001). Najnižšia hodnota IEV bola zistená v skupine s prídavkom humátu sodného.

Graf 1. Obsah sušiny v truse v 2. a 5. týždni pokusu (**P < 0.001).



Graf 2. Obsah dusíkatých látok v truse v 2. a 5. týždni pokusu (**P < 0.001; *P < 0.05).



V 2. týždni pokusu bol obsah sušiny v truse kurčiat skupiny AL (173.3 g) a HNa (178.0 g) signifikantne nižší ($P < 0.001$) a v HL signifikantne vyšší (183.3 g, $P < 0.001$) ako v kontrolnej skupine (179.2 g) (Graf 1.). Signifikantne vyšší obsah sušiny v skupine HL bol zistený aj v 5. týždni pokusu (175.6 g, $P < 0.001$) a v skupine AL (165.6 g) a HNa (169.9 g) bol porovnateľný s kontrolnou skupinou (166.9 g). Kým v 2. týždni pokusu bola koncentrácia NL v sušine trusu vo všetkých pokusných skupinách signifikantne vyššia než v kontrolnej skupine (AL 311.9 g/kg S, HL 319.7 g/kg S, HNa 308.3 g/kg S, K 298.0 g/kg S, $P < 0.001$), v 5. týždni bola vo všetkých pokusných skupinách signifikantne nižšia (AL 288.2 g/kg S, HL 301.1 g/kg S, HNa 280.5 g/kg S, K 309.5 g/kg S, $P < 0.001$, $P < 0.05$) (Graf 2.). Najnižší obsah bol zaznamenaný v sušine trusu kurčiat s prídavkom humátu sodného, čo predstavuje 9.37 %, 2.67 % a 6.84 % pokles oproti kontrolnej, AL a HL skupine. Nižší obsah dusíka v truse, aj keď nie signifikantne, zaznamenali aj Abd El-Hakim a kol. (2009) u kurčiat, ktorým podávali diétu okyslenú kyselinou citrónovou v 0,2 % koncentrácii alebo v kombinácii s fytoaditívami (*Thymus vulgaris* alebo *Cutcumma longa*). Zníženie obsahu dusíka v truse vedie k zníženiu tvorby prechavého amoniaku mikrobiálnou fermentáciou v podstielke.

Z výsledkov našej štúdie vyplýva, že prídavok prírodných humínových látok do kŕmnych zmesí má lepší vplyv na produkciu brojlerových kurčiat než prídavok humátu sodného alebo acidifikujúcej látky. Všetky sledované aditíva sa môžu podieľať na znížení záťaže na životné prostredie z chovov hydiny prostredníctvom zníženia obsahu dusíkatých látok v truse.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla za podpory výskumného zámeru č.1/0677/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abdel-Fattah S.A., El-Sanhoury M.H., El-Mednay N.M., Abdel-Azeem F. Thyroid activity, some blood constituents, organs morphology and performance of broiler chicks fed supplemental organic acids. *Int. J. Poult. Sci.* 2008; 7: 215-222
- Abd El-Hakim A.S., Cherian G., Ali M.N. Use of organic acid, herbs and their combination to improve the utilization of commercial low protein broiler diets. *Int. J. Poult. Sci.* 2009; 8: 14-20
- Biggs P., Parsons C.M. The effects of several organic acids on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. *Poult. Sci.* 2008; 87: 2581-2589
- Daskiran M., Teeter R.G., Vanhooser S.L., Gibson M.L., Roura E. Effect of dietary acidification on mortality rates, general performance, carcass characteristics, and serum chemistry of broilers exposed to cycling high ambient temperature stress. *J. Appl. Poult. Res.* 2004; 13: 605-613
- Dhawale A. Better eggshell quality with a gut acidifier. *Poultry International* 2005; 44: 18-20
- El-Husseiny O.M., Abdallah A.G., Abdel-Latif K.O. The influence of biological feed additives on broiler performance. *Int. J. Poult. Sci.* 2008; 7: 862-871
- Kocabagli N., Alp M., Acar N., Kahraman R. The effects of dietary humate supplementation on broiler growth and carcass yield. *Poult. Sci.* 2002; 81: 227-230
- Lückstädt C., Şenköylü N., Akyürek H., Ağma A. Acidifier – a modern alternative for anti-biotic free feeding in livestock production, with special focus on broiler production. *Veterinarija ir Zootechnika* 2004; 27: 91-93
- Overland M., Granli T., Kjos N.P., Fjetland O., Steien S.H., Stokstad M. Effect of dietary formates on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 2000; 78: 1875-1884
- Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition
- Stevenson F.J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions.* 2nd ed. Wiley, New York, NY 1994
- Vieira S.L., Oyarzabal O.A., Freitas D.M., Berres J., Peña J.E.M., Torres C.A., Coneglian J.L.B. Performance of broilers fed diets supplemented with sanguinarine-like alkaloids and organic acids. *J. Appl. Poult. Res.* 2008; 17: 128-133

- 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
- Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky z 31. januára 2002 č. 39/1/2002-100, ktorým sa mení a dopĺňa výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky zo 7. októbra 1997 č. 1497/1/1997-100 o krmných surovinách na výrobu krmných zmesí a o hospodárskych krmivách
- Watkins S., Cornelison J., Tillery C., Wilson M., Hubbard R. Effects of water acidification on broiler performance. Avian Advice 2004; 6: 4-6

VČASNÁ DIAGNOSTIKA RAKOVINY U ŽIEN PROFILOVOU FLUORESCENČNOU ANALÝZOU

Štefeková Z.¹, Birková A.¹, Ostró A.¹, Mareková M.²

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UPJŠ a Labmed a.s. v Košiciach

²II. Gynekologicko pôrodnická klinika LF UPJŠ v Košiciach

ABSTRAKT

Rakovina je jedným s najzávažnejších ochorení súčasnosti. Skriningové testy sú spôsob skorého zistenia malignít, pred prepuknutím choroby do symptomatického štádia. Na včasnú diagnostiku rakoviny sme aplikovali novú stratégiu vyhľadávania špecifických biochemických markerov, tzv. metabolickú profiláciu krvi a moču fluorescenčnými technikami. Fluorescenčné matrice krvného séra či moču definujú ich zloženie ako jedného celku a citlivo reagujú na zmeny. Keďže odhalia prítomnosť aj nepredvídaných metabolitov, sú perspektívnym nástrojom v diagnostike nádorových procesov, ako naznačujú aj nami dosiahnuté výsledky. Na základe kombinácie výsledkov jednotlivých analýz bude postupne tvorený algoritmus pre včasnú detekciu karcinómov žien s možným praktickým výstupom pri rutinnom skriningu v priebehu štandardných odberov počas preventívnych gynekologických prehliadok.

ÚVOD

Rakovina vaječníkov a prsníka patrí medzi najzhubnejšie a najzákernejšie nádorové ochorenia žien. Malignita ovariálnych nádorov je veľmi vysoká, viac ako 80 % karcinómov metastázuje skôr ako sú diagnostikované. Príčiny vzniku rakoviny vaječníkov nie sú známe. Dnešné metódy diagnostiky tohto druhu rakoviny nie sú dostačujúce najmä pri včasnej diagnostike, pretože príznaky nie sú špecifické. Maligný tumor je väčšinou diagnostikovaný konvenčnými metódami, až keď je jeho veľkosť dostatočná na spôsobenie klinických príznakov. Stanovenie biomarkerov v krvnom sére, plazme, alebo moči, sa javí ako vhodná metóda skriningu aj vďaka minimálne invazívnemu odberu týchto vzoriek. Problémy s využívaním súčasných tumorových markerov spočívajú v nedostatočnosti ich senzitivity a špecificity, čo do istej miery obmedzuje ich klinické využitie pri populačnom skriningu. Preto je žiadúca identifikácia nových biologických markerov, ktoré by boli schopné tento problém vyriešiť a zlepšiť tak kvalitu liečby a prežívanie pacientov. V súčasnej dobe sa venuje pozornosť identifikácii nových onkomarkerov prostredníctvom techniky fluorescenčnej spektrofotometrie (Masilamania V. a kol., 2004, Kalaivani R. a kol., 2008).

Zloženie krvi, moču a iných biologických tekutín je výsledkom metabolických procesov v organizme a dobre korešponduje s jeho celkovým stavom. Fluorescenčné metódy založené na snímaní a matematickom spracovaní fluorescenčného signálu natívnych fluorofórov biomolekúl ponúkajú perspektívny a doteraz plne nevyužitý potenciál pre štúdium komplikovaných biologických systémov. Spektrálna charakteristika zmesi fluorofórov nie je jednoduchá, lebo ich vzájomným ovplyvňovaním dochádza k zmene ich individuálnych spektier (Grubina L.A., Zenkevich E.I., 1997). Spektrálne vyhodnotenie sústavy fluorofórov vytvára pre každý materiál jedinečnú spektrálnu mapu, ktorá je typická pre daný systém a jeho fyziologický resp. patologický stav (Birková A. a kol., 2008).

Moč ako viac zložková biologická tekutina, obsahuje mnoho prirodzených fluorofórov, pričom najväčšími sú zastúpené metabolity tryptofánu (Bertazzo A. a kol., 2001). Celková natívna fluorescencia jednotlivých fluorofórov vzorky moču je vyjadrená tzv. fluorescenčnou spektrálnou matricou. Je jednoznačne preukázané, že fluorescenčná spektrálna matrica moču zdravého človeka má obraz charakteristický a len málo variabilný (Birková A. a kol., 2006).

Významné postavenie v oblasti diagnostiky metabolických a kancerogénnych procesov majú v súčasnej dobe techniky autofluorescenčnej spektroskopie. V porovnaní s inými, sú výhodné

najmä pre ich rýchlosť, bezpečnosť, vysokú senzitivitu a neinvazívny charakter. Využívajú charakteristickú vlastnosť tumorového tkaniva, ktoré v porovnaní so zdravým tkanivom vo väčšej miere akumuluje určité chemické látky s charakterom fluorofórov (napr. deriváty porfyrínov). Porovnanie autofluorescencie proteínového extraktu krvných elementov skupiny zdravých ľudí a pacientov trpiacich rôznymi typmi rakoviny ukázalo výrazný rozdiel nie len medzi chorými a zdravými, ale aj v rámci samotnej skupiny rakovinou postihnutých pacientov. Intenzita fluorescencie, a to najmä vo fluorescenčnej emisnej oblasti porfyrínových fluorofórov (excitačná vlnová dĺžka okolo 630 nm), sa u jednotlivých typov rakoviny markantne nelíšila, ale odlišná bola u toho istého typu rakoviny v rôznych štádiách jej vývoja. Fluorofóry teda predstavujú jeden z potenciálnych markerov, ktorý by mohol slúžiť na rýchlu a nenáročnú detekciu a skrining karcinómov, ale aj na špecifickejšie určenie typu a štádia ochorenia bez potreby odberu nádorového tkaniva (Kravčuková P. a kol., 2008).

Vyššie uvedené skutočnosti je možné využiť pri rozlíšení fyziologických a vybraných patologických stavov. V experimentoch sme využili fluorescenčnú spektroskopiu na monitorovanie nádorového procesu prostredníctvom zmien zloženia biologických tekutín.

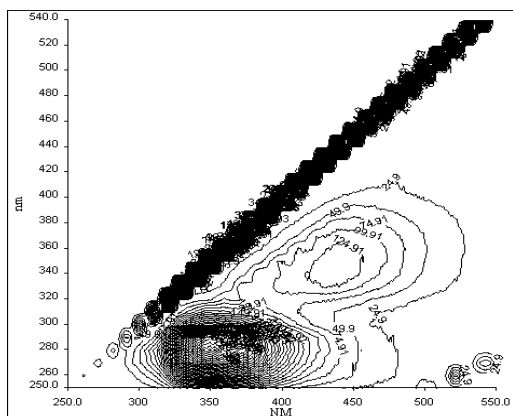
MATERIÁL A METODIKA

Vzorky moča boli získané od onkogynekologických pacientiek. Vo všetkých vyšetrovaných vzorkách boli stanovené štandardné biochemické parametre. Pred fluorescenčným meraním bola vzorka centrifugovaná a postupne riedená deionizovanou vodou do dvanástich skúmaviek. Prvá skúmavka - riedenie 0 obsahovala neriedenú (čistú vzorku moča), nasledovali riedenia 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 a 1:1024.

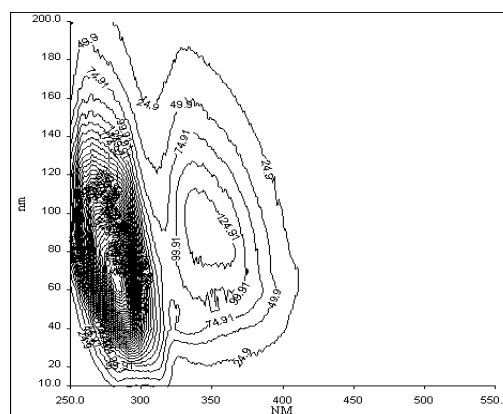
Na fluorescenčné meranie bol použitý luminiscenčný spektrofotometer Perkin Elmer LS 55 (USA) a kyveta hrúbky 10 mm s objemom 3,5 ml. Z každého riedenia boli skenované synchronne fluorescenčné spektrá. Matrica pozostáva z dvanástich skenov meraných v rozsahu vlnových dĺžok 250 - 550 nm, rozdiel vlnových dĺžok medzi excitačným a emisným monochromátorom $\Delta\lambda = 30$ nm (Dubayová K. a kol., 2003). Nastavenie excitačných/emisných štrbín bolo 5/5 nm a rýchlosť skenovania 1200 nm/min. Získané údaje boli spracované pomocou softvéru FL WinLab.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Prirodzená fluorescencia viacerých metabolitov umožňuje aplikovať na monitorovanie zloženia telových tekutín (napr. krvi, moču či likvoru) trojrozmernú fluorescenčnú spektroskopiu. Fluorescenčná exitačno-emisná matrica (Obr. 1) je grafické definovanie moču pomocou jeho natívnej fluorescencie a je daná fluorescenčnými parametrami jednotlivých fluorofórov (excitačné a emisné vlnové dĺžky). Výhodnejšou možnosťou zobrazenia je synchronná matrica (Obr. 2). Koncentračná matrica (fingerprint) je vytvorená pomocou synchronných fluorescenčných spektier. Trojrozmerný graf vytvorený z fingerprintu vyjadruje vzťah medzi intenzitou fluorescencie, vlnovou dĺžkou a riedením vzorky (Kušnír J. a kol., 2005).



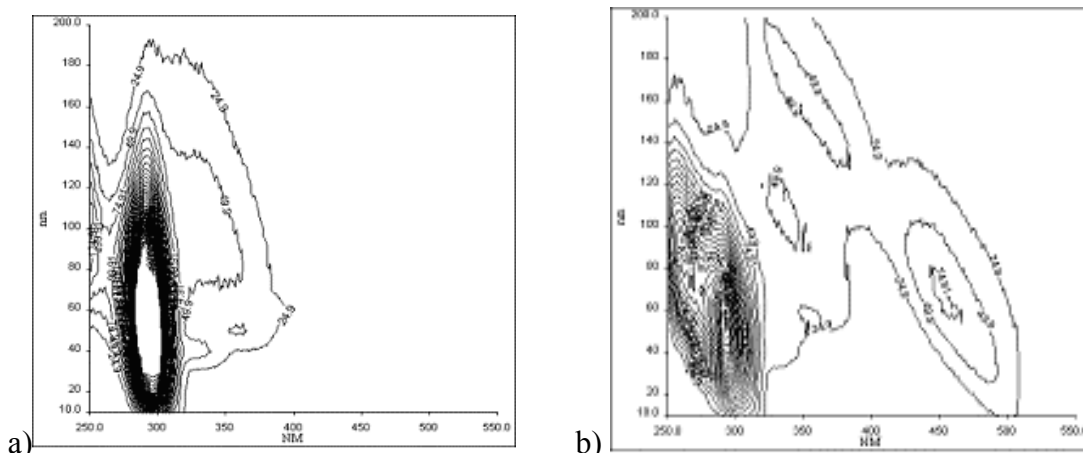
Obr. 1. Exitačno emisná matica



Obr. 2. Synchronná matica

Keďže moč ako celok je komplikovaná zmes so značne variabilným zložením, vysoká senzitivita fluorescence a dostatočný počet prirodzených fluorofórov sú vhodnými vlastnosťami na jeho celkovú analýzu. Pri vyhodnocovaní je potrebné zohľadniť aj značnú fyziologickú koncentračnú variabilitu moču jednotlivca (Li Y.Q. a kol., 2001). Intenzita fluorescence jednotlivých fluorofórov závisí napr. od výživy jedinca, stavu hydratácie, pH moču atď. Keďže fluorescenčná spektrálna matica je vlastne „sumárny snímok“ natívnej fluorescence všetkých fluorofórov nachádzajúcich sa v moči, tak podiel zmien intenzity jednotlivých fluorofórov napriek premenlivým závislostiam pri vhodne zvolenej snímacej technike nemení podstatne výsledný obraz.

Z doposiaľ sledovaných karcinómov žien (ale aj iných patologických stavov) boli týmito technikami pozorované výrazne zmeny oproti kontrolným skupinám. Fluorescenčná diagnostika nádorov sa opiera o zmenené metabolické procesy v nádorových bunkách, ktoré sa prejavujú zmenou intenzity fluorescence natívnych fluorofórov, najmä NADH, flavínov, porfyrínov, prípadne kolagénu. Porovnanie fluorescenčnej matrice s maticou štandardu – zdravým pacientom, okamžite indikuje zmeny v dôsledku patologického procesu (Obr. 3). Fluorescenčná emisná spektrosopia krvných komponentov môže byť využitá pri rôznych druhoch tumorov (Kalaivani R. a kol., 2008).



Obr. 3. Porovnanie synchronných matic kontrolnej (a) a patologickej vzorky (b)

Využitie fluorescenčných techník pri diagnostike rakoviny žien zo vzoriek telesných tekutín sa javí ako sľubná metóda skríningu. Boli dosiahnuté dobré výsledky pri odlišení onkologických pacientov a predstavuje aj prostriedok rozlíšenia rôznych štádií rakoviny,

navyše fluorescenčná detekcia má ako nástroj skríningu tri veľké výhody: vysokú senzitivitu, rýchlosť a bezpečnosť (Masilamania V. a kol., 2004).

Zostavovaním matric močov s rôznymi onkologickými diagnózami žien, ich porovnávaním s matricou zdravého človeka a porovnávaním so zdravotnou dokumentáciou pacientov sme sa snažili nájsť určitú koreláciu medzi jednoznačne patologickým nálezom v matrici, anamnestickými údajmi, fyzikálnym vyšetrením a validnými klinicko-biochemickými výsledkami týchto pacientov. Výsledok tohto porovnávania by mal slúžiť na priamu diagnostiku, ale aj na sledovanie priebehu vybraných onkologických ochorení.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla s podporou grantu VEGA 1/4233/07.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bertazzo A., Ragazzi E., Biasiolo M., Costa C.V., Allegri G.: Enzyme activities involved in tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in rabbits. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1527(3):167-175
- Birková A., Kravčuková P., Harakaľová M., Dubayová K., Kušnir J.: Využitie fluorescenčných techník na diagnostiku tumorov a vybraných patologických zmien. Konferencia učiteľov chémie, biochémie a klinickej biochémie na lekárskech fakultách v ČR a SR, Máj 25-28, 2006; Vrútky
- Birková A., Valko-Rokytovská M., Kušnir J.: Možnosti fluorescenčnej spektroskopie v diagnostike tumoróznych lézií v ústnej dutine. *Biomedicínske postupy*, December 10, 2008; Košice
- Dubayová K., Kušnir J., Podracká L.: Diagnostic monitoring of urine by means of synchronous fluorescence spectrum. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2003; 55:111-119
- Grubina L.A., Zenkevich E.I.: Express fluorescent methods for the quantitative analysis of human organism porphyrins upon oncological diseases and ionising radiation influence. Fifth International Conference on Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy, September 21-24, 1997; Berlin
- Kalaivani R., Masilamani V., Sivaji K., Elangovan M., Selvaraj V., Balamurugan S.G., Al-Salhi M.S.: Fluorescence spectra of blood components for breast cancer diagnosis. *Photomed Laser Surg*. 2008; 26(3):251-256
- Kravčuková P., Mareková M., Ostró A.: Potenciálne onkomarkery proteomických, metabolomických a metabolonomických metód. *Chemické listy*, 2008;102(1):15-20
- Kušnir J., Dubayová K., Lešková L., Lajtár M.: Concentration Matrices-Solutions for fluorescence Definition of Urine. *Analytical letters*, 2005; 38:1559-1567
- Li Y.Q., Sui W., Wu C., Yu L.J.: Derivative matrix isopotential synchronous fluorescence spectroscopy for the direct determination of 1-hydroxypyrene as a urinary biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytical sciences*, 2001; 17:167-170
- Masilamania V., Al-Zhrania K., Al-Salhia M., Al-Diabb A., Al-Ageily M.: Cancer diagnosis by autofluorescence of blood components. *Journal of Luminescence*, 2004; 109:143-154

ČIASTOČNÁ CHARAKTERIZÁCIA GENÓMU ENTEROCOCCUS FAECALIS BAKTERIOFÁGA F4

Šuľák M., Hrehová Z.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

ABSTRAKT

Bakteriofág F4 patrí medzi bakteriofágy *Enterococcus faecalis*. Bol izolovaný ako druhý bakteriofág tohto bakteriálneho druhu. Jeho genóm (dsDNA, $\approx 60,4$ kb) sa už čiastočne charakterizoval a aj esenciálne gény sa charakterizovali. (Nigutová a kol., 2008). Pre podrobnejšiu charakterizáciu genómu sa pripravili génové banky F4 fágovej DNA v hostiteľskom organizme *Escherichia coli*. Fragmenty DNA (>600 kbp) sa klonovali v klonovacom vektorovom systéme pUC118/EcoRI a pUC118/HincII. Čiastočne sa sekvenovalo 5 častí fágovej DNA s celkovou veľkosťou 3976 bp a obsahom GC párov 41,2% a z časti sa ocharakterizoval gén kódujúci hydrolázu bunkových stien.

ÚVOD

Bakteriofágy (prokaryotické vírusy) sú vírusy napádajúce baktérie. Ich výskyt je podmienený prítomnosťou baktérií a teda môžeme ich nájsť v každom prostredí. Najbohatším zdrojom je more, kde sa vyskytujú fágové častice v počtoch až $10^4 - 10^7$ na ml (Wichels a kol., 1998). Najviac preskúmané sú fágy črevných baktérií *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*.

Vysoká koncentrácia bakteriofágov sa pozorovala aj v bachore prežúvavcov. Bachorové bakteriofágy sa vyznačujú morfológickou diverzitou a patria do troch vírusových rodín *Myoviridae*, *Siphoviridae* a *Podoviridae* (Klieve a Bauchop, 1988). Svojimi vlastnosťami sú fágy dôležitým faktorom pre kontrolu dynamiky bakteriálnej populácie v bachore prežúvavcov. V súčasnosti sú bachorové bakteriofágy len málo preskúmané. Kompletne preskúmaný je len jeden bachorový bakteriofág – M1 lyzogénny fág zo *Selenomonas runinantium* ML12 (Cheong a Brooker, 1998).

Bakteriofág F4 bol izolovaný z bachorovej šťavy teľat'a (Štyriak a kol., 1994). Genóm bakteriofága F4 je tvorený cirkulárnou dsDNA o veľkosti približne 60,4 kbp. Fág F4 má pretiahnutú hlavu 75 nm dlhú a 33 nm širokú s nekontraktilným flexibilným chvostom. Má relatívne úzke hostiteľské spektrum (Štyriak a kol., 1994).

V súčasnosti sú bakteriofágy zaujímavé z medicínskeho hľadiska. Už v roku 1920 sa začali využívať ich antibakteriálne účinky. Pre fágovú terapiu sú vhodné iba lytické bakteriofágy, pretože lyzogénne fágy nemusia vyvolávať okamžitú deštrukciu bakteriálnych buniek a môžu niesť virulentné gény, ktoré sprostredkujú rezistenciu voči antibiotikám k iným baktériám. Fágová terapia sa osvedčila pri liečbe sepsí (otrave krvi), gastroenterologických ako aj nozokomiálnych infekcií. V súčasnosti je progresívnejšie využívať v boji proti baktériám génové produkty (fágmi kódované enzýmy - hydrolázy) ako samotné virulentné fágy, z dôvodu vysokej účinnosti, vysokej hostiteľskej špecificity a minimálnych vedľajších účinkov.

Hoci sú baktérie *E. faecalis* prirodzenou súčasťou ľudského gastrointestinálneho traktu, je to zároveň najrozšírenejší druh spomedzi enterokokov spôsobujúcich infekcie u človeka. Patogénom sa stáva pri výskyte mimo tráviaci trakt a v dnešnej dobe sú baktérie *E. faecalis* hlavnou príčinou nozokomiálnych infekcií.

MATERIÁL A METODIKA

Bakteriálne kmene a živné pôdy (médiá):

Kmene *E. coli* K12 ER2267 a K12 ER1821 sa kultivovali v médiu Luria-Bertani (LB) pri teplote 37 °C. Agarové platne boli pripravené pridaním 1,5 % agaru do živného média.

Kmeň 47/3 pôvodne klasifikovaný ako *Streptococcus bovis*, sa na základe 16S rRNA analýzy preklasifikoval na kmeň *Enterococcus faecalis* 47/3 (Nigutová a kol., 2008). Kmeň *E. faecalis* 47/3 sa kultivoval na živnom médiu Todd-Hewitt pri teplote 37 °C.

Izolácia fágovej DNA:

Po kultivácii sa kmeň *E. faecalis* 47/3 (hostiteľský organizmus) infikoval bakteriofágom F4 a pomnožil sa v Todd-Hewitt médiu. Po centrifugácii (10000/g, 4°C, 10 min) a odstránení bakteriálnych zvyškov sa supernatant zrážal s PEG a NaCl. Fágový roztok sa scentrifugoval a pridali sa nukleázy (DNaseI a RNaseA). Následne sa fágova DNA prečist'ovala chloroformom, centrifugovala, zrážala etanolom a takto purifikovaná fágová DNA sa rozpustila v TE roztoku.

Klonovanie a sekvenčná analýza:

Génová banka bakteriofága F4 sa pripravila z celkovej DNA bakteriofága F4, ktorá sa parciálne poštiopila reštrikčnými endonukleázami *Hind*III, *Eco*RV a *Rsa*I. Fragmenty DNA s veľkosťou nad 600 kbp sa vyextrahovali z gélu a ligovali do vektorového systému pUC118/*Eco*RI v prípade F4 DNA poštiopenej *Hind*III a pUC118/*Hinc*II pri F4 DNA štiepenej *Eco*RV a *Rsa*I. Ligačné zmesi sa použili na transformáciu kompetentných buniek *E. coli* ER 1821 a *E. coli* ER 2267. Transformačné zmesi sa vysiali na LB platne s obsahom antibiotika ampicilínu (100 µg.ml⁻¹). Individuálne kolónie získané po 18 hodinovej inkubácii pri 37°C sa podrobili ďalšej analýze. Kolónie sa preočkovali do tekutého LB média s obsahom ampicilínu a nasledujúci deň sa izolovala plazmidová DNA alkalickou lýzou. Získané plazmidy sa podrobili reštrikčnej analýze použitím reštriktáz *Hind*III, *Bam*HI pre overenie prítomnosti inzertu a analýza reštriktázami *Dra*I a *Ase*I umožnila rozlíšenie jednotlivých fragmentov. Rekombinantné klony sa sekvenčne analyzovali použitím BLAST algoritmu (Altschul a kol., 1997) dostupný na webovej stránke <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (National Centre for Biotechnology Information).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

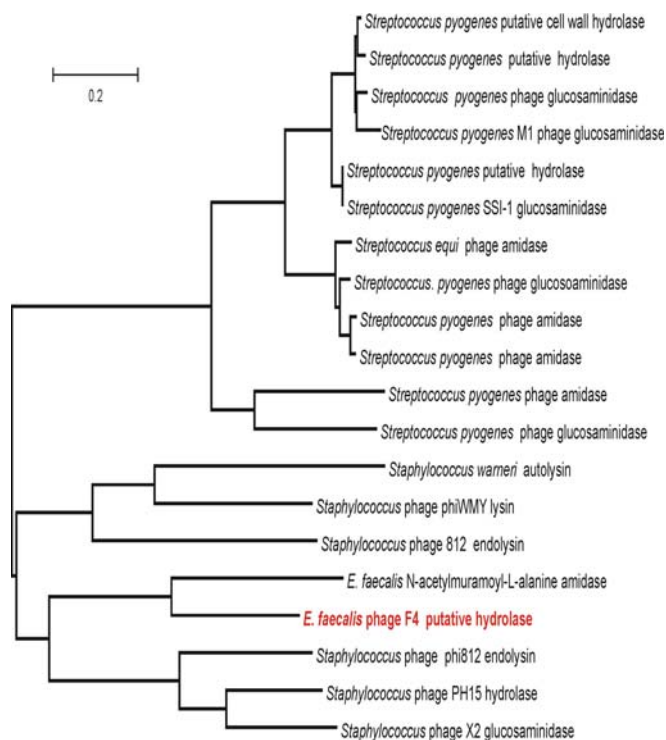
Pripravila sa génová banka bakteriofága F4, ktorá obsahovala klonované gény. Celkovo sa analyzovalo 80 kolónií na prítomnosť inzertov bakteriofágovej DNA. Vybrané rekombinanty (11) obsahujúce inzerty o vhodnej veľkosti sa sekvenčne analyzovali. Bioinformatická analýza sa vykonala BLAST algoritmom (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), v ktorej boli preložené poradia nukleotidov do poradia aminokyselín. Bioinformatická analýza bola robená ku dňu 20. apríla 2009. Na základe tejto analýzy sme pozorovali podobnosť nukleotidových sekvencií nami pripravených rekombinantov s časťami iných bakteriofágov u piatich klonov (3F4-7F4). Získané rekombinanty 3F4 a 7F4 na základe blastx analýzy kódujú gény pre portálne proteíny. Tieto gény sú prirodzenou súčasťou bakteriofágov a majú funkciu pri infekcii fágovej nukleovej kyseliny do hostiteľského organizmu. Nukleotidová sekvencia rekombinanta 4F4 vykazuje najväčšiu podobnosť s fágovou terminázou z *Clostridium perfringens*. Rekombinant 5F4 na základe blastx analýzy obsahuje gén kódujúci hypotetický proteín. Nakoľko ide o proteín neznámej funkcie, podrobil sa daný rekombinant ďalšej analýze. Veľkosť rekombinanta 5F4 bola 950 bp s obsahom 41,8% GC párov. Na základe porovnania obsahu GC párov nami pripravených rekombinantov s obsahom u enterokokov (37 - 45%) (Gilmore a kol., 2002) sa potvrdilo, že ide naozaj o fágový proteín. Najzaujímavejším sa zdá byť rekombinant 6F4, ktorý porovnaním s GenBank databázou vykazoval podobnosť s N-acetylmuramoyl-L-alanin amidázou *Enterococcus faecalis*. Význačnú podobnosť u tohto rekombinanta môžeme pozorovať aj s hydrolázami bunkových stien stafylokokových fágov. Rekombinant 6F4 obsahuje časť génu kódujúceho hydrolázu.

Celková priemerná veľkosť takýchto hydroláz predstavuje 250 aminokyselín, pričom nami pripravený rekombinant 6F4 obsahoval 137 aminokyselín, čo predstavuje približne 55% génu. V tabuľke 1 je znázornený prehľad rekombinantov, porovnanie veľkosti jednotlivých inzertov v rozmedzí 658 - 950 bp, percentuálna podobnosť rekombinanta s príslušnou GenBank sekvenciou, sekvencia v GenBank databáze vykazujúca najvyššiu podobnosť (blastx best hit) a percentuálny obsah GC párov. Podľa blastx analýzy sú rekombinanty 3F4, 4F4, 7F4 fágové a rekombinant 6F4 má podľa databázy profágový pôvod.

Tab. 1. Charakterizácia vybraných rekombinantov

Rekombinant	Blastx best hit	Podobnosť	Veľkosť inzertu (bp)	Obsah GC párov (%)
3F4	ref ZP_00602934.1 Fágový portálny proteín, HK97 [<i>Enterococcus faecium</i> DO]	40/154 (25%)	658	39,1
4F4	ref ZP_02865357.1 fágová termináza, veľká podjednotka, pbsx rodina [<i>Clostridium perfringens</i> C str. JGS1495]	127/260(48%)	950	40,7
5F4	ref ZP_02093315.1 hypotetický proteín PEPMIC_00050 [<i>Peptostreptococcus micros</i> ATCC 33270]	58/104 (55%)	950	41,8
6F4	gb EE110842.1 possible N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [<i>Enterococcus faecalis</i> TX0104]	94/137 (68%)	659	45,4
7F4	ref ZP_00144817.1 fágový portálny proteín [<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> ATCC 49256]	63/227 (27%)	759	38,9

Podrobnejšie štúdium fylogenetických vlastností sekvencie *E. faecalis* F4 hydrolázy, je znázornené fylogenetickým stromom (obrázok 1), ktorý porovnáva sekvencie *E. faecalis* F4 hydrolázy a rodu stafylokokových a streptokokových hydroláz. Tento fylogenetický strom poukazuje na skutočnosť, že *E. faecalis* F4 hydroláza je evolučne bližšia hydrolázam stafylokokových fágov, pričom by mala byť hydroláza F4 fylogeneticky podobnejšia so streptokokovými fágmi, ktorým je baktéria *E. faecalis* evolučne príbuznejšia.



Ob. 1. Fylogenetická analýza príbuzností hydrolázy bakteriofága F4.

POĎAKOVANIE

Autor ďakuje za finančnú podporu grantom VEGA 2/0006/08 a APVV-0586-07.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Cheong J.P.E., Brooker J.D.: Lysogenic bacteriophage M1 from *Selenomonas ruminantium*: isolation, characterization and DNA sequence analysis of the integration site. *Microbiology* 144, 2195-2202 (1998).
- Klieve A.V., Bauchop T.: Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1637-1641 (1998).
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J.: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, (1982).
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J.: Molecular cloning: A laboratory manual. Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, (1989).
- Nigutová, K., Štyriak, I., Javorský, P., Pristaš, P.: Partial characterization of *Enterococcus faecalis* Bacteriophage F4. *Folia Microbiol.*, 2008, 53, 234-236.
- Štyriak, I., Španová, A., Žitňan, R.: Partial characterization of two ruminal bacteriophages with similar restriction patterns and different capsids morphology. *Arch. Tierz., Drummerstorf.* 2005. 48 (6), 572-579.
- Štyriak I., Španová A., Montágová H., Kmet' V.: Isolation and characterization of a new ruminal bacteriophage lytic to a *Streptococcus bovis*. *Curr. Microbiol.* 28, 355-358 (1994).
- Wichels, A., Biel, S. S., Gelderblom, H. R., Brinkhoff, T., Muyzer G., Schutt, Ch.: Bacteriophage Diversity in the North Sea. *App. and Environ. Microbiol.*, 1998, 64 (11), 4128-4133.

VPLYV *THYMUS VULGARIS* PRIJATÉHO KRMIVOM NA ANTIOXIDAČNÝ STATUS A INTEGRITU DUODENÁLNEJ STENY U KURČIAT

Takáčová J.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Šoltésovej 4, Košice, Slovensko

ABSTRAKT

Thymus vulgaris je jedným z najsilnejších rastlinných antiseptických drog, účinný proti baktériam, pliesňam, črevným prvokom a parazitom. Má antioxidačné, antimikrobiálne, antiseptické, antireumatické a iné vlastnosti. Cieľom práce bolo sledovať vplyv éterického oleja *Thymus vulgaris* prijatého v krmive na črevný epitel kurčiat, (stanovenie elektrického odporu v duodene pomocou Ussing chamber), sledovať vplyv éterického oleja na niektoré parametre antioxidačného statusu a na niektoré biochemické ukazovatele v mukóze tenkého čreva, krvi, plazme a pečeni kurčiat. Nosnice ISA BROWN vo veku 6 mesiacov s priemernou živou hmotnosťou 1,50-1,75 kg boli rozdelené do troch skupín. Kontrolná skupina bola kŕmená štandardnou diétou pre nosnice, doplnenou slnečnicovým olejom v koncentrácii 1%. Dve pokusné skupiny boli kŕmené kŕmnom zmesou pre nosnice obohatenou tymiánovou silicou v koncentrácii 0,025% a 0,05%. Vzorky krvi a tkanív boli odoberaté po 5 týždňoch kŕmenia. Koncentrácia malondialdehydu v plazme bola vyššia u skupiny s prídavkom tymiánovej silice v koncentrácii 0,025%, oproti skupine s 0,05% prídavkom tymiánovej silice ($1,08 \pm 0,19$ vs $0,40 \pm 0,03 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $P < 0,05$). Koncentrácia alanín aminotransferázy v plazme bola signifikantne vyššia v skupine s prídavkom 0,05% tymiánovej silice oproti skupine s 0,025% prídavkom a oproti kontrole ($5,41 \pm 0,06$ vs $1,77 \pm 0,47$; $0,94 \pm 0,23 \mu\text{kat.l}^{-1}$, $P < 0,05$). Koncentrácia glutatión peroxidázy v pečeni bola signifikantne vyššia v skupine s prídavkom 0,05% tymiánovej silice oproti 0,025% prídavku ($44,63 \pm 8,56$ vs $17,23 \pm 6,15 \text{ U.g}^{-1}$ bielkovín, $P < 0,05$). Pri 0,05% koncentrácii tymiánu bol nameraný nižší elektrický odpor steny duodena v porovnaní s kontrolnou skupinou. Výsledky ukazujú, že prídavok tymiánovej silice v 0,05% koncentrácii do krmiva zvyšuje antioxidačnú ochranu organizmu kurčiat.

ÚVOD

Ľudia používali tymián mnoho storočí pre jeho liečivé účinky a arómu. Prvé záznamy o tymiáne sú z prvého storočia nášho letopočtu. Veľa autorov uvádza antimikrobiálny (Fabian a kol., 2007), antioxidačný účinok éterických olejov (Faix a kol., 2007), pôsobí protizápalovo (Juhás a kol., 2008) a ich schopnosť vychytávať voľné radikály. Antimikrobiálny účinok tymiánu sprostredkujú tymol, karvakrol a fenolové zložky oleja (Bhaskara a kol., 1998). Obsahuje veľké množstvo účinných látok (silice, triesloviny, horčiny, flavony), aromatické kyseliny, triterpenické kyseliny. Používa sa vo farmaceutickom a potravinárskom priemysle. Integrita črevnej steny tvorí bariéru, ktorá je dôležitá pre zabránenie prechodu pôvodných baktérií (črevnej mikroflóry) a exogénnych baktérií a tiež endotoxínov z gastrointestinálneho priestoru do extraintestinálneho priestoru (pečene, sleziny, krvného riečišťa). Zabezpečuje antioxidačnú ochranu organizmu. Voľné radikály môžu poškodiť bunky črevnej steny a spôsobiť poruchu absorpcie a transportu živín. Integrita (celistvosť) črevnej steny môže byť vyjadrená elektrickou rezistenciou – transepiteliálnou elektrickou rezistenciou (TEER). Cieľom experimentu bolo študovať vplyv diét obohatených rozličnou koncentráciou tymiánovej silice na črevný trakt, stanovenie elektrického odporu duodenálnej steny, antioxidačný status a fagocytárnu aktivitu u kurčiat.

MATERIÁL A METÓDY

15 kurčiat plemena ISA BROWN vo veku 6 mesiacov s priemernou živou hmotnosťou 1,50-1,75 kg bolo rozdelených do 3 skupín. V každej skupine bolo 5 kurčiat. Boli chované v

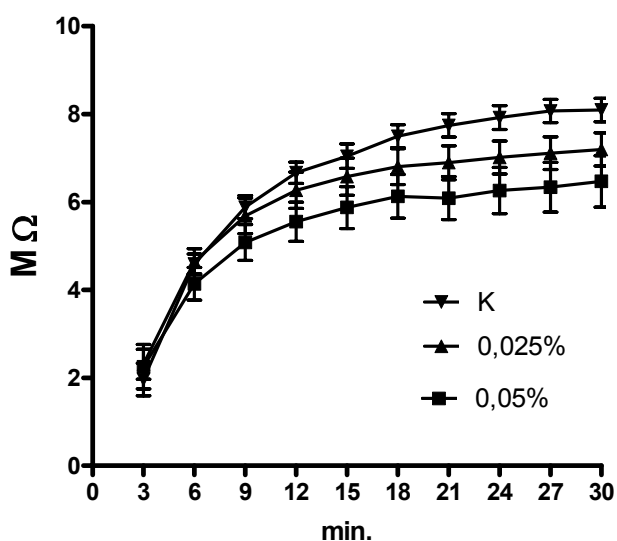
klietkach s drevenými pilinami. Teplota a svetelný režim boli upravené pre požiadavky daného plemena kurčiat. Všetky kurčatá mali voľný prístup k vode a krmivu. Kontrolná skupina bola kŕmená základnou diétou (BIOFER, Prešov, Slovensko). Druhá a tretia skupina boli kŕmené základnou diétou doplnenou tymiánovou silicou o koncentrácií 0,025% a 0,05%. Tymiánová silica bola kúpená z Calenduly (Calendula a.s., Nová Ľubovňa, Slovenská republika). Silica bola zriadená so slnečnicovým olejom, pričom výsledná koncentrácia slnečnicového oleja v diéte bola 1%. Po 5 týždňoch kŕmenia boli kurčatá eutanazované dekapitáciou a boli odobraté vzorky krvi a tkanív. 5 cm kúsok duodena bol odobratý do kadičky s Thyrodeho roztokom. Elektrický odpor (TEER) duodenálneho tkaniva bol meraný v modifikovanom komôrkovom systéme, založenom na princípe Ussing Chambers. Stena duodena o ploche 0,71cm² bola vložená do komôrky s obsahom Thyrodeho roztoku (12.5 ml na mukóznej a seróznej strane) prebublaného medicínym plynom (95% O₂ a 5% CO₂). TEER bol meraný v 3 minútových intervaloch po dobu 30 minút multimetrom (Metex, MXD-5040).

Vzorky krvi, plazmy, tkaniva pečene a epitelu duodena boli uložené do mraziaceho boxu pri -70°C do doby ich analyzovania. Aktivita glutatión peroxidázy (GPx) v pečeni a epiteli duodena bola meraná podľa Paglia a Valentine (1967). Koncentrácia malondialdehydu (MDA) vo vzorkách pečene a epitelu duodena bola po homogenizácii s deionizovanou vodou meraná modifikovanou fluorometrickou metódou (Jo a Ann 1998). Celkový antioxidačný status (TAS) v plazme, hemoglobín (Hb) a aktivita GPx v krvi boli merané spektrofotometricky kitmi firmy Randox. Koncentrácia bielkovín v tkanivách bola meraná spektrofotometrickou metódou podľa Bradforda (1976). V plazme boli merané celkové bielkoviny, alanín aminotransferáza (ALT), triglyceridy a voľný cholesterol spektrofotometricky kitmi firmy Randox. Koncentrácie alkalickéj fosfatázy (ALP), fosforu (P), vápnika (Ca), celkového cholesterolu a glukózy v plazme boli merané spektrofotometricky podľa diagnostiky Pliva – Lachema (Brno, CZ). Fagocytárna aktivita bola meraná podľa Hrubíška (1981).

Na štatistické vyhodnotenie výsledkov bola použitá jednocestná ANOVA s Tukey post-testom a použitím GraphPad Software (USA). Výsledky sú uvedené ako priemerná hodnota ± SEM.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kurčatá počas celej doby kŕmenia boli čulé a nevykazovali žiadne klinické príznaky ochorenia. Pri 0,05% koncentrácií



0,05% koncentrácií tymiánu bol nameraný nižší elektrický odpor bunkovej steny v 21. (6,09±0,49 vs 7,75±0,27), 24. (6,26±0,53 vs 7,92±0,27), 27. (6,34±0,57 vs 8,07±0,26) a v 30. (6,47±0,59 vs 8,09±0,27) minúte v porovnaní s kontrolnou skupinou (Graf 1.).

Graf 1. Hodnoty elektrického odporu duodena v kontrole a pokusných skupinách v jednotlivých minútach

Nižšie hodnoty TEER pre skupinu s 0,05% koncentráciou *Thymus vulgaris*

v diéte oproti kontrole si vysvetľujeme narušením integrity duodenálneho tkaniva a tým zvýšením prestupu iónov. Dôkazom našej hypotézy môže byť histologické vyšetrenie črevnej steny.

Koncentrácia GPx v pečeni bola signifikantne vyššia v skupine s prídavkom tymiánovej silice v koncentrácii 0,05%, oproti koncentrácii 0,025% (Tab. 2). Všeobecne sa dokázala vysoká aktivita GPx v pečeni, stredná v srdci, pľúcach a mozgu, malá aktivita vo svaloch. GPx patrí medzi enzýmové antioxidanty, ktoré majú významné zastúpenie v intracelulárnom priestore. Antioxidačná ochrana je aktívne odstraňovanie reaktívnych voľných radikálov pomocou antioxidantov, čiže látok chrániacich biologicky dôležité molekuly pred oxidatívnym poškodením (Ďuračková,1997). Hlavná úloha GPx je katalyzácia redukcie H₂O₂ a organických hydroperoxidov na príslušný alkohol alebo príslušný alkohol alebo vodu a oxidovaný tripeptid glutatiónu. Plazmová GPx zabezpečuje antioxidačnú ochranu v extracelulárnych tekutinách. Z nameraných výsledkov vyplýva, že tymiánová silica pridaná do krmiva v koncentrácii 0,05% zvyšuje antioxidačnú ochranu organizmu u kurčiat nosivého plemena v porovnaní s 0,025% koncentráciou tymiánu.

Koncentrácia MDA v plazme pri prídavku tymiánovej silice v koncentrácii 0,025% bola vyššia oproti 0,05% koncentrácii (Tab 2). Z nameraných hodnôt vyplýva, že pri 0,05% koncentrácii tymiánu je lepšie zabezpečená antioxidačná ochrana buniek, keďže MDA je ukazovateľom intenzity lipidovej peroxidácie. Lipidová peroxidácia je pokladaná za hlavný ukazovateľ úrovne oxidačného stresu (Leféure,1998; Yagi,1998) a meranie tvorby reaktívnych substancií kyseliny tiobarbitúrovej (TBARS – thiobarbituric acid reactive substances), ako sú hydroperoxydy a aldehydy, je najrozšírenejším používaným hodnotením intenzity lipidovej peroxidácie (Armstrong a Browne, 1994).

Koncentrácia ALT v plazme bola vyššia v skupine s 0,05% prídavkom tymiánovej silice, oproti kurčatám s 0,025% prídavkom a tiež oproti kontrole (Tab. 2). ALT je intracelulárny cytoplazmatický enzým, ktorý sa nachádza v mikrozómovej časti hepatocytu a podieľa sa na metabolizme aminokyselín a sacharidov. Koncentrácia ALT v plazme pri 0,05% koncentrácii tymiánovej silice bola vyššia čo môže poukazovať na to, že 0,05% prídavok nie je vhodný z hľadiska hepatálnych funkcií (Tab. 2).

Tab. 2. Koncentrácie glutatión peroxidázy (GPx), malondialdehydu (MDA), alanín aminotransferázy (ALT)

Parameter	Kontrola	0,025%	0,05%
ALT [$\mu\text{kat.l}^{-1}$]	0,94 \pm 0,23 ^b	1,77 \pm 0,47 ^a	5,41 \pm 0,06 ^{ab}
GPx pečeň [U.g ⁻¹ bielkovín]	32,89 \pm 5,15	17,23 \pm 6,15 ^a	44,63 \pm 8,56 ^a
MDA plazma [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	0,73 \pm 0,09	1,08 \pm 0,19 ^a	0,40 \pm 0,03 ^a

Rovnaké písmena horného indexu P<0,05; priemer \pm SEM, n=5.

Fagocytárna aktivita bola signifikantne zvýšená pri 0,05% prídavku tymiánovej silice ako aj pri 0,025% prídavku oproti kontrole (Tab.3). Index fagocytárnej aktivity bol signifikantne zvýšený pri 0,05% a 0,025% prídavku tymiánovej silice oproti kontrole (Tab.3). Fagocytóza je proces typický pre bunky, ktoré označujeme ako fagocyty, medzi ktoré patria neutrofilý, eozinofilý, monocyty a tkanivové makrofágy. Makrofágy sú neoddeliteľnou súčasťou imunitného systému, pôsobia ako mikrobicídne a tumoricídne efekty buniek. Podávanie tymiánového éterického oleja stimulovalo fagocytárnu aktivitu leukocytov u nosníc. Keďže fagocytárna aktivita je len jedným z imunitných parametrov, môžeme iba predpokladať, že tymián môže zlepšovať imunitné funkcie organizmu.

Tab. 3. Fagocytárna aktivita a index fagocytárnej aktivity – nosnice kŕmené 0,05% a 0,025% tymiánom

Parameter	Kontrola	0,025%	0,05%
Fagocytárna aktivita (%)	32,20±0,58 ^{ab}	37,60±0,51 ^a	42,40±0,40 ^b
Index fagocytárnej aktivity	1,44±0,04 ^{ab}	2,78±0,05 ^a	2,60± 0,03 ^b

Rovnaké písmena horného indexu $P < 0,05$; priemer \pm SEM, $n=5$.

Z našich výsledkov vyplýva, že tymianová silica pridaná do krmiva zvyšuje antioxidačnú ochranu kurčiat nosivého plemena, pri podávaní v dospelom veku, a tiež pozitívne vplýva na imunitný systém kurčiat. Zároveň však nami použitá 0,05% koncentrácia tymiánovej silice sa ukazuje ako vysoká a nevhodne ovplyvňujúca hepatálne funkcie kurčiat. Z toho dôvodu je potrebné v ďalších pokusoch presne vymedziť rozsah koncentrácií éterických olejov pridávaných do krmiva.

POĎAKOVANIE

Tento výskum bol podporovaný grantovou agentúrou pre podporu vedy VEGA č. 2/7046/27 a 1/0420/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Armstrong D, Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxidases, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Free Radic. In Diag. Med.* 1994; 366: 46-50.
- Bhaskara M, Angers P, Gosselin A, and Arul, J. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry* 1998; 8: 1515-1520.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- Cosentino S, Tuberoso C.I, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett. in App. Microb.* 1999; 29:130-135.
- Ďuračková Z. Antioxidanty v dobrom aj zlom. *Klin. Biochem. Metab.* 1997; 5:194-199.
- Fabian D, Sabol M, Domaracká K, Bujňáková D. Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicol in vitro.* 2007.
- Faix Š, Juhas Š, Faixová Z. The effect of essential oil intake on changes of plasma antioxidant status in mice. *Acta Vet. Brno.* 2007; 76: 357-361.
- Hrubiško M. Hematológia a transfuziológia. Ed. Osveta, Martin. 1981; 19.
- Jo C, Ahn D.U. Fluorometric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. *Poultry Sci.* 1998; 77: 475-480.
- Juhás Š, Bujňáková D, Reháč P, Čikoš Š, Czikková S, Veselá J, Il'ková G, Koppel J. Anti-Inflammatory Effects of Thyme essential Oil in Mice. *Acta Vet. Brno.* 2008; 77: 327-334.
- Kende M. Role of macrophages in the expression of immune responses. *J.Am.Vet. Med. Ass.* 1982; 181: 1037-1042.
- Leféure G. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Anim.Biol. Clin.* 1998; 56: 43-58.
- Paglia D.E, Valentine W.N. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. and Clin. Med.* 1967; 70: 158-169.
- Yagi K. Single procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Free Radic. and Antiox. Protocols.* 1998; 108: 101-106.

VYBRANÉ SÉROVÉ PROTEÍNY AKÚTNEJ FÁZY A MLIEČNY AMYLOID A U DOJNÍC POSTIHNUÝCH ZÁPALOVÝMI OCHORENAMI MLIEČNEJ ŽĽAZY

Tóthová Cs., Nagy O., Seidel H., Kováč G.

Klinika prežívavcov, UVL, Košice

ABSTRAKT

Zámerom práce bolo hodnotenie vplyvu zápalových ochorení mliečnej žľazy na koncentráciu špecifického proteínu akútnej fázy produkovaného mliečnou žľazou, tzv. mliečného amyloidu A (MAA) v mlieku, ako aj na koncentráciu vybraných proteínov akútnej fázy v krvnom sére dojníc s klinickou a subklinickou mastitídou. Zároveň sme hodnotili vzájomný vzťah medzi koncentráciou MAA v mlieku a stupňom postihnutia mliečnej žľazy. Do sledovania bolo zahrnutých 41 dojníc s rôznymi klinickými nálezmi na mliečnej žľaze. Dojnice boli rozdelené do skupín na základe výsledkov klinického vyšetrenia mliečnej žľazy a vykonanej rýchlej maštalnej skúšky (NK-test). Mliečny amyloid A bol stanovený v zmesných a individuálnych štvrťových vzorkách mlieka. V krvnom sére sa hodnotili haptoglobín (Hp) a sérový amyloid A (SAA). Najvyššiu priemernú koncentráciu MAA sme zaznamenali v zmesných vzorkách mlieka u dojníc s klinicky zjavnými zmenami na mliečnej žľaze. Analýzy preukázali vyššie hodnoty MAA aj v mlieku dojníc bez klinických zmien na mliečnej žľaze, ale s výrazne pozitívnym NK-testom. Pri hodnotení individuálnych štvrťových vzoriek mlieka sme zistili podobný trend zvyšujúcich sa hodnôt so zvyšujúcim sa stupňom postihnutia mliečnej žľazy ($P < 0,001$). Koncentrácie MAA zistené v zmesných, ako aj štvrťových vzorkách mlieka významne korelovali so závažnosťou ochorenia ($R = 0,657, P < 0,001$; $R = 0,735, P < 0,001$). Kým pri hodnotení Hp v krvnom sére sme zaznamenali len trend nevýznamne vyšších hodnôt u dojníc s príznakmi mastitídy, priemerná koncentrácia SAA u dojníc s klinickou mastitídou bola významne vyššia ($P < 0,05$). Dosiahnuté výsledky poukazujú na zvýšenú produkciu MAA u dojníc s klinicky zjavnými zmenami na mliečnej žľaze, ako aj u zvierat postihnutých subklinickými formami ochorenia. Ukazuje sa, že hodnotenie MAA priamo v mlieku by bolo vhodnejším nástrojom pri rozlišovaní zvierat s rôznymi príznakmi mastitídy ako stanovenie určitých proteínov akútnej fázy v krvnom sére.

ÚVOD

Zápaly mliečnej žľazy patria medzi najdôležitejšie a najčastejšie sa vyskytujúce ochorenia v chovoch hovädzieho dobytku. Majú nepriaznivý vplyv na ekonomiku chovu v dôsledku zníženého množstva a kvality mlieka vhodného na ľudský konzum, ako aj zvýšených nákladov na liečbu a veterinárnu starostlivosť (Bradley, 2002). Zatiaľ čo klinická mastitída je na základe klinicky zjavných zmien na mliečnej žľaze a zmyslovo zmeneného mlieka ľahko postrehnuteľná, subklinická mastitída predstavuje vážnejší problém pre chovateľa, ako aj pre mliečny priemysel, keďže dojnice postihnuté subklinickou formou mastitídy nejavia zreteľné zmeny ani na vemene, ani v zmyslových vlastnostiach mlieka. Mlieko od takýchto dojníc tak následne môže znehodnotiť celú dodávku mlieka. Zápal mliečnej žľazy, spolu s fyzikálnymi, chemickými a mikrobiologickými zmenami, je charakterizovaný zvýšením počtu somatických buniek v mlieku a patologickými zmenami v parenchýme mliečnej žľazy (Pyörälä, 2003). Okrem toho, postihnuté mliečne štvrte môžu produkovať zápalové proteíny, akými sú proteíny akútnej fázy (Eckersall a kol., 2001). Predpokladalo sa, že vyššie koncentrácie hlavných proteínov akútnej fázy u hovädzieho dobytku, haptoglobínu (Hp) a sérového amyloidu A (SAA), zaznamenané v mlieku mastitídnych kráv, sú dôsledkom ich prestupu z krvi do mlieka. Z tohto dôvodu aj laboratórne testy určené na analýzu uvedených zápalových proteínov v krvi boli prispôbené k stanoveniu aj vo vzorkách mlieka. Ďalšie výskumy preukázali extrahepatálnu syntézu špecifickej izofomy amyloidu A v epiteliálnych bunkách mliečnej žľazy, tzv. mliečného amyloidu A (MAA) (McDonald a kol., 2001).

Zámerom práce preto bolo posúdenie možného vplyvu zápalových ochorení mliečnej žľazy na koncentráciu MAA v zmesných a individuálnych štvrťových vzorkách mlieka, ako aj na koncentráciu vybraných proteínov akútnej fázy – Hp a SAA v krvi dojnic postihnutých klinickou a subklinickou mastitídou. Hodnotili sme tiež vzájomné vzťahy medzi koncentráciou MAA v zmesných a štvrťových vzorkách mlieka a medzi stupňom postihnutia mliečnej žľazy.

MATERIÁL A METODIKA

Do sledovania bolo zahrnutých 41 dojnic plemena čierostrakatého a jeho krížencov s rôznym stupňom postihnutia mliečnej žľazy. Klinické vyšetrenie mliečnej žľazy bolo vykonané adspekciou a palpáciou vemena. K určeniu subklinickej mastitídy bola vykonaná rýchla maštalná skúška (NK-test). Zvieratá boli rozdelené do 4 skupín na základe výsledkov klinického vyšetrenia vemena a vykonaného NK-testu: skupina I – dojnice s klinicky zdravou mliečnou žľazou a negatívnym NK-testom, skupina II – dojnice s klinicky zdravou mliečnou žľazou a mierne pozitívnym NK-testom, skupina III – dojnice s klinicky zdravou mliečnou žľazou a výrazne pozitívnym NK-testom, skupina IV – dojnice s klinicky zjavnými zmenami na mliečnej žľaze a zmyslovo zmeneným mliekom.

Laboratórne analýzy boli vykonané vo vzorkách mlieka a krvi. Vzorky mlieka boli odoberané ručným dojením. Vzorky krvi boli odoberané priamou punkciou v. *jugularis*. Vo vzorkách mlieka bol analyzovaný mliečny amyloid A (MAA, ng/ml) a v krvnom sére boli hodnotené vybrané proteíny akútnej fázy – haptoglobín (Hp, mg/ml) a sérový amyloid A (SAA, µg/ml). Koncentrácia MAA bola stanovená v 41 zmesných vzorkách mlieka a v 145 individuálnych vzorkách mlieka odoberaných jednotlivo z každej laktujúcej mliečnej štvrťky. Výsledky získané vyšetrením individuálnych štvrťových vzoriek mlieka boli rozdelené do skupín na základe rovnakých požiadaviek ako dojnice využívané v sledovaní (skupina I – IV). Z celkového počtu 164 mliečnych štvrtí bolo 19 nelaktujúcich. Koncentrácia MAA bola stanovená metódou enzýmovej imunoanalýzy využitím komerčných diagnostických testov (Tridelta Development, Írsko). Odčítanie hodnôt absorbancie s následným vypočítaním koncentrácií MAA bolo vykonané na automatickom fotometri pre mikrotitračné platne Opsys MR (Dynex Technologies, USA). Rýchla maštalná skúška bola vykonaná zmiešaním rovnakého objemu mlieka a roztoku alkyl-aryl-sulfonátu.

Koncentrácia Hp v sére bola stanovená kolorimetrickou metódou využitím komerčných diagnostických testov (Tridelta Development, Írsko). Sérový amyloid A bol analyzovaný metódou enzýmovej imunoanalýzy použitím komerčne vyrábaných ELISA testov (Tridelta development, Írsko). Odčítanie hodnôt absorbancie a vypočítanie koncentrácií oboch proteínov akútnej fázy hodnotených v krvnom sére bolo vykonané na automatickom fotometri pre mikrotitračné platne Opsys MR (Dynex Technologies, USA).

Hodnotenie získaných výsledkov bolo vykonané stanovením priemerných hodnôt (\bar{x}) a smerodajných odchýlok (sd) pre každý sledovaný ukazovateľ. Významnosť rozdielov priemerných hodnôt medzi skupinami dojnic pre ukazovatele stanovené v mlieku aj krvi bola hodnotená jednofaktorovou analýzou rozptylov (ANOVA) a Tukey-Kramerovým porovnávacím testom. Rovnaké štatistické postupy boli využité aj pri hodnotení významnosti rozdielov priemerných hodnôt MAA medzi štvrťovými vzorkami mlieka. Korelačné vzťahy medzi koncentráciou MAA v zmesných, ako aj individuálnych štvrťových vzorkách mlieka a zmenami na mliečnej žľaze a v mlieku boli hodnotené vypočítaním Pearsonovho korelačného koeficienta (R), vrátane určenia významnosti korelácie. Štatistické hodnotenie získaných výsledkov bolo vykonané v programe GraphPad Instat V2.04.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Získané výsledky charakterizované priemernými hodnotami, smerodajnými odchýlkami a hodnotením významnosti rozdielov priemerných hodnôt sú zhrnuté v tabuľkách 1 až 3. Hodnotenie korelačných vzťahov medzi koncentráciou MAA v zmesných vzorkách mlieka a stupňom postihnutia mliečnej žľazy, ako aj medzi koncentráciou MAA v štvrt'ových vzorkách mlieka a zmenami na mliečnej žľaze a v mlieku sú uvedené v tabuľke 4.

Tab. 1. Koncentrácie MAA (ng/ml) v zmesných vzorkách mlieka od dojníc s rôznym stupňom postihnutia mliečnej žľazy

Parameter	Skupina dojníc				ANOVA P
	I.	II.	III.	IV.	
MAA x	325,7 ^{a,A}	1433,1 ^B	3910,4 ^a	6073,8 ^{A,B}	< 0,001
ng/ml ± sd	173,8	949,2	2145,8	4414,0	

Rovnaké indexy v riadkoch znamenajú štatistickú významnosť rozdielov priemerných hodnôt medzi skupinami: a – P < 0,05; A, B – P < 0,001

Tab. 2. Koncentrácie MAA (ng/ml) v individuálnych vzorkách mlieka z jednotlivých mliečnych štvrtí s rôznymi nálezmi na mliečnej žľaze a v mlieku

Parameter	Skupina vzoriek mlieka				ANOVA P
	I.	II.	III.	IV.	
MAA x	473,7 ^{A,B}	1431,0 ^{C,D}	6528,6 ^{A,C,E}	10476,0 ^{B,D,E}	< 0,001
ng/ml ± sd	548,6	1347,6	3823,2	5447,2	

Rovnaké indexy v riadkoch znamenajú štatistickú významnosť rozdielov priemerných hodnôt medzi skupinami: A, B, C, D, E – P < 0,001

Najvyššia priemerná koncentrácia MAA bola zaznamenaná v skupine dojníc s klinicky zjavnými zmenami na mliečnej žľaze. Analýzy preukázali vyššiu priemernú hodnotu MAA aj vo vzorkách mlieka dojníc bez klinických zmien na mliečnej žľaze, ale s výrazne pozitívnym NK-testom. Tieto hodnoty boli významne vyššie v porovnaní s priemernou koncentráciou MAA zistenou u dojníc s klinicky zdravou mliečnou žľazou a negatívnym NK-testom (P < 0,001 a P < 0,05). Pri hodnotení koncentrácií MAA v štvrt'ových vzorkách mlieka sme zaznamenali podobný trend významne sa zvyšujúcich hodnôt (P < 0,001). Okrem toho, koncentrácie mliečného amyloidu A v zmesných vzorkách mlieka, ako aj v individuálnych štvrt'ových vzorkách mlieka významne korelovali so zmenami na mliečnej žľaze a v mlieku (R = 0,657, P < 0,001; R = 0,735, P < 0,001). Koncentrácie MAA vo vzorkách mlieka odoberaných separovane z jednotlivých mliečnych štvrtí, ale aj v zmesných vzorkách mlieka sa významne zvyšovali so zvyšujúcou sa pozitivitou NK-testu.

Tab. 3. Koncentrácie Hp a SAA v krvnom sére dojníc s rôznymi klinickými príznakmi na mliečnej žľaze a výsledkami NK-testu

Parameter	Skupina dojníc				ANOVA P
	I.	II.	III.	IV.	
Hp x	0,046	0,122	0,299	0,329	n. s.
mg/ml ± sd	0,053	0,263	0,314	0,339	
SAA x	29,7	27,6 ^a	48,2	71,5 ^a	< 0,05
µg/ml ± sd	27,6	28,0	42,5	31,5	

Rovnaké indexy v riadkoch znamenajú štatistickú významnosť rozdielov priemerných hodnôt medzi skupinami: a – P < 0,05

Sérové koncentrácie Hp preukázali tendenciu postupného nevýznamného zvyšovania sa hodnôt so zvyšujúcim sa stupňom postihnutia mliečnej žľazy. Najvyššia priemerná koncentrácia Hp bola zistená u dojníc s klinickými zmenami na mliečnej žľaze. Rozdiely priemerných hodnôt Hp v krvnom sére medzi dojnicami s rôznymi príznakmi na mliečnej žľaze však neboli významné. Podobný trend bol zaznamenaný aj v sérových koncentráciách SAA, pričom najvyššia priemerná hodnota uvedeného ukazovateľa bola zistená u dojníc s klinickou mastitídou. Priemerné sérové koncentrácie SAA zistené u dojníc s klinicky zdravou mliečnou žľazou a negatívnym NK-testom a u dojníc bez klinického nálezu na vemene, ale s mierne pozitívnym NK-testom boli približne rovnaké. Rozdiely v priemerných koncentráciách SAA medzi hodnotenými skupinami dojníc boli významné ($P < 0,05$).

Tab. 4. Korelácie medzi koncentráciou MAA a klinickými zmenami na mliečnej žľaze

Parameter	MAA v zmesných vzorkách mlieka		MAA v štvrt'ových vzorkách mlieka	
	R	P <	R	P <
Stupeň postihnutia mliečnej žľazy	0,657	0,001	0,735	0,001

R – korelačný koeficient, P – významnosť korelácie

Vyššie koncentrácie Hp a SAA v mlieku dojníc s klinickou mastitídou boli zaznamenané viacerými autormi ako následok prestupu uvedených proteínov z krvi do mlieka (Eckersall a kol., 2001, Cho, 2002, Kováč a kol., 2007). O vplyve zápalových ochorení mliečnej žľazy na koncentráciu MAA v mlieku je však k dispozícii iba málo informácií, hoci uvedený proteín by mohol byť senzitivnejším indikátorom mastitíd, pretože sa tvorí priamo v mliečnej žľaze ako odpoveď na rôzne infekcie. Petersen a kol. (2005) uvádzajú, že koncentrácie MAA sú vyššie v mlieku z mliečnych štvrtí s mastitídou v porovnaní so zdravými štvrt'ami. Podľa Berryho a kol. (2005) koncentrácia MAA v neinfikovaných štvrtiach je veľmi nízka až nedetekovateľná a hodnoty vyššie ako 500 ng/ml už poukazujú na zápalový proces vo vemene. Nami získané výsledky preukázali významne vyššie koncentrácie MAA vo vzorkách mlieka zo štvrtí s klinickou mastitídou, ako aj zo štvrtí bez klinických zmien na mliečnej žľaze, ale s výrazne pozitívnym NK-testom. Na druhej strane, priemerná hodnota MAA zistená v mlieku z klinicky zdravých mliečnych štvrtí (473,7 ng/ml) bola tiež relatívne vysoká v porovnaní s koncentráciou 500 ng/ml, ktorú Berry a kol. (2005) uvádzajú ako hraničnú hodnotu pre zápalový proces. Uvedené výsledky naznačujú, že mliečne štvrte s vyššími hodnotami MAA už mohli byť subklinicky postihnuté zápalovým procesom, ktorý sa však ešte neprejavil vo forme pozitívnej reakcie na NK-test.

Štúdie vykonané Salonenom a kol (1996) a Eckersallom a kol. (2001) poukázali na zvýšené koncentrácie Hp a SAA v krvi dojníc s klinickou mastitídou. Na druhej strane, podľa Heegaarda a kol. (2000) je otázne využitie uvedených proteínov v diagnostike mastitíd, pretože ich zvýšené koncentrácie môžu byť zapríčinené aj inými faktormi, napr. stresom. Prikláňame sa k názoru, že sérové koncentrácie Hp a SAA sú menej vhodným ukazovateľom pri hodnotení stupňa postihnutia mliečnej žľazy, keďže nami získané výsledky síce preukázali trend vyšších hodnôt Hp a SAA v krvnom sére dojníc so zvyšujúcou sa pozitivitou vykonaného NK-testu a objavením sa klinických príznakov, rozdiely v priemerných hodnotách uvedených proteínov však boli menej významné ako rozdiely zaznamenané v hodnotách MAA.

Prezentované výsledky naznačujú potenciálnu úlohu mliečneho amyloidu A v laboratórnej diagnostike klinickej, ako aj subklinickej mastitídy, kde by mohol poskytovať doplňujúce diagnostické informácie pri určovaní stupňa postihnutia mliečnej žľazy.

POĎAKOVANIE

Práca bola riešená v rámci grantového projektu VEGA 1/0614/09.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Berry EA, Hillerton JE, Torgerson P. Use of acute phase proteins in bovine milk. 2005. Dostupný na www.iah.ac.uk
- Bradley AJ. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J.* 2002; 164: 116-128.
- Cho J-G. Acute phase proteins in dairy cows with mastitis. *Kor J Vet Serv.* 2002; 25: 377-384.
- Eckersall PD, Young FJ, McComb C, Hogarth CJ, Safi S, Weber A, McDonald T, Nolan AM, Fitzpatrick JL. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet Rec.* 2001; 148: 35-41.
- Heegaard PMH, Godson DL, Toussaint MJM, Tjørnehøj K, Larsen LE, Viuff B, Rønsholt L. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000; 77: 151-159.
- Kováč G, Popelková M, Tkáčiková Ľ, Burdová O, Ihnát O. Interrelationship between somatic cell count and acute phase proteins in serum and milk of dairy cows. *Acta Vet Brno* 2007; 76: 51-57.
- McDonald TL, Larson MA, Mack DR, Weber A. Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A3 (M-SAA3) into colostrums. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001; 83: 203-211.
- Petersen HH, Gardner IA, Rossitto P, Larsen HD, Heegaard PMH. Accuracy of milk amyloid A (MAA) concentration and somatic cell count for diagnosing bovine mastitis. 5th International Colloquium on Animal Acute Phase Proteins, Dublin, 2005: 43-44.
- Pyörälä S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res.* 2003; 34: 565-578.
- Salonen M, Hirvonen J, Pyörälä S, Sankari S, Sandholm M. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Res Vet Sci.* 1996; 60: 88-91.

POROVNANIE MIKRODILUČNEJ METÓDY A ETESTU PRI STANOVENÍ CITLIVOSTI *CANDIDA ALBICANS* NA ITRAKONAZOL, KETOKONAZOL A FLUKONAZOL

Vantrubová J., Čonková E., Váczi P.

Ústav farmácie a farmakológie, UVL Košice

ABSTRAKT

Testovaná bola účinnosť itraconazolu, ketokonazolu a flukonazolu voči kvasinkám rodu *Candida* spp. Vzorky *Candida albicans* boli izolované z výterov vonkajšieho zvukovodu a kože psov s potvrdenou kandidózou. Na stanovenie citlivosti testovaných kmeňov a minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) boli použité a porovnané dve metódy: Etest a mikrodilučná metóda (CLSI – M27A). Testovanie a vyhodnocovanie výsledkov bolo vykonané podľa požiadaviek pre jednotlivé metódy.

Citlivosť testovaných kmeňov metódou Etestu predstavovala pri itraconazole 42,8 %, pri ketokonazole a flukonazole 85,7%. CLSI metódou bola zistená 100 % citlivosť v závislosti od dávky pre itraconazol a 71,4 % pre ketokonazol.

Percentuálna zhoda medzi porovnávanými metódami bola pre kmene citlivé na ketokonazol 33 %, pri itraconazole 0 % a pri flukonazole 85,7 %.

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že Etest je vhodná rutinná metóda pre testovanie citlivosti, avšak tieto metódy nie sú porovnateľné vzhľadom k tomu, že je potrebné štandardizovať médium a inkubačné podmienky.

ÚVOD

Candida albicans je dimorfná kvasinka najčastejšie sa vyskytujúca pri teplokrvných živočíchoch. Kolonizuje sliznicu ústnej dutiny, tráviaceho traktu a močopohlavného systému zdravých jedincov (Basma a kol., 2008). Ak je znížená obranyschopnosť organizmu, pôsobí ako oportúnny patogén a spôsobuje lokálne alebo systémové invázie vnútorných orgánov. Predispozíciou vzniku ochorenia je narušenie integrity sliznice, prolongovaná liečba antibiotikami, kortikosteroidmi, cytostatikami a endokrinopatie (*diabetes mellitus*, poruchy funkcie štítnej žľazy) (Moretti a kol., 2004).

Na liečbu kandidových infekcií sa používajú predovšetkým azolové deriváty a polyénové antifungálne látky (Calderone, 2002).

Citlivosť voči antimykotiká sa testuje rôznymi metódami. K *in vitro* kvantitatívnym metódam patria Etest a mikrodilučná metóda, ktoré hodnotia nielen citlivosť patogéna, ale umožňujú zároveň aj stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) antifungálnych prípravkov. Phaller a kol. (2000) na základe výskumov a štandardizácii techník považujú Etest za najvhodnejší pre hodnotenie citlivosti *Candida albicans* a antifungálnej účinnosti azolových prípravkov.

Vzhľadom na stúpajúci výskyt kandidových infekcií cieľom tejto práce bolo stanoviť a porovnať *in vitro* antifungálnu aktivitu vybraných druhov antimykotík uvedenými metódami.

MATERIÁL A METODIKA

Kvasinky *Candida albicans* izolované z výterov vonkajšieho zvukovodu a kožných sterov, pochádzali od psov s potvrdenou dermatitídou, resp. otitídou. Čisté kultúry boli získané pasážovaním na Sabouraudovom dextrózovom agare s chloramfenikolom (Hi-Media). Z týchto kultúr bola pripravená suspenzia zodpovedajúca stupnici 0,5 McFarlanda ($1 \cdot 10^6$ h.j./ml).

Pomocou Etestu (AB Biodisk, Solna, Švédsko) a mikrodilučnej metódy (CLSI-M27-A2, 2002) bola stanovená citlivosť patogénnych kmeňov a minimálna inhibičná koncentrácia

(MIC) azolových antifungálnych látok na báze itrakonazolu (IT), ketokonazolu (KE) a flukonazolu (FL).

Pri testovaní metódou Etestu boli použité platne s agarom obsahujúcim RPMI 1640, 2 % glukózu, MOPS (3-(N- morfolino propán sulfónová kyselina) a 1,5 % bakteriologický agar. Na povrch agaru boli asepticky nanosené Etest prúžky s odstupňovanou koncentráciou antifungálnej látky. Rozsah MIC pri itrakonazole a ketokonazole bol v rozpätí 0,002 – 32 µg/ml, pri flukonazole 0,016 – 256 µg/ml. Výsledky boli vyhodnotené podľa interpretačných kritérií pre *Candida albicans*.

Pri mikrodilučnej metóde boli použité štandardné antifungálne látky flukonazol, ketokonazol a itrakonazol (Sigma, Aldrich). Zásobné roztoky boli pripravené rozpustením ketokonazolu a itrakonazolu v dimethylsulfoxide (DMSO) (Lach-ner, Česká republika) a flukonazolu v sterilnej destilovanej vode. Koncentrácia uvedených antifungálnych látok sa pohybovala od 32 µg/ml do 0,0625 µg/ml.

Postup testovania a vyhodnotenie výsledkov boli vykonané podľa metódy CLSI-M27-A (2002).

Ako kontrola bol použitý referenčný kmeň *Candida albicans* CCM 8320 (Česká zbierka mikroorganizmov, Brno). Po 48 hodinovej inkubácii pri teplote 37 °C bola odčítaná hodnota MIC.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tabuľka 1 uvádza MIC testovaných antimykotík – itrakonazolu, ketokonazolu a flukonazolu. Etestom bola zistená hodnota MIC pri itrakonazole v rozpätí >0,002 µg/ml do 2,0 µg/ml, podľa CLSI metódy dosahovala 0,25 – 0,5 µg/ml. Na itrakonazol boli podľa Etestu citlivé 3 kmene, 2 kmene boli citlivé v závislosti od dávky a 2 boli rezistentné. MIC ketokonazolu sa pohybovala od >0,002 µg/ml do 0,75 µg/ml pri Eteste. CLSI metódou bola zistená hodnota od 0,125 µg/ml do 0,25 µg/ml. Mikrodilučnou metódou boli vyhodnotené 2 izoláty ako citlivé a 5 testovaných kmeňov bolo citlivých v závislosti od dávky. MIC flukonazolu bola podľa Etestu v rozpätí od >0,002 do 48 µg/ml a CLSI metódou od 0,0625 µg/ml do 4 µg/ml. Citlivých na flukonazol bolo 6 kmeňov *Candida albicans* a 1 kmeň bol citlivý v závislosti od dávky.

Tabuľka 2 vyhodnocuje stupeň citlivosti patogénu *Candida albicans* na jednotlivé antimykotiká. Etestom bola zistená najvyššia účinnosť pri flukonazole a ketokonazole (85,7 %), itrakonazol bol účinný na 42,8 %. Mikrodilučnou metódou boli izoláty najviac citlivé na flukonazol (100%).

Etestom bolo zistených 28 % izolátov citlivých na itrakonazol v závislosti od dávky a rovnaký počet kmeňov bol rezistentný. Pri ketokonazole a flukonazole bola zistená citlivosť v závislosti od dávky 14,3 %. Podľa CLSI metódy boli v závislosti od dávky na itrakonazol citlivé všetky testované kmene (100 %) a na ketokonazol 71,4 % izolátov.

Porovnávaním Etestu a mikrodilučnej metódy sa zaoberali viacerí autori. Niektoré štúdie vykazujú zhodu medzi referenčnou CLSI metódou a Etestom pri použití azolových derivátov Colombo a kol. (1995) a Koc a kol. (2000) uvádzajú percentuálnu zhodu od 71 % do 85,2 % pre ketokonazol. Podľa Sewella a kol. (1994), Espinel- Ingoffa a kol. (1996) a van Eldera a kol., (1996) percentuálna zhoda pre flukonazol predstavuje 80 – 96 % a pre itrakonazol 80 – 84 %. Ďalšie štúdie poukazujú na menšiu percentuálnu zhodu pri použití týchto dvoch metód. Martin- Mazuelos a kol. (1999) udáva pri flukonazole zhodu medzi 71 – 74 % a pre itrakonazol 61,4 %. Koga- Ito a kol. (2008) uvádzajú pre obidve metódy percentuálnu zhodu pre flukonazol 53,33 % a pre itrakonazol 45 %.

Nami zistená percentuálna zhoda vykazovala pre kmene citlivé na ketokonazol 33 %, pri itrakonazole 0 % a pri flukonazole 85,7 %. Na základe dosiahnutých výsledkov vyplýva, že pri stanovení citlivosti *Candida albicans* na antimykotiká je vhodné metódu Etestu použiť ako

rutinnú vďaka jej jednoduchosti. Stotožňujeme sa ale s názorom Koga-Ito a kol. (2008), ktorí poznamenávajú, že tieto dve metódy nie sú porovnateľné, pretože nie je štandardizované médium, ani inkubačné podmienky.

Tab. 1. MIC testovaných antimykotík a stanovenie citlivosti podľa interpretačných kritérií.

ATM	Metóda	MIC (µg/ml) Min - Max	S	S-DD	R
IT	Etest	>0,002-2,0	3	2	2
	CLSI	0,25-0,5	0	7	0
KE	Etest	>0,002-0,75	6	1	-
	CLSI	0,125-0,25	2	5	0
FL	Etest	>0,002-48	6	1	0
	CLSI	0,0625-4	7	0	0

ATM- antimykotikum, IT- Itrakonazol, KE- ketokonazol, FL- flukonazol, MIC- minimálna inhibičná koncentrácia, S- citlivý kmeň, S-DD- kmeň citlivý v závislosti od dávky, R- rezistentný kmeň.

Tab. 2. Citlivosť (%) *Candida albicans* na ATM

ATM	Metóda	S	S-DD	R
IT	Etest	42,8	28	28
	CLSI	0	100	0
KE	Etest	85,7	14,3	-
	CLSI	28,6	71,4	0
FL	Etest	85,7	14,3	0
	CLSI	100	0	0

ATM- antimykotikum, IT- Itrakonazol, KE- ketokonazol, FL- flukonazol, MIC- minimálna inhibičná koncentrácia, S- citlivý kmeň, S-DD- kmeň citlivý v závislosti od dávky, R- rezistentný kmeň.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená grantom VEGA č. 1/0736/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Basma R., Barada G., Ojaimi N., Khalaf R.A. Susceptibility of *Candida albicans* to common and novel antifungal drugs and relationship between the mating type locus and resistance in Lebanese hospital isolates. *Mycoses* 2008; 52:141-148.
- Calderone R.A. *Candida* and candidiasis, ASM Press, 2002; 40.
- Colombo A.L., Barchiesi F., McGough D.A., Rinaldi M.G. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth microdilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J clin Microbiol.* 1995; 33:535-540.
- Espinel-Ingroff A., Pfaller M., Erwin M.E., Jones R.N. Interlaboratory evaluation of Etest method for testing antifungal susceptibilities of pathogenic yeasts to five antifungal agents by using Casitone agar and solidified RPMI 1640 medium with 2% glucose. *J clin Microbiol.* 1996; 34: 848-852.
- Koc A.N., Gokahmetogllu S., Oguzkaya M. Comparison of Etest with the broth microdilution method in susceptibility testing of yeasts isolates against four antifungal. *Mycoses* 2000; 43:293-297.
- Koga- Ito, C.Y, Lyon J.P., de Resende M.A. Comparison between E-test and CLSI broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* oral isolates. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008; 50:7-10.
- Martin-Mazuelos E., Gutierrez M.J., Aller A.L. A comparative evaluation of Etest and broth microdilution methods for fluconazole and itraconazole susceptibility testing of *Candida* spp. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 43: 477-481.

- Moretti A., Posteraro B., Boncio L., Mechelli L., de Gasperis E., Agnetti F., Raspa M. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR- REA. *Rev Iberoam Micol.* 2004; 21:139-142.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal susceptibility Testing of Yeast – Second Edition: Approved Standard M27 – A2. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2002.
- Phaller M. A, Messer S. A., Houston A., Mills K., Bolmstorm A., Jones R. N. Evaluation of the Etest method for determinining voriconazole susceptibilities of 312 clinical izolates of *Candida species* by using three different agar media. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3715-3717.
- Sewell D.L., Pfaller M.A., Barry A.L. Comparison of broth macrodilution, both microdilution and Etest antifungal susceptibilty tests for fluconazole. *J clin Microbiol.* 1994; 32: 2099-2102.
- Van Eldere, J., Joosten, L., Verhaeghe, V., Surmont, I. Fluconazole and amphotericin B antifungal susceptibility testing by National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method compared with E-test and semiautomated broth microdilution test. *J clin Microbiol.* 1996; 34: 842-847.

**VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV
2009**

**Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Bod'u
IV. ročník**

Zostavil: MVDr. Dušan Fabian, PhD.

Vydal: Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4, 04001 Košice

Prvé vydanie. 144 strán.

ISBN 978-80-968618-4-2

EAN 9788096861842

ISBN 978-80-968618-4-2