



VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2011

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

VI. ročník

Košice, 13.-14. september 2011

Zborník príspevkov prezentovaných na
Seminári doktorandov venovanom pamiatke akademika Boďu
13.-14. september 2011
v Košiciach

Usporiadali:

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

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

ISBN 978-80-968618-7-3

OBSAH

VPLYV SKRMOVANIA EXTRAKTOV RASTLÍN NA OBSAH MASTNÝCH KYSELÍN, OBSAH CHOLESTEROLU A ZLEPŠENIE OXIDAČNEJ STABILITY MÄSA HYDINY Bača M. ¹ , Marcincák S. ¹ , Máté D. ¹ , Čertík M. ² , Brlejšová M. ² ¹ Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF, Košice ² Oddelenie biochemickej technológie, FCHPT STU, Bratislava	9
VPLYV STRESU NA REPRODUKČNÝ SYSTÉM MATKY Burkuš J. Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice	13
VPLYV PODMIENOK GASTROINTESTINÁLNEHO TRAKTU NA PREŽÍVANIE PROSPEŠNÝCH BAKTÉRIÍ PRODUKUJÚCICH EXOPOLYSACHARIDY V IN VITRO PODMIENKACH Borovská D., Nemcová R., Mudroňová D. Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice	18
VPLYV TYMIÁNOVEJ SILICE (THYMUS VULGARIS) NA VYBRANÉ BIOCHEMICKÉ PARAMETRE V PLAZME KURČIAT Čapkovičová A. ¹ , Faixová Z. ¹ , Ryzner M. ² , Faix Š. ² ¹ Ústav patologickej fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach ² Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4-6, 041 01 Košice	22
DETEKCIA IN VITRO ÚČINKU ANTIHELMINTÍK NA CITLIVÚ A REZISTENTNÚ POPULÁCIU PARAZITA <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> . Dolinská M., Várady M. Parazitologický ústav, SAV, Košice	26
VIRULENCIA A MOBILNÉ GÉNOVÉ ELEMENTY U KURACÍCH <i>E.COLI</i> Drugdová Z. Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice	29
VYUŽITIE MOLEKULÁRNYCH METÓD NA RÝCHLU ANALÝZU GENETICKEJ VARIABILITY DREVOKAZNÝCH HÚB Dubíková K. ¹ , Júdová J. ² , Gáper J. ³ , Pristaš P. ^{2,4} ¹ Univerzita P.J Šafárika v Košiciach, Katedra biochémie, Košice, ² Univerzita Mateja Bela, Katedra biológie a ekológie, Banská Bystrica, ³ Technická univerzita vo Zvolene, Katedra Biológie a všeobecnej ekológie, Zvolen, ⁴ Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4-6, Košice	33
VPLYV ZDRAVOTNÉHO STAVU NA ACIDOBÁZICKÚ ROVNOVÁHU A VYBRANÉ BIOCHEMICKÉ A HEMATOLOGICKÉ PARAMETRE V PERIOPERAČNOM OBDOBÍ U PSOV Ďurej M., Ledecký V. Klinika malých zvierat, Oddelenie chirurgie, ortopédie, röntgenológie a reprodukcie, UVLF Košice	36
POROVNANIE CITLIVOSTI MIKROBIÁLNYCH INHIBIČNÝCH TESTOV NA STANOVENIE BETA-LAKTÁMOVÝCH ANTIBIOTÍK Gondová, Z., Kožárová, I. Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach	41
ŠTANDARDIZÁCIA METÓDY qRT-PCR PRI ANALÝZE GÉNOVEJ EXPRESIE VYBRANÝCH CYTOKÍNOV U GNOTOBIOTICKÝCH PRASÍAT Chytilová M. ¹ , Tkáčiková L. ¹ , Nemcová R. ² ¹ Ústav imunológie, ² Ústav mikrobiológie a gnotobiológie, Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice	45
VYUŽITIE KARDIOMARKEROV V DIAGNOSTIKE A MANAŽMENTE KARDIOVASKULÁRNYCH OCHORENÍ U PSOV Jurkuláková L., Páleník Ľ., Kozák M. Klinika malých zvierat, Internné oddelenie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach	49

VPLYV VYBRANÝCH PARAMETROV WELFARE NA HYGIENICKÚ ÚROVEŇ A ZDRAVOTNÝ STAV DOJNÍC NA SLEDOVANÝCH FARMÁCH Kišová, J., Ondrašovičová, O., Sasásková, N., Fejsáková, M., Gregová, G. <i>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach</i>	54
STANOVENIE HLADINY PROZÁPALOVÝCH CYTOKÍNOV Z KRVÍ U HYDINY INFIKOVANEJ <i>SALMONELLA ENTERICA</i> . Kolesárová M. ¹ , Crhánová M. ² , Rýchlik I. ² , Spišáková V. ¹ ¹ <i>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach</i> ² <i>Výzkumný ústav veterinárneho lekárstva v Brne, Česká republika</i>	58
INDUKCIA MIKROJADIER PO 24 A 48H EXPOZÍCII PERIFÉRNÝCH LYMFOCYTOV HOVÄDZIEHO DOBYTKA TEBUKONAZOLOM Kolesárová V., Šiviková K. <i>Ústav genetiky, Katedra biológie a genetiky, UVLF, Košice</i>	61
NEUROPROTEKTÍVNE PÔSOBENIE NOVÉHO ANALÓGU KYSELINY KYNURENOVEJ PO TRAUMATICKOM POŠKODENÍ MIECHY U POTKANA Korimová A., Vanický I. <i>Neurobiologický ústav, SAV, Košice</i>	65
DRUHOVÁ DIVERZITA A KVANTITA HNIEZDNEJ ORNITOFAUNY UNIVERZITNÉHO AREÁLU UVLF V KOŠICIACH V ROKU 2010 Korytár L., Ondrejka R., Ondřejková A., Prokeš M., Slepecká E., Beníšek Z. <i>Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, UVLF v Košiciach</i>	68
NEINVAZÍVNY PRÍSTUP V TERAPII KOŽNÝCH AFEKCIÍ U VTÁČÍCH PACIENTOV Kožár M. ¹ , Molnár L. ² , Trbolová A. ¹ ¹ <i>Klinika malých zvierat,</i> ² <i>Klinika exotických a voľne žijúcich zvierat , Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach</i>	71
ELEKTROFORETICKÉ STANOVENIE HLADÍN SÉROVÉHO CHOLESTEROLU PO SKRMOVANÍ LUPINY ÚZKOLISTEJ U OVIEC Kravcová Z., Sopková D., Vlčková R., Ondrašovičová S., Danko J. <i>Katedra anatómie, histológie a fyziológie, UVLF, Košice</i>	75
VARIÁCIE POSTHEPATÁLNEHO SEGMENTU <i>V. CAVA CAUDALIS</i> U POTKANA Krešáková L., Vdoviaková K., Maženský D., Petrovová E., Kravcová Z. <i>Katedra anatómie, histológie a fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice</i>	79
MODEL INDUKOVANEJ OBEZITY MYŠÍ ZALOŽENÝ NA SKRMOVANÍ VYSOKO-ENERGETICKEJ DIÉTY Kubandová J. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice</i>	81
VPLYV OPAKOVANÉHO PODANIA BAKLOFENU NA REFLEXNÚ AKTIVITU, DISTRIBÚCIU ASTROCYTOV A ZMENY V IMUNOREAKTIVITE nNOS U POTKANA PO TRANSEKCII MIECHY Kucharíková A., Hricová L., Kisucká A., Lukáčová N. <i>Neurobiologický ústav SAV, Košice</i>	85
PAKOMÁRIKY RODU <i>CULICOIDES</i> - VEKTOR NÁKAZY BLUETONGUE Lacková Z. ¹ , Bireš J. ¹ , Kočišová A. ² , Lešková L. ¹ ¹ <i>Klinika prežívavcov, UVLF Košice,</i> ² <i>Ústav parazitológie, UVLF Košice</i>	89
VPLYV PREFERMENTOVANÝCH CEREÁLNYCH SUBSTRÁTOV (MLETÝ JAČMEŇ A RAŽNÉ OTRUBY) OBOHATENÝCH γ -LINOLÉNOVOU KYSELINOU NA BACHOROVÉ FERMENTAČNÉ PARAMETRE A PROTOZOÁLNU POPULÁCIU <i>IN VITRO</i> Laho T. <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice</i>	93

VPLYV PH NA FLUORESCENCIU VYBRANÝCH METABOLITOV TRYPTOFÁNU PRÍTOMNÝCH V MOČI Lichardusová L., Birková A., Kušnír J., Mareková M. <i>Ústav lekárskej chémie, biochémie, klinickej biochémie a LABMED a.s., Lekárska fakulta UPJŠ, Košice</i>	97
FAKTORY VPLYVAJÚCE NA HODNOTY KONCENTRÁCIE KYSELINY MLIEČNEJ, FOSFÁTOV A HODNOTU PH MÄSA U VYBRANÝCH DRUHOV ZVERI Mačanga J. ¹ , Koréneková B. ¹ , Nagy J. ¹ , Molnár L. ² ¹ <i>Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF, Košice</i> ² <i>Klinika vtákov a exotických zvierat, UVLF, Košice</i>	101
ANTIFUNGÁLNA ÚČINNOSŤ TEA TREE OLEJA A TERPINÉNU NA KVASINKY RODU <i>MALASSEZIA</i> Marciová, A., Čonková, E., Mudroňová, D., Sabová, L. <i>Ústav farmácie a farmakológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach</i>	105
SLEDOVANIE BIOCHEMICKÝCH UKAZOVATEĽOV V PROCESE STARNUTIA U NORIKA MURÁNSKEHO TYPU Noskovičová J., Novotný F., Pošivák J., Valocký I., Hura V., Tučková M. <i>Klinika koní, UVLF Košice</i>	108
DEŠTRUKČNÝ ÚČINOK ATYPICKEJ MYKÓZY VZDUCHOVÝCH VAKOV (<i>DIVERTICULUM TUBEAE AUDITIVE</i>) U KONÍ Noskovičová J., Novotný F., Boldižár M., Vidricková P., Valocký I., Redl M. <i>Klinika koní, UVLF Košice</i>	109
FLUORESCENČNÉ PROFILOVANIE VYBRANÝCH HADÍCH JEDOV Vladimír Petrilla ¹ , Lucia Lichardusová ² , Vladimíra Tomečková ² ¹ <i>Ústav fyziológie, Univerzita Veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach</i> ² <i>Ústav lekárskej chémie, biochémie, klinickej biochémie a LABMED a.s., Lekárska fakulta UPJŠ, Košice</i>	117
PROBIOTIKÁ – ALTERNATÍVNA MOŽNOSŤ PREVENČIE MORU VČELIEHO PLODU Rumanovská K. ¹ , Mudroňová D. ² , Toporčák J. ¹ ¹ <i>Klinika vtákov a exotických zvierat, UVLF, Košice</i> ² <i>Katedra imunológie a mikrobiológie, UVLF, Košice</i>	120
ANTIOXIDAČNÝ STATUS KURČIAT PO PRÍJME ŠALVIOVEJ SILICE DIÉTOU Ryzner M. ¹ , Venglovská K. ² ¹ <i>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice</i> ² <i>Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice</i>	124
VÝSLEDKY STANOVENIA PROTILÁTOK PROTI <i>LAWSONII INTRACELLULARIS</i> ELISA METÓDOU VO VYBRANÝCH CHOVOCH OŠÍPANÝCH NA SLOVENSKU Soročinová J. ¹ , Kovačociová K. ¹ , Smaržik M. ² , Reichel P. ¹ ¹ <i>Klinika ošípaných, UVLF, Košice</i> ² <i>Klinika prežúvavcov, UVLF, Košice</i>	128
AMYLOIDNÁ AGREGÁCIA INZULÍNU V PRÍTOMNOSTI MAGNETICKÝCH KVAPALÍN Šipošová K. ^{1,2} , Koneracká M. ¹ , Závišová V. ¹ , Antošová A. ¹ , Kopčanský P. ¹ , Gažová Z. ¹ ¹ <i>Ústav experimentálnej fyziky, SAV, Košice</i> ² <i>Katedra biochémie, UPJŠ, Košice</i>	132
ENDOGENNE FLUOROFÓRY MITOCHONDRIÍ AKO DIAGNOSTICKÉ MARKERY ISCHÉMIE Štefanišinová M., Tomečková V., Bilecová - Rabajdová M., Kriššáková E., Mareková M. <i>Ústav lekárskej chémie, biochémie, klinickej biochémie a LABMED a.s., LF UPJŠ Košice</i>	136

NOVÝ PRÍSTUP K FLUORESCENČNEJ ANALÝZE A DEFINÍCII BIOLOGICKÝCH TEKUTÍN VYBRANÝCH ŽIVOČÍŠNYCH DRUHOV Šteffeková Z. ¹ , Birková A. ¹ , Baranová D. ² , Supuka P. ³ , Valocký I. ⁴ , Húska M. ⁵ , Mareková M. ¹ ¹ Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UPJŠ a Labmed a.s., Košice; ² Klinika malých zvierat UVLF, Košice; ³ Ústav chovu zvierat UVLF, Košice; ⁴ Klinika koní, UVLF, Košice; ⁵ Klinika ošipaných, UVLF, Košice	140
ANALÝZA, VARIABILITA A POROVNANIE GENÓMOV BAKTERIOFÁGOV MSF1 A MSF2 S VYBRANÝMI ENTEROKOKOVÝMI PROFÁGMÍ Šul'ák M., Fecuová V. Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice	143
ANTIOXIDAČNÝ STATUS BROJLEROV A NOSNÍC PO PRÍJME <i>THYMUS VULGARIS</i> DIÉTOU Jana Takáčová Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice	147
VPLYV HYPODYNAMIE NA KOSTI PANVOVEJ KONČATINY JAPONSKEJ PREPELICE Tarabová L., Cigánková V. Katedra anatómie, histológie a fyziológie, Ústav histológie a embryológie, UVLF, Košice	151
KULTIVOVATEĽNÉ MIKROORGANIZMY Z GUANA NETOPIEROV Vandžurová A. ¹ , Bačkor P. ² , Júdová J. ² , Pristaš, P. ^{1,2} ¹ Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice ² Univerzita Mateja Bela, Katedra biológie a ekológie, Banská Bystrica	154

VPLYV SKRMOVANIA EXTRAKTOV RASTLÍN NA OBSAH MASTNÝCH KYSELÍN, OBSAH CHOLESTEROLU A ZLEPŠENIE OXIDAČNEJ STABILITY MÄSA HYDINY

Bača M.¹, Marcinčák S.¹, Máté D.¹, Čertík M.², Brlejšová M.²

¹ *Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF, Košice*

² *Oddelenie biochemickej technológie, FCHPT STU, Bratislava*

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo sledovať vplyv extraktov klinčeka, medovky a repíka ako doplnok stravy na profil mastných kyselín, obsah cholesterolu a oxidačnú stabilitu surového mäsa a tuku chladenej hydiny po 11 dňoch skladovania. Oxidácia lipidov bola stanovená metódou tiobarbiturového čísla a vyjadrená ako množstvo malóndialdehydu vo vzorkách stehna a brušného tuku po 1., 7. a 11. dni skladovania. Antioxidačná aktivita extraktov vo vzorkách bola vyjadrená nižším tiobarbiturovým číslom. Obsah cholesterolu v porovnaní s kontrolou bez pridania extraktov bol taktiež nižší. Na stanovenie obsahu mastných kyselín bola použitá metóda plynovej chromatografie. Skrmovanie rastlinných extraktov malo mierny vplyv na obsah mastných kyselín v tuku mäsa. Využitie skrmovania extraktov klinčeka, medovky a repíka by mohlo byť účinné pri zvýšení kvality hydínového mäsa.

ÚVOD

Spotreba hydínového mäsa v posledných desaťročiach výrazne vzrástla (Pipová a kol., 1995), čo sa však nedá povedať o kvalite mäsa. Jedným z faktorov, ktorý ovplyvňuje kvalitu mäsa, je oxidácia lipidov (Yanishlieva a kol., 1999). Hydínové mäso je citlivé k oxidačnému poškodeniu kvôli jeho vyššej koncentrácii polynenasýtených mastných kyselín (Igene and Pearson, 1979). Jednou z možností ako ochrániť hydínové mäso pred oxidáciou je pridávanie antioxidantov do krmiva, ktoré chránia látky pred devastačnými účinkami kyslíka. Mnoho rastlín je prirodzeným zdrojom antioxidantov, ako napríklad medovka lekárska, repík lekárske a klinčekovec voňavý (Zheng and Wang, 2001; Gülcin, 2010). Obsahujú antioxidačné zložky, ktoré sa výraznou mierou podieľajú na oxidačnej stabilite mäsa. Skrmovanie rastlinných extraktov hydine má okrem vplyvu na oxidačnú stabilitu mäsa aj vplyv na zníženie hladiny cholesterolu a antibakteriálne účinky (Raes a kol., 2004, Lee a kol., 2004). Cieľom experimentu bolo sledovať účinok skrmovania kombinácie extraktov na obsah mastných kyselín, na zníženie hladiny celkového cholesterolu a zlepšenie kvality a oxidačnej stability opracovaného chladeného hydínového mäsa.

MATERIÁL A METODIKA

V pokuse bolo použitých 120 ks brojlerových kurčiat plemena ROSS 308. Kurčatá boli rozdelené do 3 skupín. Kontrolná skupina bola, kŕmená výhradne KZ HYD 01, HYD 02 a 03 bez prídavku extraktov (K). Pokusná skupina (R+K) bola kŕmená KZ HYD 01, HYD 02 a 03 s prídavkom 1 % klinčekovca voňavého od 1. dňa výkrmu v krmive a 0,2 % extraktu repíka lekárskeho vo vode. Druhá pokusná skupina (M+K) bola kŕmená KZ HYD 01, 02 a 03 s prídavkom 1 % klinčekovca voňavého od 1. dňa v krmive a 0,2 % extraktu medovky lekárskej vo vode. Počas výkrmu (42 dní) mali kurčatá prístup ku krmivu a k vode *ad libitum*. Priebežne sa sledoval klinicky zdravotný stav zvierat. Po usmrtení zvierat sa odobrali vzorky stehnovej svaloviny a vnútorného tuku, ktoré boli zabalené do polyetylénových vreciek a uskladnené pri teplote 4 °C po dobu 11 dní. Na stanovenie rozkladných zmien tukov sme použili metódu stanovenia tiobarbiturového čísla (TBA) podľa Marcinčák a kol. (2008) v intervale 1, 7 a 11 dní po zabití. Stanovenie mastných kyselín bolo vykonané podľa Čertík a kol. (2008). Na stanovenie celkového cholesterolu bola použitá Liebermann-Buchardová metóda (Kenny, 1952).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tabuľke 1 sú uvedené výsledky stanovenia profilu mastných kyselín stehna a brušného tuku. V brušnom tuku sme zaznamenali mierne zvýšenie obsahu nenasýtených MK. Vzhľadom na to došlo k zvýšeniu n-3 a n-6 MK, pričom ale obsah n-3 MK mierne stúpol. Pri vzorkách stehna došlo k poklesu n-6 MK a následne k zlepšeniu indexu n-3/n-6. Môžeme konštatovať, že obsah esenciálnych polynenasýtených MK ako sú EPA, DHA a DPA sa vo vzorkách stehna výrazne zvýšil.

Table 1 Výsledky stanovenia profilu mastných kyselín tuku stehna a brušného tuku

Mastne kyseliny [(w/w), %]	Kontrola		Medovka		Repík	
	Stehno	Brušný tuk	Stehno	Brušný tuk	Stehno	Brušný tuk
C 16:0	19,660	21,740	20,830	21,300	20,870	20,030
C 16:1-9c	4,902	5,993	5,240	5,467	5,401	4,885
C 17:0 cyclo	0,104	0,098	0,093	0,100	0,091	0,111
C 18:0	5,964	4,817	6,506	5,130	5,960	4,791
C 18:1-9t	0,000	0,118	0,044	0,153	0,090	0,060
C 18:1-9c	33,420	35,990	32,460	36,860	33,380	34,880
C 18:1-11c	2,678	2,619	2,923	2,793	2,978	2,325
C 18:2-9c,12c	26,280	23,790	24,040	23,500	24,070	27,590
C 18:3-6,9,12c	0,165	0,152	0,182	0,170	0,171	0,177
C 18:3-9,12,15c	2,718	2,844	2,590	2,809	2,563	3,257
C 18:2-c9,t11/t9,c11 (CLA)	0,043	0,066	0,050	0,050	0,090	0,032
C 20:0	0,063	0,050	0,058	0,058	0,059	0,069
C 20:1-11c	0,326	0,353	0,336	0,269	0,348	0,360
C 20:2-11c,14c	0,302	0,196	0,360	0,205	0,336	0,241
C 20:3-8,11,14c	0,240	0,098	0,317	0,101	0,261	0,110
C 20:4-5,8,11,14c	1,280	0,220	1,641	0,197	1,287	0,258
C 20:3-11,14,17c	0,037	0,016	0,046	0,025	0,046	0,029
C 20:5-5,8,11,14,17c	0,074	0,041	0,101	0,033	0,080	0,038
C 22:5-7,10,13,16,19c	0,281	0,057	0,368	0,055	0,307	0,072
C 22:6-4,7,10,13,16,19c	0,130	0,015	0,191	0,031	0,142	0,032
Suma nasýtených MK	26,140	27,120	27,890	26,990	27,340	25,350
Suma nenasýtených MK	73,390	72,730	71,610	72,850	72,170	74,460
Suma n-3 MK	3,240	2,973	3,296	2,953	3,138	3,428
Suma n-6 MK	28,267	24,456	26,54	24,173	26,125	28,376
Index n-3/n-6	0,115	0,121	0,124	0,111	0,120	0,120

Skrmovanie antioxidantov malo minimálny vplyv na hodnoty celkového tuku v mäse ($P>0,05$), zistili sme však výrazný vplyv na zníženie hladiny celkového cholesterolu vo vzorkách stehennej svaloviny a v brušnom tuku (tabuľka 2). Najväčšie rozdiely hodnôt cholesterolu boli stanovené pri vzorkách kontroly stehna a brušného tuku oproti kombinácií R+K ($P<0,05$), kde pridané extrakty signifikantne znížili obsah cholesterolu vo vzorkách. Pri porovnaní kombinácií R+K a M+K, vykazuje kombinácia R+K vyšší pokles hodnôt cholesterolu ($P<0,05$). Pri porovnávaní našich výsledkov s podobnými štúdiami (Galvin a kol., 1998; Ciftci a kol., 2010), môžeme konštatovať, že skrmovanie kombinácie antioxidantov má vplyv na zníženie hladiny cholesterolu v hydinovom mäse.

Tab. 2 Obsah celkového tuku a cholesterolu v stehne a brušnom tuku (mg/100g)

	Tuk v stehne (%)	Cholesterol v stehne (mg/100g)	Cholesterol v brušnom tuku (mg/100g)
Kontrola	9,34 ± 0,28 ^a	144,5 ± 15,12 ^a	408,5 ± 17,11 ^a
Repík + Klinček	8,19 ± 1,28 ^a	94,0 ± 7,48 ^c	186,5 ± 13,50 ^c
Medovka + Klinček	8,80 ± 0,13 ^a	124,0 ± 6,95 ^b	329,0 ± 22,31 ^b

^{a,b,c} – hodnoty s rozdielnym označením v stĺpci sú štatistický rozdielne (P < 0,05)

V tabuľke 3 sú uvedené výsledky stanovenia TBA čísla, ktoré vyjadruje množstvo malónďaldehydu (MDA) ako hlavného sekundárneho rozkladného PNMK. Počas skladovania došlo k zvýšeniu hodnôt MDA, čo poukazuje na oxidačné procesy prebiehajúce v mäse. Avšak vzorky s obsahom extraktov vykazovali nižšie hodnoty MDA ako kontrola (P < 0,05). Z výsledkov vyplýva, že skrmovanie kombinácie extraktov malo výrazný vplyv na rozkladné zmeny tukov v porovnaní so vzorkami kontroly, ktorá dosahovala najvyššie hodnoty MDA (P < 0,05). Pri porovnaní účinnosti kombinácií extraktov R+K a M+K sú rozdiely štatisticky nevýznamné (P > 0,05). Pridané antioxidanty zvýšili oxidačnú stabilitu hydínového mäsa a tým aj kvalitu mäsa. Porovnateľné výsledky v oblasti oxidačnej stability po pridaní rastlinných antioxidantov dosiahli Šperňáková a kol.(2007).

Tab. 3 Rozkladné zmeny tukov vyjadrené ako množstvo malónďaldehydu (mg.kg-1) počas chladiarenského skladovania

	1. deň	7. deň	11. deň
Kontrola	0,132 ± 0,035 ^{a1}	0,391 ± 0,040 ^{a2}	0,539 ± 0,064 ^{a3}
Repík + Klinček	0,062 ± 0,024 ^{b1}	0,249 ± 0,021 ^{b2}	0,320 ± 0,026 ^{b3}
Medovka + Klinček	0,043 ± 0,017 ^{b1}	0,237 ± 0,020 ^{b2}	0,369 ± 0,022 ^{b3}

^{a,b} – hodnoty s rozdielnym označením v stĺpci sú štatistický rozdielne (P < 0,05)

^{1,2,3} – hodnoty s rozdielnym označením v riadku sú štatistický rozdielne (P < 0,05)

POĎAKOVANIE

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore z grantovej agentúry VEGA č.1/0648/11.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ciftci M., Simsek U.S., Yuce A., Yilmaz O., Dalkilic B.: Effects of dietary antibiotic and cinnamon oil supplementation on antioxidant enzyme activities, cholesterol levels and fatty acid compositions of serum and meat in broiler chickens. *Acta Vet. Brno* 2010; 79: 33–40.
- Čertík M., Adamechová Z., Hanusová V., Breierová E.: Biotechnology as a useful tool for nutritional improvement of cereal-based materials enriched with polyunsaturated fatty acids and pigments. *Acta Agro. Hungarica* 2008; 56: 377–384.
- Galvin, K., Morrissey, P.A., Buckley, D.J.: Cholesterol oxides in processed chicken muscle as influenced by dietary alpha-tocopherol supplementation. *Meat Science* 1998; 48: 1–9.
- Gülcin, I.: Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. *Arab. J. Chem.* 2010.
- Igene, J.O., Pearson A.M.: Role of phospholipids and triglycerides in warmed-over flavour development in meat model systems. *J. Food Sci.* 1979; 44: 1285–1290.
- Kenny A.P.: The determination of cholesterol by the Liebermann-Burchard reaction, *Biochem. J.* 1952; 52: 611–619.
- Lee K.W., Everts, H., Beynen, A.C.: Essential oils in broiler nutrition. *Int. J. Poultry Sci.* 2004; 12: 738–752.
- Marcinčák, S., Popelka, P., Šoltysová, L.: Polyphenols and antioxidative activity of extracts from selected slovakian plants. *Acta Sci. Pol.* 2008; 7: 9 – 14.

- Pipová M., Cabadaj R., Nagy J.: Hygiene of poultry, eggs, fish and game, Košice Data Help Press, 1995.
- Raes K., De Smet S., Demeyer D.: Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Animal Feed Sci. and Technology* 2004; 113: 199-221.
- Šperňáková D., Máté D., Rožanská H., Kováč G.: Effects of dietary rosemary extract and “alfa“-tocopherol on the performance of chicken, meat quality, and lipid oxidation in meat stored under chilling conditions. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2007; 51: 585–589.
- Yanishlieva N.V., Marinova E.M., Gordon M.H., Raneva V.G.: Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.* 1999; 64: 59–66.
- Zheng W., Wang S.Y.: Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agri. Food Chem.* 2001; 49: 5165–5170.

VPLYV STRESU NA REPRODUKČNÝ SYSTÉM MATKY

Burkuš J.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Na reprodukčný trakt matky môžu vplývať rôzne negatívne faktory, medzi, ktoré patrí aj stres. Stres má škodlivý vplyv na reprodukciu najmä počas gestácie a je spájaný s potratom predčasným pôrodom, nízkou pôrodnou hmotnosťou a poškodením zdravia potomka. Tento negatívny efekt bol preukázaný u viacerých živočíšnych druhov a je sprostredkovaný najmä kortikoliberínom, ACTH a adrenergými dráhami (adrenálny, noradrenálny), ktoré aktivujú os hypothalamus-hypofýza-nadoblička a inhibujú os hypothalamus-hypofýza-gonády. Toto minireview prináša zhrnutie doposiaľ známych faktov o vplyve stresu na reprodukčný trakt rôznych živočíšnych druhov.

ÚVOD

Za normálnych podmienok je v organizme nastolený rovnovážny stav zvaný homeostáza. Faktory, ktoré tento rovnovážny stav narušujú, označujeme ako stresory. Stresory ovplyvňujú homeostázu aj v reprodukčnom trakte matky a negatívne pôsobia na novovznikajúci život. Vplyv vonkajších faktorov na reprodukčný trakt matky a preimplantačný vývin bol potvrdený aj v predošlých štúdiách (Fabian a kol., 2010; Fabian a kol., 2011). Odpoveďou organizmu na stresové faktory prostredia je aktivácia neurohormonálnych reakcií v organizme, ktorých úlohou je nastolenie homeostázy. Počas stresu sa mobilizuje adaptívne správanie a periférne funkcie a naopak obmedzia sa energeticky náročné a vegetatívne funkcie ako napríklad reprodukcia, príjem potravy, trávenie a rast.

CHARAKTERISTIKA HORMONÁLNEHO SYSTÉMU PODIEĽAJÚCEHO SA NA STRESOVEJ REAKCII

Počas stresovej reakcie sa v organizme aktivuje os hypothalamus-hypofýza-nadoblička (HPA – hypothalamus-pituitary-adrenal) spolu s autonómnym nervovým systémom. Hlavnými regulátormi HPA osi sú kortikoliberín (CRH – corticotropin-releasing hormone) a antidiuretický hormón (AVP – arginine-vasopressin), produkované paraventriculárnymi neurónmi v hypotalame v nucleus paraventricularis a sú uvoľňované do hypothalamo-hypofýzového portálneho obehu (Chrousos a Gold, 1992). CRH a AVP stimulujú sekréciu (CRH aj tvorbu) adrenokortikotropného hormónu (ACTH – adrenocorticotropic hormone), ktorý následne stimuluje sekréciu kortizolu a kortikosterónu z kôry nadobličiek (Kalantaridou a kol., 2004).

Reprodukčný systém samíc je regulovaný prostredníctvom osi hypothalamus-hypofýza-gonády. Hlavným regulačným hormónom tejto osi je gonadoliberín (GnRH – gonadotropin-releasing hormone) produkovaný v nucleus arcuatus, preoptickéj a paraventriculárnej oblasti hypotalamu a je uvoľňovaný do hypothalamo-hypofýzového portálneho obehu. GnRH stimuluje sekréciu luteinizačného (LH – luteinizing hormone) a folikulostimulačného hormónu (FSH – follicle stimulating hormone), ktoré následne ovplyvňujú uvoľňovanie estradiolu a progesterónu vo vaječníkoch (Kalantaridou a kol., 2004). LH a FSH podporujú sekréciu progesterónu z *corpus luteum*, čo je na začiatku gravidity nevyhnutné. Nízka hladina progesterónu v prvých týždňoch tehotenstva naznačuje možnosť neskoršieho potratu (Arck a kol., 2008). Znížená hladina progesterónu je spôsobená zníženým vylučovaním LH a hCG (human chorionic gonadotropín) z *corpus luteum*. Prolaktín je takisto dôležitý pri riadení včasnej gravidity, podieľa sa na diferenciácii epitelových buniek, regulácií rastu buniek trofoblastu, angiogenéze, podieľa sa na imunitných reakciách a zohráva úlohu aj pri implantácii.

U hlodavcov stres inhibuje sekréciu prolaktínu a progesterónu (Parker a Douglas, 2010). Psychologický stres navodzuje zmenu cytokínovej aktivity, čo počas tehotenstva narušuje krehkú cytokínovú rovnováhu (Blois a kol., 2004). Stresom indukované cytokíny inhibujú v mozgu aktivitu GnRH a tým aj sekréciu LH (Matsuwaki a kol., 2003).

Stres takisto stimuluje autonómny nervový systém, čo má za následok zvýšenú produkciu adrenalínu, noradrenalínu a dopamínu v chromatofinných bunkách drene nadobličky a ich vyplavenie do krvného obehu (Javorka a kol., 2009).

STRES A REPRODUKČIA

Stres má škodlivý vplyv na reprodukciu najmä počas gestácie a je spájaný s potratmi, predčasným pôrodom, nízkou pôrodnou hmotnosťou a poškodením zdravia novorodenca. Vystavenie matky chronickému stresu počas včasného alebo neskorého tehotenstva má za následok dlhodobé poruchy ako napríklad kardiovaskulárne poruchy, depresie a iné (Parker a Douglas, 2010). Na stres najviac citlivým obdobím je včasná gravidita (Glynn a kol., 2001). Štúdie takisto naznačujú, že stresujúce životné situácie redukovujú šance na úspešnú *in vitro* fertilizáciu (Ebbesen a kol., 2009). Gravidné myši vystavené imobilizačnému stresu v prvých dňoch gravidity mali zníženú hladinu progesterónu v sére, zvýšil sa u nich počet abnormálnych žltých teliesok a znížil sa počet mláďat vo vrhu (Wiebold a kol., 1986). U potkanov stres počas gravidity spôsobuje luteolýzu, poškodenie plodu a potrat (Mairesse a kol., 2007). U oviec krátkodobé vyvolanie stresu (1 h na druhý a tretí deň po koncepcii) ovplyvnilo rast plodu a dĺžku gravidity (Smith a kol., 2008). Stres spôsobený obmedzením pohybu znížil u myši počet oocytov, ktoré dosiahli štádium blastocysty, a znížil aj priemerný počet buniek v blastocystách. Stres navodený počas rastu a maturácie oocytov znížil vývinové schopnosti oocytov. Podanie kortizolu myšiam (50 mg/kg telesnej hmotnosti) znížilo počet buniek v blastocystách (Zhang a kol., 2011).

Mechanizmus, akým stres poškodzuje vývin embrya a plodu, je z veľkej časti neznámy. Je však známe, že glukokortikoidy prechádzajú do vaječnikov cez krvné riečisko a aktivujú glukokortikoidové receptory prítomné v bunkách vaječnikov (Tetsuka a kol., 1999). HPA os ovplyvňuje HPG os prostredníctvom CRH, ACTH a adrenergými signálnymi dráhami, ktoré inhibujú sekréciu GnRH, glukokortikoidy znižujú sekréciu LH v hypofýze, čo má vplyv na znížené vylučovanie progesterónu a estrogénu (Chrousos a kol., 1998). Aktivácia HPA osi prostredníctvom stresu pôsobí inhibične na reprodukčný systém samíc, a to na všetkých úrovniach (hypotalamus, hypofýza, vaječníky, maternica), a je zodpovedná za amenoreu, ktorá bola pozorovaná pri stavoch úzkosti, depresie, pri podvýžive a poruchách stravovania (Chrousos a kol., 1998).

CRH utlmuje uvoľňovanie GnRH z hypotalamu, glukokortikoidy značne redukovujú sekréciu LH a takisto inhibujú estradiolom stimulovaný rast maternice (Sakakura a kol., 1975; Rabin a kol., 1990). CRH vplýva inhibične na produkciu vaječnických steroidov a tento vplyv je sprostredkovaný interleukínom 1 (Calogero a kol., 1996). Ovariálny CRH je preto spájaný s predčasnou poruchou funkcie vaječnikov u žien vystavených veľkému stresu (Bromberger a kol., 1997). CRH má však v reprodukčnom systéme aj fyziologické funkcie. Je dôležitý pre implantáciu a pri procesoch, ktoré chránia plod pred imunitným systémom matky (Makrigiannakis a kol., 2001) a takisto jeho vplyvom sa aktivujú kaskády, ktoré chránia maternicu pred kontrakciami počas tehotenstva (Grammatopoulos a Hillhouse, 1999). V endometriu potkana je v mieste implantácie koncentrácia CRH 3,5-krát vyššia ako v periimplantačných oblastiach (Makrigiannakis a kol., 1995). Lokálne produkovaný CRH podporuje implantáciu a zachovanie gravidity. CRH a jeho receptory boli identifikované vo vaječníkoch, v endometriu, v trofoblaste a syncytiotrofoblaste (Kalantaridou a kol., 2004). V ľudských oocytoch CRH nie je prítomný, ale prebieha tam expresia CRH génu a jeho

receptora CRHR-1. CRH teda môže vplývať autokrinne alebo parakrinne na maturáciu folikulov (Asakura a kol., 1997).

Opakované vystavenie sociálnemu stresu zvyšuje hladinu kortikosterónu u samíc potkanov v prvej polovici gravidity (Stefanski a kol., 2005). Zaujímavé je, že estrogén produkovaný vaječníkmi stimuluje os HPA. Tehotné ženy a ženy podstupujúce estrogénovú terapiu mali zvýšenú hladinu voľného kortizolu v porovnaní s kontrolnou skupinou (Chrousos a kol., 1998). Estrogén priamo stimuluje promótor CRH génu a centrálny adrenergny systém (Kalantaridou a kol., 2004).

Stres môže vplývať na reprodukčný systém matky aj prostredníctvom katecholamínov (adrenalin, noradrenalin, dopamin). Ich prítomnosť bola potvrdená vo folikulárnej tekutine aj v tekutine vajcovodov rôznych živočíšnych druhov (Čikoš a kol., 2011). Transkripty β -2 a β -3 adrenergnych receptorov sú prítomné v myšacích ovulovaných oocytoch aj v preimplantačných embryách. Expresia β -2 adrenoreceptora bola potvrdená aj na úrovni proteínu, čo poukazuje na to, že funkčná signalizácia tohto receptora je prítomná v bunkách preimplantačného embrya. Z alfa adrenergnych receptorov je v preimplantačných embryách prítomný len α 2C-adrenoreceptor (Čikoš a kol., 2005; Čikoš a kol., 2007). Katecholamíny vyskytujúce sa v reprodukčnom trakte môžu pochádzať z krvného obehu matky, z inervácie reprodukčných orgánov alebo z parenchýmových buniek a buniek stómy reprodukčného traktu. Prítomnosť adrenalinu a noradrenalinu bola potvrdená v tkanive vajcovodu človeka a kravy (Čikoš a kol., 2011). Myšacie embryá kultivované *in vitro* s prídavkom β -adrenergnych a α -adrenergnych agonistov do média mali signifikantne nižší počet buniek a aj podiel embryí, ktoré dosiahli štádium blastocysty, bol nižší (Čikoš a kol., 2005; Čikoš a kol., 2007). Podanie inhibítorov monoamínových oxidáz (enzýmy degradujúce monoamíny) samiciam potkana malo za následok zvýšenie hladiny noradrenalinu a serotonínu, čo viedlo k zvýšenému výskytu degenerovaných embryí a embryí nižších vývinových štádií (Mihálik a kol., 2010). Funkcia adrenergnych receptorov v embryu je ale stále málo známa. Získané poznatky však nasvedčujú, že tieto receptory môžu sprostredkovať niektoré negatívne vplyvy materského prostredia (stres) na vyvíjajúce sa embryo (Čikoš a kol., 2011).

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0041/09.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Arck PC, Rucke M, Rose M, Szekeres-Bartho J, Douglas AJ, Pritsch M, Blois SM, Pincus MK, Bärenstrauch N, Dudenhausen JW, Nakamura K, Sheps S, Klapp BF. Early risk factors for miscarriage: a prospective cohort study in pregnant women. *Reprod Biomed Online*. 2008 Jul;17(1):101-13.
- Asakura H, Zwain IH, Yen SS. Expression of genes encoding corticotropin-releasing factor (CRF), type 1 CRF receptor, and CRF-binding protein and localization of the gene products in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(8):2720-5.
- Bhat MS, Rao G, Murthy KD, Bhat PG. Housing in pyramid counteracts neuroendocrine and oxidative stress caused by chronic restraint in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2007;4(1):35-42.
- Blois SM, Joachim R, Kandil J, Margni R, Tometten M, Klapp BF, Arck PC. Depletion of CD8+ cells abolishes the pregnancy protective effect of progesterone substitution with dydrogesterone in mice by altering the Th1/Th2 cytokine profile. *J Immunol*. 2004;172(10):5893-9.
- Bromberger JT, Matthews KA, Kuller LH, Wing RR, Meilahn EN, Plantinga P. Prospective study of the determinants of age at menopause. *Am J Epidemiol*. 1997;145(2):124-33.
- Calogero AE, Burrello N, Negri-Cesi P, Papale L, Palumbo MA, Cianci A, Sanfilippo S, D'Agata R. Effects of corticotropin-releasing hormone on ovarian estrogen production *in vitro*. *Endocrinology*. 1996;137(10):4161-6.

- Čikos S, Veselá J, Il'ková G, Reháč P, Czikková S, Koppel J. Expression of beta adrenergic receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 2005;71(2):145-53.
- Čikos S, Reháč P, Czikková S, Veselá J, Koppel J. Expression of adrenergic receptors in mouse preimplantation embryos and ovulated oocytes. *Reproduction.* 2007;133(6):1139-47.
- Čikoš Š, Fabian D, Makarevich AV, Chrenek P, Koppel J. Biogenic monoamines in preimplantation development. *Hum Reprod.* 2011; *In press.*
- Ebbesen SM, Zachariae R, Mehlsen MY, Thomsen D, Højgaard A, Ottosen L, Petersen T, Ingerslev HJ. Stressful life events are associated with a poor in-vitro fertilization (IVF) outcome: a prospective study. *Hum Reprod.* 2009;24(9):2173-82.
- Fabian D, Bystriansky J, Čikoš S, Bukovská A, Burkuš J, Koppel J. The effect on preimplantation embryo development of non-specific inflammation localized outside the reproductive tract. *Theriogenology.* 2010;74(9):1652-60.
- Fabian D, Bystriansky J, Burkuš J, Reháč P, Legáth J, Koppel J. The effect of herbicide BASTA 15 on the development of mouse preimplantation embryos in vivo and in vitro. *Toxicol In Vitro.* 2011; 25(1):73-9.
- Glynn LM, Wadhwa PD, Dunkel-Schetter C, Chicz-Demet A, Sandman CA. When stress happens matters: effects of earthquake timing on stress responsivity in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(4):637-42.
- Grammatopoulos DK, Hillhouse EW. Role of corticotropin-releasing hormone in onset of labour. *Lancet.* 1999;354(9189):1546-9.
- Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA.* 1992;267(9):1244-52.
- Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med.* 1998;129(3):229-40.
- Javorka a kol.: *Lekárska fyziológia.* Martin, Vydavateľstvo Osveta, 2009, s. 423.
- Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Zoumakis E, Chrousos GP. Stress and the female reproductive system. *J Reprod Immunol.* 2004;62(1-2):61-8.
- Mairesse J, Lesage J, Breton C, Bréant B, Hahn T, Darnaudéry M, Dickson SL, Seckl J, Blondeau B, Vieau D, Maccari S, Viltart O. Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292(6):E1526-33.
- Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Coutifaris C, Margioris AN, Coukos G, Rice KC, Gravanis A, Chrousos GP. Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat Immunol.* 2001;2(11):1018-24.
- Makrigiannakis A, Margioris AN, Le Goascogne C, Zoumakis E, Nikas G, Stournaras C, Psychoyos A, Gravanis A. Corticotropin-releasing hormone (CRH) is expressed at the implantation sites of early pregnant rat uterus. *Life Sci.* 1995;57(20):1869-75.
- Matsuwaki T, Watanabe E, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Glucocorticoid maintains pulsatile accretion of luteinizing hormone under infectious stress condition. *Endocrinology.* 2003;144(8):3477-82.
- Nakamura K, Aoike A, Hosokawa T, Rokutan K, Koyama K, Nishi Y, Yoshida A, Kawai K. Effect of food-restriction stress on immune response in mice. *J Neuroimmunol.* 1990;30(1):23-9.
- Parker VJ, Douglas AJ. Stress in early pregnancy: maternal neuro-endocrine-immune responses and effects. *J Reprod Immunol.* 2010;85(1):86-92.
- Rabin DS, Johnson EO, Brandon DD, Liapi C, Chrousos GP. Glucocorticoids inhibit estradiol-mediated uterine growth: possible role of the uterine estradiol receptor. *Biol Reprod.* 1990;42(1):74-80.
- Sakakura M, Takebe K, Nakagawa S. Inhibition of luteinizing hormone secretion induced by synthetic LRH by long-term treatment with glucocorticoids in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1975;40(5):774-9.
- Smith J, Ferguson D, Jauregui G, Panarace M, Medina M, Lehnert S, Hill JR. Short-term maternal psychological stress in the post-conception period in ewes affects fetal growth and gestation length. *Reproduction.* 2008;136(2):259-65.
- Stefanski V, Raabe C, Schulte M. Pregnancy and social stress in female rats: influences on blood leukocytes and corticosterone concentrations. *J Neuroimmunol.* 2005;162(1-2):81-8.

- Tetsuka M, Milne M, Simpson GE, Hillier SG. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, glucocorticoid receptor, and mineralocorticoid receptor genes in rat ovary. *Biol Reprod.* 1999;60(2):330-5
- Won SJ, Lin MT. Thermal stresses reduce natural killer cell cytotoxicity. *J Appl Physiol.* 1995;79(3):732-7.
- Yin YY, Ming L, Zheng LF, Kan HW, Li CR, Li WP. Bioactive compounds from *Paecilomyces tenuipes* regulating the function of the hypothalamo-hypophyseal system axis in chronic unpredictable stress rats. *Chin Med J (Engl).* 2007;120(12):1088-92.
- Zhang SY, Wang JZ, Li JJ, Wei DL, Sui HS, Zhang ZH, Zhou P, Tan JH. Maternal restraint stress diminishes the developmental potential of oocytes. *Biol Reprod.* 2011;84(4):672-81.

VPLYV PODMIENOK GASTROINTESTINÁLNEHO TRAKTU NA PREŽÍVANIE PROSPEŠNÝCH BAKTÉRIÍ PRODUKUJÚCICH EXOPOLYSACHARIDY V IN VITRO PODMIENKACH

Borovská D., Nemcová R., Mudroňová D.

Katedra mikrobiológie a imunológie, Komenského 73, Košice, Slovensko

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo skúmať vplyv vonkajších podmienok imitujúcich prostredie GIT (pH, žlčové soli, tráviace enzýmy) a vysokej teploty na prežívanie prospešných baktérií produkujúcich exopolysacharidy v *in vitro* podmienkach. V experimente bolo použitých 5 kmeňov s fenotypickým prejavom tvorby exopolysacharidov (EPS⁺) na MRS médiu s vysokým obsahom sacharózy a 5 kmeňov bez fenotypického prejavu tvorby exopolysacharidov (EPS⁻). Po opracovaní baktérií žalúdočnou, duodenálnou a črevnou šťavou bola stanovená ich životaschopnosť pomocou prietokovej cytometrie. Zo získaných výsledkov vyplýva, že EPS⁺ laktobacily boli rezistentnejšie voči žalúdočnej a črevnej šťave než EPS⁻ kmene. Signifikantne najrezistentnejšie voči žalúdočnej šťave boli kmene B2/6, B6/1, 10/1 a 2/6 ($p < 0,001$). Naopak EPS⁺ kmene boli citlivejšie voči duodenálnej šťave. Jediným EPS⁺ kmeňom s vyššou rezistenciou voči duodenálnej šťave bol kmeň 2/6. Voči pôsobeniu vysokej teploty (70° C) bol najrezistentnejší EPS⁻ kmeň L81. Z EPS⁺ kmeňov najvyššiu rezistenciu vykazoval kmeň B6/1.

ÚVOD

Schopnosť prospešných mikroorganizmov prežívať a rozmnožovať sa v hostiteľovi silne ovplyvňuje ich pozitívny účinok. Baktérie by mali byť metabolicky stabilné a aktívne v produkte a prežívať počas pasáže gastrointestinálnym traktom (GIT) vo vysokých počtoch (Gilliland, 1989). V záujme zvýšenia prežívania probiotických mikroorganizmov pri nepriaznivých podmienkach sa výskum v potravinárskom priemysle zameriava na výber kmeňov odolných voči kyselinám a žlči, na používanie obalov neprepúšťajúcich kyslík, na dvojstupňovú fermentáciu, adaptáciu na stres, na inkorporáciu mikroživín a na enkapsuláciu (Vidhyalakshmi a kol., 2009). Enkapsulácia sa vyskytuje aj prirodzene keď baktérie rastú a produkujú exopolysacharidy (EPS). Bakteriálne EPS nie sú využívané ako zdroj energie pre produkujúce mikroorganizmy. Poskytujú baktériám ochranu voči napadnutiu fágmi, vyschnutiu, voči osmotickému stresu, antibiotikám, fagocytóze. EPS hrajú dôležitú úlohu nielen v ochrane buniek v rôznych prostrediach ale aj v rozpoznávaní buniek, v adherencii na rôzne povrchy a v tvorbe biofilmov uľahčujúcich kolonizáciu rôznych ekosystémov (Looijesteijn a kol., 2001).

Cieľom práce bolo skúmať vplyv vonkajších podmienok imitujúcich prostredie GIT (pH, žlčové soli, tráviace enzýmy) a vysokej teploty na prežívanie prospešných baktérií produkujúcich exopolysacharidy v *in vitro* podmienkach.

MATERIÁL A METÓDY

Bakteriálne kmene

V experimente bolo použitých 5 EPS⁺ kmeňov: *Lactobacillus* sp. 26, 10/1, 2/6 izolované z čreva prasiat a *Lactobacillus* sp. B6/1, B2/6 izolované z čreva bažantov. Kmene bez fenotypického prejavu tvorby EPS boli nasledovné: *Lactobacillus plantarum* L81 – izolovaný z trusu ciciakov, *Lactobacillus casei* Lc – izolovaný z trusu teľaťa, *Lactobacillus fermentum* 2I3 – izolovaný z črevného obsahu kury domácej a probiotické komerčné kmene *Lactobacillus rhamnosus* (Lyofast LRB) a *Lactobacillus acidophilus* (Lyofast LA3).

Testovanie vplyvu podmienok imitujúcich prostredie GIT

V experimente boli použité žalúdočná, duodenálna a črevná šťava, ktoré boli pripravené podľa metodiky Salazar a kol. (2011). Žalúdočná šťava (pH 2,5) pozostávala z 125 mmol NaCl, 7 mmol KCl, 45 mmol NaHCO₃ a 3g/l pepsínu. Duodenálna šťava (pH 8) bola pripravená z 1% boviny biele. Črevná šťava (pH 8) pozostávala z 0,3% boviny biele a 0,1% pankreatínu. Pred použitím boli všetky šťavy sterilizované filtráciou. Jednotlivé šťavy sme rozpipetovali do skúmaviek po 4,9 ml a do každej skúmavky sme pridali po 0,1 ml danej bakteriálnej kultúry, ktorá bola deň vopred inkubovaná v MRS bujóne pri teplote 37°C po dobu 18 hodín. Vzorky sme inkubovali v trepačke pri teplote 37°C po dobu 15 minút pre duodenálnu šťavu, 90 minút pre žalúdočnú šťavu a 120 minút pre črevnú šťavu. Pred a po ukončení inkubácie boli odobraté vzorky na stanovenie životaschopnosti baktérií pomocou prietokovej cytometrie.

Testovanie vplyvu vysokej teploty

Do skúmaviek sme rozpipetovali po 4,9 ml MRS bujónu, vopred prefiltrovaného cez bakteriologický filter a pridali sme 0,1 ml kultúry, ktorá bola inkubovaná v termostate pri teplote 37°C po dobu 18 hodín. Potom sme vzorky nechali inkubovať 10 minút pri teplote 70°C. Pred a po inkubácii sme odobrali vzorky na stanovenie životaschopnosti baktérií pomocou prietokovej cytometrie.

Stanovenie prežívania baktérií prietokovou cytometriou

Pre stanovenie prežívania baktérií bolo použité farbenie propídium jodidom (PI) s následnou analýzou na prietokovom cytometri BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Biosciences, USA) s použitím programu BD FACS Diva™ software. Vzorky boli pripravené zmiešaním 50 µl bunkovej kultúry v príslušnom médiu s 447 µl PBS a 3 µl zásobného roztoku PI s koncentráciou 1mg PI/ml. Pre samotné meranie bol na excitáciu použitý 488 nm modrý laser a fluorescencia bola meraná pri 670 nm (FL3). Poloha mikroorganizmov bola ohraničená na dot plot grafe použitím nastavenia SSC (Side Scatter) oproti FSC (Forward Scatter). Vzorky boli merané 30 sekúnd pri nízkej rýchlosti prietoku tekutiny (10 µl.min⁻¹). Pre stanovenie počtu živých a mŕtvych baktérií bol použitý histogram a dot plot s nastavením fluorencencie FL3 oproti SSC, pričom pri prepočte boli brané do úvahy použité riedenia.

Štatistická analýza

Výsledky boli vyhodnotené jednorozmernou analýzou rozptylu (ANOVA) s doplnkovým Tukeyho testom v štatistickom programe GraphPad Prism verzia 3.00.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Percento úhynu EPS⁻ laktobacilov je uvedené v tabuľke 1 a percento úhynu EPS⁺ laktobacilov v tabuľke 2. Na obrázkoch 1 a 2 sú príklady histogramov z prietokového cytometra, podľa ktorých bola vyhodnocovaná prežívateľnosť testovaných laktobacilov.

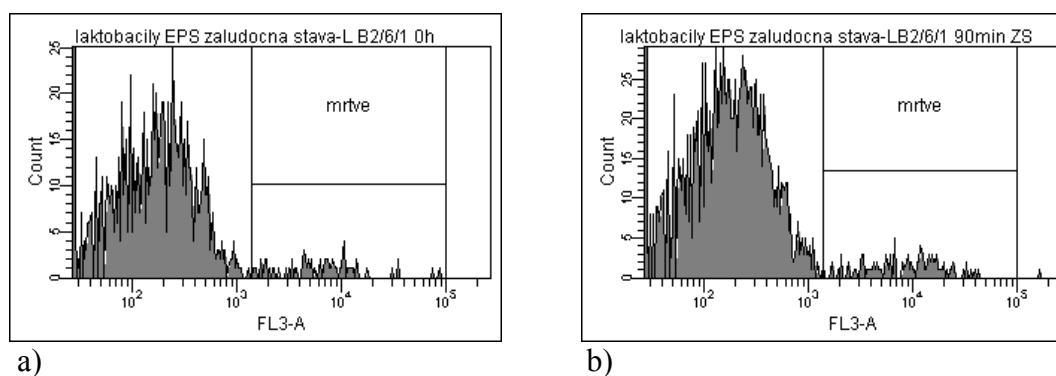
Tab. 1. Percento úhynu laktobacilov EPS⁻ v stresových podmienkach

Kmeň	Žalúdočná šťava (90 min)	Duodenálna šťava (15 min)	Črevná šťava (120 min)	Vysoká teplota (70°C, 10 min)
L81 - EPS -	77,3 ± 1,94	12,3 ± 4,35	100 ± 0	84,1 ± 0,82
L 2I - EPS -	98,5 ± 0,42	26,6 ± 2,02	100 ± 0	96,4 ± 2,11
Lc - EPS -	98,9 ± 0,77	40,8 ± 11,26	100 ± 0	96,0 ± 0,24
LRB -EPS -	92,1 ± 1,12	35,7 ± 3,07	100 ± 0	97,7 ± 1,06
LA3- EPS -	51,4 ± 2,01	27,6 ± 6,62	100 ± 0	98,2 ± 0,71

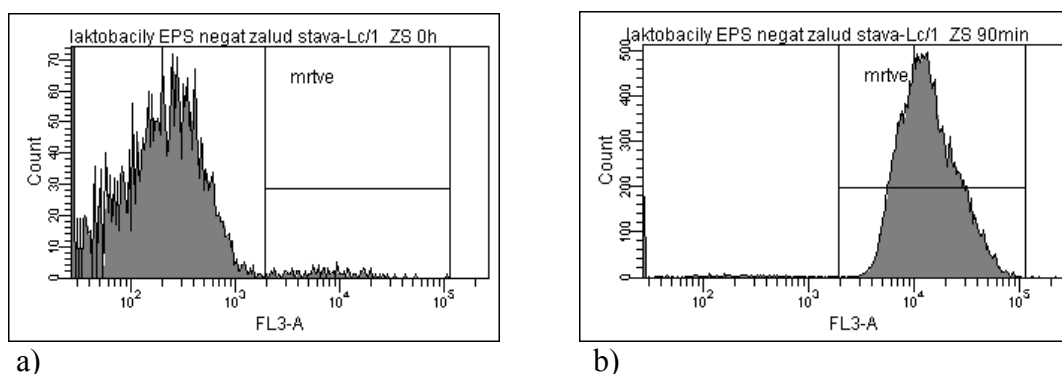
Tab. 2. Percento úhynu laktobacilov EPS⁺ v stresových podmienkach

Kmeň	Žalúdočná šťava (90 min)	Duodenálna šťava (15 min)	Črevná šťava (120 min)	Vysoká teplota (70°C, 10 min)
26/1- EPS +	17,1 ± 7,38	51,4 ± 16,44	97,9 ± 0,30	98,1 ± 0,14
B6/1 -EPS +	2,1 ± 1,63	72,6 ± 0,90	9,2 ± 1,24	92,8 ± 1,59
B2/6 -EPS +.	1,0 ± 0,20	64,1 ± 3,17	8,2 ± 0,35	95,8 ± 1,75
10/1 -EPS +.	3,5 ± 0,11	48,7 ± 9,05	87,9 ± 0,94	98,1 ± 0,87
2/6 - EPS +	2,9 ± 0,66	14,7 ± 2,80	75,9 ± 4,08	97,4 ± 0,16

Zo získaných výsledkov a štatistickej analýzy vyplýva, že EPS⁺ laktobacily boli rezistentnejšie voči žalúdočnej a črevnej šťave než EPS⁻ kmene. Signifikantne najrezistentnejšie voči žalúdočnej šťave boli kmene B2/6, B6/1, 10/1 a 2/6 ($p < 0,001$). Naopak EPS⁺ kmene boli citlivejšie voči duodenálnej šťave. Jediným EPS⁺ kmeňom s vyššou rezistenciou voči duodenálnej šťave bol kmeň 2/6 ($p < 0,05$). Voči pôsobeniu vysokej teploty (70°C) bol najrezistentnejší EPS⁻ kmeň L81. Z EPS⁺ kmeňov najvyššiu rezistenciu vykazoval kmeň B6/1. Naše výsledky poukazujú na význam exopolysacharidov v ochrane baktérií voči nízkemu pH a žľči. Izolácia prirodzene EPS produkujúcich probiotických kmeňov ponúka veľa selektívnych výhod a ukazuje cestu pre vývoj funkčných potravín a krmív s obsahom prirodzene EPS produkujúcich probiotík. Takéto probiotiká by zlepšovali životaschopnosť kmeňov počas pasáže GIT.

Obr. 1. Histogramy pre EPS⁺ *Lactobacillus sp.* B2/6 vyjadrujúce zastúpenie živých a mŕtvych baktérií pred (a) a po 90 minútovej inkubácii (b) v žalúdočnej šťave

Obr. 2. Histogramy pre EPS⁻ *Lactobacillus casei* Lc vyjadrujúce zastúpenie živých a mŕtvych baktérií pred (a) a po 90 minútovej inkubácii (b) v žalúdočnej šťave



POĎAKOVANIE

Podporené projektom SK0021 spolufinancovaného z finančného mechanizmu EHP, nórskeho finančného mechanizmu a štátneho rozpočtu SR.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Gilliland S. E. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. *J. Dairy Sci.* 1989; 72: 2483-2494.
- Looijesteijn P. L, Trapet L, de Vries E, Abee T, Hugenholtz J. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* 2001; 64: 71-80.
- Salazar N, Binetti A, Gueimonde M, Alonso A, Garrido P, Gonzáles del Rey C, Gonzáles C, Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilán C. G. Safety and intestinal microbiota modulation by the exopolysaccharide-producing strains *Bifidobacterium animalis* IPLA R1 and *Bifidobacterium longum* IPLA E44 orally administered to Wistar rats. *Int. J. Food Microbiol.* 2011; 144:342-351.
- Vidhyalakshmi R, Bhakyaraj R, Subhasree R. S.: Encapsulation The Future of Probiotics. A Review. *Adv. Biol. Res.* 2009; 3(3-4):96-103.

VPLYV TYMIÁNOVEJ SILICE (*THYMUS VULGARIS*) NA VYBRANÉ BIOCHEMICKÉ PARAMETRE V PLAZME KURČIAT

Čapkovičová A.¹, Faixová Z.¹, Ryzner M.², Faix Š.²

¹Ústav patologickej fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 83 Košice

²Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4-6, 041 01 Košice

ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo zistiť vplyv tymiánovej silice (*Thymus vulgaris* L.) na vybrané biochemické parametre v plazme kurčiat. V pokuse bolo použitých 27 jednodňových kurčiat plemena Isa Brown, rozdelených do troch skupín po deväť zvierat a kŕmených nasledovnými diétami – kontrola bez oleja; kontrola so slnečnicovým olejom (1%); tymiánová silica (0,05%) - do veku 11 týždňov. Potom bolo náhodne vybraných osem zvierat z každej skupiny, ktorým bola odobraná krv na stanovenie niektorých biochemických parametrov v plazme: celkové bielkoviny, AST, Ca, albumín, Mg a cholesterol.

Prídavok tymiánovej silice do diéty mal za následok signifikantné zvýšenie plazmatickej koncentrácie celkových bielkovín v porovnaní s kontrolnou skupinou bez prídavku slnečnicového oleja. Koncentrácia AST v plazme bola signifikantne nižšia po pridaní tymiánu v porovnaní s kontrolnou skupinou bez prídavku oleja. V kontrolnej skupine s prídavkom slnečnicového oleja došlo k signifikantnému poklesu koncentrácie AST v porovnaní s kontrolnou skupinou bez prídavku oleja. Koncentrácia plazmatického vápnika bola signifikantne nižšia po pridaní tymiánovej silice v porovnaní s kontrolnou skupinou bez prídavku oleja. Ostatné sledované parametre neboli signifikantne zmenené prídavkom tymiánovej silice.

ÚVOD

Thymus vulgaris L. je trváca bylina rastúca v strednej a južnej Európe, Afrike a Ázii, bohatá na éterické oleje a antioxidačné fenolové látky (WHO, 1999). Lístky tymiánu a jeho éterické oleje boli oddávna používané na ochucovanie jedál, aromatizáciu a konzerváciu mäsa a rýb a tiež boli súčasťou tradičnej medicíny. Hlavnými zložkami éterického oleja tymiánu sú borneol, tymol, karvakrol meryléter, kampfén, α -humulén a karvakrol (Bounatirou a kol., 2007). Práve tieto zložky vykazujú značné antioxidačné a antimikrobiálne vlastnosti, kvôli ktorým sú v posledných rokoch stále častejšie študované ako možná náhrada za doteraz používané chemické látky v humánnej aj veterinárnej medicíne.

Cieľom našej práce bolo zistiť vplyv tymiánovej silice na vybrané biochemické parametre v plazme kurčiat.

MATERIÁL A METODIKA

Do pokusu bolo zaradených 27 ks 1-dňových kurčiat plemena Isa Brown z liahne Párovské Háje. Boli rozdelené do troch skupín po 9 zvierat a kŕmené nasledujúcimi diétami (1. – kontrola bez oleja; 2. – kontrola so slnečnicovým olejom 1%; 3. – tymiánová silica 0,05%) do veku 11 týždňov. Kurčatá boli umiestnené na pilinovej podstielke, teplota bola udržiavaná v závislosti od veku (32°C prvý týždeň s postupným znižovaním o 2°C týždenne). Krmivo (BIOFER, Prešov, SR) aj voda boli podávané *ad libitum*. Zloženie diét v skupinách je uvedené v Tab.1.

Tab. 1. Kŕmenie kurčiat

1. skupina	Kontrola I (bez oleja)	1.-10. deň 200g krmiva 10.-30. deň 400g krmiva Po 30. dni 630g krmiva
2. skupina	Kontrola II (so slnečnicovým olejom 1%)	1.-10. deň 200g krmiva + 2ml slnečnicový olej 10.-30. deň 400g krmiva + 4ml slnečnicový olej Po 30. dni 630g krmiva + 6,3ml slnečnicový olej
3. skupina	0,05 % Tymianová silica	1.-10. deň 200g krmiva + 2ml slnečnicový olej + 0,1 ml tymián 10.-30. deň 400g krmiva + 4ml slnečnicový olej + 0,2 ml tymián Po 30. dni 630g krmiva + 6,3ml slnečnicový olej + 0,315 ml tymián

Na stanovenie jednotlivých biochemických parametrov boli použité vzorky plazmy z krvi ôsmich pokusných zvierat náhodne vybraných z každej skupiny po uplynutí jedenástich týždňov. Na analýzy boli použité komerčné kity firiem RANDOX Laboratories Ltd., UK a PLIVA-Lachema Diagnostika s r.o., ČR. Vzorky boli analyzované podľa príslušných návodov a merania prebiehali pri predpísaných vlnových dĺžkach na spektrofotometri GENESYS 10 UV.

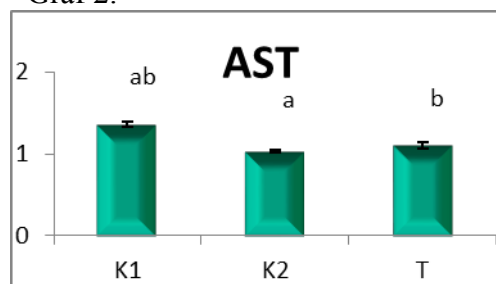
Výsledky sú vyjadrené ako priemery \pm S.E.M. Štatistická významnosť bola stanovená jednocestnou analýzou variancie (ANOVA) a Tukey post-hoc testom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

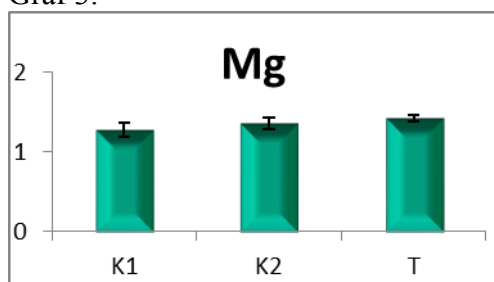
Graf 1.



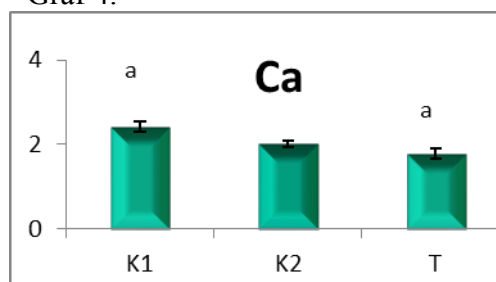
Graf 2.



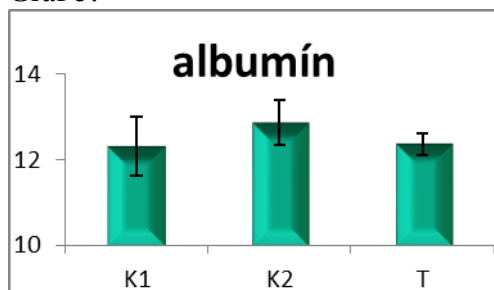
Graf 3.



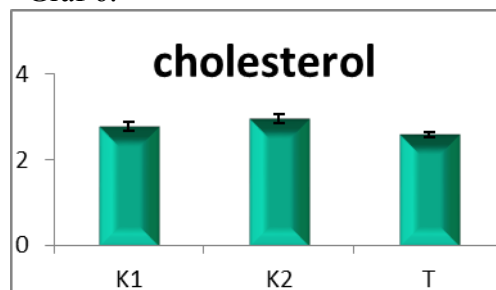
Graf 4.



Graf 5.



Graf 6.



Prídavok tymianovej silice do diéty mal za následok signifikantné zvýšenie hladiny celkových bielkovín (graf č. 1) v plazme kurčiat v porovnaní s kontrolnou skupinou bez prídavku slnečnicového oleja.

Ibrahim a kol. (2001) uskutočnili pokus s králikmi, ktorým podávali bazálnu diétu (kontrola) a bazálnu diétu s prídavkom tymiánu v pomere 1:1. Oproti kontrole zaznamenali signifikantné zvýšenie koncentrácie celkových bielkovín v plazme.

Rovnako aj El-Ghousein a Al-Beitawi (2009) dosiahli signifikantné zvýšenie koncentrácií plazmatickej glukózy, celkových bielkovín a globulínu u brojlerových kurčiat kŕmených po dobu 42 dní prídavkom tymiánu v koncentráciách 1%; 1,5% a 2%. Tiež zaznamenali signifikantný pokles koncentrácií triglyceridov a cholesterolu v plazme.

Hladina AST (graf č. 2) v plazme bola signifikantne nižšia po pridaní tymiánovej silice v porovnaní s kontrolnou skupinou bez prídavku oleja. V kontrolnej skupine s prídavkom slnečnicového oleja došlo k signifikantnému poklesu hladiny AST v porovnaní s kontrolnou skupinou bez prídavku oleja.

V štúdií Gerzilova a kol. (2011) bol do bazálnej diéty jednodňových pekinkských kačíc pridávaný premix bylín (rozmarín, tymián, bazalka, oregano a škoric, každá v množstve 0,03%) po dobu 63 dní. Na konci pokusu boli stanovené nasledovné biochemické parametre v sére: AST, ALT, GGT, triglyceridy, celkový a HDL cholesterol a kreatinín. Bolo zaznamenané signifikantné zníženie koncentrácií triglyceridov ($P < 0,01$) a celkového cholesterolu ($P < 0,01$) v sére, čo môže byť spojené s antistresovým účinkom bylinného premixu na pekinkské kačice.

Podobné výsledky dosiahli aj Abdulkarimi a kol. (2011). Vo svojej štúdií použili 160 jednodňových kurčiat, ktorým po dobu 42 dní podávali vodný extrakt tymiánu v množstvách 0,2; 0,4 a 0,6%. Vo všetkých skupinách bol zaznamenaný pokles celkového cholesterolu a triglyceridov ($P < 0,01$) oproti kontrole.

Prídavok tymiánovej silice do diéty signifikantne znížil hladinu vápnika (graf č. 4) v plazme v porovnaní s kontrolnou skupinou bez prídavku oleja.

Ostatné sledované parametre neboli signifikantne zmenené prídavkom tymiánovej silice, čo korešponduje aj s údajmi, ktoré uviedli Toghyani a kol. (2010), keď po prídavku tymiánu v množstve $10\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ do krmiva kurčiat za sledované obdobie 6 týždňov nedošlo k signifikantným zmenám v koncentráciách cholesterolu, albumínu, celkových bielkovín, ani triglyceridov.

Výsledky nášho pokusu naznačujú, že prídavok tymiánu do potravy kurčiat zvýšil koncentráciu celkových bielkovín a znížil koncentrácie AST a vápnika v plazme. Plazmatické hodnoty horčička, cholesterolu a albumínu neboli signifikantne zmenené.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla s podporou grantov VEGA č. 1/0859/11 a č. 2/0010/10

POUŽITÁ LITERATÚRA

Abdulkarimi R, Daneshyar M, Agazadeh A. Thyme (*Thymus vulgaris*) extract consumption darkens liver, lowers blood cholesterol, proportional liver and abdominal fat weights in broiler chickens. Ital J Anim Sci. 2011; 10:101-105.

Bounatirou S, Smiti S, Miguel M G, Faleiro L, Rejeb M N, Neffati M, Costa M M, Figueiredo A C, Barroso J G, Pedro L G. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus*. Food Chem. 2007; 105: 146-155.

El-Ghousein S S, Al-Beitawi N A. The effect of feeding of crushed thyme (*Thymus vulgaris* L) on growth, blood constituents, gastrointestinal tract and carcass characteristics of broiler chickens. J Poult Sci. 2009; 46:100-104

Gerzilov V, Bozakova N, Bochukov A, Penchev G, Lyutskanov M, Popova-Ralcheva S, Sredkova V. Influence of the prebiotic Salgard and a herb mixture on pekin ducklings in organic poultry production, I: Growth performance and blood biochemical parameters. Biotechnol Anim Husb. 2011; 27:33-43.

- Ibrahim S A M, El-Ghamry A A, El.Mallah G M. Effect of some medicinal plants of *Labiatae* family as feed additives on growth and metabolic changes of rabbits. Egyptian J Rabbit Sci. 2000; 10: 105-120.
- Toghyani M, Tohidi M, Gheisari A A, Tabeidian A A. Performance, immunity, serum biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth promoter. Afr J Biotechnol. 2010, 9:6819-6825.
- WHO Monographs on Selected Medicinal Plants vol. 1. 1999; Geneva.

DETEKCIA IN VITRO ÚČINKU ANTIHELMINTÍK NA CITLIVÚ A REZISTENTNÚ POPULÁCIU PARAZITA *HAEMONCHUS CONTORTUS*

Dolinská M., Várady M.

Parazitologický ústav, SAV, Hlinkova 3, 040 01, Košice

ABSTRAKT

Intenzívne a nesystémové používanie antihelmintík nielen voči gastrointestinálnym parazitom vedie k nežiadúcemu stavu - vzniku rezistencie. Rezistencia predstavuje celosvetový problém a možno ju detegovať za pomoci *in vivo* a *in vitro* metód. *In vitro* metódy – test vývinu lariev, test inhibície príjmu potravy larvami, mikromotility test a modifikovaný test migrácie lariev sú schopné detegovať rezistenciu voči makrocyclickým laktómom (ML), ale citlivosť týchto metód nie je dostatočná. Naším cieľom preto bolo vybrať medzi spomínanými metódami najcitlivejšiu a najspoľahlivejšiu metódu na detekciu rezistencie voči ML. V experimente sme použili dva citlivé a päť rezistentných kmeňov gastrointestinálnych parazitov *Haemonchus contortus*. Výsledky testov boli analyzované pomocou logitového regresného modelu a boli prezentované ako hodnoty LD₅₀/LD₉₉. Z týchto hodnôt boli následne určené faktory rezistencie. Pri teste vývinu lariev bola ich hodnota v rozsahu od 0,68 do 60,95 pri použití rôznych derivátov ivermektínu. Pri mikromotility teste boli faktory rezistencie medzi 1,00 až 108,05 pri použití liečiva ivermektín a eprinomektín. Najnižšie rozdiely medzi citlivými a rezistentnými izolátmi boli zistené pri teste migrácie lariev kde sa faktory rezistencie pohybovali od 1,70 do 17,20 pri použití liečiva ivermektín. Zo získaných výsledkov možno konštatovať, že test vývinu lariev, mikromotility test a test migrácie lariev sú vhodnými metódami na detekciu rezistencie voči ML.

ÚVOD

Najčastejšími pôvodcami gastroenteritíd u oviec zo skupiny parazitov sú *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* a *Trichostrongylus colubriformis*. Tieto parazity znižujú úžitkovosť, spôsobujú ochorenie ale aj úhyn napadnutého organizmu, teda ekonomické straty. Voči takémuto nežiadúcemu parazitárnemu ochoreniu možno bojovať a zároveň mu predchádzať používaním širokospektrálnych antihelmintík. S nesprávnym používaním daných liečiv môže byť spojený vznik rezistencie. Rezistencia je schopnosť parazitov prežiť terapiu doporučenou dávkou liečiva (Sangster, 1999) a predstavuje vážny celosvetový problém a to hlavne v krajinách s rozvinutým chovom oviec, ako je Južná Amerika, Afrika, Nový Zéland a Austrália. V súčasnosti sú nematódy rezistentné voči všetkým druhom antihelmintík.

In vivo a *in vitro* testy slúžia na detekciu rezistencie voči antihelmintikám. *In vivo* testy sú cenovo drahšie, časovo náročnejšie a niekedy charakterizované nízkou preukázateľnosťou výsledkov (Várady a Čorba, 1999). *In vitro* testy používané na detekciu rezistencie voči ML majú zníženú citlivosť čo znamená, že nedokážu presne identifikovať rezistentnú časť populácie. Naším cieľom preto bolo vybrať najvhodnejšiu citlivú a spoľahlivú metódu na detekciu rezistencie voči ML a danú metódu následne použiť pri monitoringu výskytu rezistencie voči ML na Slovensku.

MATERIÁL A METODIKA

Prvým krokom pre vykonanie *in vitro* testov je izolácia vajíčok zo vzoriek trusu oviec. Vajíčka sme získali premývaním cez tri na seba naukladané sitá o rôznom priemere ôk – 250, 100 a 25µm. Vajíčka helmintov skoncentrované na najspodnejšom site sme získali flotáciou pomocou centrifugácie. Následne sme určili ich počet, prípadne sme ich nechali vyvinúť do vývinového štádia L1, L2 alebo L3. Vajíčka alebo larvy sme následne použili pre *in vitro* testy. Základným princípom *in vitro* testov je pôsobenie rôznych koncentrácií antihelmintika

– ivermektínu, ivermektín aglykónu a eprinomektínu na vyvíjajúce sa alebo infekčné larvy (L3) parazitov *Haemonchus contortus*. V experimente sme použili dva citlivé (ISE, McM) a päť rezistentných kmeňov (MOF23, CAVR, ISE-S, ISE-ST, WR) parazitov *Haemonchus contortus*.

Modifikovaný test migrácie lariev bol uskutočnený podľa metódy opísanej podľa Kotzeho a kol. (2006), test vývinu lariev bol vykonaný podľa Colesa a kol. (2006), pre mikromotility test sme použili metódu podľa Folza a kol. (1987) a test inhibície príjmu potravy bol uskutočnený podľa Álvarez-Sánchez a kol. (2005).

Výsledky testov sú interpretované ako hodnota LD₅₀ (koncentrácia antihelmintika, ktorá zabráni vývinu 50% lariev do štádia L3) a hodnota LD₉₉ (koncentrácia antihelmintika, ktorá zabráni 99% vývinu lariev do infekčného štádia L3). Hodnoty sme určili pomocou logaritmickeho koncentračného logitového modelu (Waller a kol., 1985). Porovnaním hodnôt LD₅₀/LD₉₉ rezistentného a hodnôt LD₅₀/LD₉₉ citlivého kmeňa sme určili faktory rezistencie (RF), ktorý vyjadruje koľkokrát je hodnota rezistentného kmeňa väčšia oproti hodnote citlivého kmeňa.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tabuľkách 1 a 2 uvádzame porovnanie (faktory rezistencie RF) rezistentných a citlivých izolátov parazita *Haemonchus contortus* pri teste vývinu lariev (tab. 1), mikromotility teste a teste migrácie lariev (tab. 2). Výsledky testu inhibície príjmu potravy nie sú prezentované z dôvodu vysokej variability príjmu fluoresceínom značenej potravy, čo nám neumožnilo vypočítať dávkovú odpoveď pre tento test.

Tab. 1

Kmene	ivermektín		ivermektín aglykón		eprinomektín	
	RF50	RF99	RF50	RF99	RF50	RF99
MOF23/McM	3.92	6.01	0.68	2.98	1.48	6.69
CAVR/McM	1.89	1.86	7.63	41.77	5.34	11.08
ISE-S/McM	3.97	3.46	16.12	29.3	11.68	9.53
ISE-ST/McM	7.72	14.23	17.70	60.95	16.09	11.54
MOF23/ISE	3.85	2.98	0.92	0.97	1.45	2.95
CAVR/ISE	1.86	0.92	10.31	13.58	5.24	4.90
ISE-S/ISE	3.9	1.71	21.76	9.54	11.54	4.21
ISE-ST/ISE	7.89	7.06	23.95	19.84	15.78	5.02

Tab. 2

Kmene	Mikromotility test		Test migrácie lariev	
	IVM	EPM	IVM	IVM
	RF50	RF50	RF50	RF99
WR/McM	57.81	10.31	3.68	3.12
CAVR/McM	2.67	12.50	2.71	7.17
MOF23/McM	1.00	3.87	2.06	12.27
ISE-S/McM	49.89	11.88	3.54	17.20
ISE-ST/McM	-	-	4.90	8.16
WR/ISE	108.05	26.65	2.24	2.92
CAVR/ISE	5.00	32.32	2.24	6.70
MOF23/ISE	1.87	10.00	1.70	11.45
ISE-S/ISE	93.25	30.69	2.92	16.06
ISE-ST/ISE	-	-	4.04	7.62

ML sú liečivá, ktoré zvyšujú permeabilitu bunkových membrán pre chloridové ióny, čím spôsobujú paralýzu pažeráka (Geary a kol., 1993) a somatickej svaloviny nematódov (Gill a kol., 1991), z tohto dôvodu *in vitro* testy používané pri detekcii rezistencie voči ML porovnávajú paralýzu u citlivých a rezistentných kmeňov.

Naše výsledky *in vitro* testov pri použití ivermektínu a jeho derivátov poukazujú na zvýšenú citlivosť testov na rozdiel od iných publikácií, kde faktory rezistencie boli nízke (2 – 4 pri teste vývinu lariev). Čím je faktor rezistencie vyšší, tým je daná metóda z pohľadu detekcie rezistencie citlivejšia a spoľahlivejšia. Pri teste vývinu lariev bola hodnota RF v rozsahu od 0,68 do 60,95 pri použití rôznych derivátov ivermektínu. Pri mikromotility teste boli nami zistené faktory rezistencie v rozmedzí od 1,00 do 108,05 pri použití liečiva ivermektín a eprinomektín. Najnižšie rozdiely medzi citlivými a rezistentnými kmeňmi boli zistené pri teste migrácie lariev kde sa faktory rezistencie pohybovali od 1,70 do 17,20 pri použití liečiva ivermektín. Zo získaných výsledkov možno konštatovať, že test vývinu lariev, mikromotility test a test migrácie lariev sú vhodné metódy na detekciu rezistencie voči ML a môžeme ich zahrnúť do terénneho monitoringu rezistencie parazitov na Slovensku..

POĎAKOVANIE

Táto práca bola realizovaná s finančnou podporou grantového projektu APVV LPP 0186-07.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Álvarez-Sánchez MA, Pérez García J, Bartley D, Jackson F, Rojo-Vázquez FA. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. *Experimental Parasitology*. 2005; 110: 56 - 61
- Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson- Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA, Vercruyse J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 2006; 31: 167–185
- Folz SD, Pax RA, Thomas EM, Bennett, JL, Lee BL, Conder GA. Detecting *in vitro* anthelmintic effects with a micromotility meter. *Veterinary Parasitology*. 1987; 24: 241 - 250
- Geary TG, Sims SM, Thomas EM, Vanover L, Davis JP, Winterrowd CA, Klein RD, Ho NFH, Thompson DP. *Haemonchus contortus*: ivermectin induced paralysis of the pharynx. *Experimental Parasitology*. 1993; 77: 88 – 96
- Gill JH, Redwin JM, Van Wyk JA, Lacey E. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. 1991; 2: 771 – 776
- Kotze AC, Le Jambre LF, O'Grady J. A modified larval migration assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*, and drug screening with *Trichostrongylidae* parasites. *Veterinary Parasitology*. 2006; 137: 294 - 305
- Sangster NC. Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology*. 1999; 29: 115 – 124
- Várady M, Čorba J. Comparison of six *in vitro* tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. *Veterinary Parasitology*. 1999; 80: 239 - 249
- Waller PJ, Dobson RJ, Donald AD, Griffiths DA, Smith EF. Selection studies on anthelmintic resistant and susceptible populations of *Trichostrongylus colubriformis* of sheep. *International Journal for Parasitology*. 1985; 15: 669 – 676

VIRULENCIA A MOBILNÉ GÉNOVÉ ELEMENTY U KURACÍCH *E. COLI*

Drugdová Z.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Náš výskum bol zameraný na odhalenie prítomnosti virulentných faktorov u 24 hydinových *E.coli* kmeňov izolovaných v priebehu rokov 2009 a 2010 z kuracieho mäsa a fekálií brojlerov pred porážkou a následnú detekciu prítomnosti mobilných génových elementov (integróny, transpozóny, plazmidy). Taktiež sme u spomenutých kmeňov vykonali plazmidovú typizáciu (Johnson, T.J. a kol., 2007). Vyšetřili sme 24 izolátov *E.coli* metodikou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) s využitím primerov virulentných génov *iutA*, *iss*, *cvaC*, *tsh*, *papC*, *kpsII*, *ibeA*, ďalej integrázových génov *Int1*, *Int2*, génových kaziet dfr (*IA a II*), *aad* (*aad*) a génov *sul*. Najväčší výskyt vykazoval u APEC virulentný gén *iss* a *iutA* a vôbec sa nevyskytoval *ibeA*. Najčastejšie sa vyskytujúca integráza je *Int1*, s génovými kazetami *dfr* (87%) a *aad* (79%), *Int2* sa vyskytovala len u jedného kmeňa. Z plazmidových typov prevládala u APEC Y (100%) a Inc11 (79%).

ÚVOD

Aviárne patogénne *E.coli* (APEC) sú známe ako nositelia veľkého počtu virulentných faktorov ako *iutA*, *iss*, *cvaC*, *tsh*, *papC*, *kpsII*, *ibeA*. (Delicato a kol., 2003). V odhade kvality potravín je odporúčaná kvantifikácia počtu *E.coli* buniek, a aj odhad prítomnosti virulentných faktorov a mobilných génových elementov. Rezistencia Gram-negatívnych organizmov na antibiotiká ako β -laktamázy, aminoglykozidy, trimetoprim a chloramfenikol je spôsobená prítomnosťou získaných génov, ktoré sú súčasťou mobilných génových elementov ako génové kazety (Hall a kol., 1998). Génové kazety sa môžu presúvať z alebo na špecifické receptorové miesto (*attI*) prostredníctvom integrónu, pričom integrácia či vyčlenenie kazety je katalyzovaná špecifickou rekombinázou *Int1*. Integróny triedy 1, ktoré obsahujú gény *sull* kódujúce rezistenciu na sulfonamidy, sú najčastejšie sa vyskytujúce medzi klinickými izolátmi rôznych druhov čeľade *Enterobacteriaceae* (Sallen a kol., 1995). Taktiež zaznamenávame u *Int1* pozitívnych izolátov častý výskyt *dfr* (dihydrofolát reduktáza) a *aad* (aminoglykozid adenyltransferáza) génov. Dôležitým prostriedkom horizontálneho transferu génov rezistencie sú aj konjugatívne R-plazmidy, ktoré môžu byť nositeľmi integrónov a transpozónov. Preto sa venuje v súčasnosti veľká pozornosť ich identifikácii a klasifikácii do inkompatibilných (Inc) skupín. Je tiež známe, že špecifické plazmidové typy sú spájané s virulenciou a rezistenciou (Carattoli a kol., 2005).

V tejto práci sme u vybraných kmeňov *E.coli* stanovili prítomnosť virulentných faktorov, génových kaziet a vykonali sme plazmidovú typizáciu.

MATERIÁL A METODIKA

Kultivácia a identifikácia baktérií. Vyšetřili sme 24 kmeňov *E.coli* (2009, 2010) a tampóny z povrchu mäsa mrazených kurčiat zo slovenských supermarketov a rektálne tampóny z brojlerových fariem boli resuscitované v peptónovej vode (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) a naočkované na McConkey agar (Oxoid). Identifikácia bola prevedená za pomoci agaru podľa Hajna (Imuna, Šarišské Michaľany, Slovensko), Uriselect agaru (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA), Entero testu 24 (Pliva-Lachema, Brno, Česká republika) a Maldy-Biotyperu (Bruker, USA).

Polymerázová reťazová reakcia. Skrining izolátov *E.coli* na prítomnosť APEC virulentných génov sme vykonali pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) amplifikáciou *iutA* – receptoru pre aerobaktín (annealingová teplota 63°C, amplikónová veľkosť 300bp), *cvaC* kolicínu V (63°C, 680bp), *kpsII* – kapsulárnej polysialicovej kyseliny (63°C, 272bp)

(Johnson a kol., 2000), *iss* – séra zvýšeného prežívania (61°C, 760bp), *tsh* – teplotne senzitivneho hemaglutinínu (55°C, 620bp) (Dozois a kol., 2000), *papC* – P fimbriálneho adhezínu (65°C, 328bp) (Le Bouguenec a kol., 1992), *ibeA* – invazívneho faktoru spôsobujúceho neonatálnu meningitídu (55°C, 814bp) (Moulin- Schouleur a kol., 2006). Skrining na prítomnosť integráz 1 a 2 bol vykonaný amplifikáciou *Int1* (annealingová teplota 62°C, amplikónová 483 bp), *Int2* (annealingová teplota 62 °C, amplikónová veľkosť 788 bp), skrining na prítomnosť génových kaziet *dfr*, *aadA* a génov *sul* 1, 2 (annealingová teplota 69 °C, amplikónová veľkosť 433 bp a 293 bp) a *sul3* (annealingová teplota 51°C, amplikónová veľkosť 990 bp). V plazmidovej typizácii sme použili primery troch replikónových panelov (Johnson, T.J. a kol., 2007). PCR bola prevedená v celkovom objeme 25 µl, pričom obsahovala 1 µ DNA vzorky, obidva primery po 20 pmol, štyri deoxynukleotidové trifosfáty každý po 200 µmol·l⁻¹, PCR pufo, 1.5 mmol·l⁻¹ MgCl₂, a 1U platinovej Taq DNA polymerázy (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Teplotný program pozostával z dentaruácie pri 94°C na 5 minút, 30 cyklov pri 94°C na 1 minútu, z annealingovej teploty špecifickej pre každý primer na 1 minútu a z 74°C teploty na záver po dobu 1 minútu v termocykleri C1000 (Bio-Rad Laboratories). Amplifikované DNA fragmenty boli separované na 1% agarózovom géli a farbené s Gold View farbivom na nukleové kyseliny (SBS Genetech, Beijing, Čína). Ako štandard molekulárnej hmotnosti sme použili 100bp ladder (Invitrogen).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

U hydínových izolátov *E.coli* sme zaznamenali najvýraznejší výskyt virulentných génov *iss*, *iutA*, *tsh* a *kpsII* (Tab.1).

Tab. 1 Frekvencia virulentných génov u 24 hydínových izolátov

Virulentné faktory	hydínové <i>E.coli</i>
<i>Iss</i>	22/24 (91%)
<i>iutA</i>	12/24 (50%)
<i>cvaC</i>	1/24 (4%)
<i>Tsh</i>	4/24 (16%)
<i>papC</i>	2/24 (8%)
<i>kpsII</i>	4/24 (16%)
<i>ibeA</i>	0

Typický APEC patotyp obsahuje rôzne gény kódujúce Fe transportéri, ako *irp2*, *fyuA*, *iutA*, *iroN* a *sitA* ako aj plazmidové gény, vrátane *cvi/cvaC*, *tsh* a *iss* (Rodriguez-Siek a kol., 2005). Veľmi rozšírenou črtou aviárnych *E.coli* kmeňov je ich rezistencia na sérum (*iss*), čím sa odlišujú virulentné od nevirulentných (Foley a kol., 2000). Ako vidno v tabuľke 2, potvrdilo sa, že integrázy 1 sú najčastejšie sa vyskytujúcimi (87%) u Gram-negatívnych izolátov. Ako uvádza výskum Kanga (Kang a kol., 2005), až u 54% *E.coli* sa vyskytoval integrón 1. triedy. Integrón 1 (Lee a kol., 2006) je nositeľom viacerých génov rezistencie ako *dfr* (rezistencia na trimetoprim) a *aad* (rezistencia na aminoglykozidy), čo sa potvrdilo aj našim výskumom na prítomnosť génových kaziet *dfr* (87%) a *aad* (79%). Integráza 2 sa vyskytovala len u jedného kmeňa, avšak za prítomnosti uvedených kaziet, čo indikuje voľný pohyb kaziet medzi integrónmi. Zaznamenali sme tiež vysoký výskyt génov *sul* kódujúcich rezistenciu na sulfonamidy, taktiež viazaných na *Int1*, menovite *sul1* (75%), *sul2* (87%). Plazmidová typizácia založená na inkompatibilných replikónových typoch je relatívne nová metodika (Carattoli a kol., 2005) a tak zatiaľ nie sú úplne zrejmé súvislosti medzi výskytom jednotlivých plazmidových typov, rezistencie a virulencie u APEC. Najčastejšie sa

vyskytujúcim plazmidovým typom APEC (Johnson a kol., 2007) je Frep a IncFIB, ďalej IncI1, IncFIIA, Inc B/O. U našich APEC sa však najčastejšie vyskytoval replikón Y (100%), IncI1 (79%), Frep (25%), IncF1A (25%) a najmenej IncB/O (12%). Plazmidový typ Y a IncI1 môže mať súvislosť s výskytom virulentných faktorov rezistencie ako aj s prítomnosťou integrónu 1, čo bude treba podrobiť širšiemu výskumu.

Tab.2 Výskyt integráz, génových kaziet a replikónov u virulentných APEC.

Kmeň	<i>Int1</i>	<i>Int2</i>	<i>dfrA</i>	<i>dfrB</i>	<i>sul3</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>aad</i>	Panel1	Panel2	Panel3
5	+	-	+	-	-	+	+	+	-	Y	I1
6	+	-	+	-	-	+	+	+	-	Y	I1
7	+	-	+	-	-	+	+	+	-	Y	I1
8	+	-	+	-	-	+	+	+	-	Y	I1
9	+	-	+	-	-	+	+	+	-	Y	I1
10	+	-	+	-	-	+	+	+	-	Y	I1
11	+	-	+	-	-	+	+	+	-	Y F1A	I1
13	+	-	+	-	-	+	+	+	-	Y	I1
14	+	-	+	-	-	+	+	+	-	Y	I1
15	-	-	+	-	-	-	+	-	-	Y F1A	I1
16	+	-	+	-	-	+	+	+	B/O	Y	I1
17	+	-	+	-	-	+	+	+	-	Y	I1
18	+	-	+	-	-	+	+	+	B/O	Y F1A	I1
19	-	+	+	-	-	-	+	+	B/O	Y	I1
20	+	-	+	-	-	+	+	+	-	Y	I1 Frep
21	+	-	+	-	-	+	+	+	-	Y	I1 Frep
23	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Y	I1
24	+	-	+	-	-	+	-	+	-	Y	I1
25	+	-	+	-	-	-	+	+	-	Y	Frep
26	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Y F1A	Frep
27	+	-	-	-	-	-	+	-	-	Y	-
28	+	-	+	-	-	+	+	+	-	Y	I1
29	+	-	-	-	-	-	+	-	-	Y F1A	Frep
30	+	-	+	-	-	-	+	-	-	Y F1A	Frep

U našich slovenských hydínových vzoriek sme u *E.coli* objavili virulentné gény príbuzné aviárnym patogénnym, alebo humánnym uropatogénnym *E.coli*. Predávané potraviny môžu byť dôležitým nositeľom rozširujúcim virulentné *E.coli* (Krasenicsová a kol., 2006). Potvrdili sme prítomnosť integrázy 1 u všetkých vzoriek a takisto vysoký percento rezistentných génových kaziet a génov. Plazmidové typy, ktoré sa vyskytovali u APEC (Y, B/O), majú priamy vzťah s chloramfenikolovou, amoxicilínovou rezistenciou (Lindsey a kol., 2011) a výskytom virulentných faktorov.

POĎAKOVANIE

Tento výskum bol podporený slovenskými grantmi LPP 0045-09 a VEGA 2/0012/08.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Carattoli A., Bertini A., Villa L., Falbo V., Hopkins KL., Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol M. 2005;63:219-228.

- Delicato ER, Guimaraes de Britto B, Gaziri LCJ, Vidott MC. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterin Microbiol.* 2003; 94:97-103.
- Dozois CM, Dho-Moulin M, Brée A, Fairbrother JM, Desautels C, Curtiss III R. Relation between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infect Immunity.* 2000; 68:4145-4154.
- Foley SL, Horne SM, Giddings CW, Robinson M, Nolan LK. Iss from a virulent avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases.* 2000; 44:185-191.
- Hall RM., Collis CM. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria:the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat.* 1998;1:109-119.
- Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Diesases.* 2000; 181:261-272.
- Johnson TJ., Wannemuehler YM., Johnson SJ., Catherine ML., White DG., Doetkott C., Nolan LK. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73:1976-1983.
- Krascenicsová K, Kačlíková E, Pangallo D, Siekel P, Girotti S, Kuchta T. Detection of *Salmonella enterica* in food on the next day after the sample collection using 5'-nuclease polymerase chain reaction with end-point fluorimetry. *J Food Nutr Res.* 2006; 45:30-33.
- Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa* and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clinic Microbiol.* 1992; 30:1189-1193.
- Lee JCh., Kang HY., Oh JY., Jeong JH., Kim J., Seol SY., Cho TD., Lee YCh. Antimicrobial resistance and integrons found in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy humans. *J Bacteriol Virol.* 2006;36:133-139.
- Lindsey RL., Frye JG., Thitaram SN., Meinersmann RJ., Fedorka-Cray PJ., Englen MD. Characterisation of multidrug-resistant *Escherichia coli* by antimicrobial resistance profiles, plasmid replicon typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Microb Drug Resist.* 2011;17:157-163.
- Moulin-chouleur M, Schouleur C, Tailliez P, Mu-Rong Kao-Bree A, Germon P, Oswald E, Mainil J, Blanco M, Blanco J. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J Clinic Microbiol.* 2006; 44:3484-3492.
- Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. *Veter Research.* 2005; 36:241-256.
- Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Mabilat C. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Microb Drug Resist.* 1995;1:195-202.

VYUŽITIE MOLEKULÁRNYCH METÓD NA RÝCHLU ANALÝZU GENETICKEJ VARIABILITY DREVOKAZNÝCH HŮB

Dubíková K.¹, Júdová J.², Gáper J.³, Pristaš P.^{2,4}

¹Univerzita P.J Šafárika v Košiciach, Katedra biochémie, Košice,

²Univerzita Mateja Bela, Katedra biológie a ekológie, Banská Bystrica,

³Technická univerzita vo Zvolene, Katedra Biológie a všeobecnej ekológie, Zvolen,

⁴Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4-6, Košice

ABSTRAKT

V práci sme študovali genetickú variabilitu drevokazných húb (*Fomes fomentarius*, *Daedaleopsis confragosa/tricolor*, *Inonotus hispidus*), pochádzajúcich z chránených oblastí Vihorlatských vrchov. Na štúdium genetickej variability sme použili analýzu ITS (internal transcribed spacer) sekvencií ribozomálneho RNA operónu. Naše výsledky potvrdzujú, že PCR amplifikácia ITS sekvencií a následne štiepenie získaných amplikónov predstavuje rýchlu a spoľahlivú metódu na rozlíšenie a detekciu genotypov. Použitím restričných endonukleáz BseNI (*F. fomentarius*), HaeIII (*D. confragosa*) a MboI (*I. hispidus*) sme dokázali jednoznačne určiť, či sa u študovaných druhov vyskytuje genetická variabilita.

ÚVOD

Významný podiel na súčasnom nepriaznivom zdravotnom stave lesa majú aj ochorenia hubového pôvodu. Pôsobením rôznych hubových patogénov dochádza v lesoch na Slovensku v období posledných rokov k odumretiu 200 až 400 tis. m³ drevnej hmoty ročne (Leontovyč, Kunca 2007). Huby sú jednobunkové až mnohobunkové organizmy. Niektoré sú podobné rastlinám, na druhej strane však na rozdiel od rastlín využívajú ako zdroj uhlíka a energie organické látky rovnako ako živočíchy. Tvoria samostatnú ríšu – Fungi (Števlíková a kol., 2002).

Identifikácia húb je založená predovšetkým na analýze a porovnaní morfológických znakov. Taxonomické a fylogenetické klasifikácie húb založené výhradne na porovnávaní morfológických znakov sú však v súčasnosti spochybňované dostupnosťou rozširujúcich sa molekulárnych dát. Počas posledných pätnástich rokov, zaznamenali molekulárno-biologické praktiky využívané k identifikácii organizmov výrazný vzostup. Najmä metódy využívajúce zmoženie vhodných DNA sekvencií pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) s následnou analýzou polymorfizmu dĺžky restričných fragmentov (RFLP). Ako cieľové miesto pre túto analýzu a následnú identifikáciu druhov sa využívajú rDNA gény (Borneman, Hartin, 2000, Schabereiter-Gurtner a kol., 2001) a väčšina štúdií bola zameraná na tzv. ITS sekvencie (Internal Transcribed Spacer). Tento postup je dnes široko využívaný na identifikáciu mnohých eukaryotických organizmov, vrátane húb (Hopple, Vilgalys, 1994, Wesselink, 2002).

Cieľom tejto štúdie bolo analyzovať vnútrodruhovou variabilitu drevokazných húb (*Fomes fomentarius* (L.) J. Kickx, *Daedaleopsis confragosa* (Bolton) J. Schröt, *Inonotus hispidus* (Bull.) P. Karst.) pochádzajúcich z chránených oblastí Vihorlatských vrchov na základe dostupných ITS sekvencií.

MATERIÁL A METODIKA

DNA izolácia: Genomovú DNA sme získali izoláciou využívajúcou mierne upravenú metodiku podľa Goodwina a Lee (1993). Asi k 100 mg tkaniva rozsuspendovaného v 300 ml lyzačného roztoku a následne vystaveného dvom mikrovlnným impulzom (800 W po dobu 5 sekúnd) sme pridali 600 ml čerstvého lyzačného roztoku a inkubovali 2 minúty pri 98°C. Po ochladení sme pridali proteinázu K v konečnej koncentrácii 5 mg/ml a inkubovali 1 hodinu pri 55° C. Získanú DNA sme opakovane prečistili pomocou zmesi chloroform-

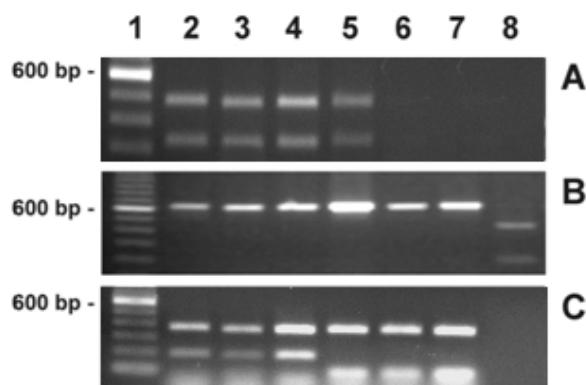
izoamylalkohol (24:1) a podrobili elektroforetickej analýze v 0,8 % agarózovom géli.

ITS-RFLP analýza. Pre amplifikáciu ITS sekvencií z jednotlivých izolátov sme použili sadu špecifických primérov ITS1 a ITS4. Reakčná zmes (50 μ l) pozostávala z 200 μ M dNTP, primérov v koncentrácii 1 μ M, Taq DNA polymerázy 1.25 U (Invitrogen, Paisley- UK), 5 μ l 10x PCR buffer (Invitrogen, Paisley- UK), 2 mM MgCl₂ a 50 ng templátovej DNA.

Získané amplikóny sme podrobili restriktkej analýze. V samostatnej reakcii sme 10 μ l PCR produktu štiepili po dobu 2 hodín vybranými endonukleázami za podmienok odporúčaných výrobcom (Fermentas GmbH, Germany). DNA fragmenty sme oddelili elektroforeticky v 1,5% agarózovom géle v porovnaní s 100 bp markerom molekulových veľkostí (Invitrogen).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Predpokladá sa, že ríša húb zahŕňa približne 250 000 druhov. Drevokazné huby tvoria jedinečnú skupinu húb, ktorých substrátom je drevná hmota. Zhoršujú mechanické vlastnosti dreva a dôsledkom napádania môže dôjsť napríklad k zlomeniu zdanlivo zdravého stromu. Rozšírený výskyt drevokazných húb má neblahý ekonomický vplyv na produkciu dreva a v súčasnosti nie je známy účinný spôsob ochrany drevenín voči týmto škodcom. Teda ich bližšia charakterizácia môže v budúcnosti významne napomôcť pri ochrane stromov. V práci sme na štúdium genetickej variability drevokazných húb použili analýzu ITS (internal transcribed spacer) sekvencií ribozomálneho RNA operónu. PCR amplifikáciou ITS sekvencií sme získali amplikóny požadovanej veľkosti, ktoré sme podrobili restriktkej analýze (Obrázok 1.).



Obrázok 1.: Profily štiepenia ITS sekvencií izolátov restriktčnými endonukleázami: *Inonotus hispidus* - MboI (panel A), *Fomes fomentarius* - BseNI (panel B) a *Daedaleopsis confragosa* -HaeIII (panel C)

U prvého, taxonomicky veľmi náročného rodu *Inonotus* s mnohými nie vždy platne popísanými druhmi, naša analýza ukázala, že v rámci druhu *Inonotus hispidus* kde nebola pozorovaná významná morfológická variabilita, RFLP analýza s použitím restriktkej endonukleázy MboI nepreukázala ani žiadnu genetickú variabilitu (Obrázok 1. panel A). Na základe týchto výsledkov môžeme konštatovať, že druh *Inonotus hispidus* je dobre separovaný a popísaný.

Fomes fomentarius parazituje na listnatých drevinách celom miernom pásme severnej pologule (Schmidt, 2006) a už dlhšiu dobu sa diskutuje o tom, či izoláty z rôznych častí Európy vykazujú genetickú variabilitu, keďže podľa Schwarza (Schwarze,1994) tento druh existuje vo viacerých formách v závislosti od hostiteľa. Vo veľkej časti Európy je to buk, ale vo Veľkej Británii väčšinou breza a v oblastiach stredozemného mora rôzne druhy duba a topoľa (Schwarze, 1992). Použitím restriktkej endonukleázy BseNI sme dokázali jednoznačne rozlíšiť dva genotypy u morfológicky inak zhodných izolátov *F. fomentarius* (Obrázok 1. panel B.), čo sme následne potvrdili sekvenčnou analýzou. Porovnanie sekvencií preukázali genetickú nehomogenitu *F. fomentarius*, a prítomnosť dvoch genotypov v rámci

tohto druhu. Izoláty patriace genotypu A pochádzali prevažne z buka, zatiaľ čo izoláty genotypu B z iných hostiteľov. Napriek tomu sme nepozorovali jednoznačnú hostiteľskú špecificitu jednotlivých genotypov. Pre overenie taxonomickej významnosti týchto rozdielov a vzťahov medzi nájdenými genotypmi sú potrebné ďalšie experimenty.

V prípade druhu *Daedaleopsis confragosa* sme sa pokúsili určiť, či pozorovaná morfológická variabilita je odrazom aj variability genetickej. Výrazne sfarbené jedince *D. confragosa* zaraďujú totiž niektorí autori do samostatného druhu *D. tricolor*, kým iní im priznávajú len status poddruhu či dokonca formy. Pomocou RFLP analýzy restričnou endonukleázou HaeIII sme potvrdili prítomnosť dvoch genotypov v rámci študovaných izolátov tohto druhu (Obrázok 1. panel C). Izoláty identifikované ako *D. tricolor* na základe morfológických znakov sa líšili od typických izolátov *D. confragosa* aj na molekulárnej úrovni. U *D. confragosa* je teda morfológická variabilita sprevádzaná aj variabilitou genetickej a sú potrebné ďalšie analýzy na určenie taxonomickej významnosti pozorovaných rozdielov.

Moderné molekulárno-biologické metódy významne napomáhajú štúdiu jednotlivých druhov a pomáhajú poukázať na nehomogénnosť určitého taxónu. Štúdium variability ITS regiónu je v dnešnej dobe najpoužívanejšou metódou pri analýze druhovej variability húb, a na základe týchto výsledkov v spojení s ďalšími metódami (štatistickými, metódami elektrónovej mikroskopie a.i.) môžeme následne rozlíšiť nové druhy (Pristaš, Gáperová, 2001).

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla za podpory grantu VEGA No. 1/0581/11.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Borneman, J., Hartin, R.J., PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples, *Appl. Env. Microbiol.* 2000; 66: 4356-4360
- Dubíková K., Júdová J., Gáper J., Pristaš P., Výskyt a rýchla detekcia genotypov *Fomes fomentarius* pomocou ITS-RFLP analýzy, *PREVEDA Zborník abstraktov* 2011; 5, ISBN 978-80-970712-0-2
- Goodwin, D.C., Lee, S.B., Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR, *Biotechniques* 1993; 15: 438, 441-442, 444
- Hopple, J.S.Jr., Vilgalys, R., Phylogenetic relationships among coprinoid taxa and allies based on data from restriction site mapping of nuclear rDNA, *Mycologia* 1994; 86: 96-107
- Leontovych, R. – Kunca, A., Výskyt najvýznamnejších hubových ochorení v lesoch Slovenska za obdobie posledných dvoch decénií. In: *Zpravodaj ochrany lesa – Aktuální problémy ochrany lesa* 2007, 14: 4 – 7. ISBN 978-80-86461-81-6; ISBN 978-80-02-01941-1
- Pristaš P., Gáperová S., K možnostiam využitia metódy PCR v mykológii. In: *Polymerázová reťazová reakcia a jej použitie v biologickom výskume a diagnostike*. Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice, 2001. ISBN 80-968618-0-8, s. 158- 163
- Schabereiter-Gurtner, C., Piňar, G., Lubitz W., Rölleke, S., Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic 18S rDNA sequence analysis. *J. Microbiol. Methods.* 2001, 47: 345-354
- Schmidt, O., *Wood and Tree Fungi. Biology, Damage, Protection, and Use*. Springer. Berlin - Heidelberg - New York, 2006
- Schwarze, F.W.M.R, Intraspecific variation in *Fomes fomentarius* from Great Britain and the European continent, MSc. Thesis, Univ. Reading, 1992
- Schwarze, F.W.M.R, Wood rotting fungi: *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Fr., *Mycologist* 1994, 8: 131-133
- Števlíková, T. a kol. 2002: *Mikrobiológia 2.časť*. SPU: Nitra, 2002, s. 156
- Wesselink, J.J., De La Iglesia, B., James, S.A., Dicks, J.L., Roberts, I.N. Rayward-Smith, V.J., Determining a unique defining DNA sequence for yeast species using hashing techniques, *Bioinformatics* 2002, 18: 1004-1010

VPLYV ZDRAVOTNÉHO STAVU NA ACIDOBÁZICKÚ ROVNOVÁHU A VYBRANÉ BIOCHEMICKÉ A HEMATOLOGICKÉ PARAMETRE V PERIOPERAČNOM OBDOBÍ U PSOV

Ďurej M., Ledecký V.

*Klinika malých zvierat, Oddelenie chirurgie, ortopédie, röntgenológie a reprodukcie, UVLF
Košice*

ABSTRAKT

Cieľom práce je vyhodnotenie acidobázickej a elektrolytovej rovnováhy a zistiť rozdielnosť týchto ukazovateľov medzi skupinami psov s rozdielnym zdravotným stavom a analýzu vybraných biochemických a hematologických ukazovateľov v perioperačnom období.

Práca bola vykonaná na skupine 20 vybraných psov. 3 psy štúdiu nedokončili. 17 psov bolo rozdelených do skupín ASA I., II., III. V perioperačnom období boli merané srdcová frekvencia, dychová frekvencia, rektálna teplota, vybrané parametre acidobázickej rovnováhy, biochemické (celkové bielkoviny, glukóza, P, Ca, K, laktát, Na, Cl) a hematologické (erytrocyty, hemoglobín, hematokrit, leukocyty) parametre analyzované z venóznej krvi. Na premedikáciu a sedáciu boli použité atropín (s alebo bez), butorfanol, medetomidín, diazepam. Na indukciu sme použili ketamín alebo propofol. Anestézia bola vo všetkých prípadoch vedená inhalačnou cestou za použitia zmesi izoflurán a kyslík. Parametre acidobázickej rovnováhy pri každej ASA skupine sme testovali pomocou jednocestného nepametrickeho ANOVA testu (Friedmanov test) a parametre medzi ASA skupinami Kruskal – Wallisovým testom. Ako post-testy sme použili Dunnov mnohonásobný porovnávací post-test. Zistili sme významnú dynamiku pri hodnotách pH pre ASA I. ($P < 0,001$), ASA II. ($P < 0,01$), ASA III. ($P < 0,01$). Významne bolo pH zmenené medzi ASA II. a ASA III. postoperačne ($P < 0,05$). Hodnoty $PvCO_2$ mali významnú dynamiku pri všetkých skupinách ($P < 0,001$; $P < 0,001$; $P < 0,05$). Aktuálny bikarbonát bol významne zmenený pri skupine ASA II. ($P < 0,05$). Významnosť zmien sa prejavila aj pri hodnote BE v rámci ASA skupín a medzi ASA II. a III. po indukcii a intraoperačne ($P < 0,05$).

ÚVOD

Homeostatická regulácia v organizme predstavuje jeho relatívnu nezávislosť od vonkajšieho prostredia, pretože homeostatické mechanizmy sú schopné regulácie len v určitom rozmedzí. Pri pôsobení podnetov, ktoré presahujú možnosti homeostatickej regulácie, vzniká stres alebo choroba. Pri strese vznikajú len nešpecifické reakcie organizmu, pri chorobe sa objavujú nešpecifické a špecifické reakcie na poruchu homeostázy (Boďa a Surynek, 1990). Anestézia je obyčajne spojená s hypotenziou a hypotermiou, ktoré priamo ovplyvňujú kyslíkový a tekutinový metabolizmus. Anestetiká spôsobujú hypoxiu a acidózu, ktoré ovplyvňujú prebúdzanie z anestézie a majú tak fatálne dôsledky u kriticky chorých pacientov (Wilson, 1992). Analýza krvných plynov môže pomôcť stanoviť rôzne chorobné procesy a môže upresniť terapeutické postupy u kritických pacientov, ako je tekutinová terapia, kyslíková terapia, podávanie elektrolytov alebo umelá pľúcna ventilácia (Mathews, 2006). Arteriálne krvné plyny primárne poskytujú informácie o oxygenácii, ventilácii a stave acidobázickej rovnováhy (Ilkiw a kol., 1991). Venózne krvné plyny môžu poskytovať informácie o stave acidobázickej rovnováhy a ventilácii (Haskin, 2004). Existuje niekoľko rozdielov medzi hodnotami arteriálnych a venózných krvných plynov. Hodnota pH získaná z venóznej krvi ukazuje nižšie hodnoty ako v arteriálnej krvi. Venózný parciálny tlak CO_2 a koncentrácia bikarbonátu (HCO_3) sú v porovnaní s arteriálnou krvou vyššie (Slanina a kol., 1992). Tekutinová a elektrolytová nerovnováha sa často vyskytujú v podobe mnohých ochorení a vyžadujú vyhodnotenie stavu pacienta. Ochorenia, ktoré zahŕňajú gastrointestinálny trakt, obličky a endokrinný systém, často spôsobujú abnormality v sodíkovej, draslíkovej

a vápnikovej rovnováhe a na terapiu a udržanie ich homeostázy si vyžadujú presné vyhodnotenie.

MATERIÁL A METODIKA

Práca bola vykonaná na skupine 20 vybraných psov prijatých na Kliniku malých zvierat, Oddelenie chirurgie, ortopedie, röntgenológie a reprodukcie na UVLF v Košiciach za účelom operačného zákroku. Na základe anamnézy o prekonaných ochoreniach, predchádzajúcej a súčasnej medikácii, zdravotnom stave, BCS (*body condition score*, stupne 1-5) a údajoch zahŕňajúcich nacionálne pacientov, boli psy rozdelení podľa klasifikácie definovanej Americkou spoločnosťou anesteziológov (ASA) do 5 kategórií – ASA I. až V.

Skupinu ASA I. tvorilo 6 pacientov, t.j. 4 suky a 2 psy s priemerným vekom 12 mesiacov (min. 7 mes., max. 24 mes.) a s priemernou hmotnosťou 25,3 kg (min. 5 kg, max 35 kg). U týchto psov bolo vykonaných 5 ortopedických operácií a 1 kastrácia s priemernou dĺžkou operačného zákroku 52 minút.

Skupinu ASA II. tvorilo 6 pacientov, t.j. 4 suky a 2 psy s priemerným vekom 99 mesiacov (min. 48 mes., max 132 mes.) a s priemernou hmotnosťou 26,3 kg (min. 12 kg, max. 40 kg). Boli vykonané 4 ortopedické operácie, 1 amputácia a 1 stomatologické ošetrenie s priemernou dĺžkou operačného zákroku 46 minút.

Skupinu ASA III. tvorilo 5 pacientov, t.j. 4 suky a 1 pes s priemerným vekom 138 mesiacov (min. 96 mes., max. 162 mes.) a s priemernou hmotnosťou 22 kg (min. 12 kg, max. 35 kg). Boli vykonané 4 extirpácie nádorov a 1 ortopedická operácia s priemernou dĺžkou operačného zákroku 95 minút.

Skupinu ASA IV. tvoril 1 pacient a skupinu ASA V. tvorili 2 pacienti.

Skupiny ASA IV. a V. pre nízky počet pacientov neboli v rámci analýzy akceptované.

Merané parametre:

Srdcová frekvencia, dychová frekvencia, rektálna teplota boli merané predoperačne, po sedácii, po indukcii celkovej anestézie, intraoperačne v intervale 10 minút a 120 minút po skončení operačného zákroku.

Krvné plyny a acidobáza vo venóznej krvi [pH, parciálny tlak CO₂, aktuálny bikarbonát - HCO₃, Base excess (BE)] boli merané predoperačne, po sedácii, po indukcii celkovej anestézie, intraoperačne v intervale 30 minút a 120 minút po skončení operačného zákroku.

Biochemické parametre vo venóznej krvi (sérová koncentrácia glukózy, celkových bielkovín, sodíka, draslíka, chloridov, fosforu, vápnika a laktátu) a hematologické parametre vo venóznej krvi (počet erytrocytov a leukocytov, koncentrácia hemoglobínu, hodnota hematokritu) boli merané predoperačne, po indukcii celkovej anestézie, intraoperačne v intervale 30 minút a 120 minút po skončení operačného zákroku.

Krvné plyny a acidobáza boli merané na analyzátore ABL Radiometer Copenhagen, biochemické parametre na analyzátore Cobas C 111 Roche a hematologické parametre pomocou mikroskopu a Bürkerovej komôrky. Monitoring bol zabezpečený monitorom životných funkcií Mindray 3000 PM Vet.

Anesteziologický protokol:

Na premedikáciu a sedáciu boli použité atropín (s alebo bez), butorfanol, medetomidín, diazepam. Na indukciu sme použili ketamín alebo propofol. Dávkovanie a použité sedatíva a anestetiká boli prispôbené individuálnym požiadavkám pacientov. Anestézia bola vo všetkých prípadoch vedená inhalačnou cestou za použitia zmesi izoflurán a kyslík. Infúzna terapia bola zabezpečená 0,9 % fyziologickým roztokom pri dávkovaní 5-10 ml/kg/hod.

Analyzovali sme parametre acidobázickej rovnováhy v rámci jednotlivých ASA skupín v nami sledovanom období pomocou jednocestného neparametrického ANOVA testu (Friedmanov test) a porovnávali jednotlivé parametre medzi skupinami ASA s využitím jednocestného neparametrického ANOVA testu (Kruskal-Wallisov test) a v oboch prípadoch

sme použili Dunnov porovnávací post-test. V rámci skupiny pacientov sme pre každé ASA skupiny stanovili priemernú hodnotu a štandardnú odchýlku ($x \pm SD$). Výsledky sú uvedené v tabuľke. (Tab. 1)

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tab. 1 Dynamika vybraných parametrov acidobázickej rovnováhy v perioperačnom období.

pH	predoperačne	sedácia	indukcia	30 min.	postoperačne	F
ASA I.	7,38±0,04 ^{a 1,2}	7,36±0,03 ^{a3}	7,25±0,07 ^{a 1}	7,19±0,04 ^{a2,3}	7,36±0,05	P < 0,001
ASA II.	7,41 ±0,05 ^{a 4}	7,35±0,02 ^{a5}	7,30 ± 0,05	7,26 ±0,04 ^{a4,5,6}	7,36 ±0,05 ^{a 6}	P < 0,01
ASA III.	7,37±0,08 ^{a 7}	7,33±0,06	7,23±0,03	7,20±0,07 ^{a 7}	7,30±0,03	P < 0,01
K-W	ns	ns	ns	ns	P<0,05*	-
PvCO₂						
ASA I.	37,9±6,3 ^{b 1}	36,8±2,5 ^{b 2}	51,5±8,3	61,1±9,7 ^{b 1,2,3}	39,9±8,2 ^{b 3}	P < 0,001
ASA II.	37,1±3,7 ^{b 4}	40,4±2,3 ^{b 5}	49,9±6,2	54,5±5,1 ^{b 4,5,6}	41,8±3,7 ^{b 6}	P < 0,001
ASA III.	34,2 ± 8,7	37,5 ± 12,4	47,7 ± 7,2	50,3 ± 6,1	41,9 ± 7,7	P < 0,05
K-W	ns	ns	ns	ns	ns	-
HCO₃						
ASA I.	22,5±1,9	21±1,5	21,8±2,3	23±1,5	22,5±2,3	ns
ASA II.	23,2±1,2	21,8±1,8	23,8±1,2	23,7±0,8	22,7±1	P < 0,05
ASA III.	20,8±4,6	19±4	19,6±3,6	17,8±3	20,6±4,6	ns
K-W	ns	ns	ns	ns	ns	-
BE						
ASA I.	-2±1,4 ^{c 1,2}	-3,7±1,6	-5,6±3 ^{c 1}	-6,5±1,5	-2,7±1,5	P < 0,01
ASA II.	-0,7±1,9 ^{c 3}	-2,7±1,7	-2,7±1,7	-4±1,3 ^{c 3}	-1,8±0,4	P < 0,05
ASA III.	-2,4±3,5 ^{c 4}	-6±2,2	-7,8±3,1	-9,4±3,4 ^{c 4}	-4,8±1,9	P < 0,01
K-W	ns	ns	P < 0,05	P < 0,05	ns	-

ns – štatisticky nevýznamné, F – Friedmanov test, K-W – Kruskal-Wallisov test

Na štatistickú významnosť porovnania v rámci rovnakej skupiny podľa Dunnovho porovnávacieho post-testu poukazujú nasledujúce číselné indexy (Tab. 1): a 1 – P < 0,05; a 2 – P < 0,01; a 3 – P < 0,05; a 4 – P < 0,01; a 5 – P < 0,05; a 6 – P < 0,05; a 7 – P < 0,01; b 1 – P < 0,01; b 2 - P < 0,05; b 3 – P < 0,05; b 4 – P < 0,01; b 5 – P < 0,05; b 6 – P < 0,05; c 1 – P < 0,05; c 2 – P < 0,01; c 3 – P < 0,05; c 4 – P < 0,001

V nami sledovanom časovom horizonte sme pozorovali štatisticky veľmi významný pokles pH, ktorého hodnota sa v postoperačnom období vrátila do fyziologického rozmedzia. Medzi skupinami ASA, pH nemalo významné rozdiely. Dynamika PvCO₂ po premedikácii a indukcii celkovej anestézie stúpala s úpravou v postoperačnom období. Podávanie medetomidínu a butorfanolu je charakteristické významným, na dávke závislým, zvýšením PaCO₂ a zníženým PaO₂ a pH (Kuo a Keegan, 2004; Lerche a Muir, 2004). Štatisticky významný rozdiel (P < 0,05) sme pozorovali pri hodnote BE medzi ASA II. a III. v čase po indukcii a 30. minúte odberu a tak isto pri hodnote pH medzi ASA II. a III. postoperačne. Pri perioperačnom podávaní tekutín obsahujúcich fyziologické koncentrácie sodíka a aniónov (obyčajne chloridov) sa vyvíja tzv. dilučná metabolická acidóza (Prough a White, 2000). Tekutinová terapia počas anestézie môže potenciálne spôsobiť zníženie koncentrácie celkových bielkovín v plazme a ovplyvniť acidobázickú rovnováhu. Alkalémia spôsobuje hypoproteinémiu a acidémia hyperproteinémiu (Valverde, 2008). V každej skupine pacientov bola pozorovaná hypoproteinémia a v ASA III. aj hyperproteinémia. Hyperglykémia bola pozorovaná u všetkých skupín. Anestetiká, ako sú ketamín, alfa 2-agonisti a opioidy vrátane morfinu spôsobujú prechodnú hyperglykémiu (Knieriem a kol., 2007). V ASA I. skupine bola pozorovaná hyperfosfatémia. Mladé zvieratá majú vyššie hladiny fosforu. Hyperfosfatémia

môže byť sprevádzaná hypomagneziémiou, hypernatrémiou a metabolickou acidózou (Crook, 1994; Shiber a Mattu, 2002). Žiadne štúdie doposiaľ neobjasňujú efekt celkovej anestézie na sérovú koncentráciu vápnika u malých zvierat. Najvýraznejší pokles sérovej koncentrácie vápnika sme zaznamenali pri ASA III. Koncentrácia laktátu bola zvýšená pri všetkých skupinách. Ako príčinu možno uviesť systémovú alebo lokálnu hypoperfúziu, hypoxémiu alebo anémiu (Hughes, 1999). Koncentrácia hemoglobínu a hodnota hematokritu bola pri všetkých skupinách znížená. V štúdiu, ktorú vykonal Valverde a kol. (2008), bola koncentrácia celkových bielkovín, hemoglobínu a hodnota hematokritu významne znížená po 1 hodine intravenózne aplikácie tekutín v objeme 10 ml/kg. V tejto štúdiu bola významne zvýšená koncentrácia draslíka. Mierna anémia sa vyskytla pri všetkých skupinách pacientov. Anémia môže byť spôsobená znížením produkcie erytrocytov, hemolýzou, akútnou stratou krvi alebo kombináciou týchto faktorov (Brugnara, 2003).

Tab. 2 Zmeny hodnôt biochemických a hematologických parametrov u ASA skupín.

parameter	Skupina ASA I.	Skupina ASA II.	Skupina ASA III
Celkové bielkoviny (TP)	↓ 16,6 %	↓ 33,3%	↓ 20 % (1 pacient) ↑ 20 %
Glukóza	↑ 100 %	↑ 83,3 %	↑ 100 %
Fosfor	↑ 33,3 %	↓ 33,3 %	↓ 20 %
Vápnik	↑ 16,6 %	↓ 50 %	↓ 80 %
Draslík	↓ 16,6 %	↓ 33,3 % ↑ 16,6 %	↓ 40 % ↑ 20 %
Laktát	↑ 33,3 %	↑ 16,6 %	↑ 80 %
Sodík	↓ 66,6 %	↓ 83,3 %	↓ 60 % ↑ 20 %
Chlór	↓ 66,6 %	↓ 50 %	↓ 60 %
Erytrocyty	↓ 16,6 %	↓ 33,3 %	↓ 60 %
Hemoglobín	↓ 83,3 %	↓ 83,3 %	↓ 60 %
Hematokrit	↓ 16,6 % ↑ 16,6 %	↓ 33,3 % ↑ 33,3 %	↓ 40 % ↑ 20 %
Leukocyty	↓ 33,3 % ↑ 50 %	↓ 16,6 %	↓ 60 % ↑ 20 %

U 1 psa z ASA I. skupiny sa vyskytla predoperačne tachykardia a tachypnoe, čo môže byť príčinou mladého veku psa a bolestivosťou zlomenej stehnovej kosti. U ďalšieho psa bolo pozorované predoperačne tachypnoe a zvýšený 4. stupeň BCS. U skupiny ASA II. sa zistilo tachypnoe a hyperventilácia u 2 psov a u 1 psa mierna hypotermia od 40 minúty operačného zákroku. Príčiny hyperventilácie môžu byť hypoxémia, pľúcne ochorenia, bolesť, úzkosť alebo ako kompenzácia metabolickej acidózy (Johnson, 2008). V Skupine ASA III. mal 1 pes tachykardiu, 2 psy tachypnoe s hyperventiláciou predoperačne a 2 psy miernu hypotermiu, a to u 1 psa už po sedácii a u 2. psa od 120 minúty operačného zákroku. U 3 psov z piatich, u ktorých sa pozoroval zvýšený 4. stupeň BCS, sa vyskytla hypoventilácia a polypnoe. Syndróm hypoventilácie u obéznych ľudí je doprevádzaný letargiou, hypoventiláciou, hypoxiou a sekundárne polycytémiou (Johnston a kol., 2008).

POĎAKOVANIE

Práca vznikla s podporou projektu VEGA č. 1/0559/09.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Bod'a K, Surynek J. Patologická fyziológia hospodárskych zvierat. 1990: 58

- Brugnara C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. *Clinical chemistry*. 2003; 49 (10): 1573 – 8
- Crook M. Phosphate: an abnormal anion? *British journal of hospital medicine*. 1994; 52 (2): 200 – 3
- Haskin S. Interpretation of blood gas measurements. In: Lesley K.G a kol. *Textbook of respiratory disease in dogs and cats*. 2004: 181 – 193
- Hughes D. Lactate measurement: Diagnostic, therapeutic and prognostic implications. In: Bonagura J.D. Kirk's current veterinary therapy XIII. 1999: 112 – 6
- Ilkiw J.E a kol. A comparison of simultaneously collected arterial, mixed venous, jugular venous and cephalic venous blood samples in the assessment of blood-gas and acid-base status in the dog. *Journal of veterinary internal medicine*. 1991; 5 (5): 294 – 8
- Johnson R.A. Respiratory alkalosis: a quick reference. *Veterinary clinics North American small animal practice*. 2008; 38 (3): 427 – 430
- Johnston R.A a kol. Diet-induced obesity causes innate airway hyperresponsiveness to methacholine and enhances ozone-induced pulmonary inflammation. *Journal of applied physiology*. 2008; 104: 1727 – 1735
- Knierem M. a kol. Hyperglycemia in critically ill patients. *Compendium*. 2007; 6: 360 – 370
- Kuo W.C a Keegan R.D. Comparative cardiovascular, analgesic, and sedative effects of medetomidine, medetomidine-hydromorphone, and medetomidine-butorphanol in dog. *American journal of veterinary research*. 2004; 65: 931 – 7
- Lerche P a Muir W.W. Effect of medetomidine on breathing and inspiratory neuromuscular drive in conscious dogs. *American journal of veterinary research*. 2004; 65: 720 – 4
- Mathews K. Acid-base assessment. In: Mathews K. *Veterinary emergency and critical care manual*. 2.vydanie. 2006: 406 – 10
- Prough D a White R.T. Acidosis associated with perioperative saline administration: dilution or delusion? *Anesthesiology*. 2000; 93 (5): 1167 – 9
- Shiber J.R a Mattu A. Serum phosphate abnormalities in the emergency department. *Journal of emergency medicine*. 2002; 23 (4): 395 – 400
- Slanina L a kol. Dynamics of the acid-base balance of venous and arterial blood in clinically healthy calves. *Deutsche tierärztliche wochenschrif*. 1992; 99: 182 – 6
- Valverde A a kol. Effects of fluid therapy on total protein and its influence on calculated unmeasured anions in the anesthetized dog. *Journal of veterinary emergency and critical care*. 2008; 18 (5): 480–7
- Wilson D.V. Anesthesia for patients with diafragmatic-hernia and severe dyspnea. *Veterinary clinics North American small animal practice*. 1992; 22: 456 – 9

POROVNANIE CITLIVOSTI MIKROBIÁLNYCH INHIBIČNÝCH TESTOV NA STANOVENIE BETA-LAKTÁMOVÝCH ANTIBIOTÍK

Gondová, Z., Kožárová, I.

Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

ABSTRAKT

Predmetom našej štúdie bolo stanovenie detekčnej citlivosti dvoch mikrobiálnych inhibičných testov (MIT), a to screeningového testu na stanovenie rezíduí antibiotík (STAR) s použitím testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 a Nouws Antibiotic Testu (NAT) s testovacím kmeňom *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 na štyri látky zo skupiny beta-laktámových antibiotík: cloxacilín (CLX), oxacilín (OX), ampicilín (AMP) a amoxicilín (AMX). Detekčná citlivosť oboch metód bola hodnotená na základe stanovenia detekčného limitu metód (LOD) pre jednotlivé látky. Z pohľadu stanoveného maximálneho limitu rezíduí (MRL) bol CLX a OX testovaný v reziduálnej koncentrácii 100 – 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a AMP a AMX v reziduálnej koncentrácii 30 – 300 $\mu\text{g.l}^{-1}$. LOD metódy STAR pre CLX a OX bol 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a AMP a AMX 30 $\mu\text{g.l}^{-1}$. LOD NAT testu bol pre sledované látky na úrovni metódy STAR. Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať rovnakú detekčnú citlivosť testovacích kmeňov oboch metód na beta-laktámové antibiotiká. Metódou STAR a NAT testom boli všetky štyri látky zo skupiny beta-laktámových antibiotík detegované nielen na úrovni MRL, ale dokonca aj pod úrovňou MRL. V záujme ochrany zdravia ľudí je citlivosť mikrobiálnych inhibičných testov na úrovni MRL pri screeningu rezíduí nevyhnutná.

ÚVOD

Beta-laktámové antibiotiká tvoria širokú skupinu liečiv používaných v humánnej, ale aj veterinárnej medicíne. Ampicilín je považovaný za veľmi cenné antibiotikum, ktoré sa podáva pri močových infekciách, infekciách dýchacích ciest vyvolaných pneumokokmi, hemofilami alebo ich zmiešanej infekcii, infekciách žľových ciest, peritonitídach, sepsách a pod. Amoxicilín je veľmi blízky ampicilínu a má s ním v podstate aj rovnaké antimikrobiálne spektrum. Cloxacilín sa podáva hlavne pri infekciách vyvolaných stafylokokmi a spektrum účinku je zhodné s oxacilínom. Je vhodný na infekcie mäkkých tkanív. Spektrum účinku oxacilínu zahŕňa aj beta-hemolytické streptokoky a klostrídie (Neuschl, 2008). Výsledkom používania týchto liekov je však nevyhnutne prítomnosť ich rezíduí v živočíšnych tkanivách a potenciálne ohrozenie verejného zdravia.

Kontrola rezíduí veterinárnych liekov v živých zvieratách a živočíšnych produktoch je v Slovenskej republike legislatívne pokrytá zákonom Národnej rady Slovenskej republiky č. 39/2007 Z. z. o veterinárnej starostlivosti a nariadením vlády Slovenskej republiky č. 320/2003 Z. z. o monitorovaní určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a produktoch živočíšneho pôvodu v znení neskorších predpisov, ktorým sa do právneho systému Slovenskej republiky implementovala smernica Rady 96/23/ES.

Metódy používané za účelom úradnej kontroly rezíduí veterinárnych liekov v potravinách živočíšneho pôvodu musia spĺňať požiadavky ustanovené rozhodnutím Komisie 2002/657/ES, ktorým sa vykonáva smernica Rady 96/23/ES a stanovovať reziduá na príslušnej úrovni. „Príslušná úroveň“ je koncentrácia látky vo vzorke, ktorá je dôležitá na určenie jej zhody s právnymi predpismi, t. j. na úrovni MRL. Pod pojmom MRL sa rozumie maximálna koncentrácia rezíduí farmakologicky účinnej látky, ktorú možno povoliť v potravinách živočíšneho pôvodu. V záujme ochrany verejného zdravia sú nariadením Komisie (EÚ) č. 37/2010 stanovené MRL veterinárnych liečiv v potravinách živočíšneho pôvodu.

Rozsiahly screening rezíduí antimikrobiálnych látok v živočíšnych produktoch je bežne vykonávaný pomocou mikrobiálnych inhibičných testov. Princípom týchto metód je inhibícia rastu testovacieho kmeňa v prítomnosti inhibujúcej látky (rezídua) prejavujúca sa tvorbou inhibičných zón (IZ). Pre prvotný screening rezíduí sú v súčasnosti príslušným orgánom schválené nasledovné úradné metódy laboratórnej diagnostiky potravín, a to platňová metóda STAR a metódy liekovkové: PREMI[®]TEST, KALIDOS TB, MP a ECLIPSE 50.

Metóda STAR (CH 12.19, 2006) pozostáva z piatich testovacích platní. Každá z platní je citlivá na inú skupinu antibiotík: *Bacillus subtilis* BGA - aminoglykozidy, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 – makrolidy a beta-laktámové antibiotiká, *Bacillus cereus* ATCC 11788 – tetracyklíny, *Escherichia coli* ATCC 11303 – chinolóny a *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 – sulfónamidy a beta-laktámové antibiotiká. NAT test (Pikkemaat a kol., 2008) predstavuje nový testovací systém, rovnako pozostávajúci z piatich testovacích platní. Každá z platní je určená na stanovenie určitej skupiny antibiotík: *Bacillus cereus* ATCC 11778 – tetracyklíny, *Yersinia ruckeri* NCIM 13282 – chinolóny, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 – beta-laktámy a makrolidy, *Bacillus subtilis* BGA – aminoglykozidy, *Bacillus pumilus* CN 607 – sulfónamidy. Oba testy poskytujú skupinovo-špecifickú identifikáciu antibiotika, čo výrazne uľahčuje následný post-screening alebo chemickú confirmáciu. NAT test nepatrí medzi úradné metódy schválené pre stanovenie rezíduí antimikrobiálnych látok v produktoch živočíšneho pôvodu a na rozdiel od metódy STAR, testovacím kmeňom na stanovenie beta-laktámových antibiotík je *Kocuria rhizophila* ATCC 9341.

Vzhľadom na rozdielnosť testovacích kmeňov odporúčaných na stanovenie rezíduí beta-laktámových antibiotík v živočíšnych tkanivách sa prezentovaná práca zaoberá zhodnotením a porovnaním detekčnej citlivosti metódy STAR a NAT testu na beta-laktámové antibiotiká na základe experimentálneho stanovenia základného hodnotiaceho kritéria - LOD pre sledované beta-laktámové antibiotiká. LOD metód sme porovnávali s MRL stanovenými pre beta-laktámové antibiotiká nariadením Komisie (EÚ) č. 37/2010 (cloxacilín 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, oxacilín 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, ampicilín 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, amoxicilín 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).

MATERIÁL A METODIKA

Štandardné roztoky. Zásobné roztoky štandardov (1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) CLX (7081-44-9), OX (1173-88-2), AMP (69-52-3) a AMX (26787-78-0) zakúpených od Sigma Chemical Co. boli pripravené rozpustením 10 mg štandardu v 10 ml sterilnej deionizovanej vode. Pracovné roztoky boli pripravené ďalším riedením v sterilnej deionizovanej vode na výsledné koncentrácie 100; 200; 300; 400; 500 a 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pre CLX a OX a koncentrácie 30; 40; 50; 100; 200; 300 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pre AMP a AMX. Zásobný roztok trimetoprimu (TMP, 92131, Fluka) pri metóde STAR bol pripravený rozpustením 10 mg štandardu TMP v 1 ml 5 % kyseliny octovej a zriedený sterilnou deionizovanou vodou na koncentráciu 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Testovacie kmene a kultivačné médiá. STAR – *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 (Merck, 1.11499), testovací agar DST pH 7,4 (Oxoid, CM 261), NAT – *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (DSM 1794), testovací agar Iso-sensitest agar pH 8.0 (Oxoid).

Príprava kultivačných médií a testovanie štandardných roztokov. STAR – kultivačné médium bolo naočkované *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 s finálnou koncentráciou 5×10^6 spór. ml^{-1} . Médium obsahovalo 0,005 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ TMP, 1 ml roztoku TMP (0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) sa pridávalo do 100 ml média. Disky z filtračného papiera (Whatman No. 1, Ø 9mm) boli nasiaknuté 30 μl štandardných roztokov CLX, OX, AMP a AMX a aplikované na povrch agaru v Petriho miske. Platne sa inkubovali pri teplote 55 °C \pm 1°C 12-15 hodín. NAT – kultivačné médium bolo naočkované *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 v množstve 10^6 KTJ. ml^{-1} . Disky z filtračného papiera (Whatman 1, Schleicher&Schull 2668, Ø 12,7 mm) boli nasiaknuté 100 μl štandardných roztokov CLX, OX, AMP a AMX

a aplikovali sa do otvorov v agare s priemerom 14 mm vytvorených pomocou sterilného korkovrtu. K diskom sa pridával platňovo špecifický tlmivý roztok 1,5 M K₂HPO₄ v množstve 200 µl. Platne sa inkubovali pri teplote 37 °C ± 1 °C 16-18 hodín.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Rozhodnutie Komisie 2002/657/ES definuje detekčnú schopnosť (LOD) metódy ako najnižší obsah látky, ktorý môže byť vo vzorke detegovaný. Pri platňových MIT sa za LOD metódy považuje najnižšia koncentrácia sledovanej látky, ktorá inhibuje rast príslušného testovacieho kmeňa tvorbou IZ. Veľkosť IZ závisí od koncentrácie a typu antimikrobiálnej látky. Veľkosť IZ bola pri metóde STAR meraná od okraja papierového disku po vonkajší okraj IZ a pri metóde NAT bol meraný celý priemer IZ pomocou digitálneho posuvného meradla (Mitutoyo, Japonsko) s presnosťou na 0,1 mm.

Výsledky stanovenia LOD metódy STAR a NAT testu pre CLX, OX, AMP a AMX sú prezentované v Tabuľkách 1 – 4. Veľkosti IZ sú vyjadrené ako priemer ± smerodajná odchýlka (SD) ôsmich meraní (Microsoft Office Excel 2007).

Pri metóde STAR sme zaznamenali inhibíciu rastu testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 tvorbou IZ pri reziduálnej koncentrácii CLX a OX 100 µg.l⁻¹ (Tab. 1) a reziduálnej koncentrácii AMP a AMX 30 µg.l⁻¹ (Tab. 2). Uvedené reziduálne koncentrácie predstavujú LOD metódy STAR s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 pre sledované látky.

Tab. 1 Veľkosti IZ vytvorené reziduálnymi koncentraciami štandardu CLX a OX pri metóde STAR s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149

µg.l ⁻¹	100	200	300 (MRL)	400	500	1000
CLX	10,27±1,28	12,95±1,57	13,65±0,69	14,56±0,87	15,45±0,60	16,68±0,48
OX	16,23±1,21	16,68±1,19	16,01±0,58	15,35±0,51	15,78±0,62	16,57±0,55

Tab. 2 Veľkosti IZ vytvorené reziduálnymi koncentraciami štandardu AMP a AMX pri metóde STAR s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149

µg.l ⁻¹	30	40	50 (MRL)	100	200	300
AMP	4,96±0,52	5,31±0,48	7,33±0,49	8,96±0,92	11,09±0,87	10,95±0,81
AMX	11,43±1,0	12,23±1,07	13,19±0,73	13,88±0,84	14,43±0,99	16,37±1,17

Pri metóde NAT sme zaznamenali inhibíciu rastu testovacieho kmeňa *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 tvorbou IZ pri reziduálnej koncentrácii CLX a OX 100 µg.l⁻¹ (Tab. 3) a reziduálnej koncentrácii AMP a AMX 30 µg.l⁻¹ (Tab. 4). Uvedené reziduálne koncentrácie predstavujú LOD metódy NAT s testovacím kmeňom *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 pre sledované látky.

Tab. 3 Veľkosti IZ vytvorené reziduálnymi koncentraciami štandardu CLX a OX pri metóde NAT s testovacím kmeňom *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

µg.l ⁻¹	100	200	300 (MRL)	400	500	1000
CLX	32,62±1,42	35,65±2,35	34,69±1,14	34,41±1,70	34,87±1,53	34,84±1,16
OX	32,73±3,12	32,94±1,56	34,24±1,49	34,14±0,81	33,12±1,17	34,45±1,50

Tab. 4 Veľkosti IZ vytvorené reziduálnymi koncentraciami štandardu AMP a AMX pri metóde NAT s testovacím kmeňom *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

µg.l ⁻¹	30	40	50 (MRL)	100	200	300
AMP	31,75±2,41	32,27±1,5	33,06±1,06	33,49±1,72	30,29±1,67	28,53±0,39
AMX	33,76±2,21	35,06±0,7	35,62±0,715	36,05±1,24	33,41±2,9	34,37±1,04

Z pohľadu MRL stanovených pre jednotlivé látky zo skupiny beta-laktámových antibiotík je možné konštatovať, že pri oboch MIT bola zaznamenaná detekčná citlivosť testovacích kmeňov na všetky sledované látky nielen v hladinách záujmu, ale dokonca v koncentráciách nižších, ako sú stanovené MRL..

Štúdia autorov Pikkemaat a kol. (2008) uvádza LOD NAT testu s testovacím kmeňom *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 pre OX 200 µg.l⁻¹, CLX 150 µg.l⁻¹, AMP 50 µg.l⁻¹ a AMX 75 µg.l⁻¹. Nami dosiahnuté výsledky poukazujú na nižšie LOD metódy NAT s testovacím kmeňom *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 pre všetky sledované látky zo skupiny beta-laktámových antibiotík.

V záujme ochrany zdravia spotrebiteľov je dôležité monitorovať rezíduá antibiotík v potravinách a surovinách živočíšneho pôvodu, vyvíjať nové metódy a zlepšovať už validované postupy. Obidve porovnávané screeningové metódy patria medzi platňové difúzne metódy, kde sa prítomnosť antimikrobiálnej látky prejaví vytvorením čirej zóny inhibície. Z vyššie uvedených výsledkov vyplýva, že testovacie kmene oboch MIT spoľahlivo zachytávali reziduálne koncentrácie štandardných roztokov beta-laktámových antibiotík pod úrovňou MRL stanovených pre dané liečivá. Môžeme teda konštatovať, že LOD metódy STAR a NAT sú vzájomne porovnateľné a obe tieto metódy sú vhodné pre screening rezíduí antibiotík v potravinách a surovinách živočíšneho pôvodu na príslušnej úrovni.

POĎAKOVANIE

Spracovanie príspevku bolo podporené grantom VEGA MŠ SR č. 1/0658/09.

POUŽITÁ LITERATÚRA

CH 12.19: Screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov (metóda STAR). Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív. In: Vestník MP SR, Doplnok č.1/2006, 38, 2006, s. 68-81.

NARIADENIE VLÁDY SLOVENSKEJ REPUBLIKY z 9. júla 2003 č. 320 o monitorovaní určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a v produktoch živočíšneho pôvodu. Zbierka zákonov č. 320/2003, čiastka 145, 2003, s. 2541-2585.

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 37/2010, o farmakologicky účinných látkach a ich klasifikácií, pokiaľ ide o maximálne limity rezíduí v potravinách živočíšneho pôvodu. Úradný vestník EÚ L 15/64, 2010, s. 1-72.

NEUSCHL, J. : Antibiotiká. In: ČONKOVÁ, E. a kol. :Veterinárska farmakológia I. diel 1. vyd. Košice : Viena s. r. o. 2008, s. 23, ISBN 978-80-8077-102-7.

PIKKEMAAT, M., G., OOSTRA-VAN DIJK, S., SCHOUTEN, J., RAPALLINI, M., VAN EGMOND, H., J. : A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening). Food Control, 19, 8, 2008, s. 781-789.

ROZHODNUTIE KOMISIE 2002/657/ES, ktorým sa implementuje smernica Rady 96/23/ES, ktorá sa týka uplatňovania analytických metód a interpretácie výsledkov. Úradný vestník EÚ L 221, 17. 8. 2002, s. 8-36.

SMERNICA RADY č. 96/23/ES z 29. apríla 1996 o opatreniach na monitorovanie určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a živočíšnych produktoch a o zrušení smerníc č. 85/358/EHS a č. 86/469/EHS a rozhodnutí č. 89/187/EHS a č. 91/664/EHS, Úradný vestník Európskych spoločenstiev L 125, 1996, s. 38.

ZÁKON NÁRODNEJ RADY SLOVENSKEJ REPUBLIKY č. 39/2007 Z. z. z 12. decembra 2006 o veterinárnej starostlivosti. Zbierka zákonov č. 39/2007, čiastka 28, s. 162-223.

ŠTANDARDIZÁCIA METÓDY qRT-PCR PRI ANALÝZE GÉNOVEJ EXPRESIE VYBRANÝCH CYTOKÍNOV U GNOTOBIOTICKÝCH PRASIAŤ

Chytilová M.¹, Tkáčiková L.¹, Nemcová R.²

¹Ústav imunológie, ²Ústav mikrobiológie a gnotobiológie, Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Metóda qRT-PCR účinne a citlivo deteguje a kvantifikuje akékoľvek zmeny v génovej expresii špecifického génu v bunkách alebo v tkanivách, a preto je v súčasnosti využívaná v mnohých *in vitro*, resp. *in vivo* experimentálnych štúdiách. Cieľom tejto práce bola optimalizácia podmienok metódy qRT-PCR, ktorú sme využili na analýzu vplyvu imunomodulačných látok typu laktobacilov a n-3 PNMK na zmeny v génovej expresii vybraných cytokínov v imunitnej odpovedi gnotobiotických prasiat infikovaných prostredníctvom ETEC. Štandardizácia qRT-PCR zahŕňala výber primerov vhodných pre túto metódu, otestovanie ich optimálnej koncentrácie a teplotných podmienok, ale aj prípravu kvalitných cDNA vzoriek, ktoré sú rovnako významným faktorom ovplyvňujúcim správnosť a objektivnosť kvantifikácie.

ÚVOD

K najvýznamnejším bakteriálnym infekciám postihujúcim ciciaky a odstavčatá patria v súčasnosti predovšetkým infekcie spôsobené enterotoxigénnymi kmeňmi *E. coli* (ETEC). Imunitnou odpoveďou organizmu na takýto typ infekcie je okrem iného aj zmena v génovej expresii pro-zápalových cytokínov a chemokínov. V *in vitro* podmienkach bola u prasiat konkrétne zaznamenaná zvýšená expresia cytokínov IL-1 α , IL-6, IL-12p35, TNF- α , IFN- γ , IL-10 a IL-13, ako aj chemokínov IL-8 a MCP-1, a to po stimulácii buniek rôznymi serotypmi ETEC kmeňov, prípadne prostredníctvom LPS (Raymond a Wilkie, 2005; Moue a kol., 2008; Pavlova a kol., 2008; Geens a Niewold, 2010). Zápal vyvolaný ETEC kmeňmi môže byť na druhej strane účinne potlačený aplikáciou vhodných imunomodulačných látok, ktoré naopak znižujú expresiu spomínaných cytokínov, a teda pôsobia protizápalovo. Naším cieľom bola optimalizácia podmienok metódy qRT-PCR v súvislosti s analýzou vplyvu laktobacilov a n-3 polynenasýtených mastných kyselín (n-3 PNMK) na zmeny v génovej expresii vybraných cytokínov u gnotobiotických prasiat infikovaných prostredníctvom ETEC K88 ENT⁻.

MATERIÁL A METODIKA

Experimentálne zvieratá: germ-free ciciaky (Yorkshire x Pietrain) získané metódou otvorenej hysterotómie, odchovávané v gnotobiotických izolátoroch, udržiavané ako bezkolostrálne (kŕmené autoklávovanou mliečnou náhradkou Senolac Ferkel)

Aplikované aditívum: vylisovaný ľanový olej z ľanového semena odrody Flanders s vysokým obsahom n-3 PNMK aplikovaný 1x denne per os v dávke 0,5 ml/deň/prasa, prvá dávka 24 h po operácii

Aplikované bakteriálne kmene: *Lactobacillus plantarum* (BiocenoLTM LP96) aplikovaný 1x denne per os v dávke 2 ml (1×10^9 .ml⁻¹), prvá dávka 24 h po operácii

Escherichia coli K88 ENT⁻ (bez enterotoxínu) na 5. deň života per os v dávke 1 ml (1×10^4 .ml⁻¹)

Schéma experimentu: germ-free ciciaky boli rozdelené do jednotlivých skupín: E – infekcia kmeňom ETEC K88 ENT⁻, EL – infekcia+aplikácia *L. plantarum*, EM – infekcia+aplikácia ľanového oleja, a ELM- infekcia+aplikácia *L. plantarum* a ľanového oleja. *L. plantarum*, resp. aditívum (ľanový olej) boli v jednotlivých skupinách nahradené čistým MRS bujónom, resp. fyziologickým roztokom. Na 9. deň (t.j. 4 dni po infekcii) boli ciciaky usmrtené intrakardiálne

preparátom T61. Jednotlivé vzorky tkaniva (duodenum, jejunum, ileum, slezina, mez. lymf. uzlina) boli odobraté do konzervačného roztoku "RNAlater" (Ambion, Inc.) a uskladnené pri -20°C .

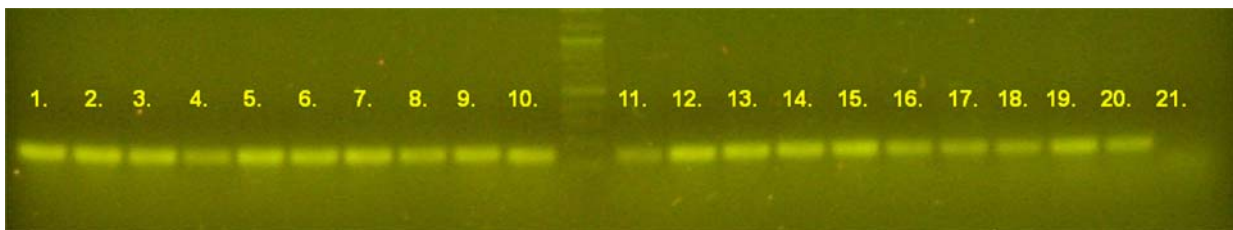
Izolácia RNA: Celková RNA bola izolovaná pomocou kitu „Aurum total RNA“ (BioRad) a jej koncentrácia bola stanovená pri 260 nm.

Prepis RNA do cDNA: 1 μg každej RNA vzorky bol prepísaný pomocou reverznej transkriptázy a primerov (oligo DT a Random, Fermentas).

qRT-PCR: Štandardizácia metódy qRT-PCR prebiehala na prístroji iCycler iQ Real-Time PCR (BioRad). Reakčná zmes pozostávala z 1x SYBR Green Supermix, 6 μl H_2O , forward a revers primerov a 6 μl cDNA, ktorá bola pripravená v triplikátoch. Reakčné podmienky boli nasledujúce: denaturácia 95°C 3 min., 40 cyklov (94°C 15 s., 60°C 30 s., 72°C 30 s.), terminálna extenzia 72°C 15 min. s následnou analýzou krivky topenia (*melting curve*) na potvrdenie amplifikácie jediného požadovaného produktu.

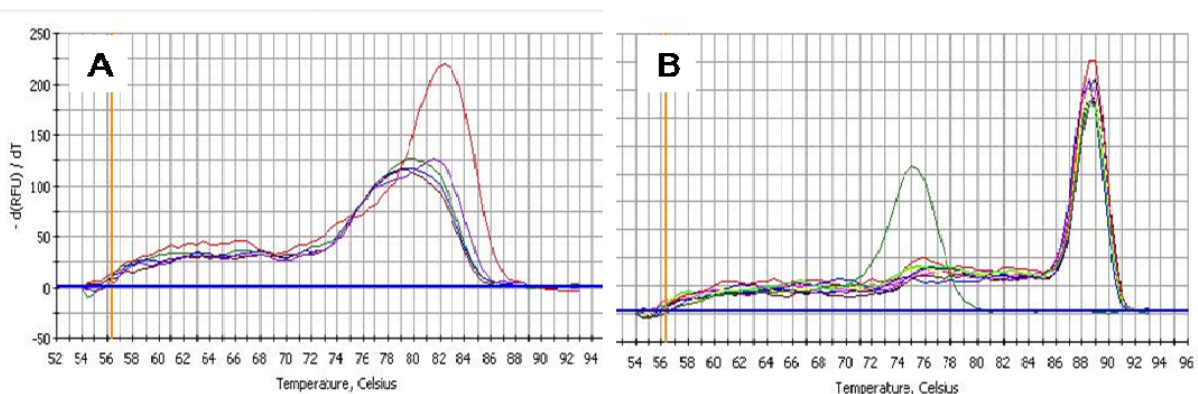
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Významným faktorom, ktorý ovplyvňuje úspešnosť qRT-PCR je nepochybne kvalita a čistota pripravených cDNA vzoriek. Tú sme potvrdili klasickou PCR s primermi pre β -aktín a následnou elektroforézou amplikónov na agarózovom géli (Obr.1). V prípade kontaminácie vzoriek genomickou DNA (veľkosť produktu 238 bp namiesto 143 bp) boli vzorky RNA ešte pred prepisom ošetrené "TURBODNase free" kitom (Ambion, Inc.).



Obr. 1 Testovanie kvality cDNA vzoriek z jejuna jednotlivých prasiat (vzorka 21 je negatívna kontrola)

Úspešnosť štandardizácie závisela aj od výberu vhodných primerov, ich teplotných podmienok a samozrejme aj od ich optimálnej koncentrácie, ktorú sme potvrdili už v predchádzajúcom pokuse na IPEC-J2 bunkách (prasacia intestinálna epitelová bunková línia), konkrétne v prípade primerov pre receptory TLR. V tomto prípade bola optimálna nižšia koncentrácia forward a revers primerov ($10\mu\text{M}$), namiesto $33\mu\text{M}$, ktorá viedla k vzniku neželaných dimérov (Obr.2). Zároveň sme potvrdili optimálnu teplotu pre hybridizáciu primerov k templátu stanovenú na základe nukleotidového zloženia primerov (60°C).



Obr. 2 Optimalizácia vhodnej koncentrácie primerov pre qRT-PCR - A, $33\mu\text{M}$; B, $10\mu\text{M}$

Relatívnu expresiu vybraných cytokínov (IL-1 α , IL-8, IL-10, IL-12p35, IFN- γ a TGF- β) sme vyhodnotili prostredníctvom $\Delta\Delta C_T$ metódy. Jej podstatou je porovnanie kvantity jednotlivých sledovaných génov s tzv. referenčným génom, ktorého expresia sa v priebehu experimentu nemení (v našom prípade s β -aktínom), a taktiež s tzv. kalibrátorom (s kontrolnou skupinou prasiat, v našom prípade skupinou označenou ako E). Výsledkom takýchto prepočtov je násobný rozdiel množstva cieľového génu medzi hodnotenými vzorkami (tzv. *fold difference*) (Obr. 3).

Obr. 3 Násobná zmena génovej expresie pre IL-1 α (jejunum) porovnávaná oproti kontrolnej skupine (E) a normalizovaná oproti β -aktínu.

	IL-1 α
Kontrolná skupina (E)	1,0
Skupina EL	0,4
Skupina EM	1,2
Skupina ELM	0,2

V našej práci sme úspešne štandardizovali podmienky metódy qRT-PCR. Túto metódu chceme následne využiť na analýzu kvantitatívnych zmien v génovej expresii nami sledovaných cytokínov, a to v rôznych tkanivách (duodenum, jejunum, ileum) v rámci jednotlivých experimentálnych skupín (E, EL, EM, ELM). Imunomodulačný účinok samotných laktobacilov, či mastných kyselín potvrdili už mnohé *in vivo*, resp. *in vitro* štúdie, no ich synergické pôsobenie pri zápalových ochoreniach GIT prasiat nie je v súčasnosti dostatočne preskúmané. Doposiaľ sú známe iba dve práce, a to *in vivo* štúdiá na gnotobiotických prasiatkach, ale bez infekcie (Bomba a kol., 2002) a *in vitro* štúdiá na ľudskej bunkovej línii Caco-2 (Kankaanpää a kol., 2002), ktoré potvrdzujú úlohu PNMK pri adherencii laktobacilov na sliznicu čreva, čím výrazne potencujú ich imunomodulačný účinok. Výrazný protizápalový účinok preto očakávame predovšetkým v skupine ELM.

POĎAKOVANIE

Publikácia bola vytvorená realizáciou projektu SK0021 spolufinancovaného z Nórskeho a EEA finančného mechanizmu a zo štátneho rozpočtu SR, a realizáciou projektu „INFEKTZOON – Centrum excelentnosti pre nákazy zvierat a zoonózy“, ITMS kód: 26220120002, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bomba A, Nemcová R, Gancarcíková S, Herich R, Guba P, Mudronová D. Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *Br J Nutr.* 2002; 88 Suppl 1: S95-9
- Geens MM, Niewold TA. Preliminary Characterization of the Transcriptional Response of the Porcine Intestinal Cell Line IPEC-J2 to Enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Escherichia coli*, and *E. coli* Lipopolysaccharide. *Comp Funct Genomics.* 2010; 1-11, doi: 1155/2010/469583.
- Kankaanpää PE, Salminen SJ, Isolauri E & Lee YK. The influence of polyunsaturated fatty acids on probiotic growth and adhesion. *FEMS Microbiology Letters.* 2001; 194, 149–153.
- Moue M, Tohno M, Shimazu T, Kido T, Aso H, Saito T, Kitazawa H. Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008; 1780 (2): 134–144.
- Pavlova B, Volf J, Alexa P, Rychlik I, Matiasovic J, Faldyna M. Cytokine mRNA expression in porcine cell lines stimulated by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol.* 2008; 132(1-2): 105-110.

Raymond CR, Wilkie BN. Toll-like receptor, MHC II, B7 and cytokine expression by porcine monocytes and monocyte-derived dendritic cells in response to microbial pathogen-associated molecular patterns. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005; 107: 235–247.

VYUŽITIE KARDIOMARKEROV V DIAGNOSTIKE A MANAŽMENTE KARDIOVASKULÁRNYCH OCHORENÍ U PSOV

Jurkuláková L., Páleník L., Freilichman R., Kozák M.

Klinika malých zvierat, Interné oddelenie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

ABSTRAKT

V poslednom období sa diagnostický význam stanovenia kardiomarkerov začína čoraz viac uplatňovať i vo veterinárnej medicíne. Výsadné postavenie medzi biochemickými markermi majú práve nátriuretické peptidy (molekuly odrážajúce funkciu myokardu), ktoré sa stali súčasťou diagnostického algoritmu a liečby niektorých ochorení srdca u psov.

Sledovanie plazmatických hladín nátriuretických peptidov je veľmi cenným parametrom pre spresnenie diagnostiky niektorých ochorení srdca s nejasnou etiológiou, predovšetkým pri diferenciálnej diagnostike chronickej dušnosti (kardiálna verus pľúcna), screening dedične podmienených ochorení srdca (DCM írskych vlkodavov, HCM mačiek) a tiež k monitoringu efektu terapie srdcového zlyhania. Spomedzi nátriuretických peptidov má najširšie klinické využitie sledovanie plazmatickej koncentrácie NT-proBNP ako vhodnejšieho markera pre diagnostiku a monitoring úspešnosti terapie kardiologických pacientov.

Cieľom našej klinickej štúdie je posúdenie a zhodnotenie klinického významu stanovenia sérových hladín NT-proBNP a proANP vo veterinárnej klinickej praxi (u 48 pacientoch) a to v nasledujúcich aspektoch:

- Zhodnotiť význam stanovenia nátriuretických peptidov NT-proBNP a proANP v diagnostike kardiologických ochorení u psov (včasná diagnostika, potvrdenie diagnózy srdcového zlyhania).
- Sledovať koreláciu sérových hladín NT-proBNP a proANP s klinickým obrazom na základe klasifikácie NYHA a morfológickými zmenami myokardu.

Z výsledkov našej štúdie vyplýva fakt, že sérové hladiny NT-proBNP na rozdiel od proANP najlepšie korelovali s ukazovateľmi prítomnosti srdcového zlyhania a s jeho závažnosťou.

ÚVOD

Veľké pokroky pre diagnostiku a terapiu kardiovaskulárnych ochorení, tak v humánnej ako aj veterinárnej kardiológii, sú sprevádzané intenzívnym výskumom v oblasti biomarkerov. Mimoriadny význam vo veterinárnej medicíne získavajú špecifické kardiomarkery zo skupiny nátriuretických peptidov pre potvrdenie diagnózy niektorých ochorení srdca (predovšetkým srdcového zlyhania u malých zvierat), odhade prognózy ochorenia a kontrolu účinnosti terapie. Nátriuretické peptidy sú skupinou hormónom podobných látok, syntetizovaných priamo v kardiomyocytoch srdcového svalu, ktoré vznikajú štiepením biologicky neaktívnych peptidov (Levin a kol., 1998). Skupina nátriuretických peptidov sa skladá z 3 hlavných peptidov (u stavovcov bolo doposiaľ izolovaných šesť typov NP), a to ANP - átrialny nátriuretický peptid, BNP - mozgový nátriuretický peptid (vyučovaný prevažne kardiomyocytmi komôr), CNP - nátriuretický peptid izolovaný z cievného endotelu (Kimmenade a Januzzi, 2009). ANP a BNP sú syntetizované v kardiomyocytoch vo forme polypeptidových prepro-, resp. prohormónov, z ktorých ďalším štiepením vzniká C-aktívny terminálny hormón a biologicky neaktívny N-terminálny peptid (Fine a kol., 2008). Z diagnostického hľadiska musíme taktiež zohľadniť eliminačný polčas rozpadu, ktorý je rádovo minútový pri ANP a BNP (22 minút), oproti hodinovým polčasom Nt-proANP a NT-proBNP (120 minút) (Thomas a Woods, 2003). Klinicky a laboratorne sa v poslednej dobe záujem sústredil viac na tzv. N-terminálne prohormóny (NT-proBNP, NT-proANP), ktoré sú stabilnejšie než konečné formy nátriuretických hormónov. Z dôvodu štrukturálnej odlišnosti psieho pre-proBNP v porovnaní s humánnym pre-proBNP (daný rozdielnym zoradením

aminokyselinových zvyškov v molekule pre-proBNP) sú údaje z veterinárnej medicíny obmedzené (dlhodobá absencia špecifického diagnostického testu pre stanovenie hladiny natriuretických peptidov u psov).

Hlavným stimulom pre zvýšenú tvorbu a uvoľňovanie NP do cirkulácie je tlakové alebo objemové preťaženie kardiomyocytov. Preto sú v klinickej praxi hodnotené ako indikátory zlyhávania srdca ako pumpy (bez ohľadu na jeho etiológiu) a ako prejav jedného zo základných neurohumorálnych systémov regulácie srdcovej výkonnosti. Natriuretické peptidy fungujú ako duálny kardiálny peptidový systém na udržanie kompenzovanej dysfunkcie komôr a oddialenie rozvoja manifestného srdcového zlyhania s predčasnou aktiváciou renin-angotenzín-aldosterón (Stoupakis a Klapholz, 2003). Oba peptidy potláčajú uvoľňovanie endotelínu, inhibujú sympatoadrenálny systém, stimulujú vágove vlákna, inhibujú renin-angiotenzín-aldosterónový systém, spôsobujú natriurézu a vazodilatáciu a znižujú proliferáciu svalových buniek. Všetky tieto priaznivé účinky sú pri srdcovom zlyhaní prevážené patologickou aktiváciou vazokonstrikčného neurohumorálneho systému. Všeobecne a veľmi zjednodušene možno povedať, že NP pôsobia ako obrana proti preťaženiu organizmu tekutinami a prevencii hypertenznej krízy.

Natriuretické peptidy tvoria integrovaný systém, kde ANP predstavuje rýchlu, „pohotovostnú“ zložku, kým BNP predstavuje akúsi „zálohu“, ktorá sa aktivuje až pri prolongovanom zaťažení myokardu (Boswood a kol. 2008). Pre klinickú interpretáciu je nutné si uvedomiť, že ANP je v kardiomyocytoch uložený v zásobných granulách a podľa potreby je uvoľňovaný do cirkulácie, tj. ANP je regulátorom a markerom akútnych zmien preload/afterload. Zásoba BNP v granulách kardiomyocytov je minimálna, a hladina BNP na rozdiel od ANP v krvi je relatívne stála. Vyplavovanie z kardiomyocytov prebieha oneskorene, pretože najprv dochádza k rýchlej transkripcii génu pre BNP, a následnému vzostupu syntézy BNP, tzn. že BNP je regulátorom a markerom dlhodobých zmien preload/afterload obzvlášť ľavej komory (Goncalvesova E., 2006). V humánnej medicíne je BNP ukazovateľom hypertrofie ľavej komory pri hypertenzii, je indikátorom dysfunkcie ľavej komory, považuje sa za vhodný marker pri sledovaní klasifikácie poškodenia myokardu podľa NYHA (New York Heart Association) a je dobrým markerom pri sledovaní komplikácii po akútnom infarkte myokardu. Z tohto pohľadu je pre posúdenie stavu kardiovaskulárneho systému a tým aj stupňa NYHA vhodnejší NT-proBNP (Špinar a kol., 2002).

MATERIÁL A METODIKA

Táto štúdia prebiehala na klinických pacientoch vyšetrených na Internom oddelení Kliniky malých zvierat Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie. Sledovanú skupinu tvorilo 48 pacientov rôzneho pohlavia, veku a plemena. Skupina 48 pacientov zahŕňala:

- pacientov s klinickými príznakmi srdcového zlyhania NYHA III, IV,
- pacientov v subklinickom štádiu ochorenia NYHA II (s alebo bez morfológických zmien na srdci),
- zdravých pacientov vrátane pacientov zaslaných na predoperačné vyšetrenie NYHA I.

Každého pacienta sme podrobili klinickému a elektrokardiografickému vyšetreniu. Na základe získaných anamnestických údajov a klinického vyšetrenia sme pacientov rozdelili do dvoch skupín podľa NYHA klasifikácie poškodenia myokardu na NYHA⁺ (pacienti s miernym až ťažkým stupňom srdcového zlyhania - NYHA III, IV) a NYHA⁻ (zdraví pacienti, resp. pacienti v subklinickom štádiu ochorenia bez morfológických zmien srdcového svalu v zmysle systolickej a diastolickej funkcie na základe echokardiografického vyšetrenia - NYHA I, II). Pacientom u ktorých bol klinickým vyšetrením zistený šelest alebo vykazovali príznaky kardiogénneho ochorenia sme súčasne previedli echokardiografické vyšetrenie srdca. Echo vyšetrenie sme prevádzali aj pacientom u ktorých bola indikácia morfológickej zmeny srdca zistená ekg vyšetrením, tzn. u pacientov bez klinických príznakov kardiogénneho ochorenia

a prítomnosti šelestu. Podľa echo nálezov sme pacientov rozdelili do dvoch skupín: ECHO⁺ a ECHO⁻ na základe prítomnosti resp. absencie patologického nálezu (La/Ao, FS, EF, E/A, doppler). Klasifikáciu ECHO meraní sme považovali za zlatý štandard pri rozhodovaní či a o aký patologický stav ide. Hladiny natriuretických peptidov NT-proBNP a NT-proANP sme stanovili podľa pokynu výrobcu Cardioscreen testu zo vzorky sér 48 pacientov. Krv sme odoberali do čistých skúmaviek bez obsahu aditív (antikoagulanciá, inhibitory proteáz). Do 30 minút sa krv centrifugovala a sérum sme až do vyhodnotenie hladín natriuretických peptidov skladovali pri -72 °C. Vzorky sme vyhodnocovali komerčnými súpravami firmy Guilday Ltd – Vetsign Cardioscreen test, obsahujúce sety na stanovenia hladín pro ANP a NT-proBNP metódou enzýmovej imunoanalýzy spolu s referenčnými limitmi pre interpretáciu výsledkov. Každá vzorka bola označená číslom a pri vyhodnocovaní nebolo podľa čísla zrejmé, v akej skupine sa podľa NYHA klasifikácie pacient nachádza. Nezávisle od výsledkov klasifikácie NYHA a echokardiografického vyšetrenia sme skupinu 48 psov rozdelili na základe serových hladín proANP a NT-proBNP na ANP⁺ a ANP⁻, NT-proBNP⁺ a NT-proBNP⁻. Následne bola sledovaná korelácia: 1. hladín natriuretických peptidov s klinickým obrazom na základe klasifikácie NYHA 2. hladín NT-proBNP a proANP s morfológickým zmenami srdcového svalu zistenými echokardiografickým vyšetrením. Diagnostická validita sledovaných hladín natriuretických peptidov bola hodnotená pomocou parametrov senzitivita, špecificita, negatívna a pozitívna prediktívna hodnota. Štatistická významnosť bola hodnotená pomocou nepárového študentovho T-testu a rozdiel medzi skupinami bol hodnotený ako štatistický významný v prípade $p < 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tab. č. 1 Porovnanie korelácie sérových hladín NT-proBNP (pmol/L) s morfológickým echokardiografickým nálezom potvrdzujúcim morfológické zmeny myokardu srdcového svalu

	NT-proBNP ⁺	NT-proBNP ⁻	Spolu
ECHO ⁺	30	0	30
ECHO ⁻	9	9	18
Spolu	39	9	48

$$Se = 30/30 = 100\%$$

$$PPH = 30/39 = 76,9\%$$

$$\check{S}p = 9/18 = 61,1\%$$

$$NPH = 9/9 = 100\%$$

Tab. č. 2 Porovnanie korelácie sérových hladín proANP (fmol/l) s echokardiografickým nálezom potvrdzujúcim morfológické zmeny myokardu srdcového svalu

	proANP ⁺	proANP ⁻	Spolu
ECHO ⁺	19	12	31
ECHO ⁻	1	16	17
Spolu	20	28	48

$$Se = 19/31 = 61,3\%$$

$$PPH = 19/20 = 95\%$$

$$\check{S}p = 16/17 = 94,1\%$$

$$NPH = 16/28 = 57,1\%$$

Tab. č. 3 Porovnanie korelácie serových hladín NT-proBNP (pmol/L) s klinickým nálezom podľa klasifikácie NYHA

	NT-proBNP ⁺	NT-proBNP ⁻	Spolu
NYHA ⁺	24	1	25
NYHA ⁻	2	21	23
Spolu	26	22	48

$$Se = 24/25 = 96\%$$

$$PPH = 24/26 = 92,3\%$$

$$\check{S}p = 21/23 = 91,3\%$$

$$NPH = 21/22 = 95,4\%$$

Tab. č. 4 Porovnanie korelácie serových hladín proANP (fmol/l) s klinickým nálezom podľa klasifikácie NYHA

	<i>proANP</i> ⁺	<i>proANP</i> ⁻	<i>Spolu</i>
<i>NYHA</i> ⁺	16	2	18
<i>NYHA</i> ⁻	6	24	30
<i>Spolu</i>	22	26	48

$$Se = 16/18 = 88,8\%$$

$$PPH = 16/22 = 72,7\%$$

$$\check{S}p = 24/30 = 80\%$$

$$NPH = 24/26 = 92,3\%$$

Po porovnaní korelácie hladín proANP a NT-proBNP s klinickým a echokardiografickým nálezom pre jednotlivé skupiny pacientov sme dospeli k nasledovným záverom:

Nt-proBNP: Pri rešpektovaní hraničných hodnôt udávaných výrobcom (>210 pmol/L dubiózny výsledok - insuficiencia srdca, nad >1000 pmol/L pozitívny výsledok - srdcové zlyhanie) cardioscreen testu bola zistená pozitívna korelácia hladín NT-proBNP s echokardiografickými meraniami potvrdzujúcimi závažnosť morfológických zmien srdcového svalu (systolickej a diastolickej dysfunkcie). Pri hodnote NT-proBNP > 210 pmol/L bola zistená až 100% senzitivita a NPH pre diagnózu ochorenia srdca na základe morfológických zmien srdcového svalu zistených echokardiografickým vyšetrením (tzn. že u každého pacienta s morfológickými zmenami myokardu bola súčasne zvýšená hladina NT-proBNP). Nízka špecificita stanovovaného kardiomerkeru len 61,1% bola vo vzájomnej korelácií s PPH 76,9%. Zahnutím pacientov s koncentráciou NT-proBNP v rozmedzí dubióznych hodnôt (>210pmol/L a < 1000 pmol/L) do skupiny pozitívnych (NT-proBNP⁺) sa podstatne znížila špecificita sledovaného kardiomerkeru. Z toho dôvodu je potrebné u takýchto pacientov (tj. pacientov s dubióznym výsledkom) vzhľadom na nízku špecificitu NT-proBNP potvrdiť diagnózu kardiogénneho ochorenia echokardiografickým vyšetrením. Pri sledovaní korelácie sérovej hladiny NT-proBNP s klinickým obrazom podľa klasifikácie NYHA pre pacientov v štádiu srdcového zlyhania (pričom sa zvýšila hraničná hodnota NT-proBNP z 210 pmol/L nad 1000 pmol/L pre skupinu NYHA III., IV - t.j. stredný až ťažký stupeň srdcového zlyhania) sme potvrdili diagnostickú validitu sledovaného parametra. Pri hraničnej hodnote NT-proBNP >1000 pmol/L došlo k miernemu poklesu senzitivity pre diagnózu srdcového zlyhania 96%, avšak k výraznému zvýšeniu špecificity na hodnotu 91,3% a PPH 92,3%. Nami namerané sérové koncentrácie NT-proBNP korelovali s ukazovateľmi prítomnosti srdcového zlyhania a jeho závažnosťou, u pacientov zatriedených do skupiny NYHA III, IV bola zistená koncentrácia NT-proBNP (priemer 2910, medián 3530), ktorá bola štatisticky signifikantne vyššia (p<0,001) ako u pacientov s NYHA I, II (priemer 486, medián 380). Rovnako bol zaznamenaný štatistický významný rozdiel (p<0,05) v koncentracii NT-proBNP u pacientov v skupine NYHA I (priemer 232, medián 180) a pacientov v skupine NYHA II (priemer 995, medián 840). Súvislosť medzi hladinou BNP a funkčným stavom pacientov bola dokázaná viacerými štúdiami z ľudskej i veterinárnej medicíny, pričom sa hodnoty NT-proBNP zvyšovali so zvyšujúcou funkčnou triedou NYHA (Gotze JP, Kastrop, 2001; Oyama a kol., 2007). Na základe uvedených prác možno konštatovať, že stanovenie hladiny BNP zvyšuje presnosť a rýchlosť diagnostiky srdcového zlyhania. Jeho význam spočíva predovšetkým v schopnosti nízkych hladín NT-proBNP vylúčiť srdcové zlyhanie a v skupine pacientov s dubióznym výsledkom NT-proBNP je indikované echokardiografické vyšetrenie.

ProANP: Hladina proANP pri hraničnej hodnote ≥ 1080 fmol/l vykazuje vysokú špecificitu 94,1% a PPH 95%, avšak veľmi nízku senzitivitu 61,3% a NPH 57,1%. Pro ANP len minimálne korelovali s echokardiografickým meraním zmien morfológie srdcového svalu. Pri

zvýšení hraničnej hodnoty ≥ 1360 fmol/l pre diagnózu pacientov v štádiu srdcového zlyhania NYHA III, IV došlo k zvýšeniu senzitivity na 88,8% a poklesu špecificity na 80%. Sérova hladina proANP bola zvýšená prevažne u pacientov s objemovým preťažením ľavej predsene v dôsledku endokardiózy mitrálnej chlopne, u ktorých dosahovala primernú hodnotu 1280 fmol/l. Z výsledkov našich meraní vyplýva že, proANP je málo senzitívnym a relatívne špecifickým ukazovateľom pre posúdenia stavu kardiovaskulárneho aparátu a tým aj stupňa NYHA. Zvýšené hodnoty ANP sa v humánnej medicíne všeobecne objavujú pri akomkoľvek preťažení obehového systému a to nielen pri srdcovom zlyhaní rôznej etiológie, pri hypertenzii, stavoch po akútnom infarkte, pri cirhóze pečene, pri respiračnom zlyhaní, pľúcnej vazokonstrikcii spojenej s hypoxiou a ďalších podobných stavoch. Vzhľadom k týmto skutočnostiam má štúdium problematiky natriuretických peptidov veľký praktický význam pre humánu i veterinárnu kardiológiu a je veľmi perspektívnou oblasťou budúceho výskumu.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Levin, ER, Gardner, D.G., Samson, W.K. 1998, Mechanisms of disease-Natriuretic peptides. *New England Journal of Medicine* 339, 321-328.
- Van Kimmenade, R.R.J., Januzzi, J.L. The evolution of the natriuretic peptides – Current applications in human and animal medicine. *J Vet Cardiol* 2009;11:S9-21.
- Deborah M.Fine, Amy E.De Clue, Carol R. Reiner, Evaluation of circulating amino terminal-pro-B-type natriuretic peptide concentration in dogs with respiratory distress attributable to congestive heart failure or primary pulmonary disease, *JAVMA*, 2008, Vol 232., No.11, June 1, 2008.
- Thomas, C.J., Woods, R.L. Hemodynamic action of B-type natriuretic peptide substantially outlasts its plasma half-life in conscious dogs. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2003,30:369-375
- Stoupakis G., Klapholz M. Natriuretic peptides: biochemistry, physiology, and therapeutic role in heart failure. *Heart Dis* 2003, 5: 215-223
- Boswood A., Duse-McEwan, Loureiro J., et al. *Journal of Small Animal Practice* 2008, 49:26-32
- Goncalvesova E., Prínos natriuretických peptidov pre diagnózu, prognózu, manažment a liečbu srdcového zlyhania, *Interní Med.* 2006,10:428-431.
- Špinar J., Ludka O., Vitovec J a kol. Diurnální variabilita big endotelinu a BNP u chorých s chronickým srdcovým zlyhaním. *Suppl Cor Vasa* 2002, 44:116
- Oyama M., Fox P., Rush J. a kol. Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. *JAVMA* 2008, 10:232
- Gotze J.P., Kastrop J. Plasma pro-brain natriuretic peptides are strong biochemical markers in clinical cardiology. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2001, 234: 47-51.

VPLYV VYBRANÝCH PARAMETROV WELFARE NA HYGIENICKÚ ÚROVEŇ A ZDRAVOTNÝ STAV DOJNÍC NA SLEDOVANÝCH FARMÁCH

Kišová, J., Ondrašovičová, O., Sasásková, N., Fejsáková, M., Gregová, G.

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo monitorovanie a vyhodnotenie vybraných parametrov welfare na hygienickú úroveň a zdravotný stav zvierat na farmách dojníc tak v konvenčnom, konverznom ako aj ekologickom systéme chovu. Sledovania boli zamerané na hodnotenie ochrany chovov v zmysle platných nariadení a ich uplatňovanie v jednotlivých chovoch.

Na základe monitoringu a sledovania vybraných ukazovateľov bola zistená priama korelácia medzi spôsobom ustajnenia, mikroklimou, ošetrovaním a hygienickou úrovňou, správaním sa zvierat, ochoreniami a kvalitou získavania mlieka.

Kľúčové slová: welfare, ekologické poľnohospodárstva, konverzia, biodiverzita

ÚVOD

Welfare alebo otázky životnej pohody zvierat chovaných človekom vyvolávajú stále širší záujem verejnosti a stávajú sa dôležitým faktorom, ktorý ovplyvňuje podmienky chovu zvierat ale aj vedecký výskum.

Ekologická výroba predstavuje komplexný systém manažmentu poľnohospodárskych fariem a výroby potravín, ktorý je kombináciou tých najlepších environmentálnych postupov, vysokej úrovne biodiverzity, ochrany prírodných zdrojov, uplatňovania prísnych noriem v oblasti pohody zvierat a výrobných metód v súlade s preferenciou určitých spotrebiteľov pre produkty vyrábané pomocou prírodných látok a procesov (NARIADENIE RADY ES č. 834/2007).

NARIADENIE VLÁDY SR č. 322 z roku 2003 ustanovuje minimálne normy na ochranu zvierat chovaných alebo držaných na farmárske účely, to znamená že ustanovuje všeobecné podmienky pre farmy konvenčného typu ale aj pre farmy ekologické.

Pri ustajnení hovädzieho dobytku sa musia rešpektovať všetky požiadavky pre ich voľný pohyb ku zdroju krmiva, vody, ploche pre odpočinok a eliminačné správanie. Použité chovné zariadenie zohľadňuje všetky potreby pre ochranu ich zdravia a optimalizáciu pohody (ANGELOVIČOVÁ a BULLA, 2006).

Konverzia v ekologickej poľnohospodárskej výrobe je obdobie, počas ktorého sa uskutočňuje prechod z konvenčného hospodárenia na ekologickú poľnohospodársku výrobu. NARIADENIE RADY ES č. 834/2007 uvádza pravidlá, ktoré farma musí dodržať keď začína s ekologickou výrobou

Ekologický chov hospodárskych zvierat by mal zabezpečovať dodržiavanie osobitných behaviorálnych potrieb zvierat. V tejto súvislosti by ustajnenie v prípade všetkých druhov hospodárskych zvierat malo spĺňať potreby príslušných zvierat, pokiaľ ide o vetranie, svetlo, priestor, a pohodlie a mala by sa zabezpečiť dostatočná plocha s cieľom umožniť dostatočnú slobodu pohybu pre každé zviera a rozvíjať prirodzené sociálne správanie zvierat (NARIADENIE KOMISIE ES č. 889/2008).

Pri výbere plemien alebo línií sa zohľadňuje schopnosť zvierat prispôbiť sa miestnym podmienkam, ich životaschopnosť a odolnosť voči chorobám. Uprednostňujú sa pôvodné plemená a línie (NARIADENIE KOMISIE ES 889/2008).

Chovateľské prostredie vytvára podmienky pre zabezpečenie fyziologických potrieb zachovania života a zdravia a pre zaistenie psychickej pohody zvierat. Komplex faktorov chovateľského prostredia ovplyvňuje ich život a rozhoduje o dosiahnutí vytýčených cieľov chovu. Preto musí byť vytvorené také chovateľské prostredie, v ktorom hospodárske zvieratá dokážu v maximálnej miere manifestovať svoje potenciálne úžitkové vlastnosti. Súčasťou

chovateľského prostredia je spôsob výživy zvierat, technika, organizácia a technológia chovu, vzťah človeka ku zvieratú, v neposlednom rade klimatické pomery a ďalšie.

V prostredí, kde sa znižuje starostlivosť o hovädzí dobytok, kde sú zvieratá zbavené možnosti výberu prostredia, aj malé odchýlky od optimálneho stavu pociťujú zvieratá ako záťaž. Biologická záťaž, ktorá je daná technológiu chovu, druhom a kategóriou zvierat určuje základnú potrebu na úpravu maštalného prostredia. Ide o dodržanie vnútorných mikroklimatických parametrov počas letného a zimného obdobia. Závisí to na druhu a kategórii zvierat, technologicko-stavebnom riešení i biologickej záťaže objektu.

Chovateľské prostredie vytvára zvieratám podnety pre ich správanie. Zviera na ne reaguje a súčasne si zabezpečuje svoje životné potreby formou pohybu, odpočinku, žrania, pitia a pod., ale ak je v chovateľskom prostredí nedostatok, vykonáva aj nepotrebné a neprirodzené aktivity (BRESTENSKÝ, 2006).

MATERIÁL A METODIKA

Monitoring a hodnotenia boli vykonané na farmách so zameraním na ekologický chov dojníc, chov v období konverzie a konvenčné chovy. Na vybraných farmách v priebehu 2 rokov boli hodnotené vybrané parametre v zmysle platných noriem a sledované boli hygienické podmienky ustajnenia, zdravotného stavu a celkovej starostlivosti o zvieratá.

Ekologický chov dojníc plemena pinzgavského sa realizuje na farme v podhorskej oblasti v nadmorskej výške 800 m viac ako 15 rokov. Farma v konverzii je situovaná v podhorskej oblasti s chovom 160 ks dojníc slovenského strakatého plemena a konvenčný chov dojníc čiernostrakatého Holsteinského plemena situovaná v nížinnej oblasti s 500 ks dojníc.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V zmysle zákona o veterinárnej starostlivosti a § 5 nariadenia vlády SR č. 322/2003 Z.z. sa vykonávajú veterinárne kontroly a inšpekcie ochrany zvierat chovaných na farmárske účely. Minimálny rozsah kontrol je stanovený obsahom záznamov z veterinárnej kontroly. Na základe týchto požiadaviek boli vykonané kontroly na vybraných farmách. Na zabezpečenie súladu s požiadavkami Nariadenia vlády č. 322/2003 Z.z. bolo vykonané hodnotenie programu kontroly ochrany zvierat v chove HD v období 2 rokov.

Charakteristika hodnotenia chovov dojníc v ekologickom, konverznom a konvenčnom chove sú uvedené v tabuľke č. 1

Tab.č. 1 Hodnotenie sledovaných fariem

Ukazovatele	konvenčná farma	farma v konverzii	ekologická farma
Plemeno	Holstein	Slovenský strakatý	Pinzgauský
Spôsob ustajnenia	boxové	boxové s podstielkou	boxové s podstielkou
Počet zvierat	500	160	120
Produkcia mlieka	7 300	4200	3 800
Frekvencia dojenia	2x	2x	2x
Dojenie	dojáreň	dojáreň	dojáreň
Hodnotenie hygieny	HACCP	HACCP	HACCP
Ošetrovanie vemena	Diemacit	Jodonal M	Podľa noriem
Produkcia mlieka	mliekáreň	mliekáreň	BIO-certifikát

Hlavným kritériom zdravia zvierat je vytváranie optimálnych životných podmienok a dodržiavanie hygienických zásad. Pri hodnotení hygienickej úrovne (tab.2) je zrejme, že sa hygienická úroveň na hodnotených farmách značne líšila. Najlepšie hygienické podmienky boli zistené na ekologickej farme.

Tabuľka č. 2 Vyhodnotenie a porovnanie hygienickej úrovne na hodnotených farmách

Kritéria	Konvenčná	Konverzia	Ekologická
Ustajnenie	Veľmi dobrá	Veľmi dobrá	vysoká
Pohybové chodby	uspokojivá	Veľmi dobrá	vysoká
Dojareň a mliečnica	vysoká	vysoká	vysoká
Pracovníci	uspokojivá	dobrá	Veľmi dobrá

Na základe hodnotenia vybraných kritérií pre hodnotenie welfare a na základe našich sledovaní v tabuľke 3 sú uvedené najčastejšie ochorenia vo vzťahu k systému farmy.

Tabuľka 3 Percentuálne zastúpenie zdravotných problémov na sledovaných farmách

Ukazovateľ	Konvenčná	Konverzia	Ekologická
Mastitídy	25-28 %	16 -18 %	3-15 %
Ochorenia pohybového aparátu	15-25 %	5 -6 %	2 %
Reprodukčné poruchy	8-11 %	6 – 8 %	3 %
Poranenia ceckov a vemena	8 %	3-6 %	1-2 %

Posudzovanie pohody zvierat sa vždy vykonáva na úrovni jednotlivých zvierat, pričom ustanovené minimálne normy musia byť vždy dodržané. V prípadoch, ak minimálne normy pre niektoré sledovanie nie sú ustanovené, stupeň pohody sa posudzuje na základe zdravotného stavu, prejavovaného správania sa a sociálnych vzťahoch zvierat.

Pri hodnotení situácie v našich chovoch na základe programu hodnotenia welfare uvedeného v Nariadení vlády č. 322/2003 Z.z., ale aj na základe nami zvolených ukazovateľov pri hodnotení welfare na vybraných farmách je potrebné na konvenčných farmách mať na zreteli predovšetkým možnosť zabezpečenia všetkých požiadaviek vyplývajúcich zo vzťahu zviera a prostredie z hľadiska jeho potrieb.

Pri hodnotení ochrany zvierat na ekologickej farme sa predpokladá vyššia úroveň welfare v porovnaní s konvenčnými chovmi, prípadne s chovmi v konverzii. Vyššie požiadavky na ustajnenie zvierat sú kladené aj európskymi nariadeniami, ktoré tieto podmienky v ekologických chovoch stanovujú. Avšak je potrebné rešpektovať všetky rozdiely medzi chovom zvierat v konvenčnom, konverznom alebo ekologickom systéme.

Veľmi dôležité je získavanie kvalitných potravín živočíšneho pôvodu pri dodržiavaní striktných požiadaviek pri získavaní, spracovaní a ošetrovaním mlieka. Výsadné postavenie patrí čisteniu a dezinfekcii a uplatňovaniu systému HACCP tak v konvenčných ako aj ekologických chovoch.

Ekologické poľnohospodárstvo sa stále vyvíja aj keď hlavné pravidlá sú dané, stále ostáva priestor na zlepšenie či už welfare zvierat, produkciu kvalitnejších potravín a skvalitňovania a ochrany životného prostredia.

POUŽITÁ LITERATÚRA

ANGELOVIČOVÁ, M. a BULLA, J.: Ochrana zvierat a produkcia potravín, 1. Vyd. Nitra: SPU v Nitre vo vydavateľstve SPU, 2006, 2006, 147 s. ISBN 80-8069-702-7.

BRESTENSKÝ, V. : Organizácia a technológia chovu mliekového hovädzieho dobytku, 1. Vydavateľstvo Nitra, SCPV, 2006, 107 s. ISBN 80-88872-53-7.

NARIADENIE VLÁDY SR č. 322/2003 o ochrane chovaných na farmárske účely.

NARIADENIE RADY ES č. 834/2007 o ekologickej výrobe a označovaní ekologických produktov.

NARIADENIE KOMISIE ES 889/2008, ktorým sa ustanovujú podrobné pravidlá implementácie nariadenia Rady (ES) č. 834/2007 o ekologickej výrobe a označovaní ekologických produktov v znení neskorších predpisov.

STANOVENIE HLADINY PROZÁPALOVÝCH CYTOKÍNOV Z KRVI U HYDINY INFIKOVANEJ *SALMONELLA ENTERICA*

Kolesárová M.¹, Crhánová M.², Rýchlik I.², Spišáková V.¹

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

²Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně, Česká republika

ABSTRAKT

V práci bola sledovaná expresia cytokínov IL-1 β , IL-8 (označovaný ako chCXCLi2), IL-12 β , IL-15, IL-17, IL-18, IL-22, IFN β , IFN γ , iNOS a TNF α (LITAF) z krvi po intravenózne a per os aplikácií *S. enterica* (SE 147) pomocou metódy RT-PCR. Skupina u ktorej bola aplikovaná SE 147 intravenózne bola hladina expresie IL-1 β , IL-8 (označovaný ako chCXCLi2), IL-12 β , IL-18, IL-22, IFN β , IFN γ a TNF α (LITAF) zvýšená. V skupine kde bola aplikovaná SE 147 per orálne bola zistená zvýšená hladina IL-15, IL-17 a iNOS. Tieto výsledky naznačujú, že po intravenózne aplikácii dochádza k rýchlejšiemu nástupu infekcie a to vedie aj k rýchlejšej odpovedi organizmu na daný patogén zvýšením hladiny prozápalových cytokínov.

ÚVOD

Cytokíny a chemokíny zohrávajú kľúčovú úlohu v komunikácii medzi bunkami imunitného systému ako aj medzi rôznymi bunkami ne-imunitného systému. Cytokíny hlavne súvisia s kontrolou imunitnej odpovede hostiteľa na rôzne cudzorodé antigény (Berndt a kol., 2007; Shaughnessy a kol., 2009) a sú aj kľúčovými regulátormi hostiteľskej imunitnej odpovede na intracelulárne patogény, medzi ktoré patrí aj *Salmonella spp.*

Salmonelóza hydiny je črevná infekcia, ktorá väčšinou prebieha subklinicky alebo s klinicky manifestujúcimi príznakmi. Salmonelózu hydiny môže vyvolať druhovo adaptovaný serovar *S. Gallinarum* vyvolávajúci závažnú systémovú salmonelózu s vysokou morbiditou a mortalitou najmä u mláďat (Levkutová a kol., 2007). Kmeň *S. enterica* (SE 147) nie je síce pre hydinu špecifická, infekcia prebieha bez klinických príznakov, no môže sa z hydiny preniesť na mäso a vajcia.

Na skoré štádium infekcie vyvolanej *Salmonella spp.* nadväzuje aktivácia komplexných mechanizmov vrodenej a v neskoršom štádiu aj získanej imunity. Dochádza k infiltrácií makrofágov do miesta infekcie a ich aktivácia vedie k sekrécii prozápalových cytokínov ako sú TNF- α , IFN γ , IL-18, IL-1 β , IL-15. K zvýšenej sekrécii prozápalových cytokínov dochádza v tkanivách ako sú cekálne tonzily, pečeň a obličky (Withanage a kol., 2004). No iba málo prác sa venuje stanoveniu hladiny cytokínov priamo z krvi.

Cieľom práce bolo stanoviť a porovnať hladinu expresie cytokínov z krvi v závislosti od spôsobu vniknutia infekcie do hostiteľského organizmu.

MATERIÁL A METODIKA

Zvieratá

Do pokusu bolo celkom zahrnutých 8 nosníc druhu Lohman Brown vo veku 55. týždňov, ktoré boli chované v štandardných podmienkach. Nosnice boli rozdelené do 2 skupín po 4 ks. Pričom I. skupina bola infikovaná kmeňom *S. enterica* (SE 147) intravenózne a II. skupina bola infikovaná SE 147 per orálne. Na 4 deň po infekcii boli nosnice utratené a bola odobratá krv z vena jugularis dextra.

Izolácia RNA

K 250 μ l odobratej krvi bolo pridané 750 μ l Trizol Blood (Molecular Research Center) a potom zhomogenizované pomocou MagNA Lyser-u (Roche, Basel, Švajčiarsko). Na separáciu jednotlivých fáz bolo pridané 50 μ l 4-bromanizolu a následne celý objem scetrifugovaný pri 12000rpm 15 min 4°C. Vrchná vodná fáza bola ďalej použitá na samotnú izoláciu RNA pomocou RNAeasy Kitu (Qiagen, Veľká Británia) podľa štandardného postupu. Čistota a výsledná koncentrácia získanej RNA bola stanovená pomocou Nanodropu.

Získaná RNA bola prepísaná pomocou reverznej transkriptázy M-MLV (Invitrogen) a oligo dT primerov. Výsledná cDNA bola 10x zriedená destilovanou vodou a ďalej použitá ako templát pre RT-PCR.

Real-time PCR

PCR Mix pozostával 5 μ l SYBR Green (Qiagenm Waltham), 4 μ l nariadených primerov a 1 μ l cDNA. Samotná amplifikácia a detekcia produktov bola vykonávaná na Light Cyclery 480 (Roche, Basel, Switzerland) podľa nasledujúceho programu: 95°C 15min, 45 cyklov: denaturácia 95°C 20s, aneling 60°C 30s a elongácia 72°C 30s.

Hladina expresie bola stanovená voči 3 houskepingovým génom: glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenáza (GAPDH), TATA box viažuci proteín (TBP) a ubiquitín (UB).

Všetky použité primery boli navrhnuté Doc. Rýchlikom (Brno, VÚVEL).

Analýza dát

Na analýzu dát bola použitá jednocestná ANOVA a Tukey test v programe GraphPad Prism Version 2.0.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po intra venóznej aplikácii SE 147 bola zaznamenaná zvýšená expresia IL-1 β , IL-8 (označovaný ako chCXCLi2), IL-12 β , IL-18, IL-22, IFN β , IFN γ a TNF α (LITAF), čo pravdepodobne súvisí s okamžitým vstupom infekcie do krvného obehu a reakciou imunitného systému. Vyššia expresia po per orálnej aplikácii SE 147 bola zaznamenaná iba u cytokínov IL-15, IL-17 a iNOS. Jednotlivé hodnoty expresie sú zobrazené v **tab.1**. Tieto hladiny expresie však neboli štatisticky významné.

Cytokín	Infekcia i.v.	Infekcia p.o.
IFN β	0,0440	0,0299
IFN γ	0,0046	0,0020
IL 12 β	0,0003	0,0003
IL 15	1,8628	4,7968
IL 17	0,0003	0,0003
IL 18	0,0738	0,0428
IL 1 β	0,2091	0,0459
IL 22	0,0002	0,0001
IL 8	0,1437	0,0316
iNOS	0,4319	0,6539
TNF α	0,0606	0,0268

Tabuľka č.1 Hodnoty expresie cytokínov

Väčšina prác sa zaoberá štúdiom expresie cytokínov z tkanív po per orálnej infekcii. Cheesman a kol. (2007) poukázali na zvýšenú hladinu IFN γ , IL-12, IL-18 a TNF α v slezine a céku 8 a 12 hodín po p.o. infekcii *S. Enteritidis*. V práci Berndt a kol. (2007) bolo dokázané signifikantné zvýšenie hladiny IL-12 a IL-18 v slezine, pečeni a céku. Zvýšená hladina IL-6 a IL-8 bola popísaná aj v práci Swaggerty a kol. (2004). Rovnako aj v práci Withange a kol. (2004) bola zaznamenaná zvýšená hladina IL-8 a IL1 β a K60 v črevách 12, 24 a 48 hodín po p. o. aplikácii *S. Typhimurium*.

Na základe nami získaných výsledkov sa ukázalo, že v krvi dochádza k zvyšovaniu hladiny najmä u tých cytokínov, ktoré boli v spomenutých prácach signifikantne zvýšené aj v tkanivách jednotlivých orgánov.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola financovaná prostredníctvom grantu LPP-0219-09.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Berndt A, Wilhelm A, Jugert C, Pieper J, Sachse K, Methner U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. *Infection and Immunity*. 2007; 75: 5993-6007.
- Cheeseman J.H, Kaiser M.G, Ciraci C, Kaiser P, Lamont, S.J. Breed effect on early cytokine mRNA expression in spleen and cecum of chicken with and without *Salmonella enteritidis* infection. *Dev. and Comp. Immunology*. 2007; 31:52-60.
- Levkutová M., Paulík Š. Infekčné choroby hydiny a ich difernciálna diagnostika. MaM. Prešov.2007.
- Shaughnessy R.G, Meade K.G, Cahalane S, Allan B, Reiman C, Callanan J.J, O'Farrelly C. Innate immune gene expression differentiates the early avian intestinal response between *Salmonella* and *Campylobacter*. *Vet. Immunology and Immunopathology*.2009; 132:191-198.
- Swaggerty CH.L, Kogut M.H, Ferro.P.J, Rothwell L and Kaiser P. Differential cytokine mRNA expression in heterophils isolated from *Salmonella*-resistant and -susceptible chickens. *Immunology*. 2004; 113: 139-148.
- Withanage G.S.K, Kaiser P, Wigley P, Powers C, Mastroeni P, Brooks H, Barrow P, Smith A. Rapid Expression of Chemokines and Proinflammatory Cytokines in Newly Hatched Chickens Infected with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*. 2004; 72: 2152-2159.

INDUKCIA MIKROJADIER PO 24 A 48H EXPOZÍCII PERIFÉRNÝCH LYMFOCYTOV HOVÄDZIEHO DOBYTKA TEBUKONAZOLOM

Kolesárová V., Šiviková K.

Ústav genetiky, Katedra biológie a genetiky, UVLF, Košice

ABSTRAKT

V našej práci sme sledovali účinok tebukonazolu, triazolového fungicídu, na periférne lymfocyty hovädzieho dobytká použitím CBMN (cytokinesis-block micronucleus) testu. CBMN test sa používa ako biomarker pre štúdium *in vitro* a *in vivo* genómového poškodenia. Lymfocyty sme vystavili účinku tebukonazolu na 24 a 48h. Frekvencie mikronukleí (MN) po 24 a 48 h expozícii nedosiahli štatisticky významné hodnoty. Najvyššiu frekvenciu MN sme zaznamenali pri koncentrácii 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (24h) a pri koncentrácii 6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (48h). Pri najvyššej použitej koncentrácii (60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) nebolo možné vyhodnotiť dostatočný počet buniek. Pri hodnotách CBPI (cytokinesis block proliferation index) sme zistili redukciiu proliferačných indexov v závislosti od dávky so štatistickou významnosťou od koncentrácie 6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po 24h expozícii (χ^2 test, $p < 0,05$ a $p < 0,001$) a od koncentrácie 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po 48h expozícii tebukonazolom ($p < 0,05$, $p < 0,01$ a $p < 0,001$). Z našich výsledkov vyplýva, že tebukonazol redukoval proliferačnú aktivitu lymfocytov hovädzieho dobytká, čím sme potvrdili jeho cytotoxický/cytostatický efekt.

ÚVOD

Pesticídy predstavujú široké spektrum chemikálií, syntetických alebo prírodných, ktoré slúžia na reguláciu výskytu hmyzu, húb, baktérií, burín, hlodavcov a iných škodcov (Chu X. G. a kol., 2005). Popri ich pozitívnom účinku, kedy eliminujú nežiaduce druhy organizmov v záujme ochrany zdravia zvierat a ľudí a zvýšenia výnosov vo výrobe, stretávame sa aj s nežiaducimi účinkami u necieľových organizmov, ako sú napríklad alergie alebo nádorové ochorenia. Voľne pasúce sa zvieratá, hovädzí dobytok a ovce, patria ku skupine zvierat priamo vystavených a najviac ovplyvnených účinkom pesticídov. Kačmár a kol. (1999) popisali zvýšenú morbiditu až mortalitu mláďat, u živo narodených potomkov zníženú vitalitu, u dospelých jedincov zníženú produktivnosť a odolnosť a pod.

Tebukonazol je fungicíd patriaci do triedy triazolových pesticídov. Na Slovensku sa používa ako komerčný prípravok Orius 25 EW (250g/l tebuconazol). V našich podmienkach sa osvedčil pri ošetrovaní listov a klasov pšenice a jačmeňa a proti hubovitým ochoreniam repky ozimnej. Inak sa tebukonazol v prípravku Folicur® vo veľkej miere používa v rámci prevencie a liečby chorôb spôsobených hubou *Pyricularia oryzae* na ryžových poliach Stredomoria (Bayer CropScience Limited, 2005).

Fungicídne vlastnosti triazolových pesticídov sú založené na inhibícii enzýmu 14- α -demetylázy (CYP 51), ktorý reguluje syntézu ergosterolu nevyhnutného pre tvorbu bunkovej steny húb (Zarn a kol., 2003).

V našej práci sme sa zamerali na zistenie genotoxických, resp. cytotoxických vlastností tebukonazolu na periférne lymfocyty hovädzieho dobytká použitím CBMN testu. Mikronukleový test bol popísaný ako veľmi senzitívny pri štúdiu bunkových a jadrových dysfunkcií spôsobených starnutím *in vitro* alebo *in vivo*, pri mikronutričných deficienciách alebo ich nadbytku, po expozíciách genotoxickými látkami a pri reparačných poruchách v oprave genómu (Fenech, 2007). Mikronukleá sú malé, extranukleárne telieska, ktoré vznikajú v deliacich sa bunkách z acentrických chromozómových/chromatídových fragmentov alebo z celých chromozómov/chromatíd, ktoré zaostali v anafáze, a preto nie sú obsiahnuté v dcérskych jadrách v telofáze (Mateuca a kol., 2006). Kľúčovou výhodou CBMN testu je súčasná detekcia klastogénnych a aneugénnych vlastností testovanej látky, teda detekcia štruktúrnych a/alebo numerických aberácií.

MATERIÁL A METODIKA

Technický tebukonazol ((R,S)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimetyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmetyl)pentan-3-ol) bol rozpustený v dimetylsulfoxide (DMSO, Sigma, St. Louis, MO, USA) a pridaný v koncentráciách 1,5; 3; 6; 15, 30 a 60 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ do kultúry lymfocytov. Ako pozitívnu kontrolu sme použili mitomycín C (MMC, Sigma St. Louis, MO USA) v koncentrácii 0,4 μM rozpustený v injekčnej vode.

Kultúry lymfocytov boli pripravené pridaním 0,2 ml heparinizovanej krvi hovädzieho dobytká (2 kusy, slovenský strakatý dobytok, veku 6 mesiacov) do kultivačného média zloženého z 4 ml RPMI 1640, 1ml bovinného fetálneho séra (BoFeS), antibiotík (penicilín 250 U. ml^{-1} a streptomycín 250 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) a fytohemaglutinínu (PHA, 180 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, Welcome, Dartford, Germany).

Lymfocytové kultúry boli kultivované 72 hodín pri 37°C. Cytochalazín B (Cyt. B, Sigma, St. Louis, MO, USA) bol pridaný 44 hodín od začiatku kultivácie v koncentrácii 6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Tebukonazol sme pridal na posledných 24 a 48 hodín kultivácie. Následne boli kultúry spracované. Po centrifugácii pri 170 \times g a odsatí supernatantu, sme lymfocyty vystavili krátkemu (2 min.) hypotonickému pôsobeniu (0,075 M KCl), potom sme pridal 1 ml fixačného roztoku (metanol:kyselina octová, 3:1) a nechali spolu pôsobiť 10 min.

Následovala centrifugácia a fixácia (10 min.), ktoré sa opakovali ešte dvakrát. Z takto získaných lymfocytových suspenzií boli pripravené preparáty, ktoré boli po vyschnutí ponorené do 100% metanolu na 10 min. a ofarbené v 5% Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany) v Sörensensovom pufri (pH 6,8) 18 min. Preparáty sme vyhodnocovali mikroskopom pri 1200 násobnom zväčšení.

Frekvenciu mikrojadier sme odčítali v 1000 dvojjadrových bunkách pre každú koncentráciu a pre každého donora (Fenech, 1993) a CBPI sme vypočítali na základe množstva buniek s jedným, dvomi, tromi a štyrmi jadrami získanými hodnotením 500 buniek v rade.

χ^2 - kvadrát test sme použili na štatistické vyhodnotenie výsledkov. Varičná štatistika výsledkov v tabuľkách bola urobená Fisherovým testom

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky štúdia bunkovej kinetiky a vzniku mikrojadier po 24 a 48 hodinovej expozícii technickým tebukonazolom sú zhrnuté v tabuľke 1 a 2.

Tab.1. Spontánna a indukovaná frekvencia mikrojadier lymfocytov HD po 24h expozícii technickým tebukonazolom.

	Donor 1			Donor 2				
	BNMN	%BNMN	CBPI	BNMN	%BNMN	CBPI		
Počet MN	1	2		1	2			
DMSO	22	1	2,4 \pm 0,16	1,37	21	2	2,5 \pm 0,17	1,464
1,5	20	1	2,2 \pm 0,5 ^a	1,38 ^a	19	1	2,1 \pm 0,15 ^a	1,432 ^a
3	22	2	2,6 \pm 0,17 ^a	1,322 ^a	24	2	2,8 \pm 0,18 ^a	1,466 ^a
6	27	2	3,1 \pm 0,18 ^a	1,304 [*]	22	4	3,0 \pm 0,19 ^a	1,264 ^{***}
15	25	5	3,5 \pm 0,21 ^a	1,284 ^{***}	24	6	3,6 \pm 0,22 ^a	1,36 ^{***}
30	16	3	2,2 \pm 0,17 ^a	1,182 ^{***}	15	2	1,9 \pm 0,15 ^a	1,186 ^{***}
60	1 ^b	0 ^b	ND	1,074 ^{***}	1 ^b	0 ^b	ND	1,072 ^{***}
MMC	8	3	1,4 \pm 0,14 ^a	1,11 ^{***}	10	3	1,6 \pm 0,15 ^a	1,124 ^{***}

MN - mikrojadro

BNMN – dvojjadrové bunky s MN

CBPI - cytokinesis block proliferation index

^a - bez štatistickej významnosti

^b - hodnotených 50 buniek

^{*,**,*} - štatisticky významne údaje ($p < 0,05$, $p < 0,001$, χ^2 test)

ND – nedostatočný počet buniek

Tab.2. Spontánna a indukovaná frekvencia mikrojadier lymfocytov HD po 48h expozícii technickým tebukonazolom.

Počet MN	Donor 1				Donor 2			
	BNMN		%BNMN	CBPI	BNMN		%BNMN	CBPI
	1	2			1	2		
DMSO	8	1	1,0±0,11	1,238	7	1	0,9±0,10	1,386
1,5	10	0	1,0±0,10 ^a	1,214 ^a	9	1	1,1±0,11 ^a	1,326 [*]
3	12	2	1,6±0,14 ^a	1,198 [*]	10	0	1,0±0,10 ^a	1,324 [*]
6	14	3	2,0±0,16 ^a	1,190 [*]	12	3	1,8±0,15 ^a	1,310 ^{**}
15	7	4	1,5±0,15 ^a	1,14 ^{***}	10	0	1,0±0,10 ^a	1,288 ^{***}
30	7	0	0,7±0,08 ^a	1,112 ^{***}	5	2	0,9±0,11 ^a	1,148 ^{***}
60	-	-	ND	1,014 ^{***}	-	-	ND	1,016 ^{***}
MMC	23	2	2,7±0,17 ^{**}	1,172 ^{**}	23	2	2,7±0,17 ^{**}	1,164 ^{***}

MN – mikrojadro

BNMN – dvojjadrové bunky s MN

CBPI - cytokinesis block proliferation index

^a - bez štatistickej významnosti

^{*,**,*} - štatisticky významne údaje ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, χ^2 test)

ND – nedostatočný počet buniek

Po 24 h expozícii sme zaznamenali zvýšenú frekvenciu MN u oboch donorov, avšak bez štatistickej významnosti. Najvyššiu frekvenciu MN sme zaznamenali pri koncentrácii 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, po expozícii periférnych lymfocytov hovädzieho dobytku tebukonazolom v koncentrácii 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sa frekvencia MN znížila. Po aplikácii najvyššej koncentrácie (60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) nebolo možné vyhodnotiť dostatočný počet buniek. Vo frekvenciách CBPI sme zistili redukciiu proliferačných indexov v závislosti od dávky (tab. 1). Pri najnižších koncentráciách (1,5 a 3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) došlo k zníženiu CBPI oproti kontrolným hladinám u oboch donorov, avšak bez štatistickej významnosti. Pri vyšších koncentráciách tebukonazolu (6, 15, 30 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) boli hodnoty CBPI výrazne redukované s vysokou štatistickou významnosťou (χ^2 test, $p < 0,05$ a $p < 0,001$). Kým u donora 1 bola redukcia CBPI pozvoľná, u donora 2 došlo už pri koncentrácii 6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ k náhlemu poklesu hodnoty CBPI ($p < 0,001$). Po predĺženej expozícii (48h, tab. 2) frekvencie MN nedosiahli štatistickú významnosť a najvyššia hodnota bola zistená už pri koncentrácii 6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a postupne klesala. Podobne pri najvyššej koncentrácii 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nebolo možné vyhodnotiť dostatočný počet buniek. Frekvencie CBPI vykazovali taktiež zníženie v dávkovej závislosti u oboch donorov so štatistickou významnosťou pri všetkých koncentráciách testovaného fungicidu ($p < 0,05$, $p < 0,01$ a $p < 0,001$).

V indukovaných frekvenciách MN po 24 a 48 h expozícii tebukonazolom sme nezaznamenali štatisticky významné hodnoty. Podľa Savage (1988) pozorované frekvencie MN sú často nižšie ako frekvencie chromozómových aberácií získané z prvých metafáz po expozícii agensom, pretože nie všetky fragmenty nevyhnutne vytvoria viditeľné MN. Taktiež MN test nie je vhodný na detekciu MN pochádzajúcich z nestabilných aberácií (Surrallés a Natarajan, 1997).

CBPI sa používa ako prídavný cytogenetický ukazovateľ informujúci o potenciáli chemickej látky ovplyvniť bunkový cyklus. Z našich výsledkov vyplýva, že tebukonazol je schopný redukovať proliferačnú aktivitu lymfocytov hovädzieho dobytku, čím sme potvrdili jeho cytotoxický/cytostatický efekt.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla vďaka podpore grantových projektov VEGA MŠ 1/0125/11 a 1/0334/10.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bayer CropScience Limited. Environmental Information Sheet Folicur® MAPP number 11278; CPA Guidance Notes version 3, 2005.
- Fenech M. The Cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* 1993; 285:35-44.
- Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2007; 2:1084-1104.
- Chu X.G., Hu X. Z., Yao H. Y. Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass selective detection. *J. Chromatogr. A* 2005; 1063:201-210.
- Kačmár P., Pisl J., Mikula I. *Imunotoxikology and veterinary medicine. Acta Vet. Brno* 1999; 68:57-79.
- Mateuca R., Lombaert N., Aka P. V., Decordier I., Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 2006; 88:1515-1531.
- Savage J. R. K. A comment on the quantitative relationship between micronuclei and chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 1988; 207 : 33-36.
- Surrallés J., Natarajan A. T. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat. Res.* 1997; 392:165-174.
- Zarn J. A., Bruschiweiler B. J., Schlatter J. R. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. *Environ. Health Perspect.* 2003; 111:255-261.

NEUROPROTEKTÍVNE PÔSOBENIE NOVÉHO ANALÓGU KYSELINY KYNURENOVEJ PO TRAUMATICKOM POŠKODENÍ MIECHY U POTKANA

Korimová A., Vanický I.

Neurobiologický ústav, SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo stanoviť možný neuroprotektívny účinok nového analógu kyseliny kynurenovej, širokospektrálneho antagonistu excitotoxických aminokyselín - glu-KYNA, podaného intratekálne počas 24 hodín bezprostredne po kompresnom poškodení miechy. Na základe behaviorálnych testov sme u zvierat injikovaných glu-KYNA zaznamenali v porovnaní s kontrolnou skupinou zvierat signifikantné zlepšenie hybnosti zadných končatín. Histologické analýzy zároveň preukázali štatisticky významné zvýšenie množstva zachovanej sivej a bielej hmoty miechy v oblasti kaudálne od epicentra lézie, i keď bez signifikantných zmien priamo v mieste najväčšieho poškodenia. Naše výsledky tak naznačujú zlepšenie priamych následkov poškodenia vzniknutých v dôsledku primárneho mechanického poranenia miechy ako aj ďalšie možnosti ďalšieho experimentálneho využitia tejto látky pri liečbe poškodenia miechy.

ÚVOD

Predpokladá sa, že excitotoxické aminokyseliny (EA) zohrávajú dôležitú úlohu v patogenéze viacerých neurodegeneratívnych ochorení vrátane akútnych - napr. cievne mozgové príhody, hypoglykémia, až po chronické - Parkinsonova choroba alebo amyotrofická laterálna skleróza (Whetsell a Shapina, 1993, Lipton a Rosenberg, 1994). V experimentálnych modeloch týchto ochorení predstavuje blokovanie receptorov pre EA, predovšetkým antagonistov N-metyl-D-aspartátového subtypu, jedno z najúčinnějších neuroprotektívnych opatrení (Hicks a kol., 1995). Nadmerným uvoľňovaním excitotoxických aminokyselín do intracelulárneho priestoru a s tým následnou neurotoxicitou je sprevádzané aj poranenie miechy (PM). Spolu s ostatnými biochemickými a bunkovými mechanizmami iniciovanými primárnym mechanickým inzultom prispieva k sekundárnemu zväčšovaniu veľkosti lézie pozorovanej v prvých hodinách po PM a stáva sa tak predmetom mnohých terapeutických stratégií s cieľom minimalizovať rozsah poškodenia tkaniva miechy.

Kyselina kynurenová (KYNA), ktorá vzniká reverzibilnou transamináciou L-kynurenínu, primárneho katabolického produktu metabolickej cesty tryptofánu (Schwarcz a Pellicciari, 2002), je vo vysokých, nefyziologických koncentráciách široko spektrálnym antagonistom iónotrópných receptorov EA. Pôsobí totiž ako nekompetitívny antagonist $\alpha 7$ -nikotínových acetylcholínových receptorov a kompetitívny antagonist glycínového miesta N-metyl-D-aspartátového subtypu receptora kyseliny glutámovej (Perkins a Stone, 1982). Identifikovaná bola aj ako endogénny ligand receptora GPR35, ktorý je exprimovaný hlavne bunkami imunitného systému (Wang a kol., 2006) a v prípade spojenia s KYNA môže zohrávať významnú úlohu v imunologickej regulácii. Pre antikonvulzívny a možný neuroprotektívny účinok slúži v podmienkach *in vivo* ako aj *in vitro* ako významný nástroj blokovania excitotoxikkej neurotransmisie.

Naším cieľom je na kompresnom modeli PM testovať protektívny účinok nového analógu KYNA, kyseliny glukosamin-kynurenovej (glu-KYNA) a stanoviť vplyv jeho podávania na obnovu neurologických funkcií a rozsah poškodenia tkaniva po poranení miechy.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente boli použité dospelé samce potkanov kmeňa Wistar s hmotnosťou 300-330 g, rozdelené do dvoch skupín. V prvej skupine (n=15) boli zvieratá s kompresným PM, ktorým bolo priamo po PM v priebehu 24 hodín cez intratekálny katéter napojený na pumpu

podávaných celkovo 120 μ l glu-KYNA (t.j., 5 μ l glu-KYNA/hod). Druhú, kontrolnú skupinu (n=15) tvorili zvieratá s intratekálne podaným fyziologickým roztokom, a to v rovnakom množstve a za rovnakých podmienok ako v prípade prvej skupiny zvierat.

Samotné kompresné PM bolo prevedené v inhalačnej anestézii pomocou 2-Fogartyho katétra vsunutého do epidurálneho priestoru cez malý otvor vyvrtaný zubnou vŕtačkou na úrovni Th10 stavca, následne jeho posunutím kraniálne do vzdialenosti 1 cm, t.j. na úroveň Th8-9 a naplnením koncovej balónikovej časti 12,5 μ l destilovanej vody po dobu 5 minút. Po sfúknutí balónika sme mäkké tkanivá zašili a zvieratá umiestnili do kliebok. Na základe 21. stupňovej škály BBB testu (Basso a kol., 1995) sme v pravidelných časových intervaloch počas celej doby prežívania (28 dní) u všetkých zvierat prevádzali neurologické testovanie hybnosti oboch panvových končatín. Prvé testovanie sa pritom uskutočnilo priamo v 1. deň po poranení a následne na 7., 14., 21. a 28. deň.

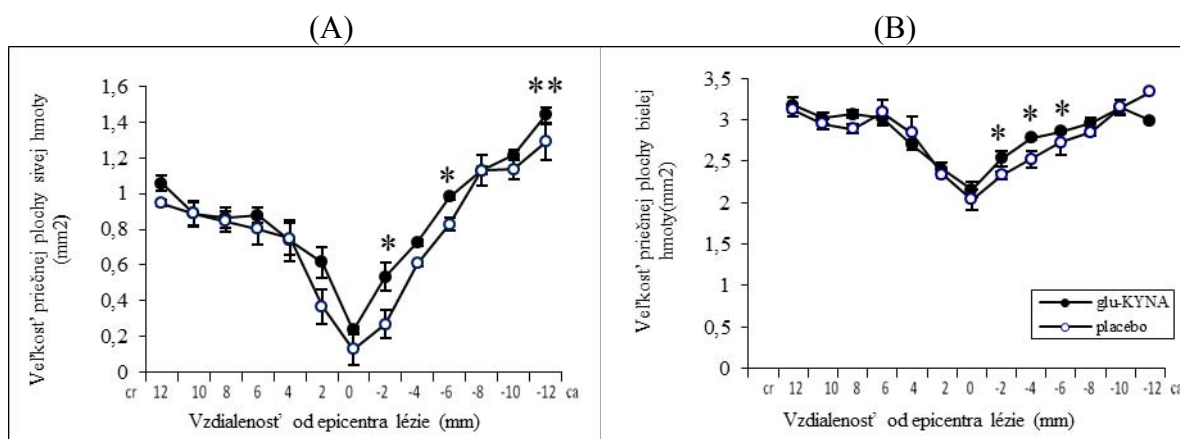
Na 28. deň po zásahu sme zvieratá v hlbkej narkóze (zmes ketamínu a xylazínu) prepláchli transkardiálne fyziologickým roztokom a následne 4% paraformaldehydom v 0,1M fosfátovom pufri (PBS, pH 7,4) a miechy vybrali z chrbtice kanála. Po 1-dňovej kryoprotekcii v 30% sacharóze a zaliatí do proteínovej matrix, sme miechy narezali na 1 mm transverzálne rezy a za účelom ďalších analýz histologicky spracovali. Rozdiely medzi stanovenými hodnotami jednotlivých testov v daných časových intervaloch sme u oboch skupín zvierat štatisticky vyhodnotili pomocou Tukey's posthoc testu programu ANOVA. Plochy zachovanej bielej a sivej hmoty miechy v jednotlivých častiach celého rostrokaudálneho rozsahu lézie miechy sme ako u experimentálnych, tak aj u kontrolných zvierat štatisticky analyzovali pomocou programu Image Tool.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Viacere experimentálne modely poškodenia mozgu potvrdili vysokú účinnosť blokovania receptorov pre EA pri redukcii rozsahu poškodenia neurónov (Hicks a kol., 1995). Napríklad v modeloch fokálnej ischémie mozgu bolo po aplikácii antagonistov receptorov EA zaznamenané zníženie rozsahu infarktom postihnutého tkaniva. Neuroprotektívne vlastnosti KYNA stanovené pri systémovom podaní z dôvodu jej nízkej penetrácie cez hematoencefalickú bariéru (Gill a Woodruff, 1990) predznamenávajú jej možné použitie v rozličných modeloch poškodenia CNS. Wrathall a kol. (1992) zaznamenali po intratekálnej aplikácii pri kontúznom poškodení miechy u potkana zmiernenie funkčného deficitu. V našom experimente sme na základe BBB testu u zvierat s intratekálne podanou glu-KYNA zaznamenali zlepšenie lokomotorických funkcií, ktoré sa udržiavalo konštantne od 1. dňa testovania vo všetkých ďalších sledovaných časových intervaloch. Rozdiely medzi jednotlivými experimentálnymi skupinami zvierat boli pritom s výnimkou 1. dňa po PM významné vo všetkých nasledujúcich meraniach ($p < 0,05$). Štatistické vyhodnotenie plochy poškodeného tkaniva u zvierat injikovaných glu-KYNA v porovnaní s kontrolnou skupinou zvierat zároveň preukázalo významné zvýšenie množstva zachovanej sivej ako aj bielej hmoty miechy kaudálne od epicentra lézie, i keď bez zistenia štatisticky významných zmien priamo v mieste najväčšieho poškodenia. Zvýšenie miery zachovania sivej a bielej hmoty miechy v priebehu celej dĺžky rostrokaudálnej lézie po cielej liečbe novým analógom glu-KYNA tak koreluje s vylepšením lokomočných funkcií u liečených zvierat (Obr.).

Výsledky nášho experimentu naznačujú zlepšenie dôsledkov poranenia miechy blokovaním účinkov nadmernej koncentrácie neurotransmiterov. Potvrdzujú účasť receptorov pre EA na rozsahu celkového funkčného deficitu v mieste poškodenia, resp. v jeho bezprostrednej blízkosti vznikajúceho práve v dôsledku traumatického poškodenia a indikujú tak možnosť terapeutického využitia tejto látky pri traumatickom PM.

Obr. Účinok glu-KYNA na rozsah poškodenia tkaniva miechy 4 týždne po PM. Množstvo zachovaného tkaniva bolo stanovené analýzou prierečnej plochy rezov zo zvierat s intratekálne aplikovanou glu-KYNA (glu-KYNA) a z kontrolnej skupiny zvierat (placebo) na 28. deň. (A) Množstvo zachovanej sivej hmoty miechy (A) a bielej hmoty miechy (B) v mieste najväčšieho poškodenia (epicentrum) a v oblastiach ležiacich kraniálne a kaudálne od tohto miesta. Údaje predstavujú priemerné hodnoty \pm smerodajná odchýlka, cr - kraniálne, ca – kaudálne; (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).



POĎAKOVANIE

Práca bola podporená VEGA grantom č. 2/0202/10

POUŽITÁ LITERATÚRA:

- Ambrozaitis KV, Kontautas E, Spakauskas B, Vaitkaitis D. Pathophysiology of acute spinal cord injury. *Medicina (Kaunas)*. 2006; 42(3):255-61
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating-scale for open-field testing in rats. *J. Neurotrauma*. 1995; 12(1):1–21
- Gill R, Woodruff GN. The neuroprotective actions of kynurenic acid and MK-801 in gerbils are synergistic and not related to hypothermia. *Eur. J. Pharmacol.* 1990; 176:143-9
- Hicks RR, Smith DH, Mcintosh TH. Temporal response and effects of excitatory amino acid antagonist on microtubule-associated protein 2 immunoreactivity following experimental brain injury in rat. *Brain Res.* 1995; 678(1-2):151-60
- Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med.* 1994; 330(9):613-22
- Perkins MN, Stone TW. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interactions with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res.* 1982; 247(1):184–7
- Schwarcz R, Pellicciari R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 303(1):1–10
- Vanický I, Urdzíkova L, Saganová K, Čížková D, Gálik J. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J. Neurotrauma*. 2001; 18(12):1399-407
- Wang J, Simonavicius N, Wu X, Swaminath G, Reagan J, Tian H, Ling L. Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J Biol Chem.* 2006;281:22021-8
- Whetsell WO, Shapira NA. Neuroexcitation, excitotoxicity and human neurological disease. *Lab Invest.* 1993; 68(4):372-87
- Wrathall JR, Bouzoukis J, Choiniere D. Effect of kynurenate on functional deficits resulting from traumatic spinal cord injury. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 218(2-3):273-81

DRUHOVÁ DIVERZITA A KVANTITA HNIEZDNEJ ORNITOFAUNY UNIVERZITNÉHO AREÁLU UVLF V KOŠICIACH V ROKU 2011

Korytár L., Ondrejka R., Ondrejková A., Prokeš M., Slepecká E., Beníšek Z.

Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Cieľom tohto príspevku bolo spoznať štruktúru hniezdnej ornitofauny univerzitného areálu Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach so zameraním najmä na prostredie univerzitného parku. Metódou mapovania hniezdných areálov a metódou odchytov vtáctva do nárazových sietí sme zmapovali množstvo a priestorové rozloženie hniezdných okrskov hniezdičov a ich druhovú diverzitu. Na území univerzitného parku sme zistili 15 hniezdičov (okrem ferálnych holubov). Hniezdenie ďalších 5 druhov je veľmi pravdepodobné.

ÚVOD

Na výskum ornitofauny urbánneho prostredia sa kladie zvýšený dôraz približne od druhej polovice dvadsiatych rokov. Jednu z prvých rozsiahlych kvantitatívnych a kvalitatívnych štúdií hniezdných ornitocenóz na Slovensku vykonali Feriancová-Masárová a Ferianc v osemdesiatych a deväťdesiatych rokoch 20. Storočia, pričom v 21 okresných mestách západného a stredného slovenska zistili 63 hniezdiacich druhov vtákov (Lučeničová a Országhová, 2010).

Charakteristika územia

Skúmaný areál o rozlohe cca. 10 ha je situovaný v priemernej nadmorskej výške 215 m v severnej časti mesta Košice, ktorého katastrálne územie podľa fyto geografického členenia spadá do oblasti panónskej flóry (Adamkovičová 2002). Fauna mesta Košice a jeho okolie patrí podľa zoogeografického členenia do provincie Karpatskej (horská) a provincie Vnútrokarpatských zníženín (stepná) (Barabas a Labunová, 2009). Univerzitný park sa vyznačuje roztrúseným zmiešaným listnatým (lipa, platan, breza, javor) aj ihličnatým (smrek, borovica, tis) stromovým porastom s prímiesou kríkov zväčša tvoriacich živé ploty a vyskytujú sa tu aj trávnaté porasty. Vhodné podmienky pre hniezdenie vtákov poskytujú aj jednotlivé budovy univerzity.

MATERIÁL A METODIKA

Za účelom zistenia počtu druhov hniezdičov a ich hniezdných okrskov sme použili metódu mapovania hniezdných okrskov podľa Jandu a Řepu, (1986). Podstatou metódy je uskutočnenie viacerých kontrol na vymedzenej ploche v priebehu hniezdného obdobia. Metóda je vhodná na mapovanie hniezdných populácií teritoriálnych nekoloniálnych druhov, ako napr. spevavce. Počas každej kontroly sa do mapy územia značkami zakresľujú pozície pozorovaných vtákov. Zvláštny dôraz sa kladie na spievajúce samce. Pri vyhodnocovaní výsledkov sa prekreslia údaje o jednom druhu zo všetkých kontrol do druhej mapy. Viaceré registrácie toho istého druhu v mape, ležiace blízko pri sebe spoja sa v zhuk registrácií druhu. Zhuk registrácií druhu predstavuje hniezdne teritórium jedného páru. Na základe zistených hniezdných teritórií sa stanovuje početnosť hniezdnej populácie (Janda a Řepa, 1986).

V priebehu hniezdnej sezóny (máj – jún 2011) bolo vykonaných 5 kontrol (snímkov), z toho štyri ranné kontroly (05⁰⁰ – 09⁰⁰ hod.), a jedna večerná kontrola na zachytenie druhov s výraznou večernou aktivitou (18⁰⁰ – 20³⁰ hod.). Jednotlivé hniezdne okrsky boli vyhodnotené na základe spevu samcov, alebo nájdenia hniezda.

Ako doplnková metóda na zisťovanie druhej diverzity hniezdnej ornitofauny bola použitá metóda odchytu do nárazových ornitologických sietí. Táto činnosť vykonával prvý autor na základe držby krúžkovateľskej licencie a povolenia a rozhodnutia MŽP SR č. 269/132/05-5.1

pil, ktorým sa udelila pre krúžkovateľov združených pri Slovenskej ornitologickej spoločnosti výnimka zo zákona č. 543/2002 na odchyt a krúžkovanie voľnežijúceho vtáctva na území SR.

Boli použité nylonové päťpolové siete o rozmeroch 2,5X10 m a 2,5X12 m o priemere ôk 16X16 mm. U odchytených vtákov bola evidované druhová príslušnosť a pohlavie a vek ak to bolo možné. Každý odchytený jedinec bol označený ornitologickým krúžkom a späťne vypustený.

Pri snímkovaní výskytu vtákov počas jednotlivých kontrol a pri vyhodnocovaní výsledkov boli použité mapové podklady voľne dostupné online prostredníctvom programu Google Earth.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V roku 2011 bolo metódou mapovania hniezdných okrskov potvrdené hniezdenie 12 druhov vtákov (Tab. 1). Všetky hniezdiče patria do radu spevavcov (*Passeriformes*). Najvyššiu hniezdnú hustotu vykazovali drozd čvíkotavý a drozd čierny. Medzi druhy pri hniezdení uprednostňujúce koruny stromov patria drozd čvíkotavý (*Turdus pilaris*), pinka lesná (*Fringilla coelebs*), kolibkárík čipčavý (*Phylloscopus collybita*), zelienska obyčajná (*Carduelis chloris*), škorec obyčajný (*Sturnus vulgaris*), krovinnú etáž, resp. kríky obsadzovali drozd čierny (*Turdus merula*), penica čiernohlavá (*Sylvia atricapilla*), penica popolavá (*Sylvia curruca*) a budovy žltochvost domový (*Phoenicurus ochruros*), muchár sivý (*Muscicapa striata*), sýkorka veľká (*Parus major*). Sýkorky veľké obsadzovali aj búbky rozmiestnené v areáli. Hniezdenie ďalších druhov, ako drozd plavý (*Turdus merula*), trasochvost biely (*Motacilla alba*), hrdlička záhradná (*Streptopelia decaocto*), straka obyčajná (*Pica pica*) a dážd'ovník tmavý (*Apus apus*) je pravdepodobné.

Tab. 1: Hniezdiče a počet hniezdných okrskov v parku UVLF v Košiciach r. 2011

	Vedecký názov	Slovenský názov	Hniezdne okrsky
1.	<i>Turdus pilaris</i>	drozd čvíkotavý	7
2.	<i>Parus major</i>	sýkorka veľká	5
3.	<i>Turdus merula</i>	drozd čierny	5
4.	<i>Fringilla coelebs</i>	pinka lesná	4
5.	<i>Sturnus vulgaris</i>	škorec obyčajný	4
6.	<i>Phoenicurus ochruros</i>	žltochvost domový	4
7.	<i>Serinus serinus</i>	kanárik poľný	3
8.	<i>Carduelis chloris</i>	zelienska obyčajná	3
9.	<i>Sylvia atricapilla</i>	penica čiernohlavá	2
10.	<i>Phylloscopus collybita</i>	kolibkárík čipčavý	1
11.	<i>Sylvia curruca</i>	penica sivá	1
12.	<i>Muscicapa striata</i>	muchár sivý	1

Do nárazových sietí bolo odchytených 19 jedincov 9 druhov spevavcov (Tab. 2).

Pravidelnými nidifikantmi univerzitného areálu UVLF v Košiciach sú aj vrabec poľný (*Passer montanus*), vrabec domový (*Passer domesticus*) a lastovička domová (*Hirundo*

rustica). Pre mapovanie týchto druhov nie je metodika mapovania hniezdných okrskov vhodná.

Tab. 2: Prehľad odchytených druhov

	Vedecký názov	Slovenský názov	Odchytené jedince
1.	<i>Passer montanus</i>	Vrabc poľný	3
2.	<i>Sturnus vulgaris</i>	Škorec obyčajný	1
3.	<i>Turdus pilaris</i>	Drozd čvíkotavý	4
4.	<i>Phoenicurus ochruros</i>	Žltouchvost domový	1
5.	<i>Carduelis chloris</i>	Zelienka obyčajná	2
6.	<i>Fringilla coelebs</i>	Pinka lesná	1
7.	<i>Cyanistes caeruleus</i>	Sýkorka belasá	2
8.	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	Glezg hrubozobý	1
9.	<i>Turdus merula</i>	Drozd čierny	3

Ide o prvé získané systematické poznatky o avifaune univerzitného areálu UVLF v Košiciach. Na ploche skúmaného areálu bolo zistených 15 druhov nidifikantov. Z tohto pohľadu je na Slovensku asi najlepšie preskúmaná mestská zeleň Bratislavy. V rokoch 1990 – 1992 tu bolo v troch parkoch (Sad J. Kráľa, Botanická záhrada a Medická záhrada) zistených 35 druhov hniezdiacich vtákov (Kocian a Franeková, 1993). Podobne, ako je tomu v parku UVLF v Košiciach, aj v parkoch Bratislavy prevažujú stromové hniezdiče (Polievková-Ličková a Kocian, 2000).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Adamkovičová A, Bebej J a kol. Správa o stave životného prostredia košického kraja k roku 2002. Slovenská agentúra životného prostredia Banská Bystrica, Centrum environmentálnej regionalizácie Košice. 2002; 48pp.
- Barabas D, Labunová A. Vybrané kapitoly z biogeografie pre geografov. Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach. 2009; 80 pp.
- Dostupné na internete: <http://www.upjs.sk/pracoviska/univerzitna-kniznica/ekniznica/elektronicke-publikovanie/ep-pfupjs/>
- Janda J, Řepa P. Matody kvantitativního výzkumu v ornitologii. Vydalo Okresní vlastivědné muzeum J.A. Komenského MOS v Přerově, Krajské středisko památkové péče a ochrany přírody Ostrava, Státní zemědělské nakladatelství Praha. 1986; 157 pp.
- Kocian Ľ, Franeková M. Príspevok k poznaniu hniezdnej ornitocenózy troch parkov v Bratislave. Tichodroma; 6; 8–89.
- Lučeničová T, Országhová Z. Hniezdne ornitocenózy vybraných plôch stupavy. Folia faunistica slovac. 2010; 15 (14); 119–126.
- Polievková-Ličková M, Kocian Ľ. Hniezdne ornitocenózy malých plôch zelene Bratislavy. Tichodroma; 61–67.

NEINVAZÍVNY PRÍSTUP V TERAPII KOŽNÝCH AFEKCIÍ U VTÁČÍCH PACIENTOV

Kožár M.¹, Molnár L.², Trbolová A.¹

¹Klinika malých zvierat, ²Klinika exotických a voľne žijúcich zvierat Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

ABSTRAKT

Kožné afekcie, ako aj ich terapia, sú často riešenou problematikou v klinickej praxi vtáčích pacientov. Lokalizácia defektov v spojení s limitáciami vtácej kože si často vyžaduje využitie nových moderných metód terapie. Pri drobných poraneniach, miestach s nedostatkom voľnej kože potrebnej na prekrytie defektu kože, ťažko prístupných miestach a lokalizácii poškodení kože, kde novovzniknuté granulačné tkanivo nebude musieť odolávať tlaku hmotnosti tela, je možné využitie neinvazívneho prístupu terapie kože. Táto metóda bez chirurgickej intervencie sa ukazuje ako vhodná možnosť terapie, avšak častokrát sprevádzaná predĺženým časom hojenia a slabším kozmetickým výsledkom. Jej základom je mechanické vyčistenie rany doplnené o medikamentóznou terapiu. Neinvazívnym postupom bolo ošetrovaných 7 pacientov exotických a voľne žijúcich vtákov s prítomným poškodením kože nôh, pričom u väčšiny z nich došlo k úplnému vyhojeniu vzniknutého poškodenia kože v období do jedného mesiaca od vzniku poranenia. Vyskúšaním neinvazívnych metód terapie defektov kože sme odobrili možnosť ich použitia pri terapii spomínaných poškodení kože s pozitívnym výsledkom hojenia.

ÚVOD

V klinickej praxi vtáčích pacientov sa stretávame s často riešenou otázkou terapie vzniknutých kožných afekcií. Množstvo vyvolávajúcich príčin radí defekty kože do skupiny multietiológických ochorení. Do hlavných skupín vyvolávajúcich príčin sa radia lacerácie spojené s traumou, bodné a hryzné poranenia, automutilácia, strelné rany, zápaly kože tela, ako aj kože nachádzajúcej sa na chodidlách (*pododermatitits*), bakteriálne, parazitárne a plesňové infekcie. Ďalšou veľkou skupinu tvoria omrzliny, chemické a tepelné popáleniny. V neposlednom rade sa medzi vyvolávajúce príčiny u vtákov držaných v zajatí radia nevhodný manažment chovu v spojení so slabou starostlivosťou, nevyhovujúcimi bidlami, nevhodnou výživou a častými traumami vznikajúcimi počas transportu (Burke a kol., 2002; Ferrell, 2002; Ritzman, 2004; Stroud a kol., 2003).

Unikátna anatómia vtácej kože spolu so zápalovými procesmi predstavujú výzvu pre liečbu a vyhojenie defektov kože. Evolučné adaptácie, ako mala hrúbka kože, nedostatočné množstvo podkožného tkaniva, slabé krvné zásobenie a náchylnosť na poškodenie si vyžadujú využitie moderných, alebo modifikovaných metód terapie (Burke a kol., 2002; Ritzman, 2004).

Pri drobných poraneniach, kožných defektoch s rozsiahlou absenciou voľnej kože, alebo miestach s prítomnou rozsiahlou infekciou je nutné využitie manažmentu terapie otvorených rán v podobe neinvazívneho prístupu. Samotný manažment nevyžaduje žiadne špeciálne vybavenia a inštrumentárium, ako je to pri chirurgickej terapii. Postupné kroky, revízie rany, odstraňovanie nekrotických zvyškov a zvládnutie prítomnej infekcie predlžujú čas hojenia so zvýšením samotných nákladov, ako aj možnosti sekundárnej kontaminácie rany (http://www.ultimatefowl.com/wiki/index.php?title=Wound_Management).

Neinvazívny prístup prináša určité výhody v klinickej praxi v podobe relatívne nízkych nákladov oproti iným metódam, minimálne invazívne zásahy do rany, ako aj pomerne vysokú úspešnosť. Okrem spomínaných výhod má manažment otvorených kožných defektov aj nevýhody v podobe dlhšieho hojenia rán, zvýšených pracovných požiadaviek a slabšieho kozmetického výsledku. Pri vtáčích jedincoch, hlavne u divo žijúcich vtákov je relatívne

obtiazna manipulacia so zvyšovaním stresovania zvierat'a, ako aj obtiaznosť vonkajšieho prekrytia poškodeného miesta (Bohling, 2008).

Po posúdení stavu a rozsahu kožného defektu zvolíme najvhodnejšiu metódu terapie. Postup neinvazívneho prístupu po jeho výbere je založený na základných princípoch v podobe opakovaných prevázov rany v určitých časových intervaloch, postupných revízií rany s odstraňovaním odumretého tkaniva a zvládnutí prítomnej infekcie antimikrobiálnou terapiou. Samotný proces terapie sa delí na dve obdobia a to na obdobie do vytvorenia granulačného lôžka, kedy je vhodné používať vlhký obvazový materiál zabraňujúci vysychaniu okrajov rany a okolitého tkaniva s jeho každodennou obmenou. Druhým obdobím je dokončenie procesu hojenia, pričom na jeho podporu a zabránenie poškodenia je využívaný hydrokoloidný obvaz vo forme bandáže.

MATERIÁL A METODIKA

Samotná klinická štúdia prebiehala na Klinike exotických a voľne žijúcich zvierat Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach v období od októbra 2009 do júna 2011.

Pri drobných poraneniach a kožných defektoch na ťažko prístupných miestach u vtáčích pacientov bola zvolená neinvazívna terapia v podobe manažmentu otvorených rán. Využitím neinvazívneho prístupu ku kožným afekciám sme ošetrili 7 pacientov. Skupinu pacientov tvorili: orol kráľovský (*Aquila heliaca*), kanárik domáci (*Serinus domestica*), myšiak lesný (*Buteo buteo*), sokol myšiak (*Falco tinnunculus*) a agapornis fišerov (*Agapornis fisheri*). Pri klinickom vyšetrení boli posúdené stav a rozsah prítomného defektu kože. Samotné posúdenie rany bolo zamerané na využitie chirurgickej, alebo neinvazívnej metódy terapie.

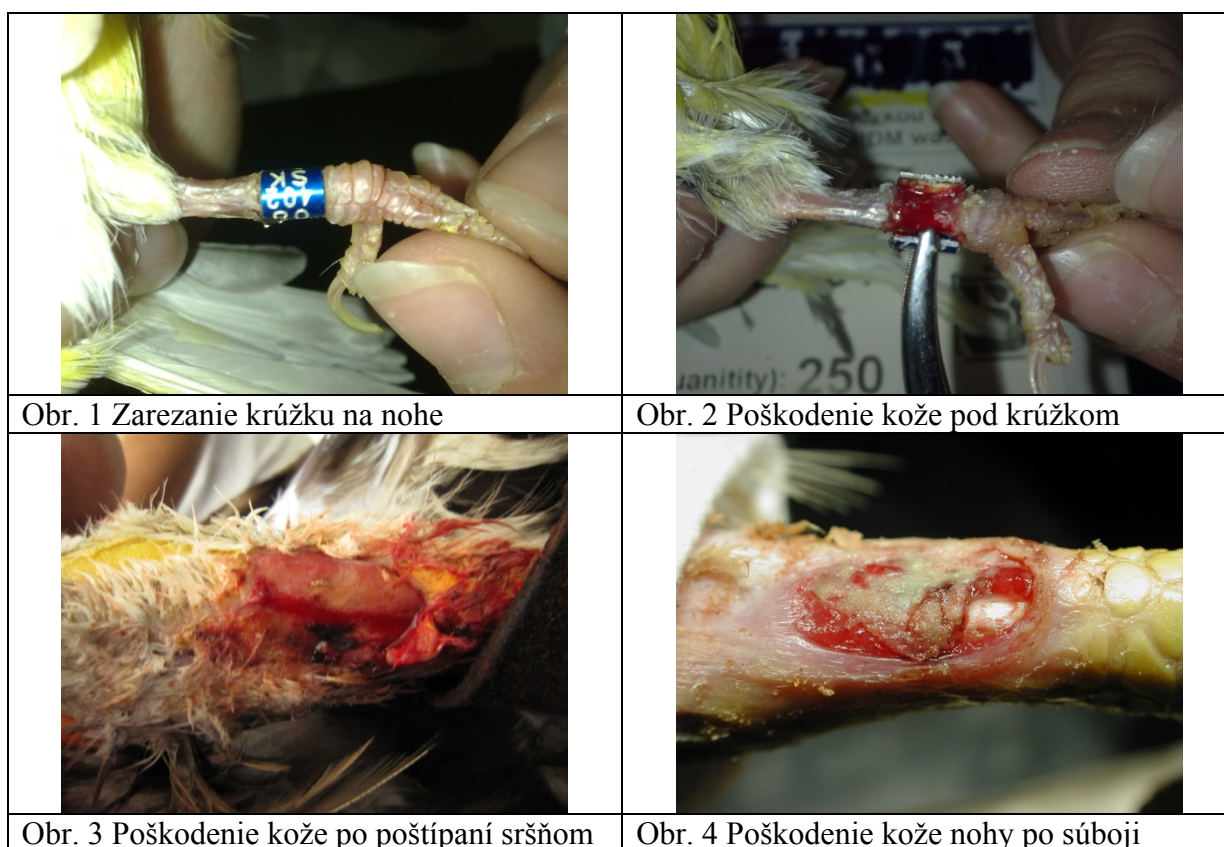
Po voľbe neinvazívneho prístupu k vzniknutým kožným afekciám boli pacienti podrobení samotnému očisteniu a výplachu rany. Z oblasti miesta kožného defektu boli odstránené nekrotické a odumreté zvyšky, pričom rana bola vypláchnutá 4 % roztokom betadínu (BETADINE, EGIS), alebo 0,05 % roztokom chlórhexidínu (Nolvasan, Cymedica). Lokálne boli podávané antibiotické masti Terramycin obsahujúci oxytetracyklín a polymyxín B (Pfizer), alebo Bactroban masť obsahujúca mupirocín (GlaxoSmithKline). Preváz a kontrola rany bola vykonávaná v prvom období 1-2krát týždenne, pričom dôraz bol kladený na prevenciu vyschnutia okrajov rany a jej okolia. V tomto prvotnom období bol u niektorých pacientov, u ktorých bola prítomná infekcia poškodeného miesta podávaný enrofloxacín v dávke 7 mg.kg⁻¹ živej hmotnosti (Enroxil, KRKA). Pri kontrolných prevázoch boli pacienti, u ktorých bola obtiazna manipulácia, uvedení do inhalačnej anestézy použitím isofluránu v koncentrácii 2-4 % (Isofluran, Torrex Chiesi).

Po zvládnutí infekcie a očistení rany bolo zahájené podávanie prostriedkov podporujúcich epitelizáciu a granuláciu a to: 20 % Solcoseryl gél (Solcoseryl, VALEANT) v spojení s betadínovou masťou (Betadine, EGIS), ako vonkajšej ochrannej bariéry pred bakteriálnou kontamináciou. Rana bola prekrytá hydrokoloidným dressingom vo forme náplaste (Hydrocoll, HARTMANN; Askina, BROWN), obvazovým materiálom a vrchnou vrstvou adhezívneho samolepiaceho obvazového materiálu (CoPoly, Yueqing Gospel Medical Instruments Co.). Kontrolné prevazy boli vykonávané raz za dva týždne.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Využitie neinvazívneho prístupu v terapii kožných defektov je indikované u vtáčích pacientov, kde nie je možné uplatniť princípy chirurgickej terapie, alebo pri drobných poraneniach kože. U štyroch pacientov (kanárik domáci /2ks/, agapornis fišerov /2ks/) bolo prítomné poškodenie šupinatej kože nohy (Obr. 2) pokrývajúcej tibiú z dôvodu zarezania kovového krúžku (Obr. 1). Pri dvoch pacientoch bolo prítomné poškodenie kože v oblasti tibiie po poštipaní sršňom (orol kráľovský) a vzájomnom súboji dvoch jedincov (myšiak

lesný) (Obr.4). U posledného pacienta boli prítomné otlaky na chodidlách v počiatočnom štádiu (sokol myšiar).



Pacienti boli podrobení princípom využívaných pri neinvazívnej terapii. V prvotnom období bol sledovaný proces hojenia rany, zvládnutie prítomnej infekcie a tvorba granulačného lôžka. Dôležitým bolo dosiahnutie vlhkého prostredia zabraňujúce často vyskytujúcemu sa vysychaniu okrajov rany a okolitého tkaniva. Kontrolné preväzy a revízia rany bola vykonávaná v prvom období raz – dva krát týždenne.

Po zvládnutí infekcie, odstránení odumretých častí kože a pozorovaní zahájenia rastu granulačného lôžka bol proces hojenia a reparácie podporený granulačnými a epitelizačnými prípravkami. Vonkajšie prekrytie rany tvorili hydrokoloidná náplasť podporujúca proces hojenia, ako aj bandáž vo forme obvazového a samolepiaceho materiálu. Kontrolné preväzy boli vykonávané v období raz za 2 týždne.

U väčšiny pacientov bolo pozorované úplné vyhojenie poškodeného miesta kože do jedného mesiaca od vzniku poranenia. U dvoch pacientov došlo k predĺženiu času hojenia z dôvodu vysychania okrajov rany a odumretia časti končatiny z dôvodu prítomného ischemického procesu.

Dobré výsledky a úspešnosť zvolenej terapie poukázali na efektívnosť a využiteľnosť neinvazívneho prístupu pri drobných poraneniach, alebo kožných defektoch na ťažko prístupných miestach. Samotná metóda nie je technicky náročná, nevyžaduje žiadne špeciálne vybavenie a inštrumentárium.

Neinvazívny prístup ku kožným afekciám v podobe medikamentóznej terapie je vhodné kombinovať s vonkajším prekrytím hydrokoloidnou náplastou. Malley a Whitbread (1996) poukázali taktiež na nutnosť zabránenia vysychania rany a okolitého tkaniva za pomoci

hydrokoloidných bandáží. Dôležitým je poznamenať, že nie všetky rany môžu byť úspešne liečené, avšak väčšina z nich môže byť redukovaná, alebo minimalizovaná (Ritzman, 2004). Celkový stav pacienta, manažment chovu, ako aj výživa prispievajú k úspešnému manažmentu terapie rán.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bohling, M. V.: Wound management in exotics and wildlife. http://works.bepress.com/mark_bohling/5/ (2008-01).
- Burke, H. F., Swaim S. F., Amalsadvala, T.: Review of wound management in raptors. *Journal of avian medicine and surgery*. 2002: 16: 180-191.
- Ferrell, S. T.: Avian Intengumentary Surgery. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2002: 11: 125-135.
- Malley, A. D., Whitbread, T. J.: The intengument. In: Beynon, P. H., Forbes, N. A., Harcourt-Brown N., eds. *BSAVA Manual of Raptors, Pigeons and Waterfowl*, Gloucestershire, UK: British Small Animal Veterinary Association Ltd. 1996: 129-139.
- Ritzman, T. K.: Wound healing and management in psittacine birds. *Vet Clin Exot Anim*. 2004: 7: 87-104.
- Stroud, P. K., Amalsadvala, T., Swaim, S. F.: The use of skin flaps and grafts for wound management in raptors. *Journal of avian medicine and surgery*. 2003: 17: 78-85.
- http://www.ultimatefowl.com/wiki/index.php?title=Wound_Management (2010-10-13).

ELEKTROFORETICKÉ STANOVENIE HLADÍN SÉROVÉHO CHOLESTEROLU PO SKRMOVANÍ LUPINY ÚZKOLISTEJ U OVIEC

Kravcová Z., Sopková D., Vlčková R., Ondrašovičová S., Danko J.

Katedra anatómie, histológie a fyziológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

V práci sme sledovali účinok fortifikácie krmiva oviec pomocou *Lupinus angustifolius*, varieta Sonet na hodnoty celkového cholesterolu (CCH) a jeho frakcií lipoproteínov s vysokou hustotou (HDL), lipoproteínov s veľmi nízkou hustotou (VLDL), lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL). Do pokusu bolo zaradených 14 oviec plemena merino (K, n=6 a P, n=6). Ovce boli kŕmené d'atelinotravnou silážou, senom, vodou a pokusnej skupine sa od 6. dňa podávala lupina v dávke 0,5 kg/kus/deň, hmotnosť oviec bola sledovaná v 1., 6. a 15. deň pokusu. Krv sme odoberali na 2., 10. a 15. deň. Po centrifugácii sme získané sérum použili na analýzu koncentrácie CCH a jeho jednotlivých frakcií. Výsledky sme vyhodnotili jednocestným ANOVA testom (Mean \pm SD). Skrmovanie lupiny nemalo výrazný vplyv na hmotnosť pokusných oviec. Nami namerané výsledky poukazujú na zníženie hodnôt CCH a tiež jeho frakcií HDL, VLDL, LDL, pokles je však nesignifikantný ($p > 0,05$), čo je pravdepodobne spôsobené krátkodobým suplementovaním krmiva oviec lupinou.

ÚVOD

Strukoviny znižujú hladinu cirkulujúceho cholesterolu (Koba a kol., 2003; Sirtori a kol., 2004) a triglyceridov (Shukla a kol., 2007) u ľudí a zvierat. Medzi strukoviny bohaté na proteíny patrí okrem sóje aj lupina. Sladké odrody lupiny sa už dlho pestovali pre skrmovanie zvieratám a tiež sa využívali vo výžive ľudí, hlavne v severných častiach Austrálie, Európy a Južnej Ameriky. Lupina sa vyznačuje nižším obsahom antinutričných látok ako ostatné strukoviny (Muzquiz a kol., 1998) a takmer úplnou absenciou fyto-estrogénov (Sirtori a kol., 2004). *Lupinus angustifolius* má vysoký obsah bielkovín (30% - 40%) a vlákniny (30%), nízky obsah tuku (6%) a má minimálny obsah škrobu z čoho vyplýva jej veľmi nízky glykemický index (Sipsas, 2008). Vyznačuje sa výhodnou manipuláciou a skladovaním a preto je rozšíreným doplnkom krmív pre prežúvavce s vysokým obsahom využiteľnej energie a bielkovín. Používa sa na kŕmenie oviec v čase nedostatku pastvy a taktiež ako krmivo v chove ošípaných a hydiny (Pettersson, 2000). Lupina pozitívne pôsobí na hladinu krvných lipidov (Spielmann a kol., 2007) a zlepšuje črevné zdravie (Johnson a kol., 2006). Cieľom našej práce bolo sledovanie CCH a jeho frakcií po skrmovaní *Lupinus angustifolius*, varieta Sonet u oviec.

MATERIÁL A METODIKA

Do pokusu bolo zaradených 14 oviec plemena merino, rozdelených do dvoch skupín. Obidve skupiny kontrolná (K, n=6) aj pokusná (P, n=6) boli kŕmené d'atelinotravnou silážou, senom a vodou ad libitum. Ovce boli umiestnené v klietkach v uzavretej budove s možnosťou výbehu a pasenia. Pokusnej skupine bola podávaná lupina (*Lupinus angustifolius*, varieta Sonet) na 6. deň pokusu v dávke 0,5 kg/kus/deň, ktorá bola skrmovaná po dobu 8 dní. Krv oviec sme získali venepunkciou v. *jugularis* na 2., 10. a 15. deň pokusu. Krv bola odoberaná do skúmaviek bez pridania antikoagulačných prostriedkov a po jednohodinovom státi sa centrifugovala pri 349 g. V získanom krvnom sére sme spektrofotometrickým prístrojom Alizé (Lisabio, Francúzsko) stanovili celkový cholesterol. Frakcie cholesterolu sme stanovovali elektroforetickým multiparametrickým prístrojom Hydrasys (Sebia, Francúzsko). Použili sme komerčnú súpravu Hydragel 7 Lipo+Lp(a) (Ecomed, Slovenská republika) na určenie profilu Lipoproteínov a screening Lp(a) frakcie. Lipoproteíny sa delili v pufrí s pH 7,5 a farbili sa pomocou Sudan black. Na šablónku sme aplikovali 10 μ l vzorky, uložili sme ju na 5 min. do vlhkej komory

(0,1% vodný roztok NaN₃), v prístroji potom prebehla migrácia (20°C/30 min.) a sušenie (45°C/35 min.), nasledovalo prvé oplachovanie vo farbiacom module (45% čistý etanol + 55% dest. voda) a ďalej druhé oplachovanie vo farbiacom module (75% čistý etanol + 25% dest. voda), tak sme získali hotový gél. Suché gély boli hodnotené vizuálne aj denzitometricky, čím boli získané presné relatívne hodnoty jednotlivých zón. Výsledky sme štatisticky spracovali jednocestným testom ANOVA. Grafické znázornenie výsledkov je v podobe hodnoty aritmetického priemeru a jej štandardnej odchýlky (Mean ± SD).

Tab. 1. Chemické zloženie *Lupinus angustifolius*, varieta Sonet (Straková a kol., 2006)

g/kg	Sonet	g/kg	Sonet	g/kg	Sonet	g/kg	Sonet
Voda	82,4	Tuk	55,7	Škrob	62	Ca	4,5
Sušina	917,6	Vlákniva	128,5	OH	882,1	P	5,47
Dusíkaté látky	311,6	BNLV	386,3	Popol	33,5	Mg	1,34

VÝSLEDKY A DISKUSIA

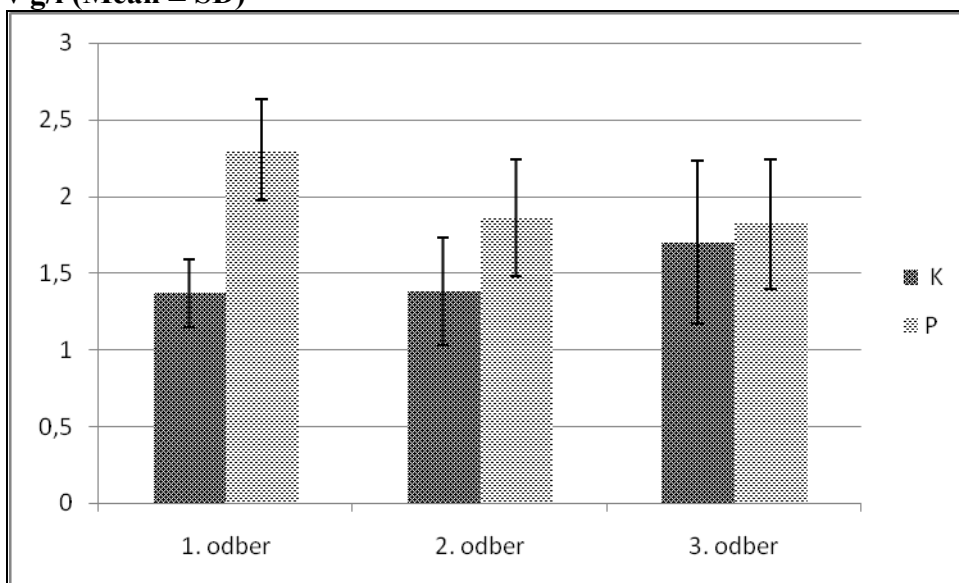
Skrmovanie lupiny nemalo výrazný vplyv na hmotnosť pokusných oviec. Ovce boli vážené na 1., 6. a 15. deň pokusu. Tabuľka 2 poukazuje na to, že medzi kontrolnou a pokusnou skupinou neboli zaznamenané štatisticky významné rozdiely ($p > 0,05$). Podobné výsledky boli publikované v práci Bettzieche a kol. (2008), u potkanov, ktorým podávali lupinu varieta Boregine s prídavkom α/β konglutinínu.

Tab. 2 Priemerné hmotnosti oviec počas pokusu v kg (Mean ± SD)

Skupiny oviec	Priemerná hmotnosť oviec v pokuse		
	Pred skrmovaním lupiny	Počas skrmovania lupiny	Po skrmovaní lupiny
K(n=6)	40,83 ± 6,85	42 ± 5,76	38,4 ± 6,64
P(n=6)	43,5 ± 2,74	45,83 ± 3,43	44,22 ± 4,25

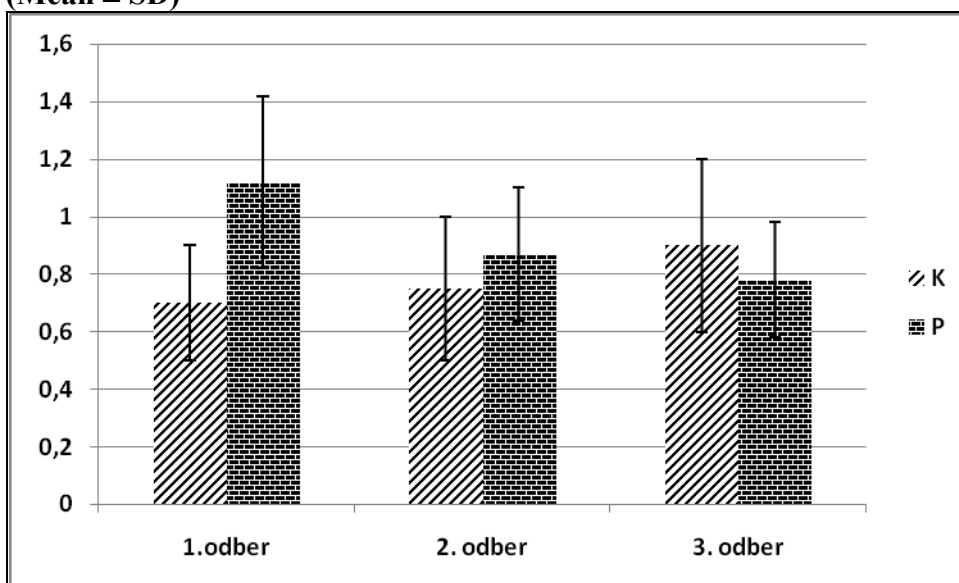
Porovnaním sérových hladín celkového cholesterolu (graf 1), sme zistili pokles u pokusných skupín, aj keď tento výsledok nebol signifikantný ($p > 0,05$). U oviec, ktorým nebola podávaná lupina sme namerali vzostup hladiny celkového cholesterolu z $1,37 \pm 0,22$ g/l na $1,7 \pm 0,53$ g/l. Naopak u oviec, ktoré skrmovali lupinu sa hodnota znížila z $2,3 \pm 0,33$ g/l na $1,82 \pm 0,42$ g/l. Analýza výsledkov pokusnej skupiny nám ukázala, že došlo k nesignifikantnému poklesu koncentrácie LDL cholesterolu (graf 2) pri treťom odbere (z $1,12 \pm 0,33$ g/l na $0,78 \pm 0,2$ g/l). U pokusných oviec bola tiež nameraná znížená koncentrácia HDL ($0,24 \pm 0,1$ g/l) a VLDL ($0,79 \pm 0,17$ g/l) cholesterolu oproti kontrolnej skupine, no hodnoty neboli signifikantné ($p > 0,05$). Znížené hodnoty HDL, VLDL, LDL a celkového cholesterolu zaznamenal aj Brandsch a kol. (2010), ktorý skrmoval tepelne neošetrenú lupinu potkanom a zistil, že po 13 dňoch skrmovania lupiny došlo k štatisticky významnému poklesu u sledovaných skupín ($p < 0,05$). V našom pokuse ovce skrmovali lupinu po dobu 8 dní, čo mohlo viesť k rozdielom v konečných hodnotách cholesterolu. Mnohí autori (Sirtori a kol., 2004; Piñeiro a kol., 2010) poukazujú na to, že na zníženie cholesterolu u zvierat vplyva vysoký obsah globulínov (konglutinín γ) a tiež vysoký obsah aminokyseliny arginínu obsiahnutého v semenách lupiny. Z našich čiastkových výsledkov vyplýva, že skrmovanie lupiny spôsobilo mierny pokles hodnôt frakcií HDL, VLDL, LDL a taktiež pokles celkového cholesterolu (CCH), no toto zníženie nebolo signifikantné ($p > 0,05$), čo mohlo byť spôsobené krátkym obdobím (8 dní) pridávania lupiny do krmiva. Preto v nasledujúcich pokusoch by bolo potrebné predĺžiť dobu suplementácie krmiva lupinou a tým dosiahnuť výraznejší efekt zníženia cholesterolu.

Graf 1 Priemerné hodnoty celkového cholesterolu počas 3 pokusných odberov uvedené v g/l (Mean ± SD)



(1. odber = obdobie pred skrmovaním lupiny, 2. odber = počas skrmovania, 3. odber = po skrmovaní)

Graf 2 Priemerné hodnoty LDL cholesterolu počas 3 pokusných odberov uvedené v g/l (Mean ± SD)



(1. odber = obdobie pred skrmovaním lupiny, 2. odber = počas skrmovania, 3. odber = po skrmovaní)

POĎAKOVANIE

Práca bola vypracovaná v rámci riešenia grantu VEGA 1/0860/09.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Anderson JW, Major AW. Pulses and lipaemia, short- and long-term effect : potential in the prevention of cardiovascular disease. BrJ Nutr. 2002; 88, Suppl.3, 263–271.
- Arnoldi A. Grain legumes as a source of food ingredients for the prevention of cardiovascular disease. In Functional Foods, Diet, Cardiovascular Disease and Diabetes, pp. 2004 : 422–447[AArnoldi,editor]. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.

- Bettzieche A, Brandsch C, Schmidt M, Weiße K, Eder K, Stangl GI. Differing effect of protein isolates from different cultivars of blue lupin on plasma lipoproteins of hypercholesterolemic rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008; 72 (12): 3114–3121.
- Brandsch C, Kappis D, Weiße K, Stangl GI. Effect of untreated and thermally treated lupin protein on plasma and liver lipids of rats fed a hypocholesterolemic high fat or high carbohydrate diet. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010; 65: 410–416.
- Duranti M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* 2006; 77: 67–82.
- Johnson SK, Chua V, Hall RS, Baxter AL. Lupin kernel fibre foods improve bowel function and beneficially modify some putative faecal risk factors for colon cancer in men. *British Journal of Nutrition.* 2006; 95 (2): 372-378.
- Koba K, Liu JW, Bobik JrE, Mills DE, Sugano M, Huang YS. Effect on phytate in soy protein on the serum and liver cholesterol levels and fatty acid profile in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003; 67: 15-22.
- Muzquiz M, Pedrosa MM, Cuadrado C, AyetG, Burbano C, Brenes A. Variation of alkaloids, alkaloidesters, phytic acid, and phytase activity in germinated seed of *Lupinus albus* and *L. luteus*. In *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rape Seeds.* 1998: 387–390 [AJM Jasman,GDHill,JHuismanandAFBvanderPoel,editors]. Wageningen,TheNetherlands:WageningenPress.
- Petterson, DS. The use of lupins in feeding systems – review. *Asian-Australian Journal of Animal Science.* 2000; 13: 861-882.
- Piñeiro V, Ortiz-Moreno A, Mora-Escobedo R, Hernández-Navarro MD, Ceballos-Reyes G, Chamorro-Cevallos G. Effect of L-arginine oral supplementation on response to myocardial infarction in hypercholesterolemic and hypertensive rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010; 65: 31–37.
- Shukla A, Brandch C, Bettzieche A, Hirche F, Stangl GI, Eder K. Isoflavone-poor soy protein alters the lipid metabolism of rats by SREBP-mediated down regulation of hepatic genes. *J. Nutr. Biochem.* 2007; 18: 313-321.
- Sipsas S. Lupin products – concepts and reality. IN J.A. Palta and J.B. Berger (eds). 2008 ‘Lupins for Health and Wealth’ Proceedings of the 12th International Lupin Conference, 14-18 Sept. 2008, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand. ISBN 0-86476-153-8.
- Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, Castiglioni S, Duranti M, Magni C, Morandi S, D’Agostina A, Arnoldi A. Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in Hep G2 cells. *J Nutr.* 2004; 134: 18–23.
- Spielmann J, Shukla A, Brandsch C, Hirche F, Stangl GI, Eder K. Dietary lupin protein lowers triglyceride concentrations in liver and plasma in rats by reducing hepatic gene expression of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Ann. Nutr. Metab.* 2007; 51: 387-392.
- Straková E, Suchý P, Večerek V, Šerman V, Mas N, Jůzl M. Nutritional composition of seeds of the genus *lupinus*. *Acta Vet Brno.* 2006; 75: 489-493.

VARIÁCIE POSTHEPATÁLNEHO SEGMENTU *V. CAVA CAUDALIS* U POTKANA

Krešáková L., Vdoviaková K., Maženský D., Petrovová E., Kravcová Z.

Katedra anatómie, histológie a fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

ABSTRAKT

Zamerali sme sa na variácie brušnej časti *v. cava caudalis* u potkana. *V. sacralis mediana* sa v 5 prípadoch (25%) vlievala do miesta sútoku *vv. iliacae communes*, v ostatných prípadoch kranialnejšie priamo do *v. cava caudalis*. *V. circumflexa ilium profunda sinistra* sa vlieva do *v. cava caudalis*, pričom u jedného potkana (5%) sa vlievala do *v. renalis sinistra*. Vo všetkých prípadoch *v. ovarica dextra* vstupovala do *v. cava caudalis* a *v. ovarica sinistra* do *v. renalis sinistra*. *Vv. testiculares* sa u jedného samca vlievali do *vv. iliacae communes*. *V. abdominalis cranialis sinistra* spolu s *v. phrenica caudalis sinistra* vstupovali do *v. renalis sinistra*. *V. renalis dextra* sa vlievala do *v. cava caudalis* kranialnejšie ako *v. renalis sinistra*. U pozorovaných žíl sme nezaznamenali žiadnu duplikáciu.

ÚVOD

Korozívne preparáty ciev sú vynikajúcim nástrojom pre detailné trojdimenzionálne morfológické zobrazenie cirkulácie (Van Steenkiste a kol., 2010).

Potkan (*Rattus norvegicus v. alba*) patrí medzi laboratórne zvieratá intenzívne využívané v humánnej i veterinárnej experimentálnej medicíne.

Variácie *v. cava caudalis* sú relatívne málo študované a vzhľadom na zložitosť vývoja venózneho systému sú možné niektoré variácie (Artico a kol., 2004), zamerali sme sa na pozorovanie časti *v. cava caudalis* na korozívnych preparátoch u uvedeného druhu.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente sme použili 20 potkanov plemena Wistar, z toho 17 samíc a 3 samcov, s priemernou hmotnosťou 300g. Eutanáziu sme vykonali inhalačne éterom. Po otvorení hrudníkovej dutiny sme vypreparovali ľavú komoru srdca cez ktorú sme zaviedli plastovú i.v. kanylu do aorty, zaistili ju ligatúrou a vykonali perfúziu cievneho systému 0,9 % roztokom NaCl. Následne sme prepláchli cievny systém benzínalkoholom pre spevnenie steny žíl. Po 3 hodinách sme pristúpili k samotnému nástreku. Cez pravú predsieň srdca sme zaviedli kanylu do *v. cava caudalis* a injikovali nástrekovú hmotu. Ako nástrekové médium sme zvolili komerčne vyrábanú, samopolymerizujúcu dentálnu živicu Spofacryl® (Spofa-Dental, ČR). Hmota pozostáva z práškovej a tekutej zložky na báze metylmetakrylátu. Zmiešaním 0,8 ml na 1g prášku vznikla riedka tekutá zmes s dobrou penetráciou cievny systémom. Na získanie požadovaného farebného odtieňa sme zmes ofarbili azúrovou modrou. Tuhnutie hmoty je ukončené do 5 minút, preto je potrebné pracovať rýchlo, aby nástreková hmota nestratila zatekavosť.

Po 1h od vykonania nástreku sme potkany opatrne premiestnili do maceračnej nádoby. Macerácia tkanív prebehla v 40% roztoku KOH, pri teplote 60-70°C, po dobu troch dní.

Na pomenovanie žíl sme použili posledné vydanie veterinárnej anatomickej nomenklatury (NAV, 2005).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V. cava caudalis vzniká na úrovni prechodu bedrovej a krížovej chrbtice, zvyčajne v mieste sútoku *vv. iliacae communes* (Navrátilová a kol., 1992). Privádza krv do pravej predsieň srdca z kaudálnej, postdiafragmatickej časti tela (Popesko, 1992).

Predmetom našej práce bolo pozorovanie variácií brušnej časti *v. cava caudalis*.

V. sacralis mediana podľa Navrátilovej a kol. (1992) sa v 14 prípadoch (46,7%) vlievala do miesta rozdelenia *v. cava caudalis* na *vv. iliaca communes*. Zaznamenali sme to v 5 prípadoch (25%), u ostatných potkanov sa vlievala kraniálnejšie, priamo do *v. cava caudalis*. Bedrové žily (*vv. lumbales*) sú 4 segmentálne žily, ktoré odvádzajú krv zo svalov brušnej steny (Nejedlý, 1965). Vo všetkých prípadoch sme zaznamenali 4 bedrové žily, čo sa zhoduje s pozorovaniami Nejedlého (1965).

Do *v. cava caudalis* sa po jej oboch stranách, pred bifurkáciou, vlieva *v. circumflexa ilium profunda* (Vrzgulová, 1998). Zistili sme 1 prípad (5%), kedy sa *v. circumflexa ilium profunda sinistra* vlievala do *v. renalis sinistra*, v 95% smerovali do *v. cava caudalis*. *Vv. ovaricae* odvádzajú krv z vaječníka a maternice (Popesko, 1992). *V. ovarica dextra* vo všetkých prípadoch ústila do *v. cava caudalis*, kaudálne od *v. renalis dextra*. *V. ovarica sinistra* sa vlievala do *v. renalis sinistra*. Tento jav opisuje Navrátilová (1992) v 60% v prípade *v. ovarica dextra* a v 80% v prípade *v. ovarica sinistra*.

U samcov *vv. testiculares* privádzajú krv zo semenníkov a prísemenníkov, pričom sa u jedného samca vlievali obojstranne do *vv. iliaca communes*. Podľa Pascuala a kol. (1992) sa *v. testicularis dextra* vlievala do *v. iliaca communis dextra* v 77,4% a v 22,6 % do *v. cava caudalis*, *v. testicularis sinistra* vstupovala do *v. iliaca communis sinistra* vo všetkých prípadoch.

Vv. renales privádzajú krv z obličiek a vlievajú sa do *v. cava caudalis*, pričom *v. renalis dextra* sa vlieva kraniálnejšie ako *v. renalis sinistra*. Navrátilová a kol. (1992) opisuje duplikácie *v. renalis* v 11 prípadoch (18,3%), my sme nepozorovali žiadnu duplikáciu. Vo všetkých pozorovaných prípadoch sa *v. abdominalis cranialis sinistra* spolu s *v. phrenica caudalis sinistra* vlievali do *v. renalis sinistra*.

Duplikácie *v. cava caudalis* u potkana boli nájdené u jednej samice (Navrátilová a kol., 1992), my sme duplikácie *v. cava caudalis* nezaznamenali.

Z doterajších pozorovaní vyplýva, že sú možné jednotlivé variácie.

Pozorovanie variácií *v. cava caudalis* má význam aj z dôvodu, že hlboká venózna trombóza žíl *v. iliaca* a *v. femoralis* u človeka (naisto spôsobená poškodením venózneho odtoku), je najfrekvencovanejšie sa vyskytujúcim symptómom anatomických variácií *v. cava caudalis* (Artico a kol., 2004).

POĎAKOVANIE

Štúdia bola podporená projektom ŠF EU, Code ITMS 26220220032.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Artico M, Lorenzini D, Mancini P, Gobbi P, Carloia S, David V. Radiological evidence of anatomical variations of the inferior vena cava: Report of two cases. *Surg Radiol Anat.* 2004; 26:153-7.

Navrátilová E, Malinovský L, DAndrea V. Variability of the *v. cava caudalis* and its tributaries in some laboratory animals. II. The laboratory rat (*Rattus norvegicus v. alba*). *Funct Dev Morphol.* 1992; 2(2): 89-98.

Nejedlý K. Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat. Praha. 1965; 337-8.

Nomina Anatomica Veterinaria 2005: V Edition, Editorial Committee Hannover. Columbia, Gent, Sapporo. 2005; 77-109

Pascual JA, Lemmi C, Rajfer, J. Variability of venous anatomy of rat testis: application to experimental testis surgery. *Microsurgery.* 1992; 13(6):335-7.

Popesko P. Anatomia hospodárskych zvierat. *Príroda.* 1992; 379-414.

Van Steenkiste C, Trachet B, Castelyen C, Van Loo D, Van Hoorbeke L, Segers J, Geerts A, Colle I. Vascular corrosion casting: Analyzing wall shear stress in the portal vein and vascular abnormalities in portal hypertensive and cirrhotic rodents. *Laboratory investigation.* 2010; 90,11: 1558-1572.

Vrzgulová M. *Angiology.* M&M Prešov. 1998; 130.

MODEL INDUKOVANEJ OBEZITY MYŠÍ ZALOŽENÝ NA SKRMOVANÍ VYSOKO-ENERGETICKEJ DIÉTY

Kubandová J.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Obezita je veľkým zdravotným problémom na celom svete. Nepriaznivý vplyv maternálnej obezity na špecifické reprodukčné parametre je dobre preskúmaný, ale mechanizmy, ktoré sa na tomto procese podieľajú, sú neznáme. Cieľom nášho výskumu bolo vytvoriť animálny model indukovanej obezity, ktorý nám umožní pravidelne produkovať populáciu obéznych myší a v ďalších experimentoch testovať priamy vplyv faktorov obezity na reprodukčné schopnosti myší v období preimplantačného vývinu embrya. Dospelé samice myší boli po pripustení samcami toho istého kmeňa, až do odstavy kŕmené štandardnou diétou v kontrolnej skupine a diétou s prídavkom výživového doplnku Ensure Plus v experimentálnej skupine. Výsledkom bola produkcia potomstva s vysokou predispozíciou pre vývin obezity. F1 generácia zvierat v experimentálnej skupine bola po odstave znova rozdelená do dvoch skupín a kŕmená štandardnou diétou alebo diétou s prídavkom Ensure Plus a pravidelne vyšetrovaná na niektoré dietologické a obezitologické parametre. Naše výsledky preukázali, že príjem vysoko-energetickej diéty v období pred odstavom a 3 týždne po odstave mal vplyv na obsah telesného tuku v F1 generácii, pričom signifikantne stúpili hodnoty telesnej hmotnosti a telesného tuku myší oboch pohlaví v pokusnej skupine. V závere môžeme povedať, že nami štandardizovaný model dieteticky-indukovanej obezity je funkčný.

ÚVOD

Základným predpokladom pre experimenty sledujúce vzťah medzi obezitou a reprodukciou je vytvorenie funkčného modelu indukovanej obezity. V laboratórnej praxi sa využívajú dva základné druhy modelov, ktoré sú založené buď na genetickej manipulácii zvierat alebo na skrmovaní vysoko-energetickej alebo vysoko-tukovej diéty (sprevádzanej hyperlipidémiou) počas rôznych fáz reprodukčného cyklu.

Obezita je vo všeobecnosti považovaná za faktor, ktorý má negatívny vplyv na reprodukciu. Zapríčiňuje zvýšené riziko patologických stavov ako je napríklad infertilita (La Vignera a kol., 2011; Lake a kol., 1997; Rich- Edwards a kol., 1992; Pasquali a kol., 2006; 2007). U obéznych žien bola zaznamenaná zvýšená frekvencia porúch pohlavného cyklu, zvýšená potreba gonádotropínov počas stimulácie ovulácie, znížený počet izolovaných oocytov, znížený počet úspešných tehotenstiev po IVF (*in vitro* fertilizácii), znížená funkcia žltého telieska a predovšetkým zvýšený risk nedonosenia (Lashen a kol., 1999; Fedorcsák a kol., 2000; 2001; 2004; Pasquali a kol., 2003). Pri obezite bola popísaná preukázateľne vyššia krvná koncentrácia väčšiny adipokínov, ktoré sa pravdepodobne podieľajú na negatívnom vplyve obezity na reprodukčné aj celkové zdravie človeka a zvierat (Čikoš a kol., 2010; Čikoš a kol., 2011; Norman a kol., 2004; Mitchell a kol., 2005; Campos a kol., 2008; Van der Steeg a kol., 2008). S obezitou je spojená aj zvýšená spotreba potravín, ktorá prevyšuje energetické potreby organizmu a prejavuje sa v nadmernom ukladaní tukových zásob, čo tiež predstavuje problém pre zdravie.

Hlavným dôvodom výberu dietetického modelu pre naše experimenty bolo, že za stav telesnej váhy a objem telesného tuku zvierat a človeka sú vo veľkej miere zodpovedné predovšetkým ich nutričné podmienky (Mozeš a kol., 2004a,b; Waterland a Garza 1999; Moura a kol., 2002).

Náš model takisto lepšie simuluje vývin prirodzenej obezity než genetický model, pri ktorom nie je vylúčený priamy i sekundárny vplyv genetickej mutácie na reprodukčné schopnosti jedinca. Genetický model je charakteristický tým, že myši sa v dôsledku lethal yellow (Ay)

mutácie stávajú obéznyimi (Brannian a kol., 2005). Ay je mutácia na chromozóme 2, ktorá spôsobuje rad pleiotropných účinkov vrátane obezity (Michaud a kol., 1994).

MATERIÁL A METODIKA

Ako vysoko-energetický dietetický zdroj sme použili výživový prípravok Ensure Plus (Abbot Laboratories, Holandsko). Výhodou užívania prípravku Ensure Plus v porovnaní s peletovou diétou (Levin a Keeseey, 1998) je to, že vedie k vývinu obezity aj u tej časti populácie, ktorá je rezistentná voči tejto diéte.

Dospelé samice myší (P generácia) boli pripustené samcami rovnakého kmeňa a rozdelené na dve skupiny. Počas obdobia gravidity (21 dní) a po pôrode (od započatia laktácie po odstav – 21 dní) boli matky v kontrolnej skupine kŕmené štandardnou peletovou diétou (M1) a matky v experimentálnej skupine kŕmené štandardnou diétou s prídavkom vysoko-energetického prípravku Ensure Plus *ad libidum*. Výsledkom tejto diéty bola produkcia potomstva (F1 generácia) s vysokou predispozíciou pre vývin obezity v čase pohlavnej dospelosti (35. deň veku). Zvieratá F1 generácie odchované v experimentálnej skupine boli po odstave (21. deň) opätovne rozdelené na dve skupiny a kŕmené počas ďalších 3 týždňov buď štandardnou diétou (skupina EX1) alebo diétou s prídavkom Ensure Plus (skupina EX2). Medzi 42. a 96. dňom veku F1 zvierat boli myši v kontrolnej skupine aj v experimentálnych skupinách kŕmené iba peletovou stravou bez ďalších prídavkov. Pokus bol ukončený na 96. deň veku zvierat. U matiek aj u odstavených zvierat bola počas celého pokusu v pravidelných intervaloch vyšetrovaná telesná hmotnosť, príjem potravy a objem telesného tuku. Objem tuku bol zaznamenávaný pomocou EchoMRI (Echo Medical system, Houston, Texas).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V deň odstavu (21. deň) sa váha u kontrolných F1 myší pohybovala okolo $9,68 \pm 0,41$ g. V skupine prikrmvanej štandardnou diétou (EX1) sme už v tomto čase zaznamenali signifikantne vyššie hodnoty telesnej hmotnosti. Myši ďalej rástli až do váhy približne 35 g. Na 42. a 96. deň však nebol rozdiel v hodnotách telesnej hmotnosti medzi kontrolnou a experimentálnymi skupinami signifikantný. U kontrolnej skupiny bol prírastok váhy signifikantne vyšší medzi 21. a 42. dňom. V období medzi 42. a 96. dňom sme nezaznamenali žiadne signifikantne významné rozdiely v prírastkoch váhy medzi kontrolnou a experimentálnymi skupinami.

Hodnoty telesného tuku u kontrolných F1 myší sa na 21. deň pohybovali okolo $8,63 \pm 0,29$ %. V experimentálnej skupine sme v deň odstavu zaznamenali signifikantne vyššie hodnoty telesného tuku ako v kontrolnej skupine. U samičiek nebol rozdiel štatisticky významný ale tendencia nárastu zostala zachovaná. Na 42. deň bola situácia obdobná – signifikantne vyššie percento tuku sme zaznamenali ako u samcov tak u samíc. Na 96. deň sme signifikantne vyššie hodnoty zaznamenali iba u experimentálnej skupiny kŕmenej štandardnou diétou (EX1). U kontrolných myší sme zaznamenali medzi 21. a 42. dňom mierny pokles objemu tuku a u experimentálnych myší kŕmených štandardnou diétou (EX1) a pokusných myší kŕmených štandardnou diétou s prídavkom Ensure Plus (EX2) sme zaznamenali signifikantný nárast telesného tuku. V období medzi 42. a 96. dňom, keď boli všetky myši kŕmené štandardnou diétou, sme zaznamenali mierny úbytok telesného tuku v EX2 skupine. Prírastok tuku bol signifikantný iba v skupine EX1.

Hodnoty kalorického príjmu sa v období po odstave pohybovali v kontrolnej skupine okolo $77,57 \pm 7,39$ kcal. V pokusných skupinách sme zaznamenali tendenciu k zvýšeniu kalorického príjmu, ale nebola štatisticky významná. Signifikantné zvýšenie kalorického príjmu sme zaznamenali iba v období medzi 42. a 96. dňom, a to medzi kontrolnou skupinou a experimentálnou skupinou kŕmenou štandardnou diétou bez prídavku Ensure Plus (EX1).

Medzi kontrolnou a pokusnými skupinami sme takisto nezaznamenali žiadne rozdiely v efektívnom využívaní energie (Energy efficiency, kcal/g).

Od odstavu do 42. dňa neboli zaznamenané žiadne signifikantné rozdiely v príjme pevnej potravy (M1) medzi kontrolnou a experimentálnymi skupinami. Experimentálna skupina s prídavkom Ensure Plus však konzumovala menšie množstvo pevnej potravy ako experimentálna skupina bez prídavku. V období medzi 42. a 96. dňom sme zaznamenali nárast v spotrebe krmiva v EX1 skupine, ale pri individuálnom porovnaní samičiek a samcov rozdiely signifikantné neboli. V našom pokuse sme zaznamenali signifikantne vyššie hodnoty hmotnosti a prírastku hmotnosti ako iní autori v predchádzajúcej štúdiu na potkanoch, ktorá využívala obdobný dietetický model (Šefčíková a kol., 2008). V našom výskume sme štandardizovali zvierací model odchovu obéznych zvierat založený na ovplyvnení výživy F1 myši v čase pred odstavom (počas embryonálneho, fetálneho, a ranného postnatálneho vývinu) a po odstave (až po čas pohlavnej dospelosti). Zistili sme, že na obsah tuku v F1 generácii myši mal najvýznamnejší vplyv príjem vysoko-energetickej diéty matky v čase od ich narodenia do odstavu. Príjem vysoko-energetickej diéty po odstave pomohol k udržiavaniu objemu telesného tuku, ale nespôsobil žiadne jeho ďalšie výrazné zvýšenie, naopak po vysadení vysoko-energetického prídavku Ensure Plus došlo k nežiaducemu poklesu objemu tuku.

Na záver môžeme skonštatovať, že model indukovanej obezity je funkčný a bude využitý na skúmanie vzťahu medzi obezitou a reprodukciou.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0049/11.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Brannian JD, Furman GM, Diggins M. Declining fertility in the Lethal Yellow mouse is related to progressive hyperleptinemia and leptin resistance. *Reprod Nutr Dev* 2005; 45: 143- 50.
- Campos DB, Palin MF, Bordignon V, Murphy BD. The beneficial adipokines in reproduction and fertility. *Int Obes* 2008; 32: 223- 231.
- Čikoš Š, Burkuš J, Bukovská A, Fabian D, Reháč P, Koppel J. Expression of adiponectin receptors and effect of adiponectin isoforms in mouse preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2010; 00: 1- 9.
- Čikoš Š, Fabian D, Makarevich AV, Chrenek P, Koppel J. Biogenic monoamines in preimplantation development. *Hum Reprod* 2011; *in press*.
- Fedorcsák P, Storeng R, Dale PO, Tanbo T, Abyholm T. Obesity is associated with early pregnancy loss after IVF or ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000b; 79: 43- 48.
- Fedorcsák P, Dale PO, Storeng R, Tanbo T, Abyholm T. The impact of obesity and insulin resistance on the outcome of IVF or ICSI in woman with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2001; 16: 1086- 1091.
- Fedorcsák P, Dale PO, Storeng R, Ertzeid G, Bjørcke S, Oldereid N, Omland AK, Abyholm T. Impact of overweight and underweight on assisted reproduction treatment. *Hum Reprod* 2004; 19: 2523- 2528.
- Lake JK, Power C, Cole TJ. Women's reproductive health: the role of body mass index in early and adult life. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;21: 432- 438.
- La Vignera S, Condorelli R, Bellanca S, La Rosa B, Mousavi A, Busá B, Vicari LO, Vicari E. Obesity associated with a higher level of pro- inflammatory cytokines in follicular fluid of women undergoing medically assisted procreation (PMA) programs. *Eur Rev Med Pharmacol Sc* 2011; 15: 267- 273.
- Lashen H, Ledger W, Lopez B, Barlow D. Extremes of body mass do not adversely affect the outcomes of superovulation and in- vitro fertilization. *Hum Reprod* 1999; 14: 712- 715.
- Levin BE, Kessey RE. Defense of differing body weight set points in diet- induced obese and resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1998; 274: R412- R419.

- Michaud EJ, Bultman AJ, Klebig AL, Van Vugt MJ, Stubbs LJ, Russel LB, Woychik RP. A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (Ay) mutation. *Genetics* 1994; 91: 2562- 2566.
- Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ. Adipokines: implication for female fertility and obesity. *Reproduction* 2005; 130: 583- 597.
- Moura AS, Franco de Sa CC, Cruz HG, Costa CL. Malnutrition during lactation as metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adult. The role of insulin leptin. *Braz K Med Biol Res* 2002; 35: 617- 622.
- Možeš Š, Šefčíková Z, Lenhardt L, Raček L. Effect of adrenalectomy on the activity of small intestine enzymes in monosodium glutamate obese rats. *Physiol Res* 2004a; 53: 415- 422.
- Možeš Š, Šefčíková Z, Lenhardt L, Raček L. Obesity and changes of alkaline phosphatase activity in the small intestine of 40- and 80- day- old rats subjected to early postnatal overfeeding or monosodium glutamate. *Physiol Res* 2004b; 53: 177- 186.
- Norman RJ, Noakes M, Wu R, Davies MJ, Moran L, Wang JX. Improving reproductive performance in overweight/ obese women with effective weight management. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 267- 280.
- Pasquali R, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M, Gambineri A. Obesity and reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 359- 372.
- Pasquali R, Patton L, Ganbineri A. Obesity and infertility. *Current Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007; 14: 482- 487.
- Rich- Edwards JW, Manson JE, Goldman MB. Body mass index at age 18 years and the risk of subsequent ovulatory infertility. *Am J Epidemiol* 1992; 5: 247- 250.
- Pasquali R, Gambineri A. Metabolic effect of obesity on reproduction. *Reproductive Biomedicine online*. 2006; 12: 542- 51.
- Šefčíková Z, Hájek T, Lenhardt L, Raček L, Možeš Š. Different functional responsibility of the small intestine to high- fat/ high- energy diet determined the expression of obesity- prone and obesity- resistant phenotypes in rats. *Physiol Res* 2008; 57: 467- 474.
- Van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJC, Habbema JDF, Hompes PGA, Burggraaff JM, Oosterhuis GJE, Bossuyt PMM, Van der Veen F, Mol BWJ. Obesity affect spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Hum Reprod* 2008; 23: 324- 328.
- Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that leads to chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 179- 197.

VPLYV OPAKOVANÉHO PODANIA BAKLOFENU NA REFLEXNÚ AKTIVITU, DISTRIBÚCIU ASTROCYTOV A ZMENY V IMUNOREAKTIVITE nNOS U POTKANA PO TRANSEKCII MIECHY

Kucharíková A., Hricová L., Kisucká A., Lukáčová N.

Neurobiologický ústav SAV, Košice

ABSTRAKT

V našej práci sme sa sústredili na monitorovanie reflexnej aktivity u spastických potkanov po opakovanom podaní baklofenu. Sledovali sme tiež zmeny v imunoreaktivite neuronálnej izoformy syntázy oxidu dusnatého (nNOS) po transekcii miechy na Th9 úrovni, ako aj zmeny v astrocytoch po baklofenovej liečbe v oblasti lumbosakrálnej miechy. Reflexnú aktivitu sme monitorovali použitím Tail-Flick Testu, prostredníctvom ktorého sme zaznamenávali reakciu zvierat na bolestivý tepelný podnet. V porovnaní s kontrolou, zvieratá po zásahu začali reagovať na bolestivý podnet skôr. Zvýšenú reflexnú aktivitu poranených zvierat sme zaznamenali 1,2,4,5 a 9 týždňov po transekcii. Podanie baklofenu týždeň po zákroku dočasne znížilo reflexnú aktivitu. Opakovaným podaním liečiva 4 týždne po zásahu sme dosiahli zníženie reflexnej aktivity až do doby ukončenia prežívania zvierat. Imunohistochemická štúdia odhalila hypertrofiu astrocytov 9 týždňov po transekcii, čo pravdepodobne súvisí s ich úlohou v reparatívnych procesoch po poškodení. Po opakovanom podaní baklofenu sa počet astrocytov znížil. Zistili sme aj zvýšenú nNOS imunoreaktivitu v motoneurónoch lumbálnych segmentov miechy 6 a 9 týždňov po transekcii, čo korešponduje so zvýšením reflexnej aktivity. Naše experimenty dokazujú prepojenie medzi distribúciou nNOS v lumbálnej mieche a reflexnou aktivitou po Th9 transekcii.

ÚVOD

Poškodenie miechy je závažným klinickým problémom modernej spoločnosti pri ktorom dochádza k prerušeniu dôležitých nervových dráh medzi supraspinálnymi centrami a miechou, a tým aj k čiastočnej alebo permanentnej strate senzorických, či motorických funkcií. Tieto zmeny môžu vyústiť do vzniku spasticity. Spasticita sa prejavuje zvýšením tónických napínaní reflexov a prehnanými svalovými záškľbmi, ku ktorým dochádza v dôsledku zvýšenej excitability svalového napínacieho reflexu (Lance, 1980). Zmeny vo svalovom tonuse vyplývajú z nerovnováhy vstupov z retikulospinálnej dráhy a iných zostupných dráh do interneurónov a motoneurónov v mieche, ako aj z prerušenia pyramídovej dráhy. K spasticite výrazne prispieva strata neurónov zapojených do presynaptickej inhibície α -motoneurónov (Kakinohana a kol., 2006) a permanentná stimulácia monosynaptickej Ia dráhy, ktorá prenáša impulzy zo svalov a šliach do miechy. Výsledky z nášho laboratória poukázali na skutočnosť, že táto dráha je nNOS imunoreaktívna (Maršala a kol., 2005), čo predpokladá účasť oxidu dusnatého na prenose nervových signálov súvisiacich s poruchami pohybovej aktivity.

Spasticita je motorickou poruchou, ktorá mnohokrát vyžaduje medikamentóznú liečbu. V súčasnosti sa na zmiernenie príznakov spasticity najčastejšie využíva GABA_B – receptorový agonista baklofen, ktorý svojím presynaptickým a postsynaptickým pôsobením znižuje excitabilitu α -motoneurónov a expresiu NK1 receptora, prioritne viažúceho mediátor bolesti - substanciu P.

V našom experimente sme sa prednostne zamerali na sledovanie účinku opakovane podávaného baklofenu na zmeny v reflexnej aktivite potkanov podrobených transekcii miechy na Th9 - úrovni. Sledovali sme aj efekt liečiva na gliové bunky zapojené do opravných procesov po poškodení, ako aj zmeny v imunoreaktivite nNOS.

MATERIÁL A METODIKA

V našich experimentoch sme použili 12 dospelých samcov potkanov kmeňa Wistar, ktorých sme rozdelili do štyroch skupín: 1) kontrola, bez chirurgického zásahu (n=3); (2-3) zvieratá podrobené transekcii miechy na Th9 úrovni s dobou prežívania 6 (n=3) a 9 týždňov po zásahu (n=3); a 4) zvieratá po transekcii, opakovane liečené baklofenom a prežívajúce 9 týždňov (n=3).

Zvieratám uvedeným do narkózy prostredníctvom halotanu sme použitím očných nožníc vykonali transekciiu miechy na úrovni Th9 segmentu. Baklofen sme zvieratám podávali perorálne v dávke 30mg/kg, denne po dobu 6 dní, prvýkrát 1 a opakovane 4 týždne po zákroku. Všetky skupiny zvierat boli podrobené imunohistochemickým a behaviorálnym analýzám.

Fixácia tkaniva

Po usmrtení tiopentalom (50 mg/kg, i.p.) sme zvieratá transkardiálne prepláchli fyziologickým roztokom a 4% paraformaldehydom v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku, pH=7,4. Lumbálne segmenty miechy sme vypreparovali z vertebrálneho kanála a inkubovali v rovnakom fixatíve po dobu 3 h pri 4°C. Segmenty miechy sme presýtili v roztoku 30% sacharózy v PBS po dobu 48 h pri 4°C. Rezy boli nakrájané v kryostate na 30µm hrubé rezy, uskladnené v PBS a spracované flotačnou metódou v inkubačných komôrkach. Na blokovanie peroxidázovej aktivity boli rezy inkubované v roztoku 0,3% H₂O₂ v PBS, 30 min pri 4°C. Následne boli rezy premyté v 0,1 M PBS 3x po dobu 10 min a blokované 5% NGS (Normal Goat Serum).

Imunohistochemické analýzy

Pre imunohistochemické zobrazenie nNOS boli lumbálne rezy miechy inkubované cez noc v primárnej nNOS králičej protilátke (riedenie 1:1000) pri 4°C. Po niekoľkých premytiach v PBS boli rezy inkubované v sekundárnej protilátke proti králičej protilátke (riedenie 1:200), po dobu 2 h, v tme pri 4°C a premyté 3x10 min v PBS. Pre vizualizáciu astrocytov bola použitá primárna myšacia GFAP (glial fibrillary acidic protein) protilátka (riedenie 1:800) a sekundárna protilátka proti primárnej myšacej protilátke (riedenie 1:200). Po zamontovaní boli rezy vizualizované fluorescenčne.

Tail-Flick Test

Na testovanie reflexnej aktivity sme použili tzv. Tail - Flick Test (Juszkiewicz – Donsbach a Levy, 1962). Zvieratá boli zafixované v bdelom stave v špeciálnom plastovom boxe s otvorom pre chvost. Spodná 1/3 chvosta bola ponorená do nádoby s vodou o konštantnej teplote 50° C. Zaznamenávali sme počiatkový čas a dĺžku trvania reakcie na teplotný podnet u kontroly a u zvierat 1, 2, 4, 5 a 9 týždňov po transekcii. Reflexná odpoveď bola monitorovaná 3 - krát po sebe v 15 - minútových intervaloch. Aby sa predišlo poškodeniu pokožky zvierat, maximálna doba pôsobenia tepelného podnetu bola stanovená na 30s.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Monitorovaním reflexnej aktivity sme zistili, že zvieratá podrobené transekcii miechy začali reagovať na bolestivý tepelný podnet skôr ako kontrolné zvieratá. Naopak, doba trvania reflexnej odpovede, ktorá sa prejavovala točením chvosta do kruhu a reflexným vyťahnutím chvosta z nádoby s horúcou vodou, bola v porovnaní s kontrolou dlhšia (Tab. 1). Namerané hodnoty boli v porovnaní s kontrolou signifikantne vyššie 1 týždeň po zákroku vo všetkých troch meraných intervaloch, ako aj 2, 4, 5 a 9 týždňov po transekcii v treťom meranom intervale (Tab. 1). Zvýšenie reflexnej aktivity súvisí s vývinom spasticity, ku ktorej došlo v dôsledku prerušenia dôležitých nervových spojení medzi mozgom a miechou. Podanie

baklofenu 1 týždeň po zákroku znížilo reflexnú aktivitu, no iba dočasne, do 20. dňa od vykonania transekcie (Tab. 2). Toto zníženie bolo pravdepodobne zapríčinené vznikom tolerancie na liečivo. Opakovaným podaním rovnakej dávky baklofenu 4 týždne po transekcii došlo k opätovnému zníženiu reflexnej aktivity a namerané hodnoty ostali znížené až po dobu ukončenia prežívania zvierat (t.j. 9 týždňov od zásahu) (Tab. 2). Imunohistochemickou analýzou sme zistili hypertrofiu astrocytov, ktorá sa prejavila hrubnutím a predĺžením ich výbežkov v lumbálnych segmentoch sivej hmoty miechy 9 týždňov po transekcii (Obr. 1B). Početné a predĺžené výbežky reaktívnych astrocytov pokrývajú rozsiahle plochy neurónov (Raisman, 1977), čím môžu zabrániť vytváraniu nových synaptických spojení a znížiť tak efektivitu regenerácie axónov. Zvýšenie počtu astrocytov v mieche po jej poranení pravdepodobne môže súvisieť s ich funkciou v CNS, kde sú zapojené do reparatívnych procesov a tvorby gliovej jazvy. Po baklofenovej liečbe sa počet hypertrofovaných astrocytov znížil (Obr. 1C).

V našej práci sme tiež sledovali imunoreaktivitu nNOS v lumbálnych segmentoch miechy. V porovnaní s kontrolou, kde sa zaznamenali nNOS imunonegatívne motorické bunky (Obr. 2A), sme 6 a 9 týždňov po transekcii detekovali nNOS imunoreaktivitu v α -motoneurónoch (Obr. 2B, 2C). Zistili sme, že v tomto čase bola zvýšená aj reflexná aktivita (Tab.1), na základe čoho predpokladáme možnú existenciu prepojenia medzi nNOS imunoreaktivitou v α -motoneurónoch a reflexnou aktivitou ako aj zapojenie NO do procesov súvisiacich s ovplyvnením motorickej aktivity.

Tab. 1: „Tail-flick“ latencia použitá ako behaviorálny index nociceptívnej citlivosti u zvierat po transekcii

Čas merania (min)	Teplom indukovaný TFR čas (s)					
	kontrola	1 týždeň	2 týždne	4 týždne	5 týždňov	9 týždňov
0'	2.00 ± 0.51	7.64 ± 1.65*	2.99 ± 0.37	1.92 ± 0.22	2.57 ± 0.26	1.20 ± 0.47
15'	2.00 ± 0.62	6.89 ± 1.04*	3.13 ± 0.58	2.69 ± 2.28	2.79 ± 0.20	2.08 ± 0.43
30'	0.58 ± 0.18	5.82 ± 0.71*	2.94 ± 0.43*	3.24 ± 0.56*	3.05 ± 0.29*	2.68 ± 0.60*

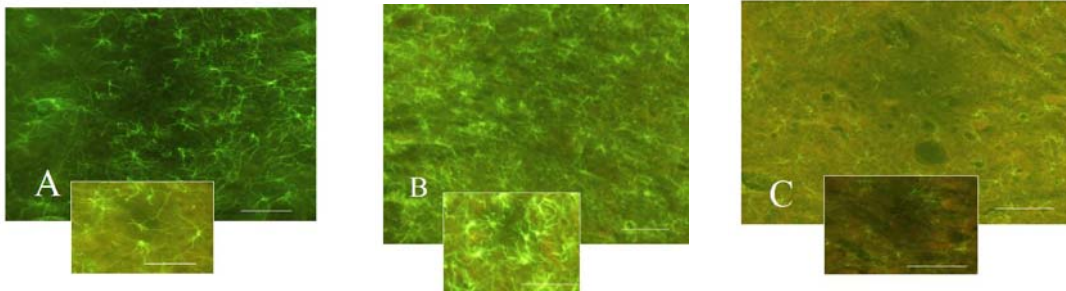
Hviezdičky označujú signifikantné rozdiely medzi kontrolou a transekciiu miechy bez baklofenovej liečby; *P<0,05.

Tab. 2: „Tail-flick“ latencia použitá ako behaviorálny index nociceptívnej citlivosti u zvierat po transekcii a liečbe baklofenom

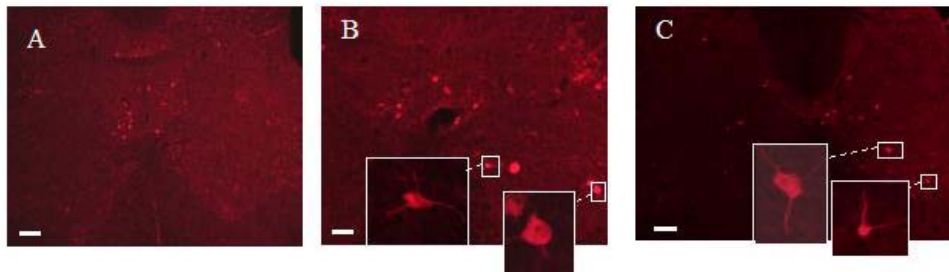
Čas merania (min)	Teplom indukovaný TFR čas (s) u zvierat liečených baklofenom					
	kontrola	1 týždeň	2 týždne+baklofen	4 týždne	5 týždňov+baklofen	9 týždňov
0'	2.00 ± 0.51	4.18 ± 2.28	2.15 ± 0.01	1.79 ± 0.19	1.76 ± 0.55	1.42 ± 0.58
15'	2.00 ± 0.62	5.27 ± 0.44*	2.23 ± 1.41	2.48 ± 0.84	1.71 ± 0.45	1.91 ± 0.47
30'	0.58 ± 0.18	4.39 ± 1.10*	2.17 ± 0.36*	4.43 ± 0.55*	2.22 ± 0.36*	1.66 ± 0.60

Hviezdičky označujú signifikantné rozdiely medzi kontrolou a transekciiu miechy u zvierat po baklofenovej liečbe; *P<0,05.

Obr.1: Imunohistochemická vizualizácia astrocytov v lumbálnej mieche A) u kontroly, B) 9 týždňov po transekcii, a C) 9 týždňov po transekcii a po liečbe baklofenom



Obr.2: Imunohistochemická vizualizácia nNOS v motoneurónoch lumbálnej miechy A) u kontroly, B) 6 týždňov po transekcii a C) 9 týždňov po transekcii



POĎAKOVANIE

Výskumná práca je podporovaná VEGA Grantom 2/0168/11 a APVV Grantom 0314-06

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Juszkiewicz – Donsbach, J., Levy, G. Effect of small variations in heat stimulus temperature on the tail flick response of rats in analgesimetry. *J. Pharm. Sci.* 1962; 51: 185 – 186.
- Kakinohana, O., Hefferan, M. P., Nakamura, S., Kakinohana, M., Galik, J., Tomori, Z., Maršala, J., Yaksh, T. L., Maršala, M. Development of GABA – sensitive spasticity and rigidity in rats after transient spinal cord ischemia: a qualitative and quantitative electrophysiological and histopathological study. *Neurosci.* 2006; 141: 1569 – 1583.
- Lance J. W. Symposium synopsis. In: Feldman, R.G., Yound, R.R., Koella, W. P., eds. *Spasticity: Disordered Motor Control.* Chicago: Year Book Medical. 1980; 485 –4 94.
- Maršala, J., Lukáčová, N., Sulla, I., Wohlfahrt, P., Maršala, M. The evidence for nitric oxide synthase immunopositivity in the monosynaptic Ia – motoneuron pathway of the dog. *Exp. Neurol.* 2005; 195:161 – 178.
- Raisman, G. Formation of synapses in the adult rat after injury: similarities and differences between a peripheral and central nervous site. *Phil. Trans. R. Soc. London. (Biol.).* 1977; 278: 349 – 359.

PAKOMÁRIKY RODU *CULICOIDES* - VEKTOR NÁKAZY BLUETONGUE

Lacková Z.¹, Bireš J.¹, Kočišová A.², Lešková L.¹

¹Klinika prežúvavcov, UVLF Košice

²Ústav parazitológie, UVLF Košice

ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo zistiť v rámci štúdia potencionálneho výskytu choroby modrého jazyka prítomnosť vektora tohto významného orbivírusového ochorenia – pakomárikov rodu *Culicoides* v nami vybranej lokalite východného Slovenska, ktorá sa nachádza v ochrannej zóne ohnisk nákazy v Maďarsku. Taktiež sa zamerať na druhové a sezónne zastúpenie jednotlivých odchytených zástupcov rodu *Culicoides* a na ich populačnú dynamiku. Sledovanie bolo vykonávané od apríla do novembra 2010. Celkovo sme odchytili 13 788 ks pakomárikov rodu *Culicoides*. Nezaznamenali sme prítomnosť hlavného vektora nákazy, ktorým je *Culicoides imicola*. Pri jednotlivých odberoch sme zachytili zástupcov komplexov *Culicoides obsoletus* (11 524 ks), *C. pulicaris* (320 ks) a *C. nubeculosus* (13 ks). Do skupiny zatiaľ neurčených druhov pakomárikov rodu *Culicoides* bolo zaradených 1 931 ks. Počas odchytovej sezóny sme zaznamenali 3 vrcholy výskytu. Najviac pakomárikov rodu *Culicoides* bolo odchytených na prelome mesiacov máj a jún (4 994 ks), druhý vrchol sme zaznamenali koncom júla (2 181 ks) a posledný tretí vrchol sme zaznamenali v auguste s počtom odchytených pakomárikov 3 578 ks. Pri sledovaní vekovej štruktúry pakomárikov rodu *Culicoides* na základe sfarbenia bruška sme zistili prevahu v kategórii „nulliparous“ (6 235 ks). Druhý najvyšší výskyt bol zaznamenaný v kategórii „parous“ (3 428 ks), najmenej v kategórii „bloodfed“ (966 ks).

ÚVOD

Rod *Culicoides* obsahuje približne 1 400 popísaných druhov (Zendulková et al., 2008). Z toho je približne 95 % druhov je hematofágnych. Hematofágne sú však len samičky, ktoré potrebujú prijať krv pre rozvoj vaječníc a vajíčok. Pri obmedzenom príjme krvi dochádza k dozrievaniu menšieho počtu vajíčok. Hostujú na rôznych druhoch hostiteľov - cicavcoch, vtákoch a obojživelníkoch. Pri cicaní krvi môžu prenášať rôznych pôvodcov ochorení zvierat (parazitárnych, bakteriálnych a vírusových). Z pakomárikov rodu *Culicoides* bolo izolovaných viac ako 50 rôznych vírusov (www.fao.org/docs/eims/upload/21304/ew_europe_sept06.pdf). Najznámejšie vírusové ochorenia sú choroba modrý jazyk (BT – Blue tongue), africký mor koní a hemoragická choroba jeleňov (Kočišová a Bireš, 2009). Na území Slovenskej a Českej republiky bolo doteraz diagnostikovaných viac ako 40 druhov pakomárikov rodu *Culicoides* zaradených do podrodov *Avaritia*, *Monoculicoides*, *Betranmyia*, *Culicoides* a *Oeacta*. Do týchto podrodov sú zaradené aj druhy patriace do skupiny pakomárikov prenášajúcich vírus choroby modrého jazyka (*Avaritia* - *Culicoides obsoletus*, *Culicoides* - *Culicoides pulicaris*, *Monoculicoides* - *Culicoides nubeculosus* (www.svscr.cz/index.phd?art=1770)).

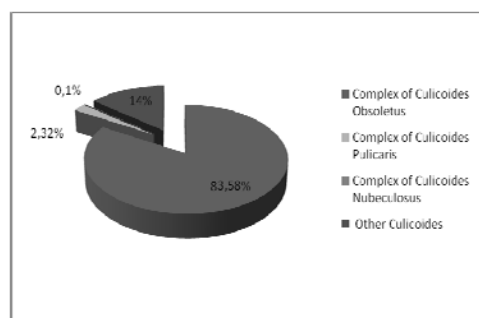
MATERIÁL A METÓDY

Odchyt hmyzu bol vykonávaný jedenkrát týždenne v období od 5.4. do 30.11. 2010 na farme s chovom oviec (356 m n. m.). V zimnom období a v noci v pastevnom období sú zvieratá ustajnené v maštali na hlbokej podstielke. Pastevné obdobie trvalo v závislosti od klimatických podmienok od apríla do novembra. Na odchyt sa použil mobilný lapač hmyzu (model JW1212) s využitím UV svetla (320-420 nm). Tento lapač bol nainštalovaný v deň odchytu medzi 17. až 18. hodinou večer a odoberaný nasledujúci deň ráno medzi 5. až 6. hodinou. Lapač bol umiestnený v blízkosti ustajňovacích priestorov zvierat približne vo výške 1,5 m od zeme a 2,5 m od stien budov so zamedzením prístupu zvierat. Miesto odchytu je

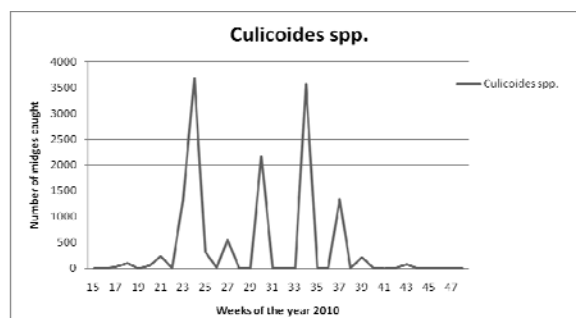
rovnaké počas celého obdobia prieskumu. Hmyz sa odchyťoval do zbernej nádoby so 150 ml pitnej vody a 2-3 kvapkami detergentu. Nádobka s odchyteným hmyzom bola najneskôr do 48 hodín transportovaná do laboratória. Počas obdobia skladovania vzoriek, až po ich transport do laboratória, musia byť vzorky uskladnené na chladnom mieste bez priameho slnečného svetla. V laboratóriu sa po otvorení nádoby obsah prefiltraval cez malý kúsok gázy (štvorec 15x15 cm). Po prefiltrovaní sa hmyz opatrne pomocou entomologickej pinzety preniesol do nádoby s obsahom 70% alkoholu (Goffredo a Meiswinkel, 2004). Pri analýze vzoriek sa najprv oddelia všetci zástupcovia rodu *Culicoides* od ostatného odchyteného hmyzu. Jednotlivé druhy, resp. komplexy z rodu *Culicoides* sú rozlišované na základe vzorovania krídel (svetlých a tmavých škvŕn, jemných chlpkov na krídlach). Do komplexov sú zaraďované druhy so skoro identickým vzorovaním krídel (Goffredo a Meiswinkel, 2004). Tieto druhy sme sledovali vo vzťahu k prenosu významného orbivírusového ochorenia oviec *febris catarrhalis ovium*. Zároveň bolo hodnotené pigmentové zafarbenie bruška samičiek (Braverman a Mumcuoglu, 2009; Bartsch et al., 2009). Pigmentovým zafarbením bruška samičiek pakomárikov rodu *Culicoides* odhadujeme vekovú štruktúru sledovanej populácie a kompetenciu vektora k možnému prenosu vírusu modrého jazyka (BTV). Rozlišujeme štyri farebné stupne, označované ako „nulliparous“ – t.j. samičky so svetlým bruškom bez vaječných folikulov; „parous“ – t.j. samičky s jasne červeným bruškom formujúce folikuly; „bloodfed“ – samičky s tmavým bruškom s natrávenou krvou hostiteľa „gravid“ – gravidné samičky s formujúcimi sa vajčkami;.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z 35 odchytoŧ počas transmisívnej sezóny (5.4. – 30.11.2010) bolo 5 negatívnych (14,3 %), dva na začiatku sezóny, v apríli a v máji a tri na konci sezóny, v novembri. V rámci týchto odchytoŧ sme získali 13 788 ks pakomárikov rodu *Culicoides*. Pri ich diferenciacii na základe vzorovania krídel sme nezistili prítomnosť *Culicoides imicola*. Určili sme však zástupcov nasledujúcich komplexov: *Culicoides obsoletus* (11 524 ks, 83,58 %), *C. pulicaris* (320 ks, 2,32 %), *C. nubeculosus* (13 ks, 0,1 %). Do skupiny zatiaľ neurčených druhov bolo zaradených 1 931 ks (14 %)(Obr. 1). Podobné zastúpenie jednotlivých komplexov zaznamenali v Rakúsku v roku 2007, kde počas transmisívnej periódy odchytili 2 533 009 ks pakomárikov rodu *Culicoides*. 87,3 % odchytených pakomárikov zaradili do komplexu *Culicoides obsoletus*, 6,7 % do komplexu *C. pulicaris* a 0,1 % do komplexu *C. nubeculosus*. Iné neurčené druhy tvorili 5,9 % z celkového počtu odchytených pakomárikov (Sehnal et al., 2008). Pri sledovaní odchytili približne o 4 % viac zástupcov komplexu *Culicoides obsoletus* a približne 3xviac zástupcov komplexu *C. pulicaris*. Tieto rozdiely mohli byť zapríčinené rozdielnymi lokalitami odchytoŧ. Zástupcovia komplexu *C. Obsoletus* pre svoj život preferujú vlhkú pôdu a kompostovaný organický materiál, naopak zástupcovia komplexu *C. Pulicaris* preferujú oblasti s mokrou pôdou, prítomnosť rašelinísk, močiarov a bahnísk (www.defra.gov.uk/animalh/diseases/notifiable/pdf/bluetongue_technical.pdf).



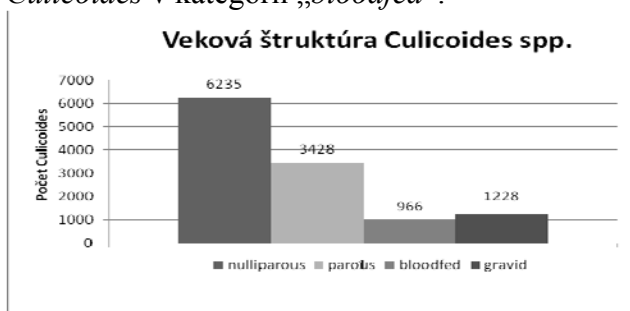
Obr. 1 Percentuálne zastúpenie jednotlivých komplexov *Culicoides*



Obr. 2 Sezónna dynamika odchytených pakomárikov *Culicoides*

Počas odchytovej sezóny sme zistili 3 vrcholy výskytu s vyšším počtom odchyteného vektora. Najviac pakomárikov bolo odchytených na prelome mesiacov máj a jún (4 994 ks, t.j. 36,22 % z celkového počtu odchytených pakomárikov). Druhý vrchol sme zaznamenali koncom júla (2 181 ks pakomárikov, 15,82 %). Tretie obdobie s najvyšším odchytom sme zaznamenali v mesiaci august (3 578 ks, 25,95 %)(Obr. 2). Dynamika výskytu pakomárikov môže súvisieť s vhodnými klimatickými podmienkami v nami sledovanej oblasti. V období od mája do októbra sú pre oblasť Košíc zisťované vhodné podmienky pre aktivitu pakomárikov rodu *Culicoides*. Pri predpokladanom globálnom otepľovaní je taktiež možné očakávať predĺženie transmisívnej (odchytovej) sezóny vektora. Pri monitoringu aktivity pakomárikov rodu *Culicoides* sa na základe dosiahnutých výsledkov na sledovanej farme odporúča využívať pre posúdenie ich aktivity aj meteorologické údaje. Prežívanie, aktivita a rozptýlenie pakomárikov rodu *Culicoides* sú závislé na zmenách klimatických podmienok, ako sú teplota a relatívna vlhkosť vzduchu, prúdenie vetra a jeho smer. V Nemecku v roku 2007 pri sledovaní sezónnej dynamiky pakomárikov rodu *Culicoides* došli k podobným výsledkom. Vrcholy počtov odchytených pakomárikov rodu *Culicoides* zaznamenali počas mesiacov jún, august a október (Clausen et al., 2009).

Pigmentovým zafarbením bruška samičiek pakomárikov rodu *Culicoides* odhadujeme vekovú štruktúru sledovanej populácie a kompetenciu vektora k možnému prenosu vírusu BTV. Na obr. 3 je znázornená veková štruktúra odchytených pakomárikov rodu *Culicoides* v rámci všetkých komplexov rodu *Culicoides*. Najviac bolo odchytených pakomárikov rodu *Culicoides* v kategórii „nulliparous“ (6 235 ks, 52,58 %), tzv. hladných samičiek s prázdny bruškami. Táto kategória pakomárikov rodu *Culicoides* sa stáva po nacicaní na infikovanom hostiteľovi prenášačom vírusu pre neinfikovaných vnímavých hostiteľov. Nacicané pakomáriky rodu *Culicoides* s červenými bruškami s obsahom čerstvej krvi zatriedené do kategórie „parous“, ako aj pakomáriky rodu *Culicoides* s tmavými až čiernymi bruškami s obsahom natrávanej krvi zatriedené do kategórie „bloodfed“ a pakomáriky rodu *Culicoides* s označením „gravid“ s vytvorenými vajíčkami v brušku sa stávajú pri opakovanom cicaní krvi potencionálnymi vektormi vírusu pre neinfikovaných hostiteľov. Druhý najvyšší výskyt v rámci odchytených pakomárikov rodu *Culicoides* bol zaznamenaný v kategórii „parous“ s celkovým počtom 3 428 ks (28,91 %). Samičiek s označením „gravid“ bolo 10,36 % (1 228ks). Najmenej bolo odchytených samičiek pakomárikov rodu *Culicoides* v kategórii „bloodfed“, kde bolo odchytených celkovo 966 ks pakomárikov rodu *Culicoides* (8,15%). V Belgicku pri sledovaní sfarbenia brušiek pakomárikov rodu *Culicoides* zistili prevahu kategórie „nulliparous“ (50,6 %). Do kategórie „parous“ zaradili 27,6 % a do kategórie „bloodfed“ 18,6 % zo všetkých odchytených pakomárikov rodu *Culicoides*. Samičky s vytvorenými vajíčkami „gravid“ tvorili v ich sledovaní 3,2 % z celkového počtu odchytených pakomárikov rodu *Culicoides* (Fassotte et al., 2008). Oproti našim výsledkom, zistili menej pakomárikov rodu *Culicoides* kategórie „gravid“ a viacej pakomárikov rodu *Culicoides* v kategórii „bloodfed“.



Obr. 3 Veková štruktúra *Culicoides* spp.

Pri našej práci sme nezistili prítomnosť hlavného vektora *Culicoides imicola* v nami vybranej lokalite východného Slovenska. Zistili sme však prítomnosť iných potencionálnych vektorov ochorenia, tzv. studenomilné druhy s prevahou zástupcov komplexu *Culicoides obsoletus*.

POĎAKOVANIE

Práca bola realizovaná v rámci projektov AV4/2041/08 a VEGA 1/0940/11

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bartsch S., Bauer B., Wiemann A., Clausen P. H., Steuber S. Feeding patterns of biting midges of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* groups on selected farms in Brandenburg, Germany. *Parasitology Research*, 2009, 105, 373-380.
- Braverman Y., Mumcuoglu K. Newly emerged nulliparous *Culicoides imicola* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) with pigmented abdomen, *Veterinary Parasitology*, 2009, 160, 356-358.
- Clausen P.H., Stephan A., Bartsch S., Jandowsky A., Hoffmann-Köhler P., Schein E., Mehlitz D., Bauer B.: Seasonal dynamics of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae, *Culicoides* spp.) on dairy farms of Central Germany during the 2007/2008 epidemic of bluetongue. *Parasitology Research*, 2009, 105, 2, 381-386
- Goffredo M., Meiswinkel R. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Veterinaria Italiana* 2004, 40, 260-265.
- Fassotte, C., Dele'colle, J.C., Cors, R., Defrance, T., De Deken, R., Haubruge, E., Losson, B. *Culicoides* trapping with Rothamsted suction traps before and during the bluetongue epidemic of 2006 in Belgium, *Preventive veterinary medicine*, 2008, 87, 74-83.
- Kočíšová, A., Bíreš, J.: Pakomáriky (Tiplíci) *Culicoides*: význam, rozšírenie, biológia, diagnostika a kontrola. *Dezinfekce, Dezinsekce, Deratizace*, 2009, XVIII., 3, 84-87.
- 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.
- Sehnal P., Schweiger S., Schindler M., Anderle F., Schneemann Y., 2008, Bluetongue: Vector surveillance in Austria in 2007, *Wiener Klinische Wochenschr* 120,4, 34–39.
- Zendulková, D., Duben, J., Semerád, Z., Šatrán, P.: Katarální horečka ovčí – Bluetongue, *Ministersvo zemědělství*, Praha, ISBN 978-80-7084-734-3, 1-20.
- www.defra.gov.uk/animalh/diseases/notifiable/pdf/bluetongue_technical.pdf : Technical review - Bluetongue: The Virus, Hosts and Vectors, Table of contents, 16.10.2009
- www.fao.org/docs/eims/upload/2130_4/ew_europe_sept06.pdf: Bluetongue in Europe, 22. február 2011
- www.svsr.cz/index.php?art=1770: Přenášecí nákazy, hmyzí vektor - tiplík (rod *Culicoides*), 22. február 2011

VPLYV PREFERMENTOVANÝCH CEREÁLNYCH SUBSTRÁTOV (MLETÝ JAČMEŇ A RAŽNÉ OTRUBY) OBOHATENÝCH γ -LINOLÉNOVOU KYSELINOU NA BACHOROVÉ FERMENTAČNÉ PARAMETRE A PROTOZOÁLNU POPULÁCIU *IN VITRO*

Laho T.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Schopnosť huby *Thamnidium elegans* (TE) rásť a využívať rôzne agroindustriálne substráty sa využíva vo vývoji nových diét obohatených γ -linolénovou kyselinou pre výživu prežúvavcov. Štyri diéty pozostávajúce z lúčneho sena (LS; 12,8 g DM/deň) a nefermentovaných cereálnych substrátov (mletý jačmeň, MJ; 3,2 g DM/deň; ražné otruby, RO; 3,2 g DM/deň) alebo z LS a prefermentovaných cereálnych substrátov (LS+MJ-TE; LS+RO-TE) sme použili na skúmanie fermentačných parametrov a rastu protozoálnej bachorovej populácie v umelom bachore (RUSITEC). Experimentálne cereálne substráty boli obohatené o hubu *T. elegans* patriacu do radu *Zygomycetes*, ktorá je schopná produkovať γ -linolénovú kyselinu. Ako inokulum sme použili bachorovú tekutinu od fistulovaných oviec. V prvom pokuse, pri LS+MJ-TE diéte, nebol zistený vplyv na fermentačné parametre v RUSITECu, avšak nepriaznivo bol ovplyvnený rast celkovej ciliátovej populácie ako aj rast jednotlivých druhov ciliát. V druhom pokuse pri LS+RO-TE diéte bola zvýšená degradácia neutrálnej detergentnej vlákniny a znížená produkcia celkových a jednotlivých krátkoreťazcových mastných kyselín. Pri LS+RO-TE diéte bol znížený celkový počet ciliát ako aj rast *Entodinium* spp., *Isotricha* spp., *Enoploplastron triloricastrum*, *Polyplastron multivesiculatum* a *Ophryoscolex c. tricornatus*. Pri tejto diéte bol zaznamenaný rast ciliáty *Dasytricha ruminantium*. Výsledky ukázali, že diéta s mletým jačmeňom obohateným hubou *T. elegans* nemala významný vplyv na fermentačné parametre na rozdiel od diéty s obohatenými ražnými otrubami, avšak obidve diéty mali nepriaznivý vplyv na rast bachorovej ciliátovej populácie.

ÚVOD

Živočíšne produkty a mäso z prežúvavcov sú dôležitým zdrojom polynenasýtených mastných kyselín (PUFA), ktorých pozitívne účinky na ľudský organizmus sú dávno známe. Zdraviu prospešné PUFA medzi ktoré patrí aj kyselina γ -linolénová (GLA), ako intermediárny metabolit premeny kyseliny linolénovej na kyselinu arachidonovú, musia byť získavané z diéty, alebo z dietárnych doplnkov. Niektoré mikroorganizmy produkujú oleje s významným množstvom PUFA a nižšie huby z radu *Zygomycetes* sú aktívne v biosyntéze GLA (Certík, 2008). Známa je aplikácia druhu *Thamnidium elegans* (TE) pre efektívnu utilizáciu agro-industriálnych materiálov (Certík a Adamechova, 2009). V predchádzajúcich experimentoch sme študovali vplyv prefermentovaných cereálnych substrátov (pšeničné otruby, mletá kukurica, mletý jačmeň a ražné otruby) obohatených γ -linolénovou kyselinou na lipidový metabolizmus (Laho a kol., 2011a, 2011b). Cieľom tejto práce bolo zistiť vplyv TE obohatených cereálnych substrátov na fermentačné parametre a protozoálnu populáciu v bachorovej tekutine *in vitro*.

MATERIÁL A METÓDY

Mletý jačmeň (MJ) a ražné otruby (RO) inokulované hubou *Thamnidium elegans* (TE) CCF 1456 (Karlova Univerzita, Praha, CZ) boli použité ako cereálne substráty v experimentoch *in vitro* v množstve 3,2 g cereálie (MJ-TE; RO-TE) doplnené lúčnym senom (LS; 12,8 g sušiny (DM)/deň). Kontrola nebola obohatená hubou (LS+MJ; LS+RO). Boli urobené dva experimenty v ktorých dve TE obohatené diéty a ich kontroly (LS+MJ vs LS+MJ-TE a

LS+RO vs LS+RO-TE) boli použité v štyroch opakovaníach. Ako fermentačný *in vitro* systém bol použitý umelý bachor (RUSITEC). Každá RUSITEC-ová fermentácia trvala 12 dní. Bachorové inokulum bolo odobraté fistulovaným ovciam pred ranným kŕmením. V RUSITECu bol zabezpečený kontinuálny prívod McDougallovho pufru s pH 8.4 obohateného o mikroelementy. Adaptačná perióda trvala 3 dni pred začiatkom odberu vzoriek. V prvej fermentačnej perióde (kontrola), všetky fermentačné nádoby boli doplnené neobohatenou diétou (LS+MJ alebo LS+RO). Odber vzoriek bol urobený na 4-6 deň. RUSITECová fermentácia potom pokračovala ďalších 6 dní s prefermentovanými cereálnymi substrátmi vo všetkých fermentačných nádobách (LS+MJ-TE alebo LS+RO-TE). Vzorky boli odoberané na 10-12 deň a potom bola fermentácia zastavená. Po skončení fermentácie v RUSITECu, nestrávené zvyšky krmiva boli chemicky analyzované v triplikátoch pri 60 °C, 48 h na obsah sušiny (DM), neutrál detergentnej vlákniny (NDF) a acid detergentnej vlákniny (ADF) (Van Soest a kol., 1991) s použitím FiberTec 2010 (Teactor Comp., Höganäs, Sweden). Na stanovenie obsahu popola a N boli použité štandardné metódy (AOAC, 1990). Fermentačný plyn bol zachytávaný do špeciálnych vakov (Tesseraux, GmbH, Birstad, Germany), koncentrácia metánu a produkcia krátkoreťazcových mastných kyselín (SCFA) bola analyzovaná na plynovom chromatografe Perkin-Elmer Clarus 500 (Perkin-Elmer, Inc., Shelton, CN, USA). Ciliáty boli počítané mikroskopicky (Coleman, 1978) a identifikované (Ogimoto a Imai, 1981). Štatistická analýza bola urobená dvojcestnou analýzou variácie (model I, fixed effects; GraphPad InStat, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) ako opakované merania dvoch diétarných skupín (LS+MJ vs LS+MJ-TE a LS+RO vs LS+RO-TE) v štyroch fermentačných nádobách a v troch časových bodoch (dni odberov). Vplyvy zahrnuté do modelu boli diéta (D), fermentačná nádoba (V) a interakcia medzi diétou a fermentačnou nádobou (D x V). Rozdiely boli analyzované Bonferroni post-testom.

Tabuľka č.1

Vplyv LS+MJ-TE diéty na fermentačné parametre a rast ciliátovej populácie (n=3)

	LS+MJ	LS+MJ-TE	SEM	D	V	D x V
DMD (g kg ⁻¹)	510	493	18,2	ns	ns	ns
OMD (g kg ⁻¹ of DM)	523	502	18,3	ns	ns	ns
dNDF (g kg ⁻¹ of DM)	165	115	18,3	ns	ns	ns
dADF (g kg ⁻¹ of DM)	87,3	89,4	11,8	ns	ns	ns
pH	6,93	6,99	0,036	ns	ns	ns
Celk. SCFA (mmol deň ⁻¹)	31,1	29,5	1,29	ns	ns	ns
Acetát (mmol deň ⁻¹)	19,4	18,1	0,83	ns	ns	ns
Propionát (mmol deň ⁻¹)	6,92	6,83	0,342	ns	ns	ns
n-Butyrát (mmol deň ⁻¹)	3,48	3,06	0,131	ns	ns	ns
Metán (mmol deň ⁻¹)	5,29	5,19	0,539	ns	ns	ns
Celk. počet ciliát	17783	2723	1056	**	***	**
<i>Entodinium</i> spp. (n ml ⁻¹)	14929	1887	1053	**	***	**
<i>Dasytricha ruminantium</i> (n ml ⁻¹)	1117	653	139	***	***	***
<i>Isotricha</i> spp. (n ml ⁻¹)	197	2	23	***	**	**
<i>Enoploplastron triloricastrum</i> (n ml ⁻¹)	179	21	10	***	ns	ns
<i>Polyplastron multivesiculatum</i> (n ml ⁻¹)	52	2	6	***	**	**
<i>Ophryoscolex c. tricoronatus</i> (n ml ⁻¹)	27	0	4	**	*	*

DMD: stráviteľnosť suchej hmoty; OMD: stráviteľnosť organickej hmoty; dNDF: degradovaná neutrálna detergentná vláknina; dADF: degradovaná acid detergentná vláknina; SCFA: krátkoreťazcové mastné kyseliny; LS: lúčne seno; MJ: mletý jačmeň; TE: *Thamnidium elegans*; D: diéta; V: fermentačná nádoba; ns: nie je signifikantné; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Fermentácia LS+MJ-TE diéty (Tabuľka č.1) nemala vplyv na pH, DMD, OMD, dNDF, metanogézu a produkciu SCFA. Pri fermentácii LS+RO-TE diéty došlo k zvýšeniu hodnoty dNDF ($P<0,01$) a pH ($P<0,01$) (Tabuľka č.2). Pokles stráviteľnosti vlákniny a organickej hmoty pri lipidovej suplementácii v RUSITECu bol už zaznamenaný (Machmüller a kol., 1998). Pri LS+RO-TE diéte bolo zaznamenané zníženie produkcie celkových aj jednotlivých SCFA ($P<0,05$; $P<0,01$; $P<0,001$), podobne ako v inej práci, kde prídavok mikrobiálneho oleja bohatého na GLA redukoval molárny podiel acetátu avšak zvýšil molárny podiel propionátu v RUSITECu (Jalč a Čertík, 2005). Produkcia metánu v našich pokusoch nebola ovplyvnená, na rozdiel od inej práce (Jalč a kol., 2002). Obidve LS+MJ-TE a LS+RO-TE diéty mali nepriaznivý vplyv na rast všetkých sledovaných druhov ciliát *Entodinium* spp., *Isotricha* spp., *Enoploplastron triloricatum*, *Polyplastron multivesiculatum*, *Ophryoscolex c. tricornatus* aj keď výskyt interakcií D x V bol vo väčšine prípadov zaznamenaný. Podobne, Kišidayová a kol., (2006) popisuje zníženie populácie ciliát v RUSITECu mikrobiálnym olejom (30 g kg⁻¹; w/w). LS+RO-TE diéta zvýšila rast iba u ciliáty *Dasytricha ruminantium* ($P<0,001$). Je zrejmé, že protozoá participujú pri trávení vlákniny a škrobu a rozdielne substráty dokážu ovplyvniť pomer medzi protozoami a baktériami, ako aj stupeň bachorovej fermentácie. Zmeny v počte ciliát môžu odrážať aj nízky obsah škrobu, hoci populácia ciliát zle rástla aj v predchádzajúcom pokuse, kde boli použité cereálie s vyšším obsahom škrobu ako kukurica a pšenica (Laho a kol., 2011a).

Tabuľka č.2

Vplyv LS+RO-TE diéty na bachorové fermentačné parametre a rast ciliátovej populácie (n=3)

	LS+RO	LS+RO-TE	SEM	D	V	D x V
DMD (g kg ⁻¹)	485	428	14,6	ns	ns	ns
OMD (g kg ⁻¹ of DM)	489	435	14,2	ns	ns	ns
dNDF (g kg ⁻¹ of DM)	11,0	5,17	2,123	**	ns	ns
dADF (g kg ⁻¹ of DM)	8,52	10,5	3,022	ns	ns	ns
pH	6,94	7,08	0,025	**	ns	ns
Celk. SCFA (mmol deň ⁻¹)	21,8	17,7	1,04	**	ns	ns
Acetát (mmol deň ⁻¹)	14,1	10,4	0,49	***	ns	ns
Propionát (mmol deň ⁻¹)	4,60	3,87	0,185	*	ns	ns
n-Butyrát (mmol deň ⁻¹)	2,25	1,73	0,072	***	ns	ns
Metán (mmol deň ⁻¹)	4,85	5,77	0,499	ns	ns	ns
Celk. počet ciliát	11291	2218	478	***	ns	ns
<i>Entodinium</i> spp. (n ml ⁻¹)	9650	262	344	***	ns	ns
<i>Dasytricha ruminantium</i> (n ml ⁻¹)	1067	1861	143	***	***	***
<i>Isotricha</i> spp.(n ml ⁻¹)	118	29	15	*	***	**
<i>Enoploplastron triloricatum</i> (n ml ⁻¹)	142	8	8	***	ns	ns
<i>Polyplastron multivesiculatum</i> (n ml ⁻¹)	11	0	2	**	ns	ns
<i>Ophryoscolex c. tricornatus</i> (n ml ⁻¹)	36	0	4	**	ns	ns

DMD: stráviteľnosť suchej hmoty; OMD: stráviteľnosť organickej hmoty; dNDF: degradovaná neutrálna detergentná vláknina; dADF: degradovaná acid detergentná vláknina; SCFA: krátkoreťazcové mastné kyseliny; LS: lúčne seno; RO: ražné otruby; TE: *Thamnidium elegans*; D: diéta; V: fermentačná nádoba; ns: nie je signifikantné; * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

Naše výsledky môžu poukazovať na určité antiprotozoálne vlastnosti použitej huby, ktoré pravdepodobne neinterferujú s hydrogenézou, keďže metanogenéza nebola ovplyvnená. Bachorové ciliáty prispievajú k produkcii butyrátu, avšak posun v produkcii SCFA bol zrejmy iba v prípade RO diéty. Je známe, že PUFA priamo inhibujú bachorové protozoá, avšak nepotláčajú bakteriálnu aktivitu (Hristov a kol., 2004; Váradyová a kol., 2007).

Výsledky týchto experimentov a všetky naše predchádzajúce výsledky (Laho a kol., 2011a, 2011b) poukazujú na to, že schopnosť *T. elegans* rásť a využívať rôzne agroindustriálne substráty môže byť užitočná vo vývoji nových γ -linolénovou kyselinou obohatených diét pre prežúvavce.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied (VEGA 2/0001/11 a VEGA 2/0021/09).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- AOAC Official method of analysis. In Association of official analytical chemists, 15th edn. Ed. Herlick, K., pp.1230, Arlington, TX, USA, 1990.
- Certik M. Biotransformation of oils to value added compounds. In Biocatalysis and Bioenergy ed. Hou, C.T., Shaw, J.F. 2008, pp. 571-585, New York: John Wiley & Sons, USA
- Certik M., Adamechova Z. Cereal-based bioproducts containing polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technol.* 2009, 21:250-253.
- Coleman G.S. Rumen entodiniomorphid protozoa. In *Methods of cultivating parasites in vitro*. Ed. Taylor A.E.R., Baker J.R., 1978, pp. 39-45, London: Academic Press
- Hristov A.N., Ivan M., McAllister T.A. *In vitro* effects of individual fatty acids on protozoal numbers and on fermentation products in ruminal fluid from cattle fed a high-concentrate, barley-based diet. *J Anim Sci* 2004, 82:2693-2704.
- Jalč D., Čertík M. Effect of microbial oil, monensin and fumarate on rumen fermentation in artificial rumen. *Czech J. Anim. Sci.* 2005, 50:467-472.
- Jalč D., Kišidayová S., Nerud F. Effect of plant oils and organic acids on rumen fermentation *in vitro*. *Folia Microbiol.* 2002, 47:480-486.
- Kišidayová S., Mihaliková K., Váradyová Z., Potkaňski A., Szumacher-Strabel M., Cieślak A., Čertík M., Jalč D. Effect of microbial oil, evening primrose oil, and borage oil on rumen ciliate population in artificial rumen (RUSITEC). *J. Anim. Feed Sci.* 2006, 15:153-156.
- Laho T., Váradyová Z., Mihaliková K., Kišidayová S., Adamechová Z., Čertík M., Jalč D. Prefermented cereals containing fungal gamma-linolenic acid and their effect on rumen metabolism *in vitro*. *Czech J. Anim. Sci.* 2011a, 56 (7): *in press*.
- Laho T., Váradyová Z., Mihaliková K., Kišidayová S., Adamechová Z., Čertík M., Jalč D. Effects of prefermented cereal-derived substrates (ground barley and rye bran) enriched with fungal γ -linolenic acid on rumen fermentation parameters and lipid metabolism *in vitro*. *J. Appl. Microbiol.* 2011b, doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05073.x
- Machmuller A., Ossowski D.A., Wanner M., Kreuz M. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation *in vitro* (Rusitec). *Anim. Feed. Sci. Technol.* 1998, 71:117-130.
- Ogimoto K., Imai S. In *Atlas of rumen microbiology*. Tokyo: Scientific Societies Press, 1981.
- Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 1991, 74:3583-3597.
- Váradyová Z., Kišidayová S., Siroka P., Jalč D. Fatty acid profiles of rumen fluid from sheep fed diets supplemented with various oils and effect on the rumen ciliate population. *Czech J. Anim. Sci.* 2007, 52:399-406.

VPLYV PH NA FLUORESCENCIU VYBRANÝCH METABOLITOV TRYPTOFÁNU PRÍTOMNÝCH V MOČI

Lucia Lichardusová, Anna Birková, Jaroslav Kušnír, Mária Mareková

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

ABSTRAKT

Moč je viaczložková biologická tekutina, ktorá obsahuje množstvo prirodzených fluorofórov. Vďaka nim sa vyznačuje silnou fluorescenciou. Rozdiely fluorescenčných parametrov jednotlivých fluorofórov meraných *in vitro* vo vodných roztokoch a v prirodzenom prostredí moču sú značné a môžu viesť k falošným výsledkom a záverom. V práci prezentujeme vplyv pH, ako jedného z najbežnejších vplyvov, ktoré sa môžu v moči prejavovať a ovplyvniť priame meranie natívnej fluorescencie moču vo vzťahu ku konkrétnym diagnózam.

ÚVOD

Ľudský moč je komplexná biologická tekutina obsahujúca množstvo chemických zlúčenín produkovaných telom, zahŕňajúcich viacero prirodzených fluorofórov, z ktorých väčšinu tvoria metabolity tryptofánu (Anwer a kol., 2009). Zmeny koncentrácie týchto fluorofórov sú vyvolané rôznymi fyziologickými alebo patologickými zmenami – poruchami metabolizmu, diétou, vekom a inými faktormi.

Fluorescenčné spektrá jednotlivých fluorofórov sa líšia od spektier zmesných fluorofórov v biologickom materiáli a to predovšetkým vďaka interakciám samotných fluorofórov v zmesi. Správanie fluorofórov spojené s charakterom prostredia nie je veľmi známe (odlišnosť pH, iónovej sily, či koncentrácie proteínov). Komplexnosť moču môže mať dopad na intenzitu fluorescencie, alebo môže spôsobiť posun excitačného a/alebo emisného maxima bez toho, aby sa menila koncentrácia samotného fluorofóru (Lichardusová a kol., 2010).

V práci prezentujeme výsledky, ktoré upresňujú vplyv pH definovaného prostredia na spektrálne vlastnosti vybraných fluorofórov v moči. Uvedené efekty sme študovali na klinicky významných metabolitoch tryptofánu – kyseline 5-hydroxyindol-3-octovej (5-HIAA), serotoníne a indoxylsulfáte (močový indikán).

Prítomnosť študovaných fluorofórov v moči je charakteristická pre rôzne poruchy. Napríklad karcinoid – srdca (Pandya a kol., 2002), štítnej žľazy, gastrointestinálneho traktu (Khan a Coleman, 2008), ako aj apendicitída (Apak a kol., 2005), Whippleova choroba a celiakia (De Jong a kol., 2008) vyvolávajú zvýšenú koncentráciu serotonínu a tiež jeho koncového degradačného produktu 5-HIAA. Downov syndróm či Hartnupova choroba sú zase spojené so zníženou koncentráciou 5-HIAA (Tasdemir a kol., 2004). Zmenená hladina serotonínu je spojená aj s prítomnosťou neurologických a psychiatrických ochorení, akými sú depresia, migréna, schizofrénia a autizmus (De Jong a kol., 2008). Patologicky zvýšená koncentrácia indikánu v moči signalizuje hnilobné procesy v organizme, ku ktorým môže dôjsť pri črevných obštrukciách, hnačkách, Hartnupovej chorobe, karcinóme žalúdka ako aj pri pľúcnom abscese (Allegri a kol., 2003; Perinchery a kol., 2010).

Naším zámerom bolo popísať efekt pH na spomínané fluorofóry moču, čo by mohlo byť využité pri ďalšom spracovaní a komplexnej analýze nameraných fluorescenčných spektier tejto biologickej tekutiny.

Detailné pochopenie faktorov ovplyvňujúcich fluorescenciu moču, môže poskytnúť nové možnosti na využitie fluorescencie ako efektívneho nástroja využiteľného pre prevenciu a diagnostiku.

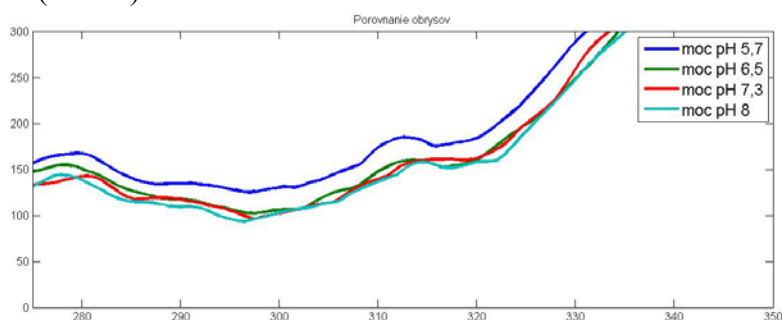
MATERIÁL A METODIKA

Štandardy jednotlivých fluorofórov boli rozpustené v deionizovanej vode o $c = 1$ mg/ml.

V moči zdravých jedincov boli indikátorovým prúžkom HexaPhan stanovené štandardné biochemické parametre. Pred fluorescenčným meraním boli vzorky moču centrifugované. Do moču boli pridávané jednotlivé fluorofóry a to v koncentrácii uvádzanej ako horná hranica ich fyziologickej hodnoty u zdravého dospelého jedinca (<http://www.hmdb.ca/>). Zmes moču a fluorofóru bola ďalej riedená tlmivým roztokom s rôznou hodnotou pH (5,7; 6,5; 7,3 a 8,0) do dvanástich skúmaviek. Prvá skúmavka - riedenie 0 obsahovala neriedenú vzorku moču + prídavok fluorofóru, ďalej nasledovali riedenia 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024. Z každého riedenia boli skenované synchronne fluorescenčné spektrá, zoradením ktorých vznikne komplexné zobrazenie - tzv. koncentračná matica. Merania sme vykonávali v rozsahu vlnových dĺžok 250-550 nm s rozdielom vlnových dĺžok medzi excitačným a emisným monochromátorom $\Delta\lambda = 30$ nm (Kušnír a kol., 2005) na fluorescenčnom spektrofotometri Perkin-Elmer LS 55 v 10 mm kremennej kyvete pri laboratórnej teplote. Získané údaje boli spracované pomocou softvéru FL WinLab a vlastnou aplikáciou bežiacou v prostredí Matlab. V obrázkoch upravených spektier sme pre lepšiu vizualizáciu rozdielov vystrihli oblasť, v ktorej by sa sledované fluorofóry mali prejaviť a to v rozsahu 275-350 nm.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

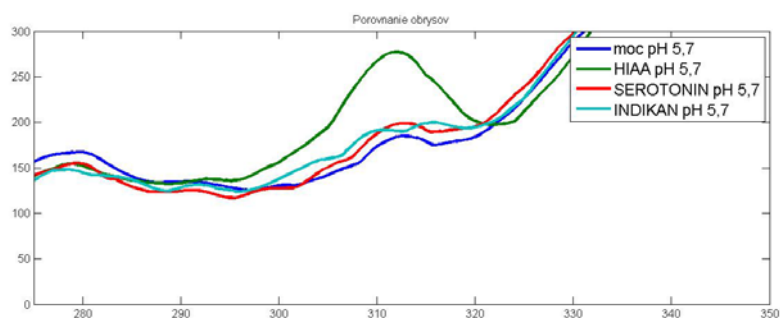
Hodnota pH je dôležitou vlastnosťou moču a fyziologicky sa pohybuje v rozmedzí 5,5 - 6. Zmena pH prostredia má len mierny vplyv na intenzitu fluorescencie moču v sledovanej oblasti 275-350 nm (Obr. 1).



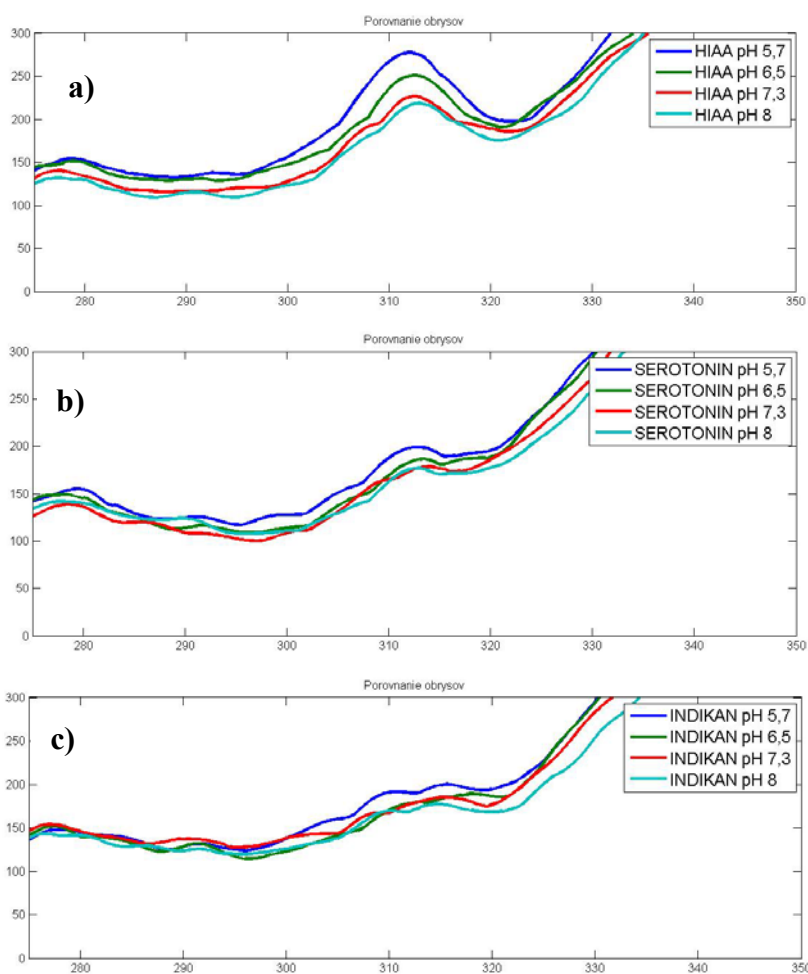
Obr. 1: Porovnanie upravených synchronných spektier toho istého moču bez prídavkov fluorofórov vo vybraných oblastiach pH.

Prídavok 5-HIAA v moči sa prejaví nárastom píku s maximom pri 312-314 nm (Obr.2). Zmena pH prostredia vplyva na intenzitu fluorescencie tohto fluorofóru nepriamo úmerne, so zvyšujúcou sa hodnotou pH klesá intenzita fluorescencie (Obr. 3a). Existencia píku pri 312 – 315 nm v spektre moču bez prídavkov fluorofórov (Obr.1) svedčí o tom, že 5-HIAA je aj bežnou súčasťou moču, prispieva k jeho celkovej natívnej fluorescencii, a zmena pH moču k zásaditej oblasti môže spôsobiť „falošne nízku“ fluorescenciu aj pri vyšších koncentráciách 5-HIAA, ktoré by mohli mať diagnostickú hodnotu.

Serotonín sa v moči bežne vyskytuje v omnoho nižšej koncentrácii, v dôsledku jeho degradácie na koncový produkt 5-HIAA. Jeho charakteristické maximum sme zaznamenali v oblasti 313-315 nm (Obr. 2). Vplyvom rastúceho pH intenzita fluorescencie tohto metabolitu mierne klesá, no všeobecne je efekt pH na fluorescenciu serotonínu zanedbateľný (Obr.3b).



Obr. 2: Porovnanie upravených spektier moču s prídavkami jednotlivých fluorofórov pri fyziologickom pH (pH 5,7)



Obr. 3: Porovnanie spektier moču s prídavkom jednotlivých fluorofórov a) 5-HIAA b) serotonínu c) indoxylsulfátu v skúmaných pH prostrediach.

Močový indikán sa v koncentračnej matici moču ($\Delta\lambda=30$ nm) prejavuje plošným zvýšením fluorescence v oblasti 295-320 nm, ktoré je pri študovanej koncentrácii iba naznačené (Obr.2). Indikán má vysokú hodnotu Stokesovho posunu (v našich meraniach okolo 100 nm), a preto v koncentračnej matici nezachytíme charakteristický pík. Vplyv pH na intenzitu tohto fluorofóru prítomného v moči je minimálny (Obr. 3c).

Zmena pH prostredia má len mierny vplyv na intenzitu fluorescence vybraných metabolitov moču typických pre rôzne poruchy. Merania ukázali, že fluoreskujúce metabolity tryptofánu prítomné v moči sa pri zmene pH vyznačujú relatívne vysokou stabilitou svojich fluorescenčných parametrov. Zmena pH má výraznejší vplyv na intenzitu fluorescence 5-

HIAA, zatiaľ čo intenzita fluorescencie indoxylsulfátu a serotonínu sa mení len minimálne. Vo všeobecnosti zvyšovanie pH nemení alebo len mierne znižuje fluorescenciu moču v oblasti výskytu sledovaných fluorofórov.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0402/10.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Allegri G., Costa C.V.L., Bertazzo A., Biasiolo M., Ragazzi E.: Enzyme activities of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in various species of animals. *Il Farmaco*, 2003, 58, s. 829 – 836.
- Anwer A.G., Perinchery M.S., Goldys, E.M., Vemulpad, S.: Distinctive autofluorescence of urine samples from individuals with bacteriuria compared with normals. *Clinica Chimica Acta*, 2009, 401, 73 – 75
- Apak S., Kazez A., Ozel S.K., Ustundag B., Akpolat N., Kizirgil A.: Spot urine 5-hydroxyindoleacetic acid levels in the early diagnosis of acute appendicitis. *Journal of Pediatric Surgery*, 2005, 40, s. 1436–1439.
- De Jong W.H.A., Graham K.S., De Vries E.G.E., Kema I.P.: Urinary 5-HIAA measurement using automated on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2008, 868, s. 28 – 33.
- Khan M.U., Coleman R.E.: Diagnosis and therapy of carcinoid tumors-current state of the art and future directions. *Nuclear Medicine and Biology*, 2008, 35, s. 77–91.
- Kušnír J., Dubayová K., Lešková L., Lajtár M.: Concentration matrices-Solutions for fluorescence definition of urine. *Analytical Letters*, 2005, 38, 1559-1567.
- Lichardusová L., Kušnír J., Valko-Rokytovska M., Mareková M.: The factors influencing direct spectral fluorimetry of some urine metabolites. *Praque medical report*, 2010, 4, 272–278.
- Lionetto L., Lostia A.M., Stigliano A., Cardelli P., Simmaco M.: HPLC–mass spectrometry method for quantitative detection of neuroendocrine tumor markers: Vanillylmandelic acid, homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Clinica Chimica Acta*, 2008, 398, s. 53–56.
- Pandya U.H., Pellikka P.A., Enriquez-Sarano M., Edwards W.D., Schaff H.V., Connolly H.M.: Metastatic carcinoid tumor to the heart: Echocardiographic-pathologic study of 11 patients. *Journal of the American College of Cardiology*, 2002, 7, s. 1328–1332.
- Perinchery S.M., Kuzhiumparambil U., Vemulpad S., Goldys E.M.: The influence of indoxyl sulfate and ammonium on the autofluorescence of human urine. *Talanta*, 2010, 80, s. 1269–1276.
- Tasdemir H.A, Cetinkaya M.C., Polat C., Belet U., Kalayci A.G., Akbas S.: Gallbladder motility in children with Down syndrome. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2004, 39, s. 187–191.

FAKTORY VPLÝVAJÚCE NA HODNOTY KONCENTRÁCIE KYSELINY MLIEČNEJ, FOSFÁTOV A HODNOTU PH MÄSA U VYBRANÝCH DRUHOV ZVERI

Mačanga J.¹, Koréneková B.¹, Nagy J.¹, Molnár L.²

¹Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF, Košice

²Klinika vtákov a exotických zvierat, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Táto práca sa zaoberá vplyvom rôznych situácií pred zabitím na koncentráciu kyseliny mliečnej, fosfátov a hodnotu pH vo svalovine bažantov poľovných, kačíc divých, králikov divých a diviakov lesných. Koncentrácie kyseliny mliečnej a fosfátov sme merali Elektroforetickým analyzátorom EA 102 a hodnoty pH sme merali pomocou pH-metra InoLab WTW 720. Zistili sme, že na vyššie uvedené parametre vplyva spôsob chovu a zabitia. Vo svalovine pernatej zveri chovanej na farme a zabitej vykvrvením sme namerali vyššie hodnoty kyseliny mliečnej a fosfátov a nižšie hodnoty pH, než vo svalovine ulovenej voľne žijúcej pernatej zveri. Rozdiely boli pozorované aj vo svalovine králikov z farmového chovu a voľne žijúcich (vyššie hodnoty kyseliny mliečnej a nižšie pH bolo vo svalovine ulovených voľne žijúcich králikov). Rozdielne hodnoty sme namerali aj vo svalovine diviakov ulovených z posedu a počas spoločnej poľovačky. Ako dokazuje táto práca, je pomerne veľa faktorov, ktoré vplyvajú na hodnotu pH a koncentráciu kyseliny mliečnej a fosfátov vo svalovine zveri.

ÚVOD

Koncentrácia svalového glykogénu a energeticky bohatých fosfátov v čase zabitia patrí medzi najdôležitejšie faktory vplyvajúce na kvalitu mäsa. Odbúraním týchto látok vznikajú metabolity ako je napríklad kyselina mliečna a fosfáty, ktorých množstvo je ovplyvnené rôznymi situáciami v čase pred zabitím. V literárnych zdrojoch je pomerne veľa výskumných prác zaoberajúcich sa vplyvom rozličných perimortálnych situácií na kvalitu mäsa hospodárskych zvierat (Henckel a kol., 2002; Lambertini a kol., 2006; Przybylski a kol., 2006; Sopková a kol., 2002), ale je veľmi málo informácií o ich vplyve na kvalitu mäsa zveri. S cieľom rozšíriť poznatky v tejto oblasti a zabezpečiť tak produkciu vysokokvalitnej zveriny sme porovnali hodnoty koncentrácie kyseliny mliečnej, fosfátov a hodnoty pH svaloviny vybraných druhov zveri, ktorá bola získaná za rozličných podmienok.

MATERIÁL A METODIKA

Na účely experimentu bola použitá:

- prsná a stehenná svalovina získaná z 18 ks bažantov poľovných - *Phasianus colchicus* (9 ks bolo ulovených v lesoch Účelového zariadenia pre chov a choroby zveri, rýb a včiel v Rozhanovciach a 9 ks z tohto zariadenia bolo zabitých vykvrvením po predchádzajúcom omráčení).
- prsná a stehenná svalovina 12 ks kačíc divých – *Anas platyrhynchos* (6 ks bolo ulovených v okolí povodia rieky Hornád a 6 ks pochádzalo z Kliniky vtákov, exotických a voľne žijúcich zvierat UVLF v Košiciach kde boli chované ako farmová zver, omráčené a zabitie vykvrvením)
- stehenná, lopatková a chrbtová svalovina odobraná z 36 ks králikov divých - *Oryctolagus cuniculus* (18 ks králikov bolo chovaných na farme v Nitre, boli prevezené autom – 7 hodín – do priestorov UVLF kde boli po omráčení zabitie vykvrvením. 18 ks králikov bolo ulovených počas spoločnej poľovačky v lesoch Účelového zariadenia pre chov a choroby zveri, rýb a včiel v Rozhanovciach)

- svalovina stehna a karé získaná zo 6 ks diviakov lesných – *Suus strofa* (3 ks vo veku 3 roky boli zastrelené z posedu a 3 ks vo veku 9 mesiacov boli ulovené počas spoločnej poľovačky v lesoch Účelového zariadenia pre chov a choroby zveri, rýb a včiel v Rozhanovciach)

Vzorky svalovín sme zhomogenizovali a na analýzu sme navážili 10 g svaloviny. Sledované analyty sme získali extrakciou z vodného výluhu. Po zmeraní pH (pH-meter - 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 roztok 10 mM HCL, β -alanín a 0,1% mHEC a zakončujúci elektrolyt roztok 5 mM kyselina kaprónová a 5 mM TRIS. Výsledky z elektroforetického analyzátoru boli vyhodnotené v programe ITPPro 32 a štatisticky analyzované v programe Microsoft Excel 2007 použitím Studentovho *t*-testu a ďalších variačno-štatistických charakteristík (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Porovnanie koncentrácií kyseliny mliečnej, fosfátov a hodnoty pH namerané do 24 hodín od ulovenia / zabitia vo svalovine pernatej zveri: bažanty poľovné (voľne žijúce / farmové) a kačice divé (voľne žijúce / farmové) popisuje tabuľka 1 a 2. Vyššie hodnoty kyseliny mliečnej boli zistené vo svalovine jedincov, ktorý boli chovaný ako farmová zver a po omráčení zabíjajú vykrvením. Štatisticky významne vyššie hodnoty kyseliny mliečnej boli namerané u farmových bažantov v stehennej svalovine ($p \leq 0,01$) a u kačiek zabíjajú vykrvením v stehennej ($p \leq 0,01$) a aj v prsnej svalovine ($p \leq 0,05$). V koncentráciách fosfátov neboli zistené významné rozdiely.

Hodnoty pH do veľkej miery závisia predovšetkým od množstva kyseliny mliečnej, čo sa potvrdilo aj v tomto prípade. Štatisticky významne nižšie hodnoty boli zistené v stehennej svalovine bažantov zabíjajú vykrvením ($p \leq 0,001$), v prsnej ($p \leq 0,001$) a v stehennej svalovine ($p \leq 0,001$) divých kačíc chovaných ako farmová zver.

Tieto rozdiely môžu byť spôsobené jednak spôsobom chovu, ale aj spôsobom zabitia. Z výsledkov vyplýva, že energetický metabolizmus v čase zabíjania, respektíve lovu prebiehal intenzívnejšie u farmovej pernatej zveri, preto produkty rozkladu glykogénu boli v ich svalovine vyššie. Naše výsledky sú veľmi podobné výsledkom, ktoré dosiahli Paulsen a kol. (2008). Vyčerpanie glykogénu je spôsobené u voľne žijúcich jedincov zvýšenou fyzickou aktivitou počas lovu. U farmovej pernatej zveri je to dôsledok manipulácie pred zabitím, ktorá na zver vplýva stresujúco. Ako uvádza práca Chloupeka a kol. (2009), už po pár minútach manipulácie sa u bažantov výrazne zvyšujú hladiny stresových hormónov.

Tab. 1. Koncentrácia kyseliny mliečnej, fosfátov a hodnota pH svaloviny bažantov poľovných (*Phasianus colchicus*) nameraná do 24 hodín po zabití/ulovení

	Laktát	Fosfát	pH
Skupina	Prsná svalovina		
A	1,18 ± 0,33	0,67 ± 0,10	5,70 ± 0,12
B	1,38 ± 0,41	0,90 ± 0,07	5,77 ± 0,07
Skupina	Stehenná svalovina		
A	0,82 ± 0,18 **	0,65 ± 0,09	6,42 ± 0,06 ***
B	1,09 ± 0,13	0,70 ± 0,04	5,93 ± 0,04

A – bažanty ulovené (voľne žijúce); B – bažanty zabíjajú vykrvením (farmový chov)

Štatistika: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Tab. 2. Koncentrácia kyseliny mliečnej, fosfátov a hodnota pH svaloviny kačíc divých (*Anas platyrhynchos*) nameraná do 24 hodín po zabití/ulovení

	Laktát	Fosfát	pH
Skupina	Prsná svalovina		
A	1,01 ± 0,15 *	0,50 ± 0,08	6,22 ± 0,12 ***
B	1,31 ± 0,12	0,40 ± 0,05	5,95 ± 0,06
Skupina	Stehenná svalovina		
A	0,66 ± 0,12 **	0,45 ± 0,07	6,57 ± 0,10 ***
B	1,04 ± 0,09	0,33 ± 0,03	6,04 ± 0,05

A – kačice ulovené (voľne žijúce); B – kačice zabitú vykrvením (farmový chov)

Štatistika: * p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001

Na počiatocnú koncentráciu kyseliny mliečnej, fosfátov a hodnotu pH vplýva aj transport zvierat z chovu na miesto zabitia. Porovnali sme tieto hodnoty namerané vo svalovine králikov divých, ktoré boli prepravované 7 hodín z farmy a po omráčení zabitú vykrvením s hodnotami nameranými vo svalovine králikov ulovených počas spoločnej poľovačky. Ako uvádza tabuľka 3, najvýraznejšie rozdiely boli zaznamenané medzi hodnotami koncentrácií kyseliny mliečnej a pH. Štatisticky významne vyššie koncentrácie kyseliny mliečnej boli namerané vo svalovine ulovených králikov (lopatka, chrbát p≤0,001; stehno p≤0,01) s čím súvisí aj hodnota pH, ktorá bola vo svalovine tejto skupiny štatisticky významne nižšia (lopatka a stehno p≤0,001; chrbát p≤0,05).

V literárnych zdrojoch je nedostatok informácií týkajúcich sa kyseliny mliečnej a fosfátov vo svalovine králikov divých, preto porovnanie našich výsledkov s inými autormi nie je možné.

Tab. 3. Koncentrácia kyseliny mliečnej, fosfátov a hodnota pH svaloviny králikov divých (*Oryctolagus cuniculus*) nameraná do 24 hodín po zabití/ulovení

	Laktát	Fosfát	pH
Skupina	Lopatková svalovina		
A	1,30 ± 0,09 ***	0,56 ± 0,05	5,89 ± 0,06 ***
B	0,72 ± 0,15	0,55 ± 0,08	6,79 ± 0,05
Skupina	Stehenná svalovina		
A	1,56 ± 0,19 **	0,55 ± 0,07 *	5,80 ± 0,03 ***
B	0,91 ± 0,16	0,73 ± 0,10	6,69 ± 0,03
Skupina	Chrbtová svalovina		
A	1,67 ± 0,16 ***	0,51 ± 0,03 *	5,64 ± 0,07 *
B	0,89 ± 0,20	0,68 ± 0,08	6,55 ± 0,38

A – králiky ulovené (voľne žijúce); B – králiky zabitú vykrvením (farmový chov)

Štatistika: * p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001

Počiatocná hodnota kyseliny mliečnej, fosfátov a hodnota pH svaloviny diviakov je ovplyvnená aj spôsobom ulovenia, ako znázorňuje tabuľka 4. U svaloviny získanej z diviakov, ktoré boli ulovené z posedu sme predpokladali nižšie hodnoty kyseliny mliečnej a fosfátov a vyššie hodnoty pH v porovnaní so svalovinou diviakov ulovených počas spoločnej poľovačky. Výsledok bol ale opačný. Štatisticky významne vyššiu koncentráciu kyseliny mliečnej a fosfátov sme zaznamenali v karé diviakov zastrelených z posedu (p≤0,05). Hodnota pH bola štatisticky významne nižšia vo svalovine pleca diviakov tej istej skupiny.

Tieto hodnoty môžu byť ovplyvnené jednak vekovým rozdielom: zastrelené z posedu – 3 roky; zastrelené počas spoločnej poľovačky – 9 mesiacov (podobné hodnoty pH u rovnakej vekovej skupiny namerali aj Postolache a kol., 2010), ako aj pravdepodobne zvýšenou fyzickou aktivitou dospelých jedincov, nakoľko boli zastrelené v období ruje.

Tab. 4. Koncentrácia kyseliny mliečnej, fosfátov a hodnota pH svaloviny diviakov lesných (*Sus scrofa*) nameraná do 24 hodín po ulovení

	Laktát	Fosfát	pH
Skupina	Karé		
A	1,40 ± 0,24 *	0,55 ± 0,08 *	5,62 ± 0,13
B	0,85 ± 0,17	0,34 ± 0,02	6,10 ± 0,30
Skupina	Plece		
A	1,07 ± 0,14	0,46 ± 0,01 *	5,81 ± 0,21 *
B	0,87 ± 0,20	0,32 ± 0,04	6,33 ± 0,25

A – diviaky zastrelené z posedu; B – diviaky zastrelené počas spoločnej poľovačky

Štatistika: * $p \leq 0,05$

Ako vidieť z výsledkov tejto práce perimortálne situácie značne vplyvajú na hodnoty pH, koncentráciu kyseliny mliečnej a fosfátov a tým aj na výslednú kvalitu zveriny.

POĎAKOVANIE

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Chloupek, P., Voslářová, E., Suchý, P. Jr., Bedáňová, I., Pištěková, V., Vitula, F., Chloupek, J., Večerek, V.: Influence of Pre-Sampling Handling Duration on Selected Biochemical Indices in the Common Pheasant (*Phasianus colchicus*). Acta Vet. Brno 2009; 78: 23–28
- Henckel, P., Karlsson, A., Jensen, M. T., Oksbjerg, N., Petersen, J. S.: Metabolic conditions in porcine longissimus muscle immediately pre-slaughter and its influence on peri- and post mortem energy metabolism. Meat Science 2002; 62: 145–155
- Lambertini, L., Vingola, G., Badiani, A., Zaghini, G., Formigoni, A.: The effect of journey time and stocking density during transport on carcass and meat quality in rabbits. Meat Science 2006; 72: 641–646
- Paulsen, P., Nagy, J., Popelka, P., Ledecy, V., Marcinčák, S., Pipová, M., Smulders, F.J.M., Hofbauer, P., Lazar, P., Dicakova, Z.: Influence of Storage Conditions and Shotgun Wounding on the Hygienic Condition of Hunted, Uneviscerated Pheasant (*Phasianus colchicus*). Poultry Science 2008; 87:191–195
- Postolache, A. N., Lazăr, R. Boișteanu, P. C.: Researches on the characterization of physical and chemical parameters of refrigerated meat from wild boar sampled from the n-e part of romania. Lucrări Științifice 2010; 53: 508-512
- Przybylski, W., Monin, G., Koćwin-Podsiadła, M., Krzęcio, E.: Glycogen metabolism in muscle and its effects on meat quality in pigs — A mini review. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 2006; 3: 257–262
- Sopková, D., Várady, J., Pástorová, B., Staníková, A., Kožárová, I.: Stress and amino-acid values of poultry meat. Folia Veterinaria 2002; 46: S53–S54

ANTIFUNGÁLNA ÚČINNOSŤ TEA TREE OLEJA A TERPINÉNU NA KVASINKY RODU *MALASSEZIA*

Marciová, A., Čonková, E., Mudroňová, D., Sabová, L.

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Ústav farmácie a farmakológie

ABSTRAKT

Stúpajúci nárast rezistencie fungálnych patogénov voči antimikrobikám zvyšuje záujem o rastlinné výťažky ako potenciálne dezinfekčné a antimikrobiálne látky (Weckesser a kol., 2007).

Použitím modifikovanej mikrodilučnej metódy (CLSI M27-A2 (2002)) bola vyhodnotená účinnosť komerčného čajovníkového oleja (tea tree oleja) a jeho hlavnej obsahovej látky terpinénu v rôznych koncentráciách voči referenčným kmeňom malasezií (*M. pachydermatis*, *M. equina*, *M. sympodialis*) a klinickým izolátom *M. pachydermatis*. Na testované referenčné kmene pôsobil Tea tree olej (TTO) v koncentrácii 0,25 µg/ml okrem *M. sympodialis*, kde hodnota MIC dosahovala 0,5 µg/ml. Terpinén inhiboval rast izolátov v koncentrácii 0,25 µg/ml s výnimkou *M. equina*, pri ktorom bola zistená MIC 0,5 µg/ml. Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC µg/ml) TTO pri klinických izolátoch bola v rozpätí 0,25 – 1 µg/ml a terpinénu 0,25 µg/ml – 0,5 µg/ml.

ÚVOD

V súčasnosti je známych niekoľko druhov malasezií, ku ktorým patrí *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. equina* a *M. nana* (Tarazooie a kol., 2003). Kvasinky rodu *Malassezia* ako oportúnne patogény môžu byť príčinou infekcií. Pomerne často je zaznamenaný ich výskyt pri psoch s otitídou a dermatitídou. Terapia je zabezpečená prípravkami s obsahom antimykotík (Bond, 2010).

Na podpornú terapiu infekcií je možné použiť esenciálne oleje. Tea tree olej (TTO) sa v poslednej dobe uplatňuje kvôli širokému spektru antimikrobiálnej aktivity. Antifungálne účinky TTO boli demonštrované aj vo veterinárnej medicíne proti *Malassezia pachydermatis* (Weseler a kol., 2002). Z približne 100 terpénov obsiahnutých v TTO bolo identifikovaných viac ako 60 jednotlivých látok. Hlavnú obsahovú látku tvorí terpinen-4-ol (Hammer a kol., 2004).

MATERIÁL A METODIKA

Mikrodilučnou metódou M27-A2 (CLSI, 2002) bola stanovená účinnosť komerčného čajovníkového oleja (Tea tree oleja) (Dr. Müller PHARMA, Hradec Králove) a jeho hlavného komponentu terpinen-4-ol (Sigma Aldrich Co., Steinheim, Germany) v koncentráciách 128 µg/ml – 0,25 µg/ml voči 10 klinickým izolátom *M. pachydermatis* a referenčným kmeňom: *M. pachydermatis* CBS 1879, *M. sympodialis* CBS 8334, *M. equina* CBS 9969 (Utrecht, Holandsko). Kontrola kvality testovania bola overená použitím referenčného kmeňa *C. parapsilosis* (CCM 2860, Brno, ČR) voči itrakonazolu. Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) itrakonazolu bola hodnotená aj pri referenčných kmeňoch.

Citlivosť kvasiniek na testované antifungálne látky bola hodnotená vizuálne po 72 hod. inkubácii pri teplote 32 °C. Rast patogénov bol porovnávaný s rastom pozitívnej kontroly a na základe zákalu boli pridelené každej jamke číselné hodnoty 0 – 4 (0 – opticky čisté, 1 – slabý zákal, 2 – výrazný zákal, 3 – slabá redukcia zákalu, 4 – žiadna redukcia zákalu). Výsledky účinnosti antifungálnych látok boli verifikované aj spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 530 nm (BioTek µQuant, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tabuľka 1 uvádza hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie. TTO bol účinný v koncentrácii 0,25 µg/ml na všetky kmene okrem *M. sympodialis*, kde hodnota MIC bola 0,5 µg/ml. Hammer kol. (2000) zistili však nižšie hodnoty MIC TTO pre *M. sympodialis* (0,016 – 0,12 µg/ml). Inhibícia rastu *C. parapsilosis* bola zaznamenaná pri koncentrácii 0,25 µg/ml pre TTO a terpinén. V porovnaní s výsledkami (0,06 – 0,125 µg/ml) Olivu a kol. (2003) je nami nameraná hodnota vyššia (0,5 µg/ml).

Tabuľka 1 Minimálna inhibičná koncentrácia ((MIC; µg/ml) pri referenčných kmeňoch

Testovaná látka	<i>M. pachydermatis</i>	<i>M. equina</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
TTO	0,25	0,25	0,5	0,25
Terpinén-4-ol	0,25	0,5	0,25	0,25
Itrakonazol	0,25	0,5	0,25	0,5

Tabuľka 2 dokumentuje hodnoty MIC klinických izolátov. TTO pôsobil na kmene v koncentráciách 0,25 – 1 µg/ml. Rovnaké výsledky boli zistené aj pri itrakonazole. MIC terpinenu sa pohybovala v rozpätí 0,25 – 0,5 µg/ml.

Tabuľka 2 Hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC; µg/ml) pri izolátoch *M. pachydermatis*

Testovaná látka	MIC (µg/ml) min. – max.	x	±SD	Mo
TTO	0,25 – 1	0,45	0,31	0,25
Terpinén-4-ol	0,25 – 0,5	0,33	0,12	0,25
Itrakonazol	0,25 – 1	0,55	0,33	0,25

min. – minimálne; max. – maximálne; x – priemer; SD – smerodajná odchýlka; Mo – modus

Tabuľka 3 vyhodnocuje účinnosť testovaných látok. TTO pôsobil na 6 izolátov (60 %) pri MIC 0,25 µg/ml. Terpinen inhiboval rast 70 % izolátov v rovnakej koncentrácii.

Tabuľka 3 Počet (n) citlivých kmeňov a účinnosť (%) TTO a terpinenu

MIC µg/ml	TTO (n/%)	Terpinen (n/%)
0,25	6/60	7/70
0,5	2/20	3/30
1	2/20	0

Nami uvedené namerané hodnoty poukazujú na potenciálne využitie TTO v terapii malasezióz. Účinok TTO a terpinenu je porovnateľný s účinnosťou itrakonazolu.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporovaná projektom APVV 0357-07.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Bond, R. Superficial veterinary mycoses. Clin Dermatol, 28, 2, 2010; 226 – 36.

- Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. In vitro activities of ketoconazole, econazole, miconazole, and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Malassezia* species. *Antimicrob Agents Chemoter*, 44, 2, 2000; 467 – 469.
- Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 2004; 1081 – 1085.
- Oliva B., Piccirilli E., Ceddia T., Pontieri E., Aureli P., Ferrini A. M. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 2, 2003: 185 – 187.
- Tarazooie, B., Kordbacheh, P., Zaini, F., Zomorodian, K., Saadat, F., Zeraati, H., Zahra Hallaji, Z., Rezaie, S. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. *BMC Dermatology*, 4, 2004; 1 – 6.
- Weckesser, S., Engel, K., Simon-Haarhaus, B., Wittmer, A., K. Pelz, Schempp, C. M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine* 14, 2007; 508 – 516.
- Weseler, A., Geiss, H. K., Saller, R., Reichling, J. Antifungal effect of Australian tea tree oil on *Malassezia pachydermatis* isolated from canines suffering from cutaneous skin disease. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 144 (5), 2002; 215 – 21.

SLEDOVANIE BIOCHEMICKÝCH UKAZOVATEĽOV V PROCESE STARNUTIA U NORIKA MURÁNSKEHO TYPU

Noskovičová J., Novotný F., Pošivák J., Valocký I., Hura V., Tučková M.

Klinika koní, UVLF Košice

ABSTRAKT

Starnutie môže zapríčiniť metabolické zmeny, ktoré vplyvajú na interpretáciu klinických dát u starnúceho zvieratá a to bez ohľadu na prítomnosť alebo absenciu choroby. Referenčné hodnoty z krvi stanovených parametrov sa môžu líšiť podľa plemena a sú ovplyvňované vekom, a do určitého rozsahu aj chovnými podmienkami. Obmedzené počty štúdií sa vykonali na základe vplyvu veku na biochemické parametre u rôznych plemien koní. Cieľom našej práce bolo sledovanie zmien biochemických parametrov v procese starnutia u kobýl chladnokrvného plemena Norika muránskeho typu. Tento výskum hodnotil vybrané biochemické parametre chovných kobýl Norika muránskeho typu rôzneho veku. Zdá sa, že staroba významne ovplyvňuje biochemické parametre u kobýl Norika muránskeho typu. Biochemické parametre u Norika muránskeho typu ukazujú niektoré rozdiely v porovnaní s inými koňmi. Stanovenie biochemických parametrov je špecifické pre Norika muránskeho typu, ktoré sú výsledkom konkrétneho chovu a selekcie daného plemena. Údaje získané z tejto štúdií môžu posilniť naše pochopenie biochemických parametrov u tohto druhu, čo umožní veterinárnym lekárom stanoviť zodpovedajúce interpretácie laboratórnych údajov a dať týmto zvieratám zodpovedajúcu starostlivosť.

ÚVOD

Napriek zvyšujúcemu sa počtu starnúcich koní, je málo poznatkov v oblasti geriatrickej medicíny koní. Metabolické zmeny, ako časť fyziologického procesu starnutia, nie sú spájané so špecifickými ochoreniami (McFarlane a kol., 1998).

Starnutie môže zapríčiniť metabolické zmeny, ktoré vplyvajú na interpretáciu klinických dát u starnúceho zvieratá a to bez ohľadu na prítomnosť alebo absenciu choroby (Bertone, 2006). Referenčné hodnoty z krvi stanovených parametrov sa môžu líšiť podľa plemena a sú ovplyvňované vekom, a do určitého rozsahu aj chovnými podmienkami (Satue a kol., 2009; Cebulj-Kadunc a kol., 2002). Špecifické referenčné hodnoty sú potrebné pre každé jednotlivé druhy zvierat na príslušnú interpretáciu biochemických výsledkov. Preto niektoré rozboru vyžadujú rôzne referenčné hodnoty pre rôzne vekové skupiny (Meyer a Harvey, 2004). Obmedzené počty štúdií sa vykonali na základe vplyvu veku na biochemické parametre u rôznych plemien koní (Gurgoze a Icen, 2010; McFarlane a kol., 1998; Horohov a kol., 2002). Cieľom našej práce bolo sledovanie zmien biochemických parametrov v procese starnutia u kobýl chladnokrvného plemena Norika muránskeho typu.

MATERIÁL A METODIKA

1. Pokusné zvieratá

Počas deviatich mesiacov bolo sledovaných 27 chovných kobýl Norika muránskeho typu na SCHK (Stredisko chovu koní) Dobšiná. Kobyly boli rozdelené podľa veku do štyroch skupín: A (n=7, 5-8 rokov), B (n=6, 9-15), C (n=7, 16-20) a D (n=7, 21-23) na základe záznamov poskytnutých chovateľmi na farme. V skupine A boli mladé kobyly od piatich do ôsmich rokov, v skupine B to boli dospelé kobyly aktívne využívané v reprodukcii. V skupine C boli kobyly so znižujúcou sa reprodukčnou schopnosťou a v skupine D boli zaradené kobyly buď ako chovné alebo boli používané na iné pracovné činnosti na farme.

Kobyly boli voľne ustajnené s vonkajšími výbehmi a cez leto boli na pastvinách. Denné množstvo krmiva bolo 4 kg ovsa a 12 kg sena, ktoré sa rozdeľovalo do dvoch dávok. Príjem vody bol *ad libitum*. Všetky kobyly boli podrobené celkovému klinickému vyšetreniu pred

odberom krvných vzoriek a vo všetkých prípadoch neboli pozorované klinicko-patologické symptómy.

2. Odber, analýza vzoriek a štatistika

Vzorky krvi na biochemické vyšetrenie boli odoberané z jugulárnej vény použitím vákuových skúmaviek. Všetky vzorky boli získané od 9,00-10,00 hodiny, v maštali, počas odpočinku, pred kŕmením kobýl. Odber krvi bol vykonaný v prirodzených podmienkach, pričom zvieratá boli na manipuláciu zvyknuté. Na odber vzoriek boli použité ihly (BD Vacutainer® Precision Glide™, BD Diagnostics, USA) a sérové skúmavky (Sérum-SST™ II Advance, BD Diagnostics, USA). Počas odberu krvi ako aj počas transportu boli vzorky uchovávané pri teplote 8 – 10°C (Doubek a kol., 2003) a čo najskôr analyzované.

Biochemické parametre z krvného séra, a to aspartát-aminotransferáza (AST), alanín aminotransferáza (ALT), alkalická fosfatáza (ALP), lipáza (LIP), kreatinín (Crea), močovina (Urea), celkový proteín (TP), albumín (Alb), kyselina močová (UA), bilirubín (Bil), gamaglutamyltransferáza (GMT), glukóza (Glu) a cholesterol (Chol) boli analyzované pomocou biochemického analyzátoru Cobas c 111 (Roche, Švajčiarsko).

Referenčné hodnoty pre kobyly boli určené Laboratóriom klinickej biochémie a hematológie (UVMF, Košice). Výsledky boli štatisticky spracované pomocou Student t-testu. Hodnota $P < 0,05$ bola považovaná ako štatisticky významná. Taktiež bol vypočítaný aritmetický priemer (\bar{x}) a \pm smerodajná odchýlka (SD) a to programom Microsoft Excel (2003).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Jednotlivé biochemické parametre sa stanovili u Norika muránskeho typu na základe veku (Tab č.1). Koncentrácia AST klesala s pribúdajúcim vekom, ale v najstaršej skupine koncentrácia presiahla najmladšiu vekovú kategóriu. Koncentrácia ALT klesala s vekom kobýl. Koncentrácia lipázy bola v rámci referenčného rozpätia rovnako ako aj koncentrácia GMT a Crea. Urea sa mierne zvyšovala, ale v skupine C poklesla. TP a Alb klesal s vekom koní. Štatisticky signifikantný rozdiel sa zaznamenal v koncentrácii kyseliny močovej (UA). Celkový bilirubín stúpil s vekom. Koncentrácia glukózy klesala s vekom a koncentrácia cholesterolu s vekom narastala.

Tabuľka č. 1 Biochemické parametre Norika muránskeho typu v rôznych vekových skupinách (A, B, C a D). Minimálna (Min), maximálna (Max) hodnota, priemer (\bar{x}) a smerodajná odchýlka (\pm SD) v absolútnych hodnotách.

Vek. Sk	A (n=7)	B (n=6)	C (n=7)	D (n=7)	Referenčné hodnoty	
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	Min. hodn.	Max. hodn.
AST μ kat/l	5,69 \pm 1,13	5,36 \pm 0,9	5,13 \pm 1,1	5,88 \pm 1,37	3,9	6,52
ALT μ kat/l	0,15 \pm 0,04	0,14 \pm 0,04	0,14 \pm 0,05	0,13 \pm 0,01		0,53
ALP μ kat/l	2,47 \pm 0,3	2,44 \pm 0,46	2,66 \pm 0,43	2,77 \pm 1,17	2	3,38
LIP μ kat/l	0,1 \pm 0	0,13 \pm 0,05	0,13 \pm 0,05	0,11 \pm 0,04	0,08	0,16
GMT μ kat/l	0,28 \pm 0,05	0,29 \pm 0,03	0,25 \pm 0,04	0,29 \pm 0,15	0,21	0,37
CREA μ mol/l	139,1 \pm 37,49	118,45 \pm 23,18	119,31 \pm 19,85	111,59 \pm 21,08	88,3	138,7
UREA mmol/l	7,88 \pm 2,04	7,97 \pm 0,8	7,76 \pm 0,85	8,29 \pm 1,23	6,5	9,1
TP g/l	70,07 \pm 5,29	65,87 \pm 7,78	63,96 \pm 6,59	67,41 \pm 8,2	59,6	74,8
ALB g/l	31,34 \pm 3,24	30,03 \pm 2,41	30 \pm 2,77	29,67 \pm 2,85	27,9	33,5
UA μ mol/l	20,06 \pm 3,39	19,22 \pm 6,82	25,29* \pm 2,29	17 \pm 8,36	14,2	26,4
BIL T μ mol/l	9,9 \pm 3,9	14,98 \pm 5,2	12,03 \pm 3,67	12,39 \pm 5,2	8	17,2
Glu mmol/l	4,51 \pm 0,99	4,69 \pm 1,05	4,56 \pm 1,03	4,03 \pm 0,64	3,6	5,3
Chol mmol/l	2,33 \pm 0,56	2,3 \pm 0,25	2,36 \pm 0,29	2,43 \pm 0,37	1,9	2,7

* a-c<0,05

Je ťažké stanoviť, či narastá populácia geriatrických koní, alebo či je poskytnutá väčšia veterinárna starostlivosť pre túto istú populáciu. Starnutie ako samotné nie je choroba, ale

môže to byť výsledok v zmenách, ktoré majú predispozíciu k chorobám (Paradis, 2002). Kone vo veku 20 rokov a viac tvoria vyše 15% z konskej populácie. Tieto kone sú stále aktívne v rôznych konských športoch alebo v oblasti reprodukcie (Malinowski a kol., 1997). Rozdielne referenčné hodnoty sú potrebné pre analýzu na základe určitého veku alebo plemena zvierat, ktoré sa menia s vekom zvierat (Meyer a Harvey, 2004). Len málo štúdií posudzovalo vplyv veku na biochemické parametre koní (Gurgoze a Icen, 2010; McFarlane a kol., 1998; Horohov a kol., 2002).

Zvýšenie koncentrácie AST sa vyskytuje pri subletálnych zraneniach, nekrózach vo svaloch a hepatocelulárnej permeabilite (Eades a Bounous, 1997). Vo všetkých vekových skupinách bola priemerná koncentrácia AST v rozmedzí referenčných hodnôt. Mierne, ale nevýznamné zvýšenie nastalo u najstarších kobýl (skupina D). Znížená koncentrácia AST bola zaznamenaná u dospelých somárov v porovnaní s mladými (Jordana a kol., 1998). Koncentrácia AST u teplokrvných koní a u Arabských koní bola nižšia u starších ako u mladších koní (McFarlane a kol., 1998; Gurgoze a Icen, 2010). Koncentrácia ALT mierne klesala s vekom u Norika muránskeho typu. U Arabských koní koncentrácia ALT nebola ovplyvnená vekom a nenašli sa žiadne významné rozdiely vplyvu veku (Gurgoze a Icen, 2010). Zvýšená koncentrácia ALP v sére sa vyskytujú spolu s cholestázou (gravíditou, rastom kostí). Normálna alebo mierne zvýšená koncentrácia ALP je pri akútnej hepatitíde spolu s veľmi vysokou koncentráciou AST (Eades a Bounous, 1997). Koncentrácia ALP narastala s pribúdajúcim vekom kobýl. U teplokrvných koní a čistokrvných arabských koní koncentrácia ALP klesala s pribúdajúcim vekom (McFarlane a kol., 1998; Gurgoze a Icen, 2010). Mierne zvýšenie priemernej koncentrácie lipázy bolo zaznamenané v stredných vekových kategóriách (skupina B a C), ale v referenčnom rozpätí. Koncentrácia GMT sa zvyšuje pri cholestáze a sekundárne hepatocelulárnym poškodením. Mierne až stredné zvýšenie sa vyskytuje pri obštrukčných chorobách veľkého kolónu (Eades a Bounous, 1997). Koncentrácia GMT nebola vekom ovplyvnená, nastal tam mierny pokles koncentrácie GMT u starších kobýl (skupina C), ale v rámci referenčných hodnôt. U poníkov koncentrácia GMT sa zvyšovala s vekom (Horohov a kol., 2002). U teplokrvných koní klesala s vekom (McFarlane a kol., 1998) a u mladších somárov bola vyššia ako u starších (Jordana a kol., 1998). V koncentrácii kreatinínu neboli pozorované vekom súvisiace zmeny. U arabských kobýl bola pozorovaná zvýšená koncentrácia medzi 6-12 rokom a nad 20. rokom veku. Ale v ostatných vekových skupinách bola pod referenčným rozpätím. U somárov bola koncentrácia GMT nižšia u mladších ako u starších somárov (Jordana a kol., 1998). Žiadny rozdiel v koncentrácii GMT nebol pozorovaný medzi vekovými skupinami teplokrvných koní (McFarlane a kol., 1998). Nižšia koncentrácia kreatinínu bola u mladších ako u dospelých somárov (Jordana a kol., 1998). Zvýšená koncentrácia močoviny je spájaná so zníženou obličkovou filtráciou ako pri chorobách obličiek a proteínovom katabolizme. Znížená koncentrácia sa vyskytuje pri zlyhaní pečene, nízko proteínovej diéte a použitím anabolických steroidov (Eades a Bounous, 1997). Koncentrácia močoviny ukázala postupný nárast s pribúdajúcim vekom, ale v rámci referenčných hodnôt. Podobné výsledky sa zaznamenali aj u Arabských čistokrvných kobýl (Gurgoze a Icen, 2010) a somárov (Jordana a kol., 1998), ale nie u teplokrvných koní (McFarlane a kol., 1998). Celkový proteín závisí na zmenách v zložení najmä globulínov a albumínov (Eades a Bounous, 1997). Celkové proteíny klesali s postupne pribúdajúcim vekom, ale v najstaršej skupine kobýl došlo k miernemu zvýšeniu, ale v rámci referenčných hodnôt. Vzrastajúci TP bol zaznamenaný u žriebät až po 12. rok u Arabských kobýl (Gurgoze a Icen, 2010). Žiadne zmeny TP neboli pozorované u teplokrvných koní (McFarlane a kol., 1998). Albumín je najdôležitejšia zložka na udržiavanie onkotického tlaku v plazme. Viaže a prenáša iné proteíny, AMK, hormóny a lieky. Selektívna strata albumínu sa vyskytuje pri renálnych ochoreniach a chorobách GIT (malabsorbcia, malnutrícia, hladovanie, chronické ochorenia pečene) (Eades a Bounous,

1997). Albumín s pribúdajúcim vekom postupne klesal. U arabských chovných kobýl sa nezaznamenali žiadne signifikantné rozdiely medzi jednotlivými vekovými skupinami (Gurgoze a Icen, 2010), rovnako ako to bolo aj u teplokrvných koní (McFarlane a kol., 1998). Celkový bilirubín s pribúdajúcim vekom stúpal, najnižšia koncentrácia bola v najmladšej vekovej kategórii s postupným narastaním koncentrácie BIL s vekom. Výrazné zvýšenie bolo v skupine mladších koní (skupina B). Najvyššia koncentrácia BIL bola zaznamenaná medzi 6-12 rokom, s pribúdajúcim vekom klesala (Gurgoze a Icen, 2010). Celkový bilirubín sa nemenil s vekom koní (McFarlane a kol., 1998) ani s vekom somárov (Jordana a kol., 1998). Prechodné zvýšenie glukózy sa vyskytuje postprandiálne, s katecholamínovým a glukokortikoidným uvoľňovaním spájané s bolesťou, ochorením CNS a transportom alebo stresom. Hypoglykémia sa vyskytuje s adrenokortikálnou insuficienciou, zlyhaním pečene, septikémiou, hladovaním alebo malabsorbciou (Eades a Bounous, 1997). Glukóza bola významne ovplyvnená vekom kobýl. S narastajúcim vekom, koncentrácia glukózy klesala. U arabských kobýl koncentrácia krvnej glukózy bola nižšia u starších vekových kategórií v porovnaní s najmladšími vekovými kategóriami (Gurgoze a Icen, 2010). Koncentrácia glukózy sa nemenila u teplokrvných koní (McFarlane a kol., 1998). Koncentrácia cholesterolu narastala s pribúdajúcim vekom u Norika muránskeho typu. U somárov koncentrácia cholesterolu klesala s vekom (Jordana a kol., 1998).

Tento výskum hodnotil vybrané biochemické parametre chovných kobýl Norika muránskeho typu rôzneho veku. Zdá sa, že staroba významne ovplyvňuje biochemické parametre u kobýl Norika muránskeho typu. Údaje získané z tejto štúdie môžu posilniť naše pochopenie biochemických parametrov u tohto druhu, čo umožní veterinárnym lekárom stanoviť zodpovedajúce interpretácie laboratórnych údajov a dať týmto zvieratám zodpovedajúcu starostlivosť. Biochemické parametre u Norika muránskeho typu ukazujú niektoré rozdiely v porovnaní s inými koňmi. Stanovenie biochemických parametrov je špecifické pre Norika muránskeho typu, ktoré sú výsledkom konkrétneho chovu a selekcie daného plemena. Väčší počet koní je potrebných zahrnúť do danej problematiky pre lepšiu objektivnosť výsledkov.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola podporená grantom VEGA Ministerstva Školstva Slovenskej republiky 1/0263/09. Autori by sa radi poďakovali Ing. Vladimírovi Šmelkovi, MVDr. Františkovi Lašákovi, pánovi Imrichovi Palocsyi a ošetrovateľom na SCHK Dobšiná; zamestnancom Kliniky koní a Laboratóriu klinickej biochémie a hematológie na UVMF v Košiciach.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bertone J. Equine Geriatric Medicine and Surgery. 2006. Elsevier-Saunders. St. Louis, USA. pp. 263.
- Čebulj-Kadunc N, Božic A, Kosec M, Cestnik, V. The Influence of Age and Gender on Haematological Parameters in Lipizzan Horses. 2002. J. Vet. Med., A 49: 217–221.
- Doubek, J. et al. Veterinární hematologie. 2003. Noviko a.s. Brno, CZ, pp. 464.
- Eades SC, Bounous DI. Laboratory profiles of equine diseases. 1997. Mosby, St. Louis, USA. pp. 304.
- Gurgoze SY, Icen H. The Influence of Age on Clinical Biochemical Parameters in Pure-bred Arabian Mares. 2010. Journal of Equine Veterinary Science 30, 10: 569-574.
- Horohov D, Kydd J, Hannant D. The effect of aging on T cell responses in the horse. 2002. Developmental and Comparative Immunology 26: 121–128.
- Jordana J, Folch P, Cuenca R. Clinical biochemical parameters of the endangered Catalonian donkey breed: normal values and the influence of sex, age, and management practices effect. 1998. Research in Veterinary Science 64: 7-10.
- Malinowski K, Christensen AR, Konopka A, Scanes CG, Hafs HD. Feed intake, body weight, body condition score, musculation and immunocompetence in aged mares given equine somatotropin. 1997. J Anim Sci. 75: 755-60.
- Meyer D J, Harvey J W. Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis. 3rd ed.

2004. St. Louis, MO Saunders. pp.351.

McFarlane D, Sellon DC, Gaffney D, Hedgpeth V, Papich M, Gibbs S. Hematologic and serum biochemical variables and plasma corticotropin concentration in healthy aged horses. 1998. *American Journal of Veterinary Research* 59: 1247–1251.

Paradis MR. Demographics of health and disease in the geriatric horse. 2002. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 18: 391–401.

Satue K, Blanco O, Munoz A. Age-related differences in the hematological profile of Andalusian broodmares of Carthusian strain. 2009. *Veterinari Medicina* 54: 175–182.

DEŠTRUKČNÝ ÚČINOK ATYPICKEJ MYKÓZY VZDUCHOVÝCH VAKOV (*DIVERTICULUM TUBEAE AUDITIVAE*) U KONÍ

Noskovičová J., Novotný F., Boldižár M., Vidricková P., Valocký I., Redl M.

Klinika koní, UVLF Košice

ABSTRAKT

Mykózy vzduchových vakov sú zriedkavé, fungálne ochorenia horných ciest dýchacích u koní. Môžu mať za následok akútne a fatálne krvácanie z *a. carotis interna* alebo *a. maxillaris* u koní. Patogenéza nie je celkom známa, a nie je jasné, či dilatácia cievnych štruktúr je predisponujúcou príčinou alebo dôsledkom mykotickej infekcie. Postihnuté zvieratá môžu vykazovať spontánne krvácanie nosa, dysfágiu, ochrnutie tváre, Hornerov syndróm a mykotickú encefalitídu. Cieľom našej práce bolo sledovanie výskytu mykóz vzduchového vaku a poukázanie na ich aj možný deštrukčný účinok u koní. Endoskopickým vyšetrením sme zaznamenali vo vzduchových vakoch neprítomnosť septa medzi vakmi, v mediálnom kompartmente prítomnosť cudzieho telesa kruhovitého tvaru mycetómu. S dostupnosťou lepšej kvality endoskopov sa vzduchové vaky stávajú bežnou súčasťou vyšetrenia horných ciest dýchacích s možnosťou pozorovať abnormality vzduchových vakov bez zjavných klinických príznakov. Obmedzené počty štúdií boli vykonané na základe deštrukčného účinku mykóz vzduchového vaku, resp. neprítomnosťou septa medzi jednotlivými kompartmentmi. V klinickom prípade č.1 sme opísali deštrukčný účinok mykózy vzduchového vaku u koňa s neprítomnosťou septa. Viac klinických prípadov je potrebných na lepšie posúdenie rozdielov v klinických prejavoch a terapii mykóz vzduchových vakov u koní.

ÚVOD

Vzduchové vaky (GP) sú párové, vzduchom-naplnené, ventrálne evaginácie sluchovej trubice (Dyce a kol., 2002). V strednej rovine, sú vľavo a vpravo vzduchové vaky oddelené mediálne septom. Z laterálnej strany, stylohyoid neúplne rozdeľuje každý GP na mediálny a laterálny kompartment (Baptiste a kol., 2000). Medzi najvýznamnejšie ochorenia vzduchových vakov patrí tympania, empyém, mykózy a novotvary (Baptiste, 1998). Mykózy vzduchových vakov (GPM) môžu mať za následok akútne a fatálne krvácanie z *a. carotis interna* alebo *a. maxillaris* u koní (120 zo 125 prípadov) (Lane, 1989). Difterické membrány sú zvyčajne umiestnené na strope mediálneho kompartmentu (*a. carotis interna*) a v menšej miere na dorzolaterálnej stene laterálneho kompartmentu (*a. maxillaris*) (Lane, 1989), ale môže tiež zasahovať na stylohyoidnú kosť a príslušné dôležité hlavové nervy (Laus a kol., 2010), poprípade sa rozširovať vpred k *recessus pharyngealis* (Greet, 1987), laterálne k laterálnemu kompartmentu, mediálne ku kontra laterálnemu vzduchovému vaku (Jacobs a Fretz, 1982).

Patogenéza nie je celkom známa, a nie je jasné, či dilatácia cievnych štruktúr je predisponujúcou príčinou alebo dôsledkom mykotickej infekcie (Colles a Cook, 1983). Postihnuté zvieratá môžu vykazovať spontánne krvácanie nosa, dysfágiu, ochrnutie tváre, Hornerov syndróm a mykotickú encefalitídu (Hardy a Leveile, 2003). Najbežnejšie mykózy vyskytujúce sa vo vzduchových vakoch sú *Aspergillus* (Cook a kol., 1968). Medzi iné vzácnejšie druhy mykóz patrí *Candida*, *Penicillium* (Grabner, 1987) a *Mucor* (Freeman a kol., 1989). Diagnóza je potvrdená nálezom difterických membrán počas endoskopického vyšetrenia vzduchových vakov (Hardy a Leveile, 2003). Cieľom našej práce bolo sledovanie výskytu mykóz vzduchového vaku a poukázanie na ich aj možný deštrukčný účinok u koní.

MATERIÁL A METODIKA

Do pokusu bolo zapojených 6 koní rôznych plemien a pohlavia vo veku od 5 do 12 rokov. Kone pochádzali z východného Slovenska a využívali sa na šport.

Anamnéza

Majitelia koní pozorovali vykašliavanie hlienu. Bola pozorovaná aj strata výkonnosti, abnormálny respiračný zvuk a distres už pri miernej záťaži. V priebehu predchádzajúcich týždňov majitelia zaznamenali aj miernu stratu hmotnosti. Abnormálne zvuky sa progresívne zhoršovali, takže prestali majitelia kone trénovať.

Klinické nálezy

Kone boli mierne apatické, ale v dobrej telesnej kondícii. Epistaxis nebola potvrdená. Teplota bola 37,7 – 38,0 °C, pulz 35 - 40 a dych 25 - 30/min. V pokoji bolo zreteľné expiračné a inspiračné dyspnoe, auskultačne zostrené expírimum a inspírimum, s fokálnymi piskotmi, výtok z nosa nepozorovaný. Vyprovokovanie kašľa bolo pozitívne.

Endoskopia sa vykonávala v sedácii s použitím detomidini hydrochloridum (Cepesedan 10 mg/ml) v množstve 0,5 ml a butorphanolum 10 mg (Butomidor) v množstve 1 ml i.v. pro toto. Po asi 3 minútach po i.v. aplikácii sa zaviedol endoskop cez nosovú dutinu za použitia Mesocain gélu (trimecaini chloridum 200 mg) na prvých 10 cm endoskopického kanálu.

Na vyšetrenie vzduchového vaku sa použil endoskop (Storz Karlstorz, Aida Control NEO) a cez pracovný kanál sa zasunul vodiaci stylet (Equivet Endoscope Guttural Pouch Guide 2,0 mm x 220 cm, sterile), pretože je nutné naddvihnúť fibrokarartilagózne ostium vzduchového vaku v nosohltane. Vodiaci stylet bol smerovaný hore ipsilaterálne ventrálным meatusom, zatiaľ čo začiatok endoskopu sa umiestil v nosohltane len rostrálne priložený k ostiu vzduchového vaku. Endoskop pri vstupe do GP musí byť otočený o 180° vzhľadom k excentrickému umiestneniu bioptického kanála v špičke endoskopu. Rotácia endoskopu po osi zabránila zachyteniu sa na fibrokarartilagózne ostia, keď sa pokračuje smerom do vnútra sluchovej trubice (Barakzai, 2007). Keď sa endoskop dostal do vzduchových vakov, vodiaci stylet sa vybral z pracovného kanála a vložil sa katéter (Equivet Endoscope Flushing Catheter 2,3 mm x 220 cm, sterile) cez pracovný kanál endoskopu na laváž vzduchových vakov. Laváž sa vykonala sterilným fyziologickým roztokom o objeme 20 ml cez pracovný kanál a aspirát sa nasal späť do sterilnej striekačky určený na ďalšie bakteriologické a mykotické vyšetrenie. Tento postup sa musel opakovať pre každý vzduchový vak oddelene, pretože vaky medzi sebou za fyziologických okolností nekomunikujú. Každému koňovi bola spravená aj bronchoalveolárna laváž (BAL) na dôkaz prítomnosti patogénom. Vzorok boli zaslané na ŠVPÚ DK, kde bola použitá metóda ŠPP 1.4.15 CH - diagnostika dermatomykóz zvierat a metóda ŠPP 2.3.1- základný postup bakteriologického vyšetrenia biologického materiálu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Endoskopia dýchacej sústavy v pokoji neodhalila žiadne abnormality nosových dutín, faryngálnej steny, epiglottis či mäkkého podnebia. Mykotické a bakteriálne kultivácie vzduchových vakov a bronchov odhalili prítomnosť mykóz (**Tab. 1.**) a baktériálnu inváziu (**Tab. 2**) v respiračnom trakte.

Tab. 1 Výsledky mykotického vyšetrenia pravého (RGP) a ľavého (LGP) vzduchového vaku a bronchov bronchoalveolárnou lavážou (BAL)

n	LGP	RGP	BAL
1	Aspergillus fumig. + Mucor spp. +++++	Mucor spp. +++++	Aspergillus flavus + Aspergillus parasiticus +++++ Aspergillus niger +++++
2	Mucor spp.+	negatívny nález	negatívny nález
3	negatívny nález	negatívny nález	negatívny nález
4	negatívny nález	negatívny nález	negatívny nález
5	negatívny nález	negatívny nález	negatívny nález
6	negatívny nález	negatívny nález	negatívny nález

Tab. 2 Výsledky bakteriologického vyšetrenia pravého (RGP) a ľavého (LGP) vzduchového vaku a bronchov bronchoalveolárnou lavážou (BAL)

n	LGP	RGP	BAL
1	Proteus spp.+ Staphylococcus epidermidis +	Proteus spp.+ Staphylococcus epidermidis +	Proteus spp.+ Staphylococcus epidermidis +
2	Klebsiella pneumoniae +	negatívny nález	Klebsiella pneumoniae +
3	E.coli +	E.coli +	E.coli +
4	negatívny nález	negatívny nález	Bacillus cereus +
5	negatívny nález	negatívny nález	Proteus spp.+ Staphylococcus epidermidis +
6	negatívny nález	negatívny nález	Proteus spp.+ Staphylococcus epidermidis +

Vo vzduchových vakoch sa potvrdil mykotický nález len u jedného koňa č.1 a to lavážou oboch vzduchových vakov (LPG a RPG) bolo dokázané masívne zamorenie *Mucor* spp. a v ľavom vzduchovom vaku aj ojedinelý nález *Aspergillus fumigatus*. BAL preukázala prítomnosť *Aspergillus* spp. s masívnym nálezom. U tohto koňa sa vo vzduchových vakoch endoskopickým vyšetrením zistila neprítomnosť septa medzi vakmi, v mediálnom kompartmente prítomnosť cudzieho telesa kruhovitého tvaru s priemerom 10 mm. Biopsia tohto útvaru potvrdila, že ide o fungálny mycotóm. Krv nebola pozorovaná vo vzduchových vakoch alebo v iných častiach dýchacieho traktu. Neurologické abnormality neboli zistené. Bakteriálne vyšetrenie LGP, RPG a BAL odhalilo prítomnosť *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus* spp, *Aspergillus* spp. (Tab č. 2).

Kontrolné vyšetrenie bolo vykonané o 2 týždne neskôr. Endoskopia vzduchového vaku preukázala neprítomnosť septa vzduchového vaku. Ale prítomnosť cudzieho telesa – fungálneho mycotómu už nebola zaznamenaná. HDC endoskopicky odhalili hyperpláziu II.stupňa.

U koňa č.2 BAL potvrdila *Mucor* spp. a *Klebsiella pneumoniae* aj v LGP. Ostatné kone boli negatívne na diagnostiku mykotických ochorení. U koňa č.3 bola potvrdená *E.coli* BAL, RGP, LGP; u koňa č. 4 BAL *Bacillus cereus*; a u koňa č.5 a 6 BAL nám odhalila ojedinelý nález *Proteus* spp. a *Staphylococcus epidermidis*.

Mykózy vzduchových vakov (GPM) sú zriedkavé, fungálne ochorenia horných ciest dýchacích u koní (Cook, 1968). GPM nezáleží na veku, pohlaví alebo plemene (Cook, 1966). Zdá sa, že vyskytuje sa sporadicky a má celosvetovú distribúciu (Cook, 1968). U koňa č. 1 sme zaznamenali prítomnosť *Mucor* spp. Mukormykózy sú oportúnne infekcie spôsobená hubami coenocytic (rad *Mucorales*). Mukormykózy zriedkavo boli hlásené u koní (Ludwig a kol., 2005), a môžu byť rozšírené alebo obmedzené na konkrétny orgán (Guillot a kol., 2000). *Mucor* spp. môžu byť patogénne a pracovať v symbióze s *Aspergillus* spp. a spôsobiť difteritické lézie (Blomme a kol., 1998). Predispozičný faktor pre rozvoj aspergilózy u koní je pravdepodobne predĺžená antibiotická liečba alebo podávanie NSAID (Guillot a kol., 2000). Patogenéza mykóz je neznáma, špekuluje sa však, že vrstva sliznice vzduchového vaku je narušená traumou, miestnym zápalom alebo primárnou bakteriálnou infekciou (Freeman, 1980). Toto narušenie umožňuje oportunistickým mykózam, ktoré sú prítomné v bežne v dýchacích cestách koní, ako je rod *Aspergillus*, k invázii do hlbších tkanív, vrátane lokálnych tepien a nervov (Cook a kol., 1968).

Endoskopickým vyšetrením sme zaznamenali prítomnosť mycotómu vo vzduchových vakoch, vzniknutého z hýf infiltrovaných do steny vzduchového vaku s možnosťou prechádzať do hlbších tkanív (Cook a kol., 1968). Viac než 50% neliečených koní zomiera na následky fatálneho krvácania (Caron a kol., 1987). V našom prípade epistaxis nebola pozorovaná ako klinický príznak, endoskopiou sa potvrdila neprítomnosť septa medzi vzduchovými vakmi a žiadne difterické membrány taktiež neboli pozorované. Podobné klinické príznaky

zaznamenali aj u 3 ďalších koní (Carmalt a Baptiste, 2004). Taktiež zriedkavé výskyty spontánneho zotavenia boli hlásené (Cook, 1968).

S dostupnosťou lepšej kvality endoskopov sa vzduchové vaky stávajú bežnou súčasťou vyšetrenia horných ciest dýchacích s možnosťou pozorovať abnormality vzduchových vakov bez zjavných klinických príznakov. Obmedzené počty štúdií boli vykonané na základe deštruktívneho účinku mykóz vzduchového vaku, resp. neprítomnosťou septa medzi jednotlivými kompartmentmi (Carmalt a Baptiste, 2004). V klinickom prípade č.1 sme opísali deštruktívny účinok mykózy vzduchového vaku u koňa s neprítomnosťou septa. Viac klinických prípadov je potrebných na lepšie posúdenie rozdielov v klinických prejavoch a terapii mykóz vzduchových vakov u koní.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola podporená grantom VEGA Ministerstva Školstva Slovenskej republiky 1/0263/09.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Baptiste KE. A Preliminary Study on the Role of the Equine Guttural Pouches in Selective Brain Cooling. 1998. *Veterinary Journal*, 155: 139-148.
- Baptiste KE, Naylor J, Bailey J, Barber E, Post K, Thornhill J. A function for guttural pouches in the horse. 2000. *Nature*, 403:382–383.
- Barakzai S. Handbook of equine respiratory endoscopy. 2007. Elsevier, Philadelphia, USA, p 50-53.
- Blomme E, Del Piero F, La Perle KMD, Wilkins PA. Aspergillosis in horses: a review. 1998. *Equine Veterinary Education*, 10: 86–93.
- Carmalt JL, Baptiste KE. Atypical guttural pouch mycosis in three horses. 2004. *Pferdeheilkunde*, 20, 6: 542-548.
- Colles CM, Cook WR. Carotid and cerebral angiography in the horse. 1983. *Veterinary Record*, 113: 483–489.
- Cook WR. The clinical features of guttural pouch mycosis in the horse. 1968. *Vet Rec*; 83:336–345.
- Cook WR. Observations on the aetiology of epistaxis and cranial nerve paralysis in the horse. 1966. *Vet Rec* 78, 396 – 445.
- Cook WR, Campbell RSF, Dawson C. The pathology and aetiology of guttural pouch mycosis in the horse. 1968. *Vet Rec.*, 83:422–428.
- Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. Textbook of veterinary anatomy. 2002. Philadelphia, WB Saunders Company, pp. 864.
- Freeman DE, Ross MW, Donawick WJ, Homir AN. Occlusion of the external carotid and maxillary arteries in the horse to prevent hemorrhage from guttural pouch mycosis. 1989. *Vet Surg* 18, 39-47.
- Freeman DE. Diagnosis and treatment of diseases of the guttural pouch. I. 1980. *Compend Contin Educ Pract Vet.*, 2:S3–S11.
- Grabner A. Diagnose und therapie der Luftsockmykosen des Pferdes. 1987. *Tier Praxis Suppl*, 2: 10 14.
- Greet TRC. Outcome of treatment in 35 cases of guttural pouch mycosis. 1987. *Equine Vet. J* 19: 483-487.
- Guillot J, Collobert C, Jensen HE, Huerre M., Chermette R. Two cases of equine mucormycosis caused by *Absidia corymbifera*. 2000. *Equine Vet. J.*, 32: 453–456.
- Hardy J, Leveile R. Diseases of the guttural pouches. 2003. *Veterinary Clinic of North America-Equine Practice*, 19: 123–158.
- Jacobs KA, Fretz PB. Fistula between the guttural pouches and the dorsol pharyngeal recess as a sequela to guttural pouch mycosis in the horse. 1982. *Can Vet J*. 23: 117 -118.
- Lane JG. The management of guttural pouch mycosis. 1989. *Equine Veterinary Journal*, 21: 321–4.
- Laus F, Paggi E, Cerquetella M, Spaziante D, Spaterna A, Tesei B. Guttural pouch mycosis in a donkey (*Equus asinus*): a case report. 2010, *Veterinari Medicina*, 2010. 5: (11): 561–565.
- Ludwig A, Gatineau S, Reynaud MC, Cadore' JL, Bourdoiseau G. Fungal isolation and identification in 21 cases of guttural pouch mycosis in horses (1998–2002). 2005. *The Veterinary Journal*, 169: 457–461.

FLUORESCENČNÉ PROFILOVANIE VYBRANÝCH HADÍCH JEDOV

Vladimír Petrilla¹, Lucia Lichardusová², Vladimíra Tomečková²

¹Ústav fyziológie, Univerzita Veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

²Ústav lekárskej chémie, biochémie, klinickej biochémie a LABMED a.s., Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Medzi plávajúce kobry afriky patrí rod *Hemachatus* (druh *H. haemachatus*) a niektoré druhy rodu *Naja* (*N. nigricollis*, *N. aschei*, *N. nigricincta*, *N. mossambica*, *N. katiensis*, *N. nubiae*, *N. pallida*). *N. aschei* bola považovaná za poddruh *N. nigricollis*. Po genetickej analýze bola *N. aschei* označená ako nový druh plávajúcej kobry. Cieľom našej práce je charakterizovanie a porovnanie jedov hadov *N. aschei* a *N. nigricollis* pomocou atómovej silovej mikroskopie a fluorescenčnej analýzy.

Naše výsledky potvrdili odlišnú štruktúru jedov, čo poukazuje na druhové rozdiely medzi hadmi *N. aschei* a *N. nigricollis*.

ÚVOD

Čeľaď korálovcovité (*Elapidae*) má niekoľko plávajúcich a nepľávajúcich rodov.

Jedová žľaza sa vyvinula zo slinnej maxilárnej žľazy (*Glandula maxillaris*), od ktorej je úplne oddelená (Kornalík, 1967). Plávajúce kobry majú prevažne cytotoxický jed (Warrell, 2010). Hadí jed je viskózna tekutina obsahujúca zmes biologicky aktívnych komponentov, proteínových toxínov a enzýmov, polypeptidových a peptidových toxínov, polysacharidov, nízkomolekulových látok a iónov. Toxíny tvoria peptidy, polypeptidy a proteíny bez enzymovej aktivity s približnou molekulovou hmotnosťou 3-30 kDa. (Valenta, 2008).

Plávajúce kobry afriky sú rod *Hemachatus* a niektoré druhy rodu *Naja* (*H. haemachatus*, *N. nigricollis*, *N. aschei*, *N. nigricincta*, *N. mossambica*, *N. katiensis*, *N. nubiae*, *N. pallida*). *N. aschei* bola považovaná za poddruh *N. nigricollis*, ale po dôkladnej analýze 1333 sekvencií mitochondriálnej DNA, bolo zistené, že je to úplne nový druh, ktorý je zároveň najväčším druhom plávajúcich kobier na svete (Wüster a kol., 2007). V dôsledku toho cieľom našej práce je charakterizovanie týchto dvoch hadov pomocou atómovej silovej mikroskopie a fluorescenčnej analýzy ich jedov.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky jedu z afrických kobier: *Naja nigricollis* a *N. aschei* (odchytené v Tanzánii)

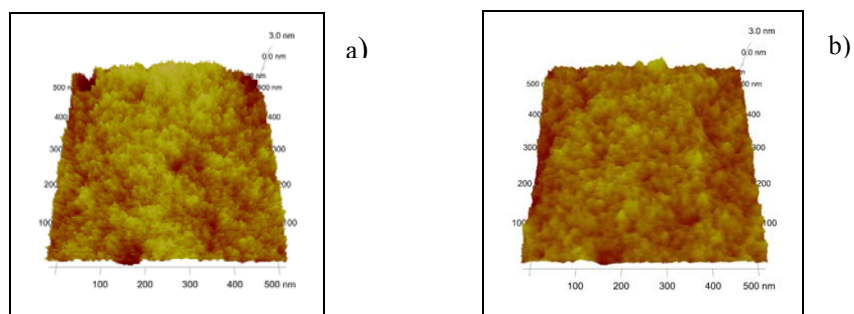
Odber vzoriek: Odbery jedu boli vykonané zahryznutím hada jedovými zubami do odmernej nádoby s umelohmotnou fóliou a jeho transportné uskladnenie bolo v kryopendorfových skúmavkách v LN2 (-195°C) a uskladnených v hlbokomraziacom boxe (-70 °C).

Fluorescenčné spektrálne metódy: Vo vzorkách bolo potenciometricky stanovené pH. Povrchy centrifugovaných neriedených vzoriek jedov boli charakterizované pomocou atómovej silovej mikroskopie a monitorovaním endogénnej fluorescencie pomocou synchronných fluorescenčných fingerprintov $\Delta 40$. Jednotlivé vzorky boli ďalej riedené deionizovanou vodou, jednotlivé riedenia boli snímané pri 10 rôznych excitáciách a emisiách pomocou fluorescenčnej analýzy, ktoré boli pomocou softvéru FL WinLab spracované do podoby topografických máp excitačno-emisnej matrice. Merania boli uskutočnené na fluorescenčnom spektrofotometri Perkin-Elmer LS 55 v kremennej kyvete pri laboratórnej teplote.

Atómová silová mikroskopia: Povrchy kobrích jedov boli merané atómovým silovým mikroskopom ICON na mikroskopickom skličku (25 μ l) pomocou kremikového hrotu s polomerom 10 nm pri izbovej teplote. Topografické mapy boli spracované softvérom Nanoscop.

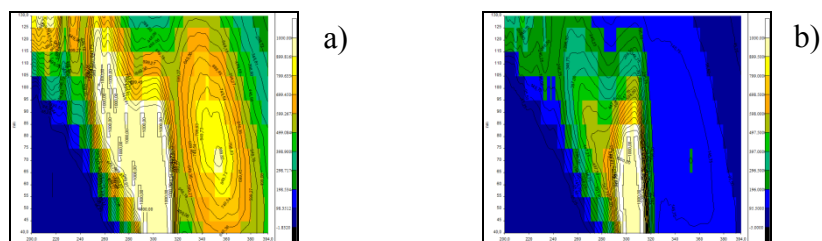
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pomocou atómovej silovej mikroskopie sme porovnali drsnosť povrchov skúmaných vzoriek jedu (Obr. 1). Naše výsledky poukázali na väčšiu drsnosť povrchu jedu *N. aschei* (pH = 6,4 – 6,7) v rozsahu 0,47-0,6 nm v porovnaní s *N. nigricollis* (pH = 6,1 – 6,3), ktorá mala menšie množstvo proteínov a drsnosť povrchu bol 0,323 nm. V jede *N. aschei* sú globuly proteínov veľkosti 18-20 nm, ktoré sú zliate do vrstvy polyméru, kým u *N. nigricollis* boli zaznamenané globuly s veľkosťou 8-10 nm.

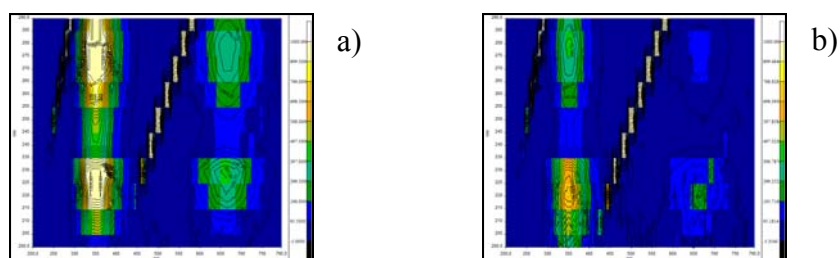


Obr. 1: Atómová silová mikroskopia jedov a) *N. aschei* a b) *N. nigricollis*

Pre komplexnú charakterizáciu jedu hada *N. aschei* a jeho porovnanie s jedom hada *N. nigricollis* sme využili fluorescenčnú analýzu. Merania fluorescenčných vlastností všetkých endogénnych fluorofórov jednotlivých jedov ako jedného celku poukázali na rozdiely v ich zložení, ktoré sa prejavili ako odlišné charakteristické fluorescenčné odtlačky (Obr.2). Kým u jedu *N. aschei* sa prejavila signifikantná fluorescencia v lipofilnej (nižšie vlnové dĺžky) aj hydrofilnej oblasti (dlhšie vlnové dĺžky) u jedu *N. nigricollis* to bolo v lipofilnej oblasti (obr. 2,3).

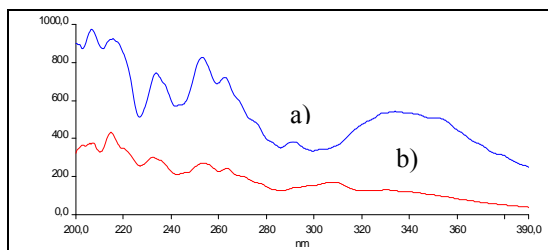


Obr. 2: Synchronne fingerprinty jedov a) *N. aschei* a b) *N. nigricollis*

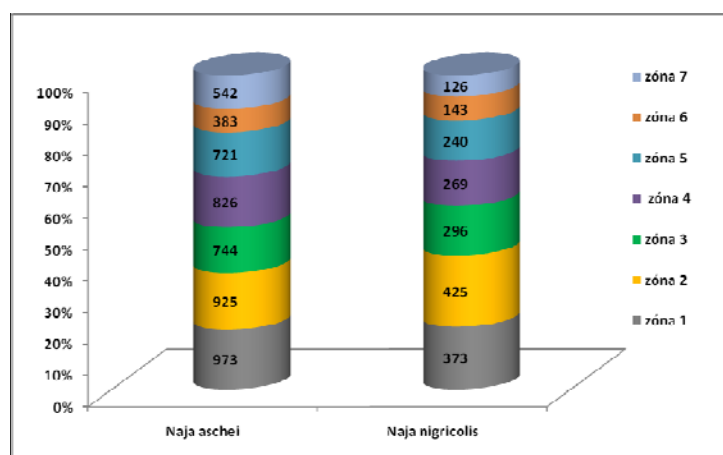


Obr. 3: Excitačno-emisné matrice jedov a) *N. aschei* a b) *N. nigricollis*

Endogénna fluorescencia synchronného spektra jedu *N. aschei* bola porovnateľne vyššia ako fluorescencia *N. nigricollis*. Tieto spektrá boli členité a identifikovali výskyt 7 fluorescenčných maxim (obr.4). Matematické porovnanie intenzity fluorescencie fluorescenčných zón (obr. 5) potvrdilo, že fluorofóry jedu *N. aschei* majú vyššiu fluorescenciu ako fluorofóry *N. nigricollis*.



Obr. 4: Porovnanie jednoduchých synchronných spektier a) *N. aschei* a b) *N. nigricollis*



Obr.5: Porovnanie fluorescencie fluorescenčných zón, ktoré vznikli ako výsledok intenzity fluorescencie všetkých fluorofórov prítomných v skúmaných jedoch

Výsledky získané pomocou atómovej silovej mikroskopie ako aj fluorescenčnej analýzy poukazujú na druhové rozdiely hadu *N. aschei* a *N. nigricollis*.

POĎAKOVANIE

Ďakujeme RNDr. Vladimírovi Komanickému, PhD z Ústavu fyzikálnych vied, PF UPJŠ, Košice za realizáciu meraní atómovej silovej mikroskopie.

Ďalej ďakujeme kolektívu Viperafarm Biely Kostol a kolektívu Tropický svet Trakovice za profesionálnu pomoc pri odobratí jedu od jedovatých hadov a vyhotovenia fotodokumentácie.

A na záver ďakujeme profesionálnej herpetologičke Thea Litschka Koen zo Svazijska za zabezpečenie protijedu a poskytnutie fotodokumentácie.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Kornalík F. Živočíšné toxíny. Praha : SZN. 1967; 1. vyd.: Jedovatí hadi:148-154.

Valenta, J.: Jedovatí hadi: Intoxikace, terapie. Galén Praha. 2008; 1. vyd. ISBN 978-80-7262-473-7: 3.Hadí jedy: 45-66.

Warrell A.D. Guidelines for the prevention and clinical management of snakebite in Africa. WHO Regional Office for Africa. Brazzaville. 2010; 2.1.3 Spitting or cytotoxic cobras (Genus *Naja*): 7-9.

Wüster W, Crookes S, Ineich I, Mane Y, Pook C.E, Trape J.-F, Broadley D.G.: The phylogeny of cobras inferred from mitochondrial DNA sequences: evolution of venom spitting and the phylogeography of the African spitting cobras (Serpentes: *Elapidae*: *Naja nigricollis* complex). Molecular Phylogenetics and Evolution. 2007; 45: 437-453.

PROBIOTIKÁ – ALTERNATÍVNA MOŽNOSŤ PREVENČIE MORU VČELIEHO PLODU

Rumanovská K.¹, Mudroňová D.², Toporčák J.¹

¹Klinika vtákov a exotických zvierat, UVLF, Košice

²Katedra imunológie a mikrobiológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Mor včelieho plodu je celosvetovo rozšírená nákaza včiel spôsobená baktériou *Paenibacillus larvae*. Antibiotická terapia je málo účinná a na území Európskej únie zakázaná. Preto je nutné nájsť účinnú prevenciu, prípadne terapiu, s využitím predovšetkým prírodných látok. Jednu z alternatívnych metód by mohli predstavovať probiotiká. Cieľom tejto práce bolo bližšie preskúmanie vlastností vybraných kmeňov laktobacilov pre ich možné využitie v probiotickom prípravku. Pre výskum boli použité laktobacily izolované v predchádzajúcich prácach z tráviacich traktov zdravých dospelých včiel a vybrané na základe ich schopnosti inhibovať rast *P. larvae*, prežívať dlhodobé skladovanie zmrazením a autoagregačne rásť. U týchto kmeňov boli otestované ich rastové schopnosti v PYG bujóne, produkcia organických kyselín, ktorých koncentrácia bola bližšie stanovená kapilárnou izotachoforézou a pokles pH počas rastu, ktorý bol zaznamenávaný pH metrom. Taktiež bol zisťovaný rast laktobacilov v prítomnosti rôznych substrátov (1 % sacharidov) pomocou prístroja Synergy Reader 4 a ich prežiteľnosť v mede a sacharóze stanovovaním ich počtov platňovou metódou. Kmene izolované z včiel, ktoré vykazovali najvyššiu inhibíciu rastu *P. larvae*, boli charakterizované ako *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus plantarum*. Tieto izoláty preukázali dobré rastové vlastnosti s poklesom pH po 24 hodinách približne na 4 u *L. plantarum* a na 4,7 u *L. brevis*. *L. plantarum* produkoval vysokú koncentráciu kyseliny mliečnej ($269,2 \pm 14,3$ mmol.l⁻¹) a *L. brevis* tvoril vysoké koncentrácie kyseliny octovej ($73,9 \pm 5,9$ mmol.l⁻¹), mliečnej ($42,9 \pm 3,3$ mmol.l⁻¹) a acetocovej ($27,2 \pm 1,7$ mmol.l⁻¹). Rast oboch kmeňov bol sledovaný v médiách s prídavkom 1 % glukózy, fruktózy, maltózy a fruktooligosacharidu - IPX. U *L. brevis* bol zaznamenaný najlepší rast po prídavku glukózy alebo fruktózy do média. Najlepšia rastová dynamika *L. plantarum* bola zistená po prídavku fruktózy alebo IPX. Prežiteľnosť oboch kmeňov v sacharózovom roztoku bola nedostatočná. V 12,5 a 25 % roztoku medu oba izoláty prežívali počas 3 dní vo vysokých počtoch (približne 10⁷ cfu/ml). Avšak po 7 dňoch inkubácie neboli už v týchto roztokoch nájdené žiadne živé baktérie.

ÚVOD

Mor včelieho plodu je závažné celosvetovo rozšírené nakažlivé ochorenie včiel. Pôvodcom ochorenia je Gram pozitívna tyčinkovitá baktéria *Paenibacillus larvae* (Alippi a Aguilar, 1998), ktorá je schopná dlhodobo pretrvávať v prostredí vo forme spór (Švancer, 1977). Podľa legislatívy Európskej únie nie je aplikácia antibiotík pri výskyte tejto nákazy povolená. Tento zákaz vyplýva z dôvodu výskytu rezíduí aplikovaných antibiotík vo včelích produktoch, predovšetkým v mede. Jedinou povolenou intervenciou je spálenie infikovaných včelstiev, s čím sú spojené značné ekonomické straty. Preto je potrebné venovať pozornosť skúmaniu alternatívnych prírodných metód prevencie moru včelieho plodu, ktoré by nezaťažovali včelie produkty a životné prostredie. Jednou z možností môže byť využívanie probiotík. Táto práca sa zaoberá skúmaním vlastností včelích laktobacilov s cieľom vytvorenia vhodného probiotického prípravku.

MATERIÁL A METODIKA

Pre výskum boli použité kmene laktobacilov, ktoré boli v predchádzajúcich prácach vyzisované z tráviaceho traktu zdravých dospelých včiel. U týchto izolátov sa prejavila

schopnosť inhibovať rast *P. larvae*. Na základe ich biochemických vlastností a rep-PCR metódou boli identifikované a použité v našich experimentoch.

Rastová dynamika laktobacilov bola sledovaná v PYG bujóne (peptón pre bakteriológiu, 5g; enzymatický-kazeínový hydrolyzát, 5g; kvasničný extrakt, 10g; D(+) glukóza, 10 g/1000ml, pH 6,2) meraním absorbancie vzoriek každé 2 hodiny pri 640 nm pomocou spektrofotometra (SP-870 plus, Metertech Inc., Taiwan) počas 24 hodinovej inkubácie vo vodnom trepacom kúpeli (Julabo SW 20C, Labor Technik GmbH Selbach, Germany) pri 37°C a 150 otáčkach.min⁻¹. Počty laktobacilov boli stanovené po 0, 6, 12 a 24 hodinách rastu platňovou metódou.

Schopnosť laktobacilov znižovať pH prostredia počas svojho rastu bola zaznamenávaná pH metrom (ION Activity Meter MS20, Laboratórní přístroje, Praha, ČR). Pokles pH je odôvodnený produkciou organických kyselín laktobacilmi, ktorých koncentrácia bola stanovená kapilárnou izotachofórezou (ITP s technikou spájania kolón ZKI-01, Spišská Nová Ves, SR).

Taktiež bola zisťovaná schopnosť laktobacilov prežívať a rásť v prítomnosti rôznych substrátov - boli použité glukóza, fruktóza, maltóza (MALDEX 150) (Merck, Darmstadt, SRN) a komerčný prípravok na báze fruktooligosacharidov - RAFTIFEED IPX (Orafti, Tienen, Belgicko) v 1 % koncentrácii. Rastové krivky boli zaznamenávané prístrojom SYNERGY READER 4 (BioTek, Merck, SRN) v mikrotitračných 96-jamkových platničkách s PYG bujónom, kde glukóza bola nahradená príslušným substrátom. Zmeny v absorbancii boli merané v 15 minútových intervaloch počas 24 hodinového rastu pri teplote 37°C.

Prežiteľnosť laktobacilov v mede a v sacharóze bola zisťovaná na základe stanovenia ich počtov platňovou metódou. Laktobacily boli inkubované 24 hodín v 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 % a 1,56 % medovom roztoku. Následne bola testovaná ich prežiteľnosť v 50 %, 25 % a 12,5 % roztoku medu alebo sacharózy počas dlhšej doby inkubácie. Počty boli stanovené po 48, 72 hodinách a po 7 dňoch.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pre výskum boli použité 3 izoláty (B50, B22 a P12) pochádzajúce z tráviaceho traktu včiel, pretože najsilnejšie inhibujú rast *P. larvae*. Tieto izoláty boli charakterizované ako *Lactobacillus brevis* (B50 a B22) a *Lactobacillus plantarum* (P12).

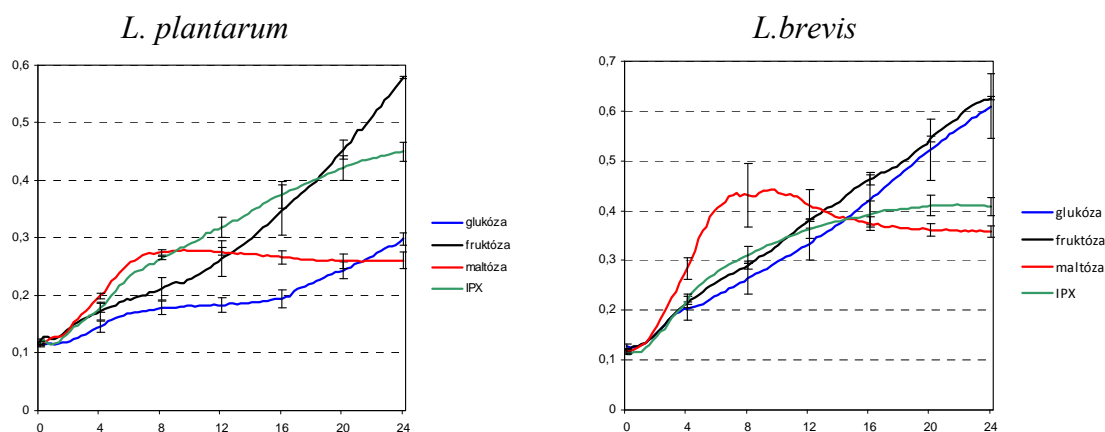
U týchto kmeňov boli zaznamenané dobré technologické vlastnosti, prežívajú dlhodobé skladovanie zmrazením a vyznačujú sa autoagregačným typom rastu.

Rastová dynamika v PYG bujóne bola u oboch kmeňov priaznivá, pričom nebol zaznamenaný signifikantný rozdiel medzi rastovými krivkami obidvoch kmeňov. Po 24 hodinovej inkubácii boli počty laktobacilov stanovené na hodnotu 10⁸ cfu/ml.

U *L. plantarum* bola zistená výraznejšia schopnosť znižovať pH prostredia počas 24 hodinového rastu až na hodnotu 4,1 ± 0,02, čo je odôvodnené produkciou vysokej koncentrácie kyseliny mliečnej (269,2 ± 14,30 mmol.l⁻¹). *L. brevis* znižuje pH média na hodnotu 4,7 ± 0,15 a produkuje v najvyšších koncentráciách kyselinu octovú (73,9 ± 5,87 mmol.l⁻¹), mliečnu (42,9 ± 3,29 mmol.l⁻¹) a acetocetovú (27,2 ± 1,69 mmol.l⁻¹). Okrem uvedených kyselín tvoria obidva kmene kyselinu propiónovú, jantárovú, valérovú a maslovú v nižších koncentráciách.

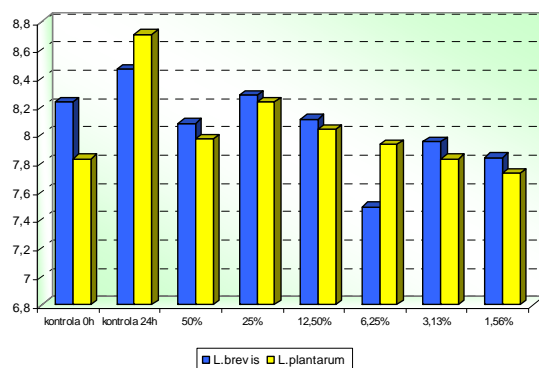
U oboch kmeňov bola testovaná ich schopnosť prežívať a rásť v prítomnosti 4 druhov sacharidov v 1 % koncentrácii. Na začiatku rastu nebol u obidvoch kmeňov zaznamenaný štatisticky významný rozdiel v absorbancii bujónov s prídavkom substrátov. Po 24 hodinovej inkubácii boli zistené významné rozdiely medzi nameranými hodnotami. *L. plantarum* vykazoval najlepšie rastové schopnosti v médiu s prídavkom fruktózy. U *L. brevis* bol zaznamenaný najlepší rast v médiách s prídavkom glukózy a fruktózy (Graf č. 1 a 2).

Graf č. 1 a 2, Rast *L. plantarum* a *L. brevis* v PY bujóne s prídavkom 1 % sacharidov – glukózy, fruktózy, maltózy a fruktooligosacharidu (IPX)



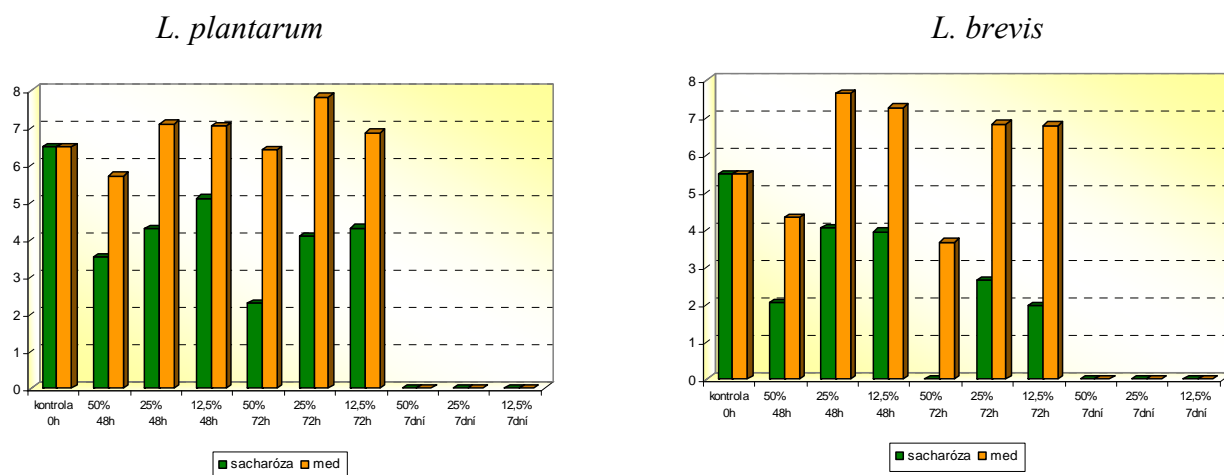
U oboch kmeňov laktobacilov sme zaznamenali schopnosť prežívať vo všetkých použitých koncentráciách medových roztokov počas 24 hodinovej inkubácie, pričom počty laktobacilov v 50 %, 25 % a 12,5 % roztoku boli približne 10^8 cfu/ml. Počty oboch kmeňov laktobacilov v 6,25 %, 3,125 % a 1,56 % roztoku sme zhodnotili ako nedostatočné, a preto sme roztoky s týmito koncentraciami vyradili z ďalšieho testovania (Graf. č. 3).

Graf č. 3, Počty laktobacilov vo fyziologickom roztoku s rôznou koncentráciou medu po 24 hodinách inkubácie vyjadrené ako \log_{10} cfu/ml porovnané s kontrolou v MRS médiu



V 50 %, 25 % a 12,5 % roztok medu alebo sacharózy bola zisťovaná prežiteľnosť *L. plantarum* a *L. brevis* počas dlhšej doby inkubácie. U oboch kmeňov boli stanovené nedostatočné počty vo fyziologických roztokoch s prídavkom sacharózy vo všetkých koncentráciách. V medových roztokoch bola najlepšiu prežiteľnosť zaznamenaná v 25 % a 12,5 % koncentracii u oboch kmeňov, počty laktobacilov boli približne 10^7 cfu/ml, čo hodnotíme ako dostatočné. Po 7 dňoch inkubácie došlo u oboch kmeňov k úplnej inhibícii ich životaschopnosti (Graf č. 4 a 5).

Graf č. 4 a 5, Počty *L. plantarum* a *L. brevis* vo fyziol. roztoku s medom alebo sacharózou (koncentrácia v %) po 48, 72 hodinách a 7 dňoch inkubácie vyjadrené ako log₁₀ cfu/ml



Probiotiká predstavujú potenciálnu možnosť náhrady syntetických prípravkov, predovšetkým antibiotík, pri prevencii, dokonca aj terapii mnohých ochorení zvierat a ľudí. Medzi najbežnejšie využívané kmene v probiotických prípravkoch patria: *Lactobacillus* sp., *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium* sp., *E. coli*, pričom laktobacily sú najčastejšie používanými baktériami pre prípravu probiotických preparátov (Nemcová, 1997). Kmene podávané tomu istému druhu, od ktorého boli vyizolované, lepšie kolonizujú tráviaci trakt a preto sú účinnejšie. Toto kritérium spĺňajú izoláty testované v našej práci. Ďalším dôležitým selekčným kritériom je inhibícia cieľových patogénov, čo bolo v našich pokusoch taktiež naplnené. Schopnosť včelích laktobacilov inhibovať rast *P. larvae* potvrdili aj Forsgren a kol. (2010) alebo Canganella a Balsamo (2008). Pre využitie laktobacilov je potrebné nájsť vhodné médium, v ktorom by preživali. Naše výsledky sú porovnateľné so závermi Forsgren a kol. (2010), ktorí taktiež testovali prežívateľnosť laktobacilov v mede, sacharóze a v materskej kašičke.

POĎAKOVANIE

Podporené projektom SK0021 spolufinancovaného z finančného mechanizmu EHP, nórskeho finančného mechanizmu a štátneho rozpočtu SR.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alippi AM, Aguilar OM. Unique Dna fingerprint patterns of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* strains. *J. Apicult. Res.* 1998; 37(4): 273 - 280. ISSN 1098-5336.
- Švancer, L. Boj proti chorobám včiel. Bratislava: Príroda, 1977.
- Canganella F, Balsamo R. Isolation and selection of probiotic microorganisms with antagonistic activities against *Paenibacillus larvae* and *Paenibacillus alvei*. International Probiotic Conference, Probiotics for the 3rd Millenium, June 4th-7th 2008, High Tatras, Slovakia.
- Forsgren E, Olofsson TC, Vasquez A, Fries I. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologia.* 2010; 41: 99 – 108. ISSN 0044-8435.
- Nemcová R. Kritéria výberu laktobacilov pre probiotické účely. *Veterinary Medicine - Czech.* 1997; 42: 19 – 27. ISSN 0375-8427.

ANTIOXIDAČNÝ STATUS KURČIAT PO PRÍJME ŠALVIOVEJ SILICE DIÉTOU

Ryzner M.¹, Venglovská K.²

¹Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

²Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo sledovať vplyv rôznych koncentrácií éterického oleja *Salvia officinalis* prijatého krmivom na niektoré parametre antioxidačného statusu nosníc hybridného plemena ISA BROWN počas 12. týždňoch kŕmenia. Jednodňové nosnice boli rozdelené do šiestich skupín po 10. Prvá pokusná skupina (kontrolná) bola kŕmená bazálnou diétou (BD), druhá skupina tou istou BD doplnenou o slnečnicový olej (1%). Tretia skupina dostávala BD obohatenú o šalvióvu silicu v koncentrácii 0,01%. Štvrtá skupina mala diétu obohatenú o šalvióvu silicu v koncentrácii 0,025%. Diéta pre piatu skupinu pozostávala z diéty obohatenej o 0,05% šalvióvu silicu. Šiesta skupina kurčiat dostávala diétu obohatenú o 0,1% šalvióvu silicu. Naše výsledky ukázali, že aktivita glutatión peroxidázy (GPx) v pečeni bola signifikantne vyššia v 2. 3. a 4. pokusnej skupine oproti kontrole. Najnižšia koncentrácia šalviovej silice signifikantne zvýšila aktivitu GPx v mukóze duodena oproti 2. skupine s prídavkom čistého slnečnicového oleja. V obličke bola GPx signifikantne zvýšená v 3. skupine oproti skupinám bez prídavku šalviovej silice. Signifikantné zvýšenie GPx v obličke bolo aj v poslednej pokusnej skupine oproti 2. skupine doplnenej o čistý slnečnicový olej. Koncentrácia malondialdehydu (MDA) v obličke bola signifikantne zvýšená v poslednej 6. skupine oproti 1. a 2. skupine. Celkový antioxidačný status v plazme bol signifikantne zvýšený u nosníc v 4., 5. a 6. pokusnej skupine oproti kontrole. Výsledky ukazujú, že krmivo obohatené šalvióvou silicou zvyšuje antioxidačnú ochranu organizmu nosníc. Najlepšiu antioxidačnú ochranu zabezpečili nižšie koncentrácie šalviovej silice pre nami sledované nosnice.

ÚVOD

Éterické oleje sú prchavé, prírodné, komplexné zlúčeniny intenzívne voňajúce, olejovité látky obsiahnuté v rôznych častiach rastlín. Sú tvorené aromatickými látkami, sekundárnymi metabolitmi rastlín, z ktorých prevládajú terpenické uhľovodíky so silným terapeutickým účinkom. Pôsobia protizápalovo (Juhás a kol., 2008), antimikrobiálne (Fabian a kol., 2006), antioxidačne (Faix a kol., 2007), adstringenčne, fungicídne (Pinto a kol., 2007) a insekticídne (Acamovic a Brooker, 2005). Biologické vlastnosti éterického oleja *Salvia officinalis* sú pripisované najmä alfa a beta tujónu, gáfru a 1,8 cineolu (Senatore a kol., 2006). V nemalej miere obsahuje aj diterpény, flavonoidy, fenolové kyseliny, triesloviny, horčiny, živicu a iné látky, pre ktoré je významný z aromatického a medicínskeho hľadiska.

Jedným z významných antioxidačných enzýmom je glutatión peroxidáza (GPx), ktorá má významnú úlohu v antioxidačných reakciách pri odstraňovaní peroxidov vodíka, lipidových a fosfolipidových peroxidov a iných škodlivých hyperoxidov, čím chráni bunky pred oxidatívnym poškodením (Kyriakopoulos a Behne, 2002). Jednou z dôležitých reakcií typických pre oxidačný stres organizmu je oxidácia polyenasýtených mastných kyselín, takzvaná lipidová peroxidácia. Pre bunky každého živého organizmu je táto reakcia deštruktívnym procesom, ktorý priamo napadá fosfolipidy bunkových membrán, pričom vznikajú reaktívne druhotné metabolity narušujúce ďalšie, a pre fungovanie organizmu dôležité molekuly. Vzhľadom k tomu, že voľné radikály majú v organizme veľmi krátku životnosť, sú ako biomarkery oxidatívneho stresu bežne používané produkty oxidácie vyvolané týmito voľnými radikálmi a jedným z nich je napríklad malondialdehyd (Lin a kol., 2011).

Cieľom práce bolo skúmať vplyv šalviovkej silice na aktivitu GPx, lipidovú peroxidáciu a celkový antioxidačný status kurčiat.

MATERIÁL A METÓDY

60 jednoduchých kurčiat hybridného plemena ISA BROWN (Párovské háje, Nitra) s priemernou živou hmotnosťou 45g bolo rozdelených do šiestich skupín po 10. Kurčatá boli umiestnené na podstielke z drevených hoblín, kde teplota a svetelný režim boli upravené pre požiadavky daného plemena a vekovej kategórie kurčiat. Voda a krmivo bolo k dispozícii pre všetky skupiny *ad libidum*. Prvá pokusná skupina bola kŕmená štandardnou diétou HYD-02 (Biofeed a.s. Kolárovo), druhá skupina diétou obohatenou o slnečnicový olej, pričom jeho výsledná koncentrácia v krmive bola 1%. Tretia skupina dostávala diétu obohatenú o šalviu (HANUS, Nitra) v koncentrácii 0,01%. Šalviová silica bola pred pridaním do krmiva zriedená so slnečnicovým olejom, ktorý slúžil ako vehikulum. Štvrtá skupina mala diétu obohatenú o 0,025% šalviou silicu. Diéta pre piatu skupinu pozostávala z diéty obohatenej o šalviou silicu v koncentrácii 0,05%. Posledná šiesta skupina kurčiat dostávala diétu obohatenú o 0,1% šalviou silicu. Po 12 týždňoch kŕmenia a eutanázii vyvolanej intraperitoneálnou aplikáciou xylazínu (Rometar 2%, SPOFA, ČR) a ketamínu (Narkamon 5%, SPOFA, ČR) v dávke 0,6 a 0,7 ml/kg živej hmotnosti, boli odobraté vzorky krvi a tkanív. Vzorky krvi, plazmy, tkanív pečene, obličiek a mukózy duodena boli uložené do mraziaceho boxu pri teplote -75 °C do doby ich analyzovania.

Aktivita glutatión peroxidázy (GPx) v pečeni, obličkách, mukóze duodena a krvi bola meraná metódou podľa Paglia a Valentine (1967). Celkový antioxidačný status (TAS) v plazme, hemoglobín (Hb) a aktivita GPx v krvi boli merané spektrofotometricky kitmi firmy Randox. Koncentrácia malondialdehydu (MDA) vo vzorkách pečene, obličke a mukóze duodena bola meraná modifikovanou fluorometrickou metódou (Jo a Ann 1998). Koncentráciu bielkovín v tkanivách sme stanovovali spektrofotometrickou metódou podľa Bradforda (1976). Na štatistické vyhodnotenie výsledkov bola použitá jednocestná ANOVA s Tukey post-testom a použitím GraphPad Software (USA). Výsledky sú uvedené ako priemerná hodnota \pm SEM.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Namerané hodnoty GPx v pečeni ukázali signifikantne vyššiu aktivitu v 2, 3. a 4. pokusnej skupine oproti kontrole. Aktivita GPx v mukóze duodena bola signifikantne zvýšená v 3. pokusnej skupine oproti 2. skupine s prídavkom čistého slnečnicového oleja. V obličke bola GPx signifikantne zvýšená v 3. skupine oproti skupinám bez prídavku šalviovkej silice. Signifikantné zvýšenie GPx v obličke bolo aj v poslednej pokusnej skupine oproti 2. skupine doplnenej o čistý slnečnicový olej (Tab.1). Nižšia aktivita GPx v tkanivách je všeobecne sprevádzaná zvýšením koncentrácie MDA (Balogh a kol., 2004). Koncentrácia MDA v obličke bola signifikantne zvýšená v poslednej 6. skupine oproti 1. a 2. skupine. Celkový antioxidačný status v plazme bol signifikantne zvýšený u nosníc kŕmenými diétou obohatenou o 0,025%, 0,05% a 0,1% šalviovkej silice oproti kontrole (Tab.2). Asadi a kol. (2010) analyzovali šesť druhov šalvie, kde u všetkých potvrdili antioxidačné vlastnosti, kde ich účinné látky inhibujú DNA poškodenie voľnými radikálmi. Predpokladá sa, že vysoká antioxidačná aktivita šalvie, závisí od prítomnosti fenolických skupín, ktoré sa správajú ako donori vodíka peroxidovým radikálom produkovaných behom prvého kroku v oxidácií tukov, a tým spomaľujú hydroxy-peroxidovú formáciu. MDA ako produkt peroxidácie lipidov a TAS slúžia ako vhodné markery oxidačného stresu (Gil a kol., 2006).

Tab. 1 Aktivita GPx v krvi (U.g⁻¹ Hb) a tkanivách (U. g⁻¹ bielkovín)

Skupina	Krv	Pečeň	Mukóza duodena	Oblička
	(U.g ⁻¹ Hb)		(U. g ⁻¹ bielkovín)	
1. kontrola	165,4±18,34	9,37±0,49 ^{ac}	18,81±2,21 ^{ab}	21,05±1,84 ^{ac}
2. slneč. olej	155,5±11,45	11,84±0,67 ^b	12,29±1,22 ^a	15,83±1,39 ^a
3. 0,01% šalvia	164,3±19,06	12,70±0,33 ^b	21,13±2,21 ^b	35,95±5,04 ^b
4. 0,025% šalvia	172,8±3,81	11,91±0,82 ^b	13,69±1,41 ^{ab}	21,42±2,37 ^{ac}
5. 0,05% šalvia	166,8±15,40	11,24±0,46 ^{bc}	14,53±2,51 ^{ab}	24,73±3,11 ^{abc}
6. 0,1% šalvia	163,1±9,14	8,66±0,31 ^a	13,42±2,39 ^{ab}	32,65±2,16 ^{bc}

Výsledky sú udané ako priemer ± SEM, rozdielne písmená horného indexu predstavujú signifikantný rozdiel medzi skupinami (P<0,05).

Tab.2 Celkový antioxidačný status v plazme (TAS, mmol.L⁻¹) a koncentrácia malondialdehydu (MDA, nmol.g⁻¹) v tkanivách

Skupina	TAS	Pečeň (nmol.g ⁻¹)	MDA	Oblička (nmol.g ⁻¹)
	Plazma (mmol.L ⁻¹)		Mukóza duodena (nmol.g ⁻¹)	
1. kontrola	1,23±0,07 ^a	93,51±15,13	50,18±5,69	76,78±6,53 ^a
2. slneč. olej	1,40±0,03 ^{abc}	155,0±17,29	39,67±3,57	66,31±5,67 ^a
3. 0,01% šalvia	1,27±0,04 ^{ac}	119,1±12,91	57,16±8,61	113,0±9,27 ^{ab}
4. 0,025% šalvia	1,54±0,03 ^b	142,7±15,11	50,88±6,42	83,02±11,78 ^a
5. 0,05% šalvia	1,46±0,06 ^{bc}	132,5±18,18	51,11±7,53	104,2±18,64 ^a
6. 0,1% šalvia	1,46±0,05 ^{bc}	142,0±15,13	44,22±6,22	154,4±6,59 ^b

Výsledky sú udané ako priemer ± SEM, rozdielne písmená horného indexu predstavujú signifikantný rozdiel medzi skupinami (P<0,05).

Z našich výsledkov vyplýva, že šalviová silica pridaná do krmiva zvyšuje antioxidačnú ochranu nosníc, a ako najvhodnejšie sú práve jej nižšie koncentrácie.

POĎAKOVANIE

Tento výskum bol podporovaný grantovou agentúrou pre podporu vedy VEGA No. 2/0010/10.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Asadi S, Ahmadiani A, Ali Esmaeili M, Sonboli M, Ansari N. In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six Salvia species from Iran. A comparative study. Fariba Khodaghohi Food and Chemical Toxicology. 2010; 48:1341–1349.
- Acamovic T, Brooker J.D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. Proc.Nutr. Soc. 2005; 64:403–412.
- Balogh K, Weber M, Erdelyi M, Mézes M.. Effects of excess selenium supplementation on the glutathione redox system in broiler chicken. Acta Vet Hung. 2004; 52:403–414.

- 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.
- Fabian D, Sabol M, Domaracka K, Bujnakova D. Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in vitro.* 2006; 20:1435-1445.
- Faix Š, Juhas Š, Faixova Z. The effect of essential oil intake on changes of plasma antioxidant status in mice. *Acta Vet. Brno.* 2007; 76:357-361.
- Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeden P, Voss P, Grune T. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radical Research* 2006; 49:495–505.
- 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.
- Kyriakopoulos A, Behne D. Selenium-containing proteins in mammals and other forms of life. In *Rev. Physiol. Bioch.* 2002; 145:3-46.
- Lin WY, Chen CS, Wu SB, Lin YP, Levin RM, Wei YH. Oxidative stress biomarkers in urine and plasma of rabbits with partial bladder outlet obstruction. *Bju International.* 2011; 107:1839-1843.
- 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.
- Pinto E, Salgueiro L.R, Cavaleiro C, Palmeira A, Goncalves M.J. In vitro susceptibility of some species of yeast and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products.* 2007; 26:135-141.
- Senatore F, Apostolides Arnold N, Piozzi F, Formisano C. Chemical composition of the essential oil of *Salvia microstegia* Boiss. et Balansa growing wild in Lebanon. *J. Chromatogr. A.* 2006;1108:276-278.

VÝSLEDKY STANOVENIA PROTI *LAWSONII INTRACELLULARIS* ELISA METÓDOU VO VYBRANÝCH CHOVOCH OŠÍPANÝCH NA SLOVENSKU

Soročinová J.¹, Kovačociová K.¹, Smaržik M.², Reichel P.¹

¹Klinika ošípaných, UVLF, Košice

²Klinika prežúvavcov, UVLF, Košice

ABSTRAKT

V príspevku zhodnocujeme výsledky stanovenia protilátok proti *Lawsonii intracellularis* ELISA metódou vo vybraných chovoch ošípaných na Slovensku. Celkovo bolo vyšetrených 19 chovov a z nich 290 vzoriek. 63 % vzoriek bolo pozitívnych na protilátky proti *Lawsonii intracellularis*, 6 % dubióznych a 31 % negatívnych, pričom dominantné postavenie v skupine pozitívnych jedincov mali kategórie prasnice a výkrm. V skupine negatívnych jedincov prevažovali kategórie ciciaky a odstavčatá.

ÚVOD

Gram-negatívna baktéria *Lawsonia intracellularis* patriaca do čeľade *Desulfovibrionaceae* je pôvodcom jedného z najčastejších hnačkových ochorení ošípaných na Slovensku. Porcinná proliferatívna enteropatia, (proliferatívna enteropatia, ileitída, lawsonióza) postihuje ošípané v predvýkrme a výkrme vo všetkých vyspelých štátoch s rozvinutým chovom ošípaných. Spôsobuje značné hospodárske straty nízkou konverziou krmív a vysokými nákladmi na lieky, menšie sú straty priamo uhynutím (Šajgalík, 2007). Ochorenie je charakterizované proliferáciou epitelových buniek v kryptách črevnej sliznice kaudálnej časti ilea, s následným zhrubnutím tenkého čreva, prípadne aj hornej tretiny špirálovitej časti kolónu. Konečným štádiom ochorenia býva nekrotická ileitída.

V závislosti od klinických, resp. patologicko-anatomických zmien sú popisované 2 – 4, no najčastejšie 3 formy PPE (Bane, 1997) a to:

1. Subklinická forma postihuje odstavčatá so živou hmotnosťou 15 – 20 kg. Spomedzi všetkých foriem PPE je v chovoch najčastejšie prítomná. Je sprevádzaná radom nešpecifických príznakov (predovšetkým inapetenciou a celkovou vyčerpanosťou), ale vo väčšine prípadov má inaparentný priebeh.

2. Akútna forma (Porcinná hemoragická enteritída – PHE) sa vyskytuje u výkrmových ošípaných a mladých kancov vo veku 17 – 24 týždňov. Je sprevádzaná krvavou hnačkou s dechtovitými výkalmi a anémiou. Pri premiestňovaní zvierat často dochádza k epizootickým záchvatom krvavých hnačiek, z ktorých viac ako 10 % prípadov končí uhynutím. Smrť prichádza náhle, v priebehu 48 hodín po objavení sa prvých klinických príznakov.

3. Chronická forma (Porcinná intestinálna adematóza – PIA) je charakterizovaná sporadickou hnačkou s vodnatými bledohnedými výkalmi, v ktorých sa nachádza množstvo nestrávenej potravy. Postihuje výkrmové ošípané a odstavčatá vo veku 6 – 16 týždňov. Hnačka po niekoľkých dňoch vymizne alebo pretrváva dlhšiu dobu, čo má za následok výrazný pokles živej hmotnosti, dehydratáciu a celkovú vyčerpanosť.

Morbidita dosahuje 15 – 20 %, zatiaľ čo mortalita je minimálna. Zdrojom nákazy sú postihnuté zvieratá, kontaminovaná voda, krmivo, podstielka alebo náradie. Infekcia sa prenáša trusom postihnutých zvierat prostredníctvom drobných hlodavcov a vtákov. Častý je aj prenos z matky na mláďa. Inkubačná doba je 14 – 21 dní.

MATERIÁL A METODIKA

Celkovo bolo odobratých 290 vzoriek krvi z 19 chovov ošípaných na Slovensku (viď mapa).

Mapa

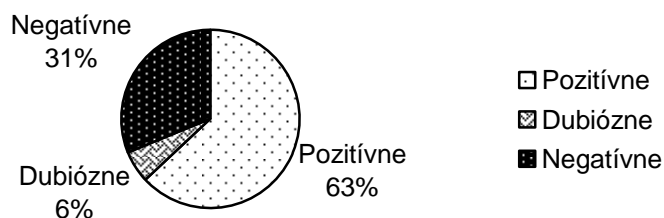


Ošípané boli rozdelené do 6 kategórií: ciciaky, odstavčatá, predvýkrm, výkrm, prasničky, prasnice. V závislosti od príslušnosti do kategórie bola krv odoberaná venepunkciou z *plexus venosus suborbitalis*, resp. venepunkciou v *cava cranialis*. Z odobranej krvi bez antikoagulancií bolo po centrifugácii (3000 ot./30 min) získané sérum k sérologickému vyšetreniu na protilátky proti *Lawsonii intracellularis*. V práci bol použitý komerčný kit „bioScreen Ileitis Antibody ELISA“ od firmy SYNBIOTICS EUROPE SAS, určený na detekciu špecifických protilátok proti *Lawsonii intracellularis* v sére a plazme ošípaných. Tento ELISA test je založený na princípe tzv. blocking ELISA.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

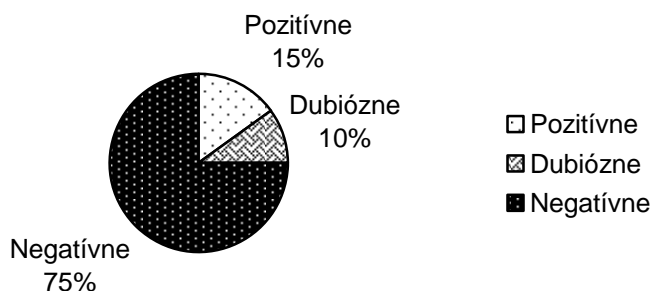
Z našich zistení vyplýva, že z celkového počtu vyšetrených vzoriek bolo 63 % pozitívnych, 6 % dubióznych a 31 % negatívnych na protilátky proti *Lawsonii intracellularis* (graf č.1).

Graf č.1: celková prevalencia



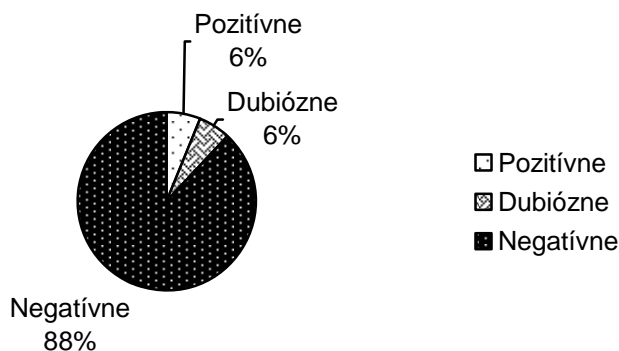
V kategórii ciciakov bolo 15 % vzoriek pozitívnych, 10 % dubióznych a 75 % negatívnych na protilátky proti *Lawsonii intracellularis* (graf č. 2).

Graf č. 2: ciciaky



V kategórii odstavčiat bolo 6 % vzoriek pozitívnych, 6 % dubiöznych a 88 % negatívnych na protilátky proti *Lawsonii intracellularis* (graf č. 3).

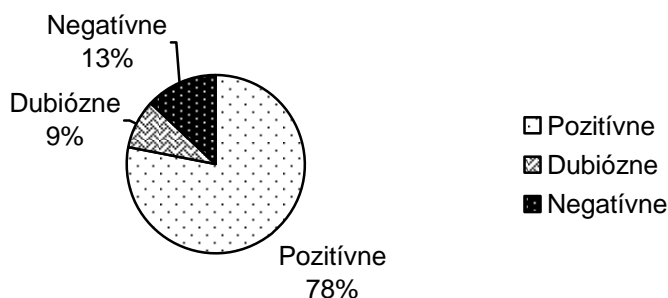
Graf č. 3: odstavčatá



V kategórii predvýkrm bolo 100 % vzoriek pozitívnych na protilátky proti *Lawsonii intracellularis*.

V kategórii výkrm bolo 78 % vzoriek pozitívnych, 9 % dubiöznych a 13 % negatívnych na protilátky proti *Lawsonii intracellularis* (graf č. 4).

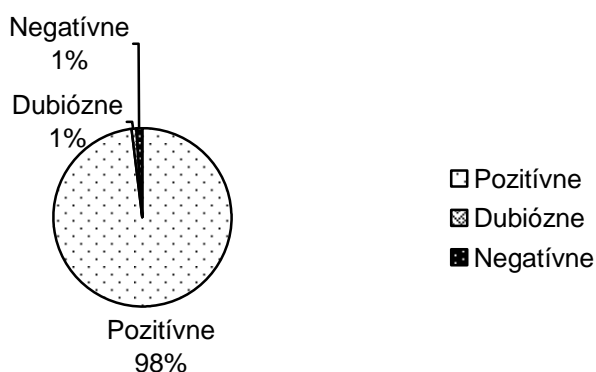
Graf č. 4: výkrm



V kategórii prasničiek bolo 100 % vzoriek pozitívnych na protilátky proti *Lawsonii intracellularis*.

V kategórii prasníc bolo 98 % vzoriek pozitívnych, 1 % dubióznych a 1 % negatívnych na protilátky proti *Lawsonii intracellularis* (graf č. 5).

Graf č. 5: prasnice



V Európe je v súčasnosti 34 – 67 % ošípaných a 88 – 100 % chovov infikovaných *Lawsoniou intracellularis* (Šajgalík, 2007). Podľa posledných údajov z roku 2000 sa prevalencia tohto ochorenia na Slovensku pohybuje od 12 – 50 %, vyskytuje sa v chovoch s väčším počtom zvierat a postihuje najmä ošípané vo veku 1 – 5 mesiacov (Podmanický a Kováč, 2000). Naše čiastkové výsledky poukazujú na vyššiu mieru prevalence porcinnej proliferatívnej enteropatie ako posledné publikované výsledky (63 %) a to najmä v kategórii výkrm a prasnice. U cicakov a odstavčiat je zistená prevalencia nižšia v porovnaní s ostatnými kategóriami. Je uvádzané, že ciciaky bývajú chránené detegovateľným titrom materských protilátok, ktorých hladina vo veku 3 – 5 týždňov klesá (Šajgalík, 2007), čo koreluje s nami stanovenými výsledkami.

POĎAKOVANIE

Táto práca je súčasťou grantu VEGA č. 1/0727/09 „Štúdium účinku β -glukánov ako modifikátorov biologickej odpovede u hospodárskych zvierat“.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bane D. An update on porcine proliferative enteropathy (ileitis) in swine. *Feed Facts*. 1997; 7:67 – 70.
- Podmanický D, Kováč G. Lawsoniáza ošípaných – proliferatívna hemorrhagická enteropathia (ileitída). *Infovet*. 2000; 5:203 – 206.
- Šajgalík M. Máme nové ochorenie? Ileitídu spôsobuje *LAWSONIA INTRACELLULARIS*. *Slovenský veterinársky časopis*. 2007; 2:78 – 80.

AMYLOIDNÁ AGREGÁCIA INZULÍNU V PRÍTOMNOSTI MAGNETICKÝCH KVAPALÍN

Šipošová K.^{1,2}, Koneracká M.¹, Závišová V.¹, Antošová A.¹, Kopčanský P.¹, Gažová Z.¹

¹Ústav experimentálnej fyziky, SAV, Košice

²Katedra biochémie, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Proteínové amyloidné agregáty sú spojené s mnohými závažnými chorobami. Inzulínové amyloidné depozity sú pozorované u pacientov, ktorým je inzulín podávaný formou injekcií pri liečbe diabetu. Študovali sme účinok štyroch rôznych magnetických kvapalín (MK) na amyloidnú agregáciu inzulínu. Zistili sme, že magnetické kvapaliny potláčajú amyloidnú agregáciu inzulínu, veľkosť účinku závisí od vlastností jednotlivých magnetických kvapalín. Najvyššia schopnosť inhibície a deštrukcie amyloidných agregátov bola pozorovaná pre magnetickú kvapalinu funkcionalizovanú dextransom (MKD) a magnetickú kvapalinu dispergovanú vo fyziologickom roztoku (MKF). Získané výsledky poukazujú na to, že MK majú schopnosť redukovať amyloidnú agregáciu inzulínu, čo naznačuje, že majú potenciál eliminovať problémy spojené s amyloidnou agregáciou inzulínu, prípadne iných proteínov, ktoré sú spojené s amyloidnými ochoreniami.

ÚVOD

V poslednom období sa veľká pozornosť venuje špecifickej – amyloidnej agregácii proteínov vzhľadom na poznatky poukazujúce na spojitosť mnohých závažných chorôb so vznikom stabilných proteínových depozitov, ktoré sa akumulujú v rôznych orgánoch a tkanivách. K takýmto ochoreniam patrí napr. Alzheimerova choroba alebo diabetes typu II (Dobson, 2001, Fändlich a kol., 2001). V procese amyloidnej agregácie dochádza k agregácii normálne rozpusteného proteínu alebo jeho časti do typických amyloidných štruktúr (diméry, oligoméry, póry, protofilamenty, fibrily), ktoré sa vyznačujú veľmi podobnou morfológiou bez ohľadu na druh agregujúceho proteínu (Finke a kol., 2000). Tendencia proteínov vytvárať amyloidné agregáty nie je rovnaká, závisí na mnohých faktoroch – vnútorných (štruktúra proteínu) alebo vonkajších (prostredie, v ktorom sa proteín nachádza) (Dobson, 1999). Medzi hlavné faktory, ktoré podmieňujú tvorbu agregátov *in vivo* patria: generovanie amyloidogénnych (t.j. nenatívnych stavov) poly/peptidov, zníženie aktivity opravných systémov (chaperónov) a degradačných systémov (ubiquitín- proteázomového systému), strata energetického zásobovania, poruchy antioxidantného mechanizmu, postranlačné modifikácie proteínov (napr. fosforylácia, glykácia) a ďalšie. Tvorba amyloidných agregátov *in vitro* môže byť indukovaná v priebehu niekoľkých hodín vyššou teplotou, extrémnym pH, prítomnosťou solí, polymérov, denaturantov alebo zvýšením koncentrácie proteínu.

Inzulínové amyloidné depozity sú pozorované u diabetických pacientov, ktorým je inzulín podávaný formou injekcií. Amyloidné agregáty v miestach vpichu sú tvorené celými molekulami inzulínu, vrátane disulfidických mostíkov (Yumlu, 2009). Molekulárna podstata zatiaľ nie je dostatočne objasnená. Jednou z možností je, že inzulínové amyloidné agregáty vznikajú kvôli nedostatočnej resorpcii inzulínu v mieste aplikácie, čo má za následok lokálne zvýšenie koncentrácie proteínu indukujúce proces fibrilizácie. Druhá možnosť je spojená so vznikom amyloidných agregátov počas výroby alebo uskladnenia tohto proteínu vo forme lieku. K veľmi závažným problémom dochádza pri aplikácii inzulínových púmp.

Amyloidné choroby sa v súčasnosti nedajú vyliečiť. Doposiaľ známe terapeutiká len zmiernujú príznaky a spomaľujú progres amyloidných chorôb, pričom počet pacientov trpiacich na rôzne amyloidózy neustále narastá. Z tohto hľadiska je celený výskum mechanizmov tvorby amyloidných štruktúr ako aj identifikácia liečiv, ktoré by pomohli v prevencii, zastavení progresie alebo vyliečení amyloidných ochorení veľmi dôležitý. Existuje

niekoľko terapeutických prístupov, ktoré môžu pôsobiť v rozličných štádiách procesu tvorby amyloidných štruktúr. Jedným z najviac perspektívnych sa v súčasnosti javí redukcia amyloidných agregátov, ktorých prítomnosť v bunkách spôsobuje ich nefunkčnosť až smrť. Nanočastice sú čoraz častejšie využívané v priemysle aj v medicíne, pretože ich veľkosť je porovnateľná s proteínmi a inými biomakromolekulami a zároveň sa vyznačujú veľkým povrchom schopným interagovať s biomakromolekulami. Napriek tomu vedeckých štúdií, ktoré sa venujú problematike vplyvu nanočastíc na amyloidnú agregáciu je málo a poskytujú veľmi protichodné výsledky.

V našom štúdiu sme sa zamerali na sledovanie účinku štyroch rôznych magnetických nanokvapalín (MK) na amyloidnú agregáciu inzulínu.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Ľudský rekombinantný inzulín (I2643-50MG, Sigma Aldrich), tioflavín T (ThT) boli zakúpené od firmy Sigma, hydrogénfosforečnan a dihydrogén fosforečnan sodný od firmy LaChem.

Amyloidná agregácia inzulínu

Amyloidné fibrily boli pripravené 2 h inkubáciou 10 μ M inzulínu v 50 mM fosfátovom tlmivom roztoku, pH 7.5 intenzívnym miešaním (1200 rpm) pri teplote 65°C (Sorci a kol., 2009). Vytvorenie amyloidných fibríl bolo overené viacerými metodikami (meranie fluorescencie po naviazaní ThT alebo ANS, elektrónová a atómová kontaktnou mikroskopiou).

Priprava magnetických kvapalín

Magnetické kvapaliny boli pripravené chemickou zrážacou reakciou železnatých a železitých solí v alkalickom médiu. K roztoku FeSO_4 a FeCl_3 v mólovom pomere 1 : 2 bol v nadbytku pridaný hydroxid amónny. Vzniknuté čierne magnetitové nanočastice boli viacnásobne premyté deionizovanou vodou a následne stabilizované (za účelom zabránenia agregácie častíc) rôznymi spôsobmi za vzniku MK. Elektrostaticky stabilizovaná magnetická kvapalina (MKE) bola pripravená pridaním kyseliny chloristej HClO_4 k magnetitovým časticiam vo vode za stáleho miešania. Druhá skupina magnetických kvapalín bola stabilizovaná stéricky. K magnetitovým časticiam bol pridaný surfaktant oleát sodný za stáleho miešania a zmes bola ohrievaná až kým bol dosiahnutý bod varu. Povrch magnetických častíc v MK bol modifikovaný dextransom (MKD) alebo hovädzím sérovým albumínom (MKA) a častice boli dispergované v deionizovanej vode. V MKF boli magnetitové nanočastice stabilizované oleátom sodným a dispergované vo fyziologickom roztoku.

Viazanie ThT

K jednotlivým vzorkám bol pridaný ThT vo výslednej koncentrácii 20 μ M. Viazanie ThT do amyloidných fibríl je sprevádzané nárastom intenzity fluorescencie v emisnom spektre. ThT bol excitovaný pri 440 nm a emisia bola meraná pri 485 nm. Merania boli uskutočnené na spektrofluorimetri RF-5000 v semi-mikro quarzovej kyvete. Šírka excitačnej štrbiny bola 1.5 nm a emisnej 3 nm.

Skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM)

Vzorky jednotlivých magnetických kvapalín boli nanosené na hliníkový terčík a sušené vo vákuu. Následne po naparení uhlíkom boli získané snímky jednotlivých vzoriek použitím mikroskopu SEM, JEOL 7000F.

Atómová kontaktná mikroskopia

Vzorky boli nanosené na čerstvo očistenú sľudu a po adsorpcii bola sľuda opláchnutá ultračistou vodou a usušená. AFM snímky boli získané použitím mikroskopu Veeco di Innova v „tapping“ móde s kantileverom NCHV. Vzorky neboli filtrované.

Sledovanie inhibičnej aktivity magnetických kvapalín na amyloidnú agregáciu inzulínu

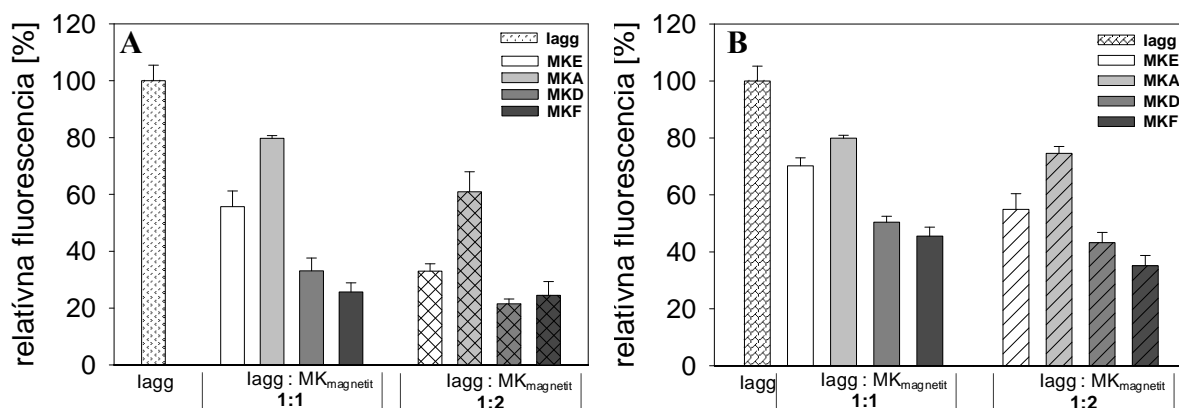
K roztoku inzulínu (10 μM) boli pridané jednotlivé magnetické kvapaliny (MK) vo výslednom hmotnostnom pomere inzulín:MK_{magnetit} = 1:1 a 1:2. Vzorky boli inkubované za rovnakých podmienok aké boli použité na prípravu inzulínových amyloidných agregátov. Množstvo vytvorených amyloidných agregátov bolo sledované pomocou viazania ThT alebo ANS meraním intenzity fluorescence, ktorá bola normalizovaná k hodnote fluorescence detegovanej pre inzulínové amyloidné agregáty v neprítomnosti magnetických kvapalín (kontrolná vzorka 100%). Merania boli uskutočnené trikrát, výsledná hodnota predstavuje priemernú hodnotu s priemernou odchýlkou.

Sledovanie depolymerizačnej aktivity magnetických kvapalín na amyloidné agregáty inzulínu
 Inzulínové amyloidné fibrily (10 μM) boli inkubované 24 h s jednotlivými magnetickými kvapalinami vo výslednom hmotnostnom pomere inzulín:MK_{magnetit} 1:1 a 1:2 pri teplote 37°C. Depolymerizačná aktivita bola sledovaná pomocou viazania ThT a ANS a normalizovaná k intenzite fluorescence fibril bez prítomnosti magnetických kvapalín. Merania boli uskutočnené trikrát, výsledná hodnota predstavuje priemernú hodnotu s priemernou odchýlkou.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Amyloidné agregáty zohrávajú významnú úlohu v patogenéze rozličných ochorení. Generická povaha procesu amyloidnej agregácie dovoľuje *in vitro* štúdium vzniku amyloidných štruktúr (Uversky, 2004), čo umožňuje hľadať látky s anti-agregačnými vlastnosťami, ktoré by mohli byť potenciálne využité na liečbu amyloidných ochorení.

V našom štúdiu sme sa zamerali na sledovanie účinku štyroch rôznych magnetických kvapalín pozostávajúcich z magnetitového jadra (koncentrácia magnetitu $\sim 30\text{mg/ml}$) na amyloidnú agregáciu inzulínu. Pre všetky magnetické kvapaliny sme sledovali inhibičný a depolymerizačný účinok na inzulínovú amyloidnú agregáciu pre dve koncentrácie magnetických kvapalín (hmotnostný pomer inzulín:MK_{magnetit} = 1:1 a 1:2). Rozsah amyloidnej agregácie inzulínu bol sledovaný pomocou fluorescence tioflavínu T (ThT) (Obr. 1), ktorého fluorescenčná intenzita je proporcionálna množstvu amyloidných agregátov. Inhibičná a depolymerizačná aktivita bola kvantifikovaná percentuálne k intenzite fluorescence inzulínových fibril bez prítomnosti derivátov (kontrolná vzorka 100%).



Obr. 1. Inhibičný (A) a depolymerizačný (B) účinok magnetických kvapalín na amyloidnú agregáciu inzulínu pre hmotnostný pomer inzulín:MK_{magnetit} = 1:1 a 1:2 sledovaný viazaním ThT. Fluorescenčná intenzita ThT bola normalizovaná k fluorescenčnému signálu inzulínových agregátov bez prítomnosti magnetických kvapalín.

Pozorovali sme, že jednotlivé MK majú rôzny vplyv na množstvo amyloidných agregátov, pričom najvýraznejšia anti-amyloidná aktivita bola pozorovaná pre magnetické kvapaliny MKD a MKF. Pri pomere 1:2 bola pozorovaná asi 75% inhibícia tvorby amyloidov a skoro

55% depolymerizačná aktivita. Anti-amyloidná aktivita bola potvrdená aj pomocou atómovej kontaktnej mikroskopie. V prítomnosti MK sme pozorovali menší počet vzniknutých amyloidných fibríl, ktoré boli kratšie ako amyloidné fibrily vytvorené v neprítomnosti magnetických kvapalín. Pri depolymerizačných experimentoch, prítomnosť magnetických kvapalín viedla k deštrukcii a redukcii množstva amyloidných agregátov.

Pre najviac účinné magnetické kvapaliny (MKD, MKF) sme určili hodnoty IC_{50} a DC_{50} , t.j. hodnotu koncentrácie MK, ktorá je potrebná na 50% redukcii amyloidných agregátov pri inhibičných a depolymerizačných experimentoch. Zistili sme, že pre MKD a MKF sa tieto hodnoty pohybujú v rozmedzí koncentrácií $\mu\text{g/ml}$, ktoré sú porovnateľné s koncentráciou proteínu.

Na základe získaných experimentálnych údajov sme zistili, že magnetické kvapaliny majú schopnosť ovplyvňovať amyloidnú agregáciu inzulínu. Rozsah účinku závisí od vlastností jednotlivých magnetických kvapalín. Najväčšia schopnosť inhibovať tvorbu amyloidných štruktúr a depolymerizovať vzniknuté inzulínové fibrily bola pozorovaná pre magnetickú kvapalinu dispergovanú vo fyziologickom roztoku a magnetickú kvapalinu funkcionalizovanú dextransom. Získané výsledky poukazujú na to, že nanokvapaliny majú potenciál odstrániť problémy spojené s amyloidnou agregáciou inzulínu, prípadne môžu byť využité na terapiu amyloidných ochorení.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená projektami VEGA č. 0077, 0079, Centrom excelentnosti SAV Nanofluid a ŠF EU 26220220005, 26220120033, projektami APVV-0171-10 a APVV SK-RO 0012-10.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Cohen E., Bieschke J., Perciavalle R.M., Kelly J.W., Dillin A., Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science*. 2006; 313:1604-10
- Dobson C.M. The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001; 356:133-45
- Dobson C.M., Karplus M., Protein misfolding, evolution and disease. *Curr. Opin. in Struct. Biol*. 1999. 9:92-101
- Finke J.M., Gross L.A., Ho H.M., Sept D., Zimm B.H., Jennings P.A., Commitment to Folded and Aggregated States Occurs Late in Interleukin-1 β Folding. *Biochemistry*. 2000, 39(50):15633-15642
- Fändrich M., Fletcher M.A., Dobson C.M., Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature*. 2001;410(6825):165-166
- Sorci, M., Grassucci, R. A., Hahn, I., Frank, J., Belfort, G., Time-dependent insulin oligomer reaction pathway prior to fibril formation: Cooling and seeding. *Proteins*. 2009; 77:62-73
- Uversky V.N. a Fink A.L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1698:131-153
- Yumlu, S., Barany, R., Eriksson, M., Röcken, Ch. Localized insulin-derived amyloidosis in patients with diabetes mellitus: a case report. *Human pathology*. 2009. 40:1655-1660

ENDOGENNE FLUOROFÓRY MITOCHONDRÍI AKO DIAGNOSTICKÉ MARKERY ISCHÉMIE

Štefanišínová M., Tomečková V., Bilecová - Rabajdová M., Kriššáková E., Mareková M.
Ústav lekárskej chémie, biochémie, klinickej biochémie a LABMED a.s., LF UPJŠ Košice

ABSTRAKT

V našej práci sme sledovali poškodenie mitochondrií (izolovaných z pečeni experimentálnych potkanov) vplyvom ischémie tenkého čreva pomocou fluorescenčnej analýzy (excitačno - emisná matrice). Na tenkom čreve bola realizovaná 1 hodinová ischémia s následnou 1, 24 hodinovou a 30 dňovou reperfúziou. Mitochondrie izolované z experimentálnych skupín (IR₁, IR₂₄, IR₃₀) boli porovnávané s mitochondriami izolovanými z kontrolných zvierat (K). Zistili sme zníženie obsahu proteínov u všetkých experimentálnych skupín, ktoré bolo identifikované vo fluorescenčnej zóne 1 v porovnaní s kontrolnou skupinou mitochondrií. Fluorescenčná zóna 2 identifikovala nedostatok kyslíka u vzoriek IR₁, IR₂₄ čo sa prejavilo ako nárast intenzity fluorescencie redukovaného nukleotidu NADH + H⁺. Na základe dosiahnutých výsledkov endogénnej fluorescencie mitochondrií z pečeni potkanov bol vypracovaný experimentálny model monitoringu ischémicko/reperfúzneho poškodenia tenkého čreva.

ÚVOD

Ischemicko/reperfúzne (I/R) poškodenie tenkého čreva začína ako syndróm systémovej zápalovej odpovede (Nüssler, N.C. a kol, 2003 a Kimizukaa, K., a kol., 2004) a je spojený s vysokou pravdepodobnosťou mortality (Marshall, J.C, 2006). Včasná diagnostika a stanovenie klinických biomarkerov by mohli prispieť k zníženiu úmrtnosti pri chirurgických zákrokoch. Metabonómika je novou alternatívou štúdia intestinálnej ischémie/reperfúzie I/R, ktorej výsledky by mohli byť použité v kvantitatívnej analýze intestinálneho proteómu u pacientov s I/R poškodením tenkého čreva (Kinross, J., 2009). Ischemicko – reperfúzne poškodenie je jednou z hlavných komplikácií počas transplantácie tenkého čreva. V skorej fáze sa tvoria reaktívne formy kyslíka (ROS), ktoré majú často za následok oxidačné poškodenie (Eismann, T., 2009). Mitochondrie sú indikátorom metabolického stavu (Bagnato, V. S., a kol., 2006), ale sú aj hlavným zdrojom a cieľovým miestom ROS. Mitochondrie zohrávajú hlavnú úlohu v ischemicko/reperfúznom poškodení pečene, keďže dysfunkcia mitochondrií je hlavnou príčinou hepatocelulárnej apoptózy alebo nekrózy (Eismann, T. a kol, 2009). Fluorescenčná spektroskopia je kvantitatívna a rýchla metóda, ktorá poskytuje dôležité diagnostické informácie o hypoxii alebo ischémii tkaniva, a preto by mohla byť využívaná aj na diagnostiku poškodenia tkaniva. Spektroskopický signál môže citlivo indikovať biochemické zmeny, ktoré poukazujú na morfológické zmeny pozorované histologicky (Bagnato, V. S., a kol., 2006).

MATERIÁL A METODIKA

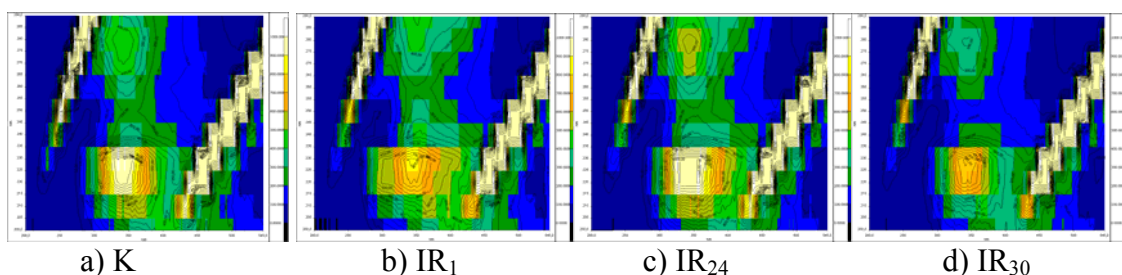
Ako testovaný biologický materiál boli použité mitochondrie izolované z pečene potkana rodu Wistar podľa Johnsona a Lardyho, 1967. Ischémia tenkého čreva bola vyvolaná oklúziou *arteria mesenterici cranialis* po dobu 60 minút v malých atraumatických klipoch pod anestéziou. Kontrolná skupina zvierat (K) bola pripravená rovnakým spôsobom bez oklúzie *arteria mesenterici cranialis*. Po 1 hodinovej ischémii zvieratá následne podstúpili 1 hodinovú, 24 hodinovú a 30 dňovú reperfúziu (R₁, R₂₄ a R₃₀).

Izolované mitochondrie boli rozdelené do kontrolnej (K) a experimentálnych skupín (IR₁, IR₂₄, IR₃₀). Koncentráciu bielkovín v izolovaných mitochondriách (v kontrolnej aj v experimentálnych skupinách) sme stanovili Bradfordovej kolorimetrickou metódou použitím farbiva Coomasie Brilliant Blue G-250 (Bradford, 1976). Na všetky fluorescenčné

merania boli použité mitochondrie riedené (1:1000) s výslednou koncentráciou 2 $\mu\text{g/ml}$. Autofluorescencia vzoriek bola meraná v respiračnom médiu a sukcináte *in vitro*. Na meranie fluorescenčných spektier bol použitý spektrofluorimeter Perkin Elmer model LS 55. Namerané výsledky excitačno-emisných matric boli spracované do grafickej podoby a vyhodnotené pomocou softvéru FLWinLab.

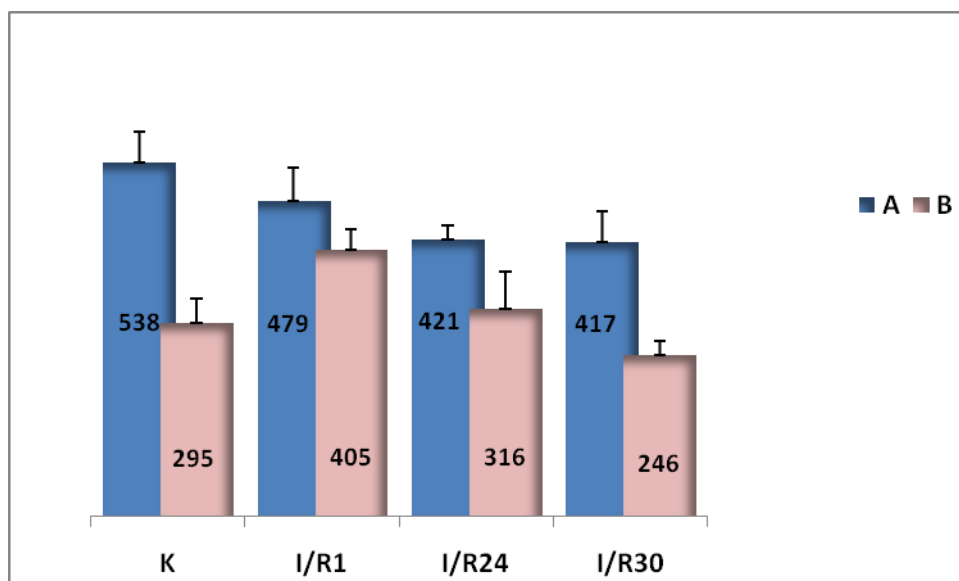
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Prirodzené fluorofóry mitochondrií napr. aromatické aminokyseliny, koenzým NADH a proteíny, umožňujú študovať metabolické zmeny mitochondrií v roztoku respiračného média a substrátu sukcinátu pomocou fluorescenčnej analýzy. Topografické zobrazenia excitačno-emisných matric (EEM) porovnávané navzájom vizuálne (Obr. 1) aj matematicky (Obr. 2), ukázali rozdiely medzi experimentálnymi skupinami mitochondrií (IR_1 , IR_{24} , IR_{30}) navzájom, ako aj s kontrolnou skupinou (K). Vyhodnotením jednoduchých emisných spektier, ktoré vznikli horizontálnym rezom trojdimenzionálnych EEM pri $\lambda = 240 \text{ nm}$, sme odhalili dve fluorescenčné maximá (Obr. 1, 2). Tieto maximá poukazovali na existenciu dvoch fluorescenčných oblastí (Obr. 2), ktoré boli výslednými zobrazeniami intenzity fluorescencie zmesi mnohých endogénnych fluorofórov. Endogénne fluorofóry mitochondrií boli monitorované v rozsahu vlnových dĺžok 220 – 450 nm.



Obrázok 1: Porovnanie excitačno - emisných fluorescenčných topografických zobrazení (EEM) a) kontrolných skupín mitochondrií (K) izolovaných z pečňových buniek potkana s experimentálnymi skupinami mitochondrií izolovanými z pečňových buniek po b) 1 hod ischemii a následnej 1 hod reperfúzií čreva (I/R_1) c) 1 hod ischemii a následnej 24 hod reperfúzií čreva (I/R_{24}) d) 1 hod ischemii a následnej 30 dňovej reperfúzií čreva (I/R_{30}).

Naše výsledky ukázali zníženie množstva proteínov u všetkých experimentálnych skupín mitochondrií, ktoré bolo identifikované vo fluorescenčnej zóne A v porovnaní s kontrolnou skupinou mitochondrií (K). Fluorescenčná zóna B identifikovala nedostatok kyslíka u vzoriek IR_1 , IR_{24} čo sa prejavilo ako nárast intenzity fluorescencie pyridínového redukovaného nukleotidu $\text{NADH}+\text{H}^+$. U vzorky IR_{24} sme pozorovali dostatočne zvýšenie intenzity fluorescencie vo fluorescenčnej zóne B, ale napriek tomu k najväčšiemu poškodeniu mitochondrií došlo u vzorky IR_1 (Obr. 2). Toto zvýšenie u IR_{24} by mohlo poukazovať na nestabilný medzistav, v ktorom dochádza k regeneračnému procesu ischemie a súčasne pretrváva aj ischemické poškodenie, ktoré identifikujeme z podobného grafického zobrazenia skupiny IR_1 v porovnaní s kontrolou K (Obr. 1).



Obrázok 2: Porovnanie intenzít fluorescence fluorescenčných zón A, B, ktoré vznikli ako výsledok fluorescenčných maxim všetkých fluorofórov prítomných v kontrolných (K) a experimentálnych skupinách mitochondrií po 1 hod ischemii a následnej 1 hod reperfúzií čreva (I/R₁), 1 hod ischemii a následnej 24 hod reperfúzií čreva (I/R₂₄) a po 1 hod ischemii a následnej 30 dňovej reperfúzií čreva (I/R₃₀).

Počas 30 dňovej reperfúzie experimentálnych vzoriek IR₃₀ došlo k poklesu intenzity fluorescence redukovaného koenzýmu NADH+H⁺ v porovnaní s kontrolou, čo poukazuje na dostatočné zásobenie mitochondrií kyslíkom a bioenergetickú regeneráciu mitochondrií po ischemickom poškodení (Obr. 2).

Fluorescencia redukovaného NADH+H⁺ dominantne prispieva k celkovej fluorescencii mitochondrií. Redoxný stav pyridínového nukleotidu je markerom diagnostiky metabolického stavu mitochondrií, ale aj celkového energetického stavu bunky (Ebenezar a spol., 2010). Na základe dosiahnutých výsledkov endogénnej fluorescence mitochondrií z pečeni potkanov bol vypracovaný experimentálny model monitoringu ischemicko/reperfúzneho poškodenia tenkého čreva.

POĎAKOVANIE

Projekt bol podporený grantom APVV-0252-07: Syndróm multiorgánového zlyhania po ischemii / trasplantácii tenkého čreva.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bagnato, V. S., Kurachi, C., Ferreira, J., Sankarankutty, A.K., Zucoloto, S., Silva, O.: New photonic technologies for the treatment and diagnosis of hepatic diseases. *New photonic technologies for the treatment and diagnosis of hepatic diseases, Acta Cirurgica Brasileira, Acta Cir. Bras.* 2006, 21: doi: 10.1590/S0102-86502006000700002
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976, 72: 248-254.
- Ebenezar J., Aruna P., Ganesan S.: Synchronous fluorescence spectroscopy for the detection and characterization of cervical cancers in vitro, *Photochemistry and Photobiology.* 2010, 86: 77-86.
- Eismann, T., Huber, N., Shin, T., Kuboki, S., Galloway, E., Wyder, M., Edwards, M.J., Greis, K. D., Shertzer, H.G., Fisher, A.B., Lentsch, A.B.: Peroxiredoxin-6 protects against mitochondrial dysfunction and liver injury during ischemia-reperfusion in mice, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009, 296: 266-274.

- Johnson, D., Lardy, H.: Isolation of liver and kidney mitochondria. *Methods Enzymol.* 1967, 10: 94-96.
- Kimizukaa, K., Nakao, A., Nalesnikb, M.A., Demetris, A.J., Uchiyamac, T., Ruppert, K., Fink, M.P., Stolze, D.B., Murasea, N.: Exogenous IL-6 Inhibits Acute Inflammatory Responses and Prevents Ischemia/Reperfusion Injury after Intestinal Transplantation. *American Journal of Transplantation.* 2004; 4: 482-494.
- Kinross, J., Warren, O., Basson, S., Holmes, E., Silk, D., Darzi, A., Nicholson, J., Kinross, J.: Intestinal ischemia/reperfusion injury: defining the role of the gut microbiome, *Biomarkers in Medicine.* 2009, 3:175-192.
- Marshall, J.C.: Iatrogenesis, inflammation and organ injury: insights from a murine model, *Critical Care.* 2006; 10: 1-2.
- Nüssler, N.C., Müller, A.R., Weidenbach, A., Platz, K.P., Volk, H.D., Neuhaus, P., Nussler, A.K.: Increases Tissue Injury After Selective Intestinal Ischemia/Reperfusion, *Annals of Surgery.* 2003; 238: 49-58.

NOVÝ PRÍSTUP K FLUORESCENČNEJ ANALÝZE A DEFINÍCIH BIOLOGICKÝCH TEKUTÍN VYBRANÝCH ŽIVOČÍŠNYCH DRUHOV

Šteffeková Z.¹, Birková A.¹, Baranová D.², Supuka P.³, Valocký I.⁴, Húska M.⁵, Mareková M.¹

¹Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UPJŠ a Labmed a.s., Košice,;

²Klinika malých zvierat UVLF, Košice, SR; ³Ústav chovu zvierat UVLF, Košice, SR; ⁴Klinika koní, UVLF, Košice, SR; ⁵Klinika ošipaných, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Fluorescenčná spektrofotometria je analytická metóda založená na meraní emitovaného žiarenia určitých molekúl, tzv. fluorofórov, po excitácii žiarením určitej vlnovej dĺžky. V analytických vedách sa preukázala užitočnosť tejto metódy napríklad pri štúdiu molekulárnych interakcií. Moč obsahuje množstvo organických a anorganických zlúčenín, vrátane prirodzene fluoreskujúcich metabolitov. V porovnaní s inými prístrojovými technikami je fluorescenčná spektroskopia považovaná za jednu z najcitlivejších, schopnú rýchlo a jednoducho detegovať rozdiely medzi komplikovanými biologickými materiálmi. Fluorescenčná analýza moču bez pridania akýchkoľvek reagensí je schopná poskytnúť dostatok užitočných informácií na jeho určenie a identifikáciu. V tejto práci sa nám grafickým zjednodušením koncentračných matric podarilo veľmi presne definovať a rozlíšiť vzorky moču vybraných živočíšnych druhov.

ÚVOD

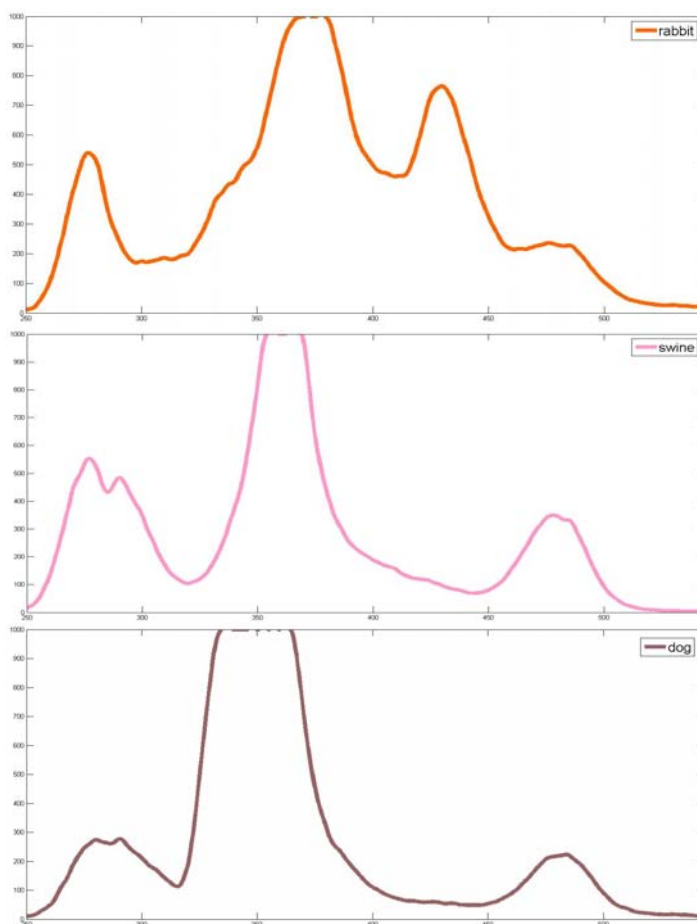
Fluorescencia je charakterizovaná ako vlastnosť niektorých atómov a molekúl absorbovať svetlo pri príslušných vlnových dĺžkach a následne ho emitovať pri vyšších vlnových dĺžkach. Prirodzenou fluorescenciou sa vyznačujú metabolity ako polycyklické aromatické molekuly napr. niektoré vitamíny (kyselina listová), koenzýmy (NADH, FAD), alebo aromatické aminokyseliny a ich deriváty. Tieto látky sú prirodzenou súčasťou biologických tekutín a ich zloženie, koncentrácia a vzájomné interakcie v biologických tekutinách poskytujú komplexný obraz o metabolizme individua. Fluorescenčné metódy založené na snímaní a matematickom spracovaní fluorescenčného signálu natívnych fluorofórov sú typické vysokou senzitivitou, rýchlosťou a jednoduchosťou prevedenia. Vďaka týmto vlastnostiam je fluorescenčná analýza vhodná na profilovanie materiálu, čiže analýzu viacerých látok naraz s čo najmenšími úpravami vzorky alebo úplne bez úprav. Profilovanie bez presnej identifikácie jednotlivých analytov sa označuje ako fingerprinting. Metabolický fingerprint je vhodný predovšetkým na rýchlu klasifikáciu typov vzorky, kontrolu kvality produktu alebo sledovanie súboru zmien. Spektrálne vyhodnotenie sústavy fluorofórov vytvára pre každý materiál jedinečnú spektrálnu mapu – fingerprint, typický pre daný systém. Biologické materiály obsahujú špecifickú kombináciu fluorofórov, čo sa týka kvality aj kvantity a teda ich je na základe fluorescenčných charakteristík možné navzájom od seba odlíšiť (Birková a kol., 2011). Už dlho je známa typická modrozelená fluorescencia moču človeka. Moč ako jednoducho dostupná a z biochemického hľadiska zaujímavá biologická tekutina je vďaka obsahu prirodzených fluorofórov veľmi vhodná na fluorescenčnú analýzu (Dubayová a kol., 2003). Celkovú natívnu fluorescenciu moču je možné graficky znázorniť pomocou koncentračnej matrice vytvorenej zo synchronných spektier vybraných riedení moču (Kušnír a kol., 2005). Koncentračné matrice močov zvierat sú typické pre daný druh (Šteffeková a kol., 2010), ale ich vizuálne porovnávanie a stanovenie „referenčnej matrice“ je problematické. Preto sú na analýzu komplexných fluorescenčných meraní potrebné matematické úpravy. Upravený fluorescenčný profil moču zjednodušuje komplexnú koncentračnú maticu, extrahuje z nej najdôležitejšie informácie a uľahčuje charakterizáciu a vzájomné porovnávanie fluorescenčných vlastností moču.

MATERIÁL A METODIKA

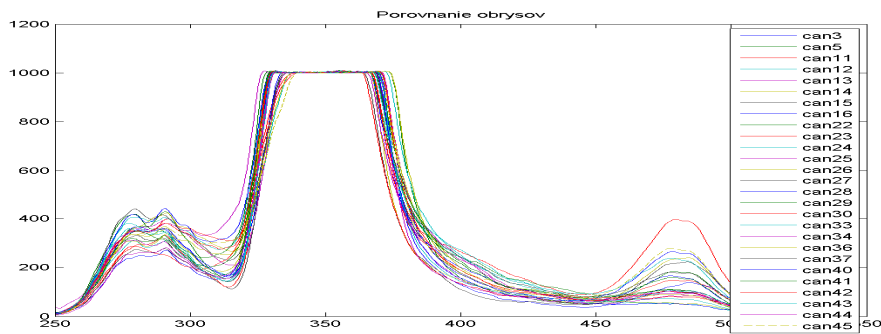
Vzorky moču použité na analýzu boli získané od zdravých zvierat. Od svine a psa sme odobrali vzorky pri spontánnej mikcii a postmortálne punkciou močového mechúra od králik. Všetky vzorky boli ihneď po odbere zmrazené (-18°C) až do ich analýzy. Pred fluorescenčným meraním boli vzorky rozmrazené pri laboratórnej teplote a následne centrifugované 10 minút pri 3500 otáčkach za minútu. Riedenie, meranie a vytváranie koncentračných matric sme vykonávali podľa Kušnír a kol. (2005). Profilová fluorescenčná krivka bola vytvorená vlastnou aplikáciou v prostredí MATLAB®.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Už niekoľko rokov trvá éra biomik, ku ktorým patria napríklad genomika, proteomika alebo transkriptomika. Keďže metabolitov je rádovo menej ako proteínov, RNA alebo DNA, metabolomika, ako veda zaoberajúca sa štúdiom kompletného metabolického profilu, sa javí ako najvhodnejšia a najjednoduchšia stratégia na analýzu biochemických zmien (Birková a kol., 2007). Porovnaním upravených koncentračných matric močov vybraných živočíšnych druhov sa nám s vysokou presnosťou podarilo definovať a navzájom rozlíšiť jednotlivé druhy. Píky v profilovej fluorescenčnej krivke zodpovedajú fluorescenčným centrárom koncentračnej matrice. Týmto grafickým zjednodušením komplexných fluorescenčných fingerprintov močov jednotlivých živočíšnych druhov je podstatne zjednodušené ich vzájomné porovnanie a krivka typická pre jeden druh má charakteristický a veľmi málo variabilný tvar (Obr. 2). Krivky močov rôznych živočíšnych druhov sa odlišujú v počte, polohe aj výške pík zodpovedajúcich fluorescenčným centrárom (Obr. 1).



(Obr. 1) Profilová fluorescenčná krivka moču králik, svine a psa



(Obr. 2) Typické profilové fluorescenčné krivky súboru zdravých psov

Použitím profilovej fluorescenčnej krivky sa nám podarilo definovať vzorky močov získané od rôznych druhov zvierat a navzájom ich rozlíšiť s veľkou presnosťou. Podarilo sa nám vytvoriť grafický záznam fluorescenčných vlastností rôznych močov, ktorý je jednoduchý, druhovo typický, ľahko reprodukovateľný a vhodný na definíciu a vzájomné porovnávanie. Tento prístup k analýze moču dokazuje metabolické rozdiely živočíšnych druhov a poskytuje priestor na podrobnejšie skúmanie metabolizmu živočíchov a možnou diagnostickou aplikáciou.

POĎAKOVANIE
VEGA 1/0402/1

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Birková A, Dubayová K, Kušnir J. Metabolické profilovanie – nový pohľad na hodnotenie biologického materiálu. *Klin.Biochem.Metab.* 2007; 15:, 145-149.
- Birková A, Šteffeková Z, Baranová D, Supuka P, Húska M, Valocký I. Profilová fluorescenčná analýza - nový spôsob rozlišovania biologického materiálu zvierat. *Študentská vedecká a odborná činnosť - 54. ročník : pri príležitosti svetového roka veterinárskej medicíny 2011 : zborník abstraktov - Košice : Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, 2011; 30.*
- Dubayová K, Kušnir J, Podracká E. Diagnostic monitoring of urine by means of synchronous fluorescence spectrum. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2003; 55:111 –119.
- Kušnir J, Dubayová K, Lešková L, Lajtár M. Concentration Matrices-Solutions for fluorescence Definition of Urine. *Analytical letters* 2005; 38:1559-1567.
- Pilotná štúdia definovania biologického materiálu zvierat fluorescenčnou profilovou Šteffeková Z, Birková A, Supuka P, Mareková M, Baranová D, *Biomedicínske postupy : zborník referátov z vedeckej pracovnej konferencie s medzinárodnou účasťou : Košice, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika 2010; 79-84.*

ANALÝZA, VARIABILITA A POROVNANIE GENÓMOV BAKTERIOFÁGOV MSF1 A MSF2 S VYBRANÝMI ENTEROKOKOVÝMI PROFÁGMAMI

Šuľák M., Fecuová V.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Bakteriofágy MSF1 a MSF2 patria medzi bakteriofágy infikujúce bakteriálny druh *Enterococcus faecalis*. Pre podrobnejšiu charakterizáciu genómov týchto bakteriofágov sa pripravili génové banky MSF, MSF2 fágovej DNA v hostiteľskom organizme *Escherichia coli*. Fragmenty DNA (>600 kbp) sa klonovali v klonovacom vektore systému pUC118/EcoRI a pUC118/HincII. Čiastočne sa sekvenovalo 30 fragmentov fágovej DNA MSF1 a MSF2. Génové úseky kódovali hypotetické proteíny, konzervované proteínové domény, časti lytického modulu (MSF1), stavebné moduly a iné. Všetky získané sekvencie vykazujú významnú podobnosť (viac ako 90%) s už známymi fágovými alebo profágovými sekvenciami, čo naznačuje limitovanú variabilitu a všeobecnú rozšírenosť enterokokových bakteriofágov. Bioinformatickou analýzou dostupných sekvencií bakteriofágov *Enterococcus* spp. sme potvrdili limitovanú variabilitu týchto bakteriofágov.

ÚVOD

Vírusy sú obligátne vnútrobunkové parazity, ktoré pre svoju reprodukciu potrebujú hostiteľský organizmus, pretože im chýba reprodukčný aparát. Samostatnú skupinu vírusov tvoria bakteriofágy. Ich výskyt je podmienený prítomnosťou baktérií a teda môžeme ich nájsť v každom prostredí. Najbohatším zdrojom je more, kde ich koncentrácia dosahuje 10^4 - 10^7 fágových častíc 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).

V súčasnosti sú bakteriofágy zaujímavé z medicínskeho hľadiska. Už v roku 1920 sa začali využívať ich antibakteriálne účinky. Fágová terapia sa osvedčila pri liečbe sepsí (otrave krvi), gastroenterologických ako aj nozokomiálnych infekcií.

Hoci je *E. faecalis* prirodzenou súčasťou ľudského gastrointestinálneho traktu, je zároveň najrozšírenejším druhom spomedzi enterokokov spôsobujúcich infekcie u človeka. Patogénom sa stáva pri výskyte mimo tráviaceho traktu a v dnešnej dobe je *E. faecalis* hlavnou príčinou nozokomiálnych infekcií.

MATERIÁL A METODIKA

Bakteriálne kmene ich kultivácia a analýza DNA:

Kmene *E. coli* K12 ER2267 a ER1821 rástli na médiu Luria-Bertani (LB) pri teplote 37 °C. Agarové platne boli pripravené pridaním agaru do živného média. Kmeň 47/3 pôvodne klasifikovaný ako *Streptococcus bovis*, po 16S rRNA analýze sa preklasifikoval na kmeň *Enterococcus faecalis* 47/3 (Nigutová a kol., 2008). Kmeň rástol na živnom médiu Todd-Hewitt pri teplote 37 °C. Po kultivácii sa kmeň *E. faecalis* 47/3 infikoval fágovým roztokom a DNA izolovala klasickým postupom podľa Maniatis a kol. (1989).

Klonovanie a sekvenčná analýza:

Totálna fágová DNA sa parciálne poštiepila reštrikčnými endonukleázami *HindIII*, *HincII*, *EcoRI*, *Tsp509I* a *SspI*. Fragmenty DNA s veľkosťou nad 600 kbp sa vyextrahovali z gélu a ligovali do vektorových systémov pUC118/*EcoRI* a pUC118/*HincII*. Ligačné zmesi sa použili na transformáciu kompetentných buniek *E. coli* ER1821 a *E. coli* ER2267.

Transformačné zmesi sa vysiali na LB platne s obsahom ampicilínom ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Individuálne transformanty sa po inkubácii podrobili ďalšej analýze. Získané rekombinanty sa kompletne sekvenovali a sekvencie sa analyzovali použitím blast algoritmu (Altschul a kol., 1997) dostupného na <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> a genómy enterokokových bakteriofágov sme porovnávali za účelom nájdenia homológnych génov použitím *genomeblast* analýzy dostupnej na <http://bioinfo-srv1.awh.unomaha.edu/genomeblast>. Za homologické sme považovali tie gény, ktoré v oblasti predstavujúcej minimálne 50% génu vykázali identitu viac ako 30%.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Aj keď je druh *E. faecalis* intenzívne študovaný ako významný patogén, existuje relatívne málo informácií o genómoch bakteriofágov infikujúcich tento druh. V tejto chvíli (júl 2011) je v GenBank databáze dostupných 8 sekvencií kompletných genómov bakteriofágov *Enterococcus* spp. Veľkosti genómov sú v rozmedzí 16,9 až 142,1 kbp. Porovnaním genómov jednotlivých bakteriofágov sme klasifikovali bakteriofágy do troch skupín korelujúcich s veľkosťou genómu (Tab. 1). Do prvej Skupiny patria malé bakteriofágy

Tab. 1. Porovnanie genómov bakteriofágov *Enterococcus* spp.

Group/Phage	Genome Size (kbp)	Number of genes	No. of homologues in genome of							
			EFRM31	EFAP-1	phiFL1A	phiFL2A	phiFL3A	phiFL4A	phiEf11	phiEF24C
I / EFRM31	16,9	23	23	20	4	4	0	0	2	14
I / EFAP-1	21,1	24	20	24	0	0	5	3	2	15
II / phiFL1A	38,8	61	4	0	61	57	54	17	35	15
II / phiFL2A	36,3	63	4	0	57	63	56	26	32	16
II / phiFL3A	39,6	64	0	5	54	56	64	13	35	21
II / phiFL4A	37,9	55	0	3	17	26	13	55	10	10
II / phiEf11	42,8	65	2	2	35	32	25	10	65	22
III / phiEF24C	142,1	226	14	15	15	16	21	10	22	226

(EFRM31 a EFAP-1). Do druhej skupiny radíme fágy s tzv. strednou veľkosťou genómu (phiFL1A, phiFL2A, phiFL3A, phiFL4A a phiEf11). Posledná skupina je tvorená fágom phiEF24C s najväčším genómom. Najviac homológnych génov obsahujú fágy patriace do prvej skupiny – skupiny s najmenším genómom. Pri celkovom počte génov 24 obsahujú až 20 homológov. Bakteriofágy II. skupiny vykazujú 40 – 80 % zastúpenie homológov v rámci skupiny. Zaujímavo vyzerá bakteriofág phiEF24C, ktorý má najväčšiu veľkosť genómu a obsahuje približne iba 6,5 % homológnych génov – teda génov, ktoré sa nachádzajú na genóme iných bakteriofágov *Enterococcus* spp. Prekvapujúco relatívne veľmi vysoký počet homológov sa dá nájsť medzi skupinou I. a III. teda fágmi s najmenším a najväčším genómom. Nepodarilo sa nám však detegovať gén, ktorý by bol prítomný vo všetkých doteraz

známych bakteriofágov *Enterococcus* spp. Najviac unikátnych génov kóduje najväčší bakteriofág phiEF24C, čo zrejme súvisí s faktom, že veľké bakteriofágy sú len minimálne závislé na enzýmoch kódovaných hostiteľom a na rozdiel od menších bakteriofágov si kódujú všetky enzýmy potrebné pre expresiu fágového genómu.

Tab. 2: Porovnanie sekvencií bakteriofágov MSF1 a MSF2 s kompletnými genómami fágov *Enterococcus* spp.

Phage/Clone	Best Hit (%) in Group		
	Group I	Group II	Group III
MSF1 / R1	YP_002727879.1 31%	ZP_05599192.1 96%	YP_001504317.1 35%
MSF1 / R2	YP_002727878.1 41%	ZP_05474704.1 98%	YP_001504139.1 42%
MSF1 / R3	YP_002727878.1 28%	ZP_05581577.1 95%	YP_001504281.1 32%
MSF1 / R4	YP_002727874.1 35%	ZP_05585423.1 98%	YP_001504139.1 42%
MSF1 / R5	YP_002727892.1 53%	ZP_07551638.1 100%	YP_001504300.1 31%
MSF1 / R6	YP_002727876.1 34%	CBL31291.1 92%	YP_001504164.1 32%
MSF1 / R7	YP_002727878.1 27%	ZP_05594005.1 99%	YP_001504164.1 32%
MSF1 / R8	YP_002727890.1 46%	EFU91160.1 95%	YP_001504295.1 53%
MSF1 / R9	YP_002727879.1 22%	ZP_07551625.1 98%	YP_001504317.1 35%
MSF1 / R10	YP_002727892.1 40%	ZP_05585395.1 81%	YP_001504115.1 30%
MSF2 / R11	No significant similarity found	ZP_06744756.1 99%	YP_001504150.1 41%
MSF2 / R12	YP_002727878.1 36%	ZP_07566898.1 96%	YP_001504269.1 78%
MSF2 / R13	YP_002727877.1 42%	ACZ63857.1 100%	YP_001504209.1 34%

Pri genomickej analýze bakteriofágov MSF1 a MSF2 izolovaných z mlieka sme analyzovali približne 30 rekombinantov predstavujúcich približne % genómu bakteriofága MSF1 a % genómu bakteriofága MSF2. Algoritmom blastx sme pozorovali významnú podobnosť nukleotidových sekvencií nami pripravených rekombinantov s časťami iných bakteriofágov u všetkých klonov. Naše bakteriofágy patria medzi stredne veľké bakteriofágy a v súlade s tým vykazovali významnú podobnosť (minimálne 90%) bakteriofágom II skupiny (Tab. 2). Len v jednom prípade sa pozorovala podobnosť ku génom bakteriofágov II. a III. skupiny vyššia než 70%. Analýza bakteriofága MSF2 ukázala, že je prakticky identický s bakteriofágom phiFL1A izolovaným z klinických kmeňov *E. faecalis* (Yasmin a kol., 2009) Bakteriofág MSF1 okrem podobnosti ku genómom lýtických bakteriofágov *E. faecalis* vykazuje významnú sekvenčnú podobnosť a rovnakú lokalizáciu jednotlivých génov ako profágy identifikované v kompletne sekvenovaných genómoch baktérií *E. faecalis* CH188 a ATCC4200 a je pravdepodobne samostatne žijúcim analógom týchto profágov. Z našich výsledkov vyplýva, že enterokokové bakteriofágy patria medzi menej variabilné fágy s ubiquitárnym výskytom.

POĎAKOVANIE

Autor ďakuje za finančnú podporu grantu VEGA 2/0066/11.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25,389-402 (1997).
- 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., Pristaš P., Javorský P.: Lack of GATC sites in the genome of *Streptococcus bovis* bacteriophage F4. *Res. Microbiol.*, 151, 2000, 285-289.
- 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.
- Yasmin A., Kenny J., Shankar J., Darby A., Hall N., Edwards C., Horsburgh M.: Comparative Genomics and Transduction Potential of *Enterococcus faecalis* Temperate Bacteriophages. *J Bacteriol.* 2009, 52:559-64.

ANTIOXIDAČNÝ STATUS BROJLEROV A NOSNÍC PO PRÍJME *THYMUS VULGARIS* DIÉTOU

Jana Takáčová

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

ABSTRAKT

Thymus vulgaris je významným antioxidantom. Používa sa na zmiernenie chorôb týkajúcich sa oxidačného stresu. Cieľom práce bolo sledovať vplyv 0,05% koncentrácie éterického oleja *Thymus vulgaris* prijatého v krmive na integritu črevného epitelu kurčiat a na niektoré parametre antioxidačného statusu v mukóze tenkého čreva, obličkách, pečeni, krvi, plazme a na fagocytárnu aktivitu v krvi kurčiat. Vzorky krvi a tkanív boli odobraté po 12 týždňoch kŕmenia nosníc a po 5 týždňoch kŕmenia brojlerov. Koncentrácia malondialdehydu v obličke bola signifikantne vyššia u nosníc oproti brojlerom a aktivity glutatión peroxidázy v čreve, krvi a obličke a tioredoxín reduktázy v čreve a obličke boli tiež signifikantne vyššie u nosníc. Fagocytárna aktivita a index fagocytárnej aktivity boli taktiež signifikantne zvýšené u nosníc, podobne ako u vyššie uvedených parametrov. Pri sledovanej koncentrácii tymiánu bol nameraný vyšší elektrický odpor steny duodena u nosníc v porovnaní so skupinou brojlerov. Výsledky ukazujú, že prídavok tymiánovej silice v koncentrácii 0,05% do krmiva zvyšuje antioxidačnú ochranu organizmu nosníc pri dlhodobom podávaní významnejšie ako tomu je pri krátkodobom podávaní u brojlerov.

ÚVOD

Autori uvádzajú antimikrobiálny (Fabian a kol., 2006) a antioxidačný (Faix a kol., 2007) účinok éterických olejov, ich schopnosť pôsobiť protizápalovo (Juhás a kol., 2008) a vychytávať voľné radikály. Fenolové zložky éterického oleja ovplyvňujú tiež antioxidačnú aktivitu a majú spazmolytický účinok (Sacchetti et al., 2005). Antioxidačná ochrana zabezpečuje aktívne odstraňovanie reaktívnych voľných radikálov pomocou antioxidantov (Faitweather-Tait a kol., 2010). Tymián obsahuje veľké množstvo účinných látok (silice, triesloviny, horčiny, flavony), aromatické kyseliny, triterpenické kyseliny. Používa sa vo farmaceutickom a potravinárskom priemysle. Intestinálna absorpcia živín je vysoko ovplyvnená zdravotným, teda funkčným stavom črevného traktu. Jedným z potenciálnych toxických faktorov črevného poškodenia sú kyslíkové radikály v bunkách. Tieto superoxidové radikály indukujú početné iné poškodzujúce voľné radikály, ako napr. hydroxyl radikály a peroxid vodíka, ktoré sú schopné zapríčiniť progresívny rozpad buniek (Harman, 1984). Voľné radikály môžu poškodiť bunky črevnej steny a spôsobiť poruchu absorpcie a transportu živín. Integrita (celistvosť) črevnej steny môže byť vyjadrená transepiteliálnou elektrickou rezistenciou (TEER).

Cieľom experimentu bolo študovať antioxidačný status brojlerov a nosníc po príjme tymiánovej silice diétou, a jeho vplyv na integritu duodenálnej steny a na fagocytárnu aktivitu u kurčiat.

MATERIÁL A METÓDY

30 kurčiat hybridného plemena ROSS 308 (Párovské Háje, Nitra) s priemernou živou hmotnosťou 45 g a 27 jednoduchých kurčiat plemena ISA BROWN s priemernou živou hmotnosťou 40 g bolo rozdelených do troch skupín. Kurčatá boli chované na podstielke z drevených hoblín. Teplota a svetelný režim boli upravené pre požiadavky daného plemena a vekovej kategórie kurčiat. Zvieratá mali voľný prístup k vode a krmivu. Kontrolné skupiny boli kŕmené štandardnými diétami (brojlery- BIOFED – KKZ BR2, Kolárovo, Slovensko; nosnice - HYD – 04/b, Spiš s.r.o, Slovensko). Druhé kontrolné skupiny boli kŕmené diétou obohatenou o slnečnicový olej v koncentrácii 1%. Pokusné skupiny dostávali diétu obohatenú

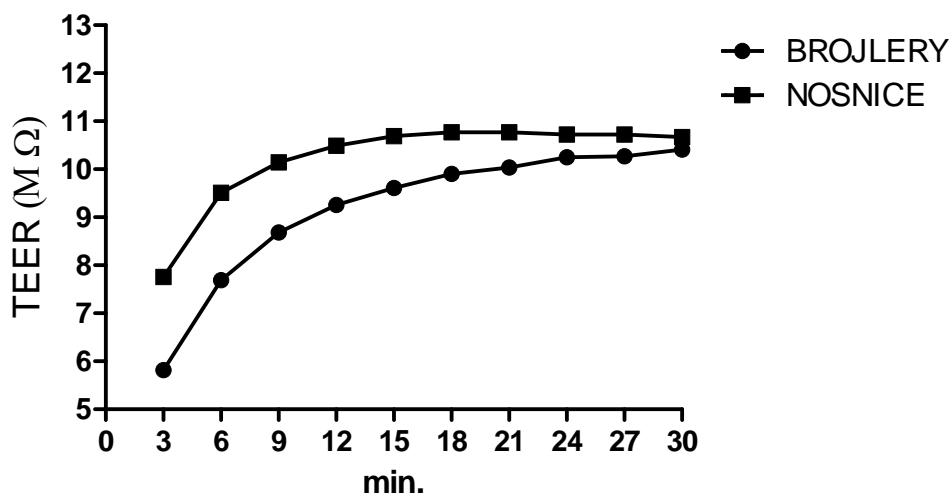
o tymián v koncentrácii 0,05 %. Tymiánová silica (HANUS, Nitra, Slovenská republika) pre brojlery aj nosnice bola zriedená so slnečnicovým olejom, pričom výsledná koncentrácia slnečnicového oleja v diéte bola 1%. Vzorky krvi a tkanív nosníc boli odobraté po 12 týždňoch kŕmenia, u brojlerov po 5 týždňoch kŕmenia. Elektrický odpor (TEER) duodenálneho tkaniva bol meraný v modifikovanom komôrkovom systéme, založenom na princípe Ussing Chambers. Aktivita glutatión peroxidázy (GPx) v pečeni a epiteli duodena bola meraná podľa Paglia a Valentine (1967). Stanovenie aktivity thioredoxín reduktázy (TrxR) bolo robené metódou podľa Holmgrena a Bjornstenda (1995). 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). Fagocytárna aktivita bola meraná podľa Hrubíška (1981).

Na štatistické vyhodnotenie výsledkov bol použitý nepárový t - test. Výsledky sú uvedené ako priemerná hodnota \pm SEM.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kurčatá počas celej doby kŕmenia boli čulé a nevykazovali žiadne klinické príznaky ochorenia. Pri 0,05% koncentrácii tymiánu u nosníc bol nameraný signifikantne vyšší elektrický odpor bunkovej steny v 3. – 18. minúte v porovnaní so skupinou brojlerov (Graf 1.).

Graf 1. Hodnoty elektrického odporu duodena u nosníc a brojlerov v jednotlivých minútach



Vyššie hodnoty TEER u nosníc s 0,05% koncentráciou *Thymus vulgaris* v diéte oproti brojlerom si vysvetľujeme zabezpečením integrity duodenálneho tkaniva a tým zníženým prestupom iónov. Dôkazom našej hypotézy môže byť histologické vyšetrenie črevnej steny. Koncentrácia GPx v čreve, obličke, krvi a koncentrácia TRxR v čreve a obličke bola signifikantne vyššia u nosníc oproti brojlerom v skupine s prídavkom tymiánovej silice v koncentrácii 0,05% (Tab.1). GPx a TRxR patria medzi enzýmové antioxidanty, ktoré majú významné zastúpenie v intracelulárnom priestore. Hlavná úloha GPx je katalyzácia redukcie H₂O₂ a organických hydroperoxidov na príslušný alkohol alebo príslušný alkohol alebo vodu a oxidovaný tripeptid glutatiónu. Obličky obsahujú vysokú koncentráciu plazmovej pGSH-Px

mRNA a sú hlavným miestom produkcie tohto enzýmu (Avissar a kol, 1994). TRxR spolu s glutatiómom a ďalším systémom udržiava voľné –SH skupiny (Arner a Holmgren, 2006). Pomocou NADPH, ktorý slúži ako donor elektrónov, redukuje TRxR tioredoxín. Samotný tioredoxín potom zvyšuje redukčnú kapacitu enzýmov, ktoré sa zúčastňujú antioxidantných aktivít (Mustacich a Powis, 2000). TRxR je nevyhnutná pre reguláciu proteínov v bunkách, zabezpečenie rovnováhy v redoxnom systéme a na zmiernenie škôd spôsobených kyslíkovými radikálmi generovanými pomocou oxidačnej fosforylácie v mitochondriách (Conrad, 2004). Z nameraných výsledkov vyplýva, že tymiánová silica pridaná do krmiva v koncentrácii 0,05% zvyšuje antioxidantnú ochranu organizmu u dlhodobo kŕmených kurčiat nosivého plemena v porovnaní s krátkodobo kŕmenými brojlermi. Koncentrácia MDA v obličkách u nosníc bola vyššia pri prídavku tymiánovej silice v koncentrácii 0,05% oproti brojlerom. Aktivita antioxidantných enzýmov môže stúpať v odpovedi na oxidačný stres (Dvorská, 2007). Z nameraných hodnôt vyplýva, že pri 0,05% koncentrácii tymiánu je zabezpečená antioxidantná ochrana buniek, keďže aj hladina GPx v obličkách bola signifikantne vyššia u nosníc v porovnaní s brojlermi. MDA je ukazovateľom intenzity lipidovej peroxidácie. Lipidová peroxidácia je pokladaná za hlavný ukazovateľ úrovne oxidačného stresu (Yagi, 1998). Meranie tvorby reaktívnych substancií kyseliny tiobarbitúrovej (TBARS – thiobarbituric acid reactive substances), ako sú hydroperoxydy a aldehydy, je najpoužívaným hodnotením intenzity lipidovej peroxidácie (Armstrong a Browne, 1994).

Tabuľka 1. Aktivita glutatión peroxidázy (GPx) a tioredoxín reduktázy (TRxR) a koncentrácia malondialdehydu (MDA)

PARAMETER	BROJLER	NOSNICA
GPx v čreve (U.g ⁻¹ bielkovín)	15,00±0,09 ^a	19,81±1,59 ^b
GPx v obličke (U.g ⁻¹ bielkovín)	7,54±1,15 ^a	24,41±2,04 ^b
GPx v krvi (U.g ⁻¹ hemoglobínu)	92,23±11,49 ^a	127,7±7,62 ^b
MDA v obličke (nmol.g ⁻¹ bielkovín)	48,7±4,1 ^a	74,7±4,4 ^b
TRxR v čreve (U.g ⁻¹ bielkovín)	0,19±0,05 ^a	0,57±0,09 ^b
TRxR v obličke (U.g ⁻¹ bielkovín)	0,05±0,02 ^a	0,25±0,03 ^b

Rozdielne písmena horného indexu znamenajú signifikantné rozdiely (P<0,05); hodnoty sú priemery ± SEM, n=9.

Fagocytárna aktivita ako aj index fagocytárnej aktivity boli signifikantne zvýšené u nosníc pri 0,05% prídavku tymiánovej silice oproti brojlerom (Tab.2). Fagocytóza je proces typický pre bunky, ktoré označujeme ako fagocyty, medzi ktoré patria neutrofilny, eozinofily, monocyty a tkanivové makrofágy. Podávanie tymiánového éterického oleja stimulovalo fagocytárnu aktivitu leukocytov u nosníc. Keďže fagocytárna aktivita je len jedným z imunitných parametrov, môžeme iba predpokladať, že 0,05% koncentrácia tymiánu v krmive môže zlepšovať imunitné funkcie organizmu.

Tabuľka 2. Fagocytárna aktivita a index fagocytárnej aktivity u nosníc a brojlerov kŕmených bazálnou diétou s 0,05% koncentráciou tymiánovej silice.

Parameter	BROJLER	NOSNICA
Fagocytárna aktivita (%)	40,13±0,61 ^a	42,25±0,75 ^b
Index fagocytárnej aktivity	2,10±0,05 ^a	2,35±0,05 ^b

Rozdielne písmena horného indexu znamenajú signifikantné rozdiely (P<0,05); hodnoty sú priemery ± SEM, n=9.

Z našich výsledkov vyplýva, že tymianová silica pridaná do krmiva významnejšie zvyšuje antioxidačnú ochranu kurčiat pri dlhodobejšom podávaní, a tiež pozitívne vplýva na imunitný systém kurčiat.

POĎAKOVANIE

Tento výskum bol podporovaný grantovou agentúrou pre podporu vedy VEGA No. 2/0010/10.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Armstrong D, Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Free Radicals In Diag Med.* 1994; 366: 43-58.
- Arner ES, Holmgren A. The thioredoxin system in cancer. *Eur J Biochem.* 2006; 16: 420-426.
- Avissar N, Kerl EA, Baker SS, Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase mRNA and protein in human cell lines. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 309: 239-246.
- 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.
- Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippel S, Banjac A, Schneider M, Beck H, Hatzopoulos AK, Just U, Sinowatz F, Schmahl W, Chien KR, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function *Mol Cell Biol.* 2004; 24 (21): 9414-23
- Dvorská JE, Pappas AC, Karadas F, Speake BK, Surrai PF. Protective effect of modified glucomannans and organic selenium against antioxidant depletion in chicken liver due to T-2 toxin - contaminated feed consumption. *Comp Biochem Physiol.* 2007; 45: 582-587.
- Fabian D, Sabol M, Domaracká K, Bujňáková D. Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicol In Vitro.* 2006; 20: 1435-45.
- Faix Š, 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.
- Faitweather-Tait S.J, Collings R, Hurst R. Selénium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr* 2010; 91:1484-91.
- Harman D, Armstrong D, Sohal, R.S, Cutter, R.S, Slater, T.F.: Free radicals and the origination, evolution, and present status of the free radical theory of aging. In *Free radicals in molecular biology, aging and diseases.* Raven Press, New York 1984; 27.
- Holmgren, A., Bjornstedt, M.: Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 1995; 252: 199-208.
- 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.
- Mustacich DG, Powis. Thioredoxin reductases. *Biochem J.* 2000; 346: 1-8.
- Paglia D.E, Valentine W.N. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70: 158-169.
- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry.* 2005; 91: 621-632.
- Yagi K. Single procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Free Radic and Antiox Protocols.* 1998; 108: 101-106.

VPLYV HYPODYNAMIE NA KOSTI PANVOVEJ KONČATINY JAPONSKEJ PREPELICE

Tarabová L., Cigánková V.

Katedra anatómie, histológie a fyziológie, Ústav histológie a embryológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Mikrogravitácia indukuje morfológické, biochemické a funkčné zmeny na rozličných tkanivách a orgánoch, preto je jedným z limitujúcich faktorov nielen pri pobyte zvierat a ľudí vo vesmíre, ale aj u dlhodobu ležiacich pacientov. V práci sme porovnávali zmeny v mikroskopickú a submikroskopickú štruktúru špongiózneho kostného tkaniva, zmeny v uhľovaní kostí panvových končatín a vylučovanie vápnika trusom u japonských prepelíc na 56., 63. a 90. deň trvania simulovanej mikrogravitácie - hypodynamie. V závislosti od dĺžky trvania hypodynamie sa v kostnom tkanive zvyšoval počet osteoklastov, zväčšovala sa plocha ich kontaktu s kostnými trámami, znižoval sa počet osteoblastov, v porovnaní s kontrolnou skupinou. V dôsledku atrofie svalov panvových končatín dochádzalo ku výrazným kontraktúram kĺbov. Zároveň sme zaznamenali zvýšené vylučovanie vápnika trusom.

ÚVOD

Japonská prepelica je vďaka svojej adaptabilite na zmenené podmienky, nenáročnosti, krátkemu reprodukčnému cyklu a vysokej produkcii biologicky hodnotného mäsa a vajec ideálnym pokusným zvieratom pre experimenty vo vesmíre a slúži aj pre simulovanú mikrogravitáciu na Zemi – hypodynamiu (Boďa, 1997; Baumgartner a Hetényi, 2001; Škrobánek a Hrančová, 2003). Cieľom našej práce bolo objasniť vplyv hypodynamie na katabolické procesy prebiehajúce v kostnom tkanive.

MATERIÁL A METODIKA

Pokusy boli robené na Ústave biochémie a genetiky SAV v Ivanke pri Dunaji v súlade so zákonmi a predpismi Slovenskej republiky (Korim a kol., 2003). Do jednotlivých pokusov dĺžky trvania hypodynamie bolo zaradených po 10 kurčiat samčieho pohlavia. Kohútiky vo veku 2 dní po vyliahnutí boli fixované v špeciálnych závesných konštrukciách a po dosiahnutí dospelosti v špeciálnych košielkach tak, aby sa panvovými končatinami nemohli dotýkať zeme, ale aby mali prístup ku krmivu a ku vode *ad libitum*. Kontrolné zvieratá boli umiestnené v rovnakej miestnosti v boxoch, kŕmené rovnakou kŕmnom zmesou *ad libitum* ako pokusné. 56 a 63 dňovú hypodynamiu prežili všetky kohútiky, 90 dňovú hypodynamiu prežilo len 6 jedincov. Zvieratá boli usmrtené dekapitáciou a bezprostredne po usmrtení boli odobraté celé panvové končatiny, ktoré boli uložené do 4% neutrálneho formaldehydu a pripevnené na pevnú podložku tak, aby vo fixačnom roztoku nedošlo k zmene uhľovania končatín. Röntgenogramy sme zhotovili pomocou digitálneho röntgenového prístroja GIRTH 400 z lateromediálnej projekcie. Vzorky pre transmisnú elektrónovú mikroskopiu sme odoberali z proximálnej časti stehrovej kosti a ihneď po odobratí fixovali 3% -tným glutaraldehydom v 0.1 M kakovylátovom pufrí a odvápnené v EDTA. Po postfixácii v 1% OsO₄ a odvodnení v vzostupnej acetónovej rade sme vzorky zaliali do Durcupanu (ACM Fluka). Po polymerizácii zalievacej hmoty sme vzorky pre svetelnú mikroskopiu (SEM) rezali na poloténkové rezy o hrúbke 1 µm na ultramikrotóme Tesla BS 490, ofarbili toluidínovou modrou (1% roztok tetraboritanu sodného) a pozorovali svetelným mikroskopom Jenamed 2. Mikrografie sme urobili pomocou digitálneho mikrofotografického zariadenia. Ultratenké rezy pre TEM sme dvojfázovo kontrastovali uranyl acetátom a citrátom olovnatým a pozorovali na elektrónovom mikroskope Tesla BS 500. Zhotovené elektónogramy sme po ich spracovaní vyhodnotili. Trus japonských prepelíc sme odoberali od kontrolnej skupiny, ako aj od pokusných zvierat v sledovaných časových intervaloch. Vzorky boli predušené na

konštantnú hmotnosť pri 150 °C a sušené v Muflovej peci pri 500°C. Získaný popol bol rozpustený v HCl, vápnik sa vyzrážal ako šťavelan vápenatý. Zrazenina bola rozpustená v kyseline sírovej a následne titrovaná manganistanom draselným.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V špongióznom kostnom tkanive experimentálnych prepelíc sme po hypodynamii trvajúcej 56, 63 a 90 dní pozorovali oproti kontrolným zvieratám výrazné zmeny. So zvyšujúcou sa dĺžkou trvania hypodynamie sa zvyšovalo množstvo osteoklastov nasadajúcich na povrch kostných trámčov, ich veľkosť a rezorbčná aktivita. Mali veľké množstvo euchromatických jadier (6-12), ktoré sa nachádzali v blízkosti Golgiho komplexu a v cytoplazme obsahovali lyzozómy a veľké množstvo vakuol. V mieste kontaktu s kostným trámcom vytvárali osteoklasty tzv. „ruffled border“ – kefkovitý lem tvorený mikroklkami, ktorý zväčšuje aktívnu rezorbčnú plochu osteoklastu. Množstvo mikroklkov sa zvyšovalo s pribúdajúcou dĺžkou trvania hypodynamie. Osteoklasty svojou rezorbčnou činnosťou vytvárali na povrchu kostných trámčov priehlbinky, tzv. Howshipove lakúny. Osteoblasty, ktoré sa podieľajú na tvorbe kostného tkaniva sa na 56. deň nachádzali na povrchu kostných trámčov v malých skupinkách a mali kubický tvar. Na 63. deň sme osteoblasty nachádzali len sporadicky ako jednotlivé bunky a po hypodynamii trvajúcej 90 dní neboli osteoblasty prítomné vôbec. Množstvo vápnika vylúčeného trusom pokusných zvierat bolo oproti kontrolným zvieratám vyššie v každej fáze hypodynamie a malo tendenciu sa s pribúdajúcimi dňami experimentu zvyšovať. Röntgenograficky sme potvrdili výrazné zmeny v uhľovaní päťového kĺbu a mierne zmeny v kolennom kĺbe na 63. a 90. deň hypodynamie, ktoré nastali vplyvom absencie záťaže a pohybu a atrofiou kostrovej svaloviny. Najvýraznejšie boli kontraktúry kĺbov *ossa digitorum pedis*. Na röntgenogramoch sme zároveň pozorovali zmeny v denzite kostného tkaniva vyšetřovaných končatín, kedy kosti pokusných zvierat vykazovali nižšiu rádioopacitu ako kontroly, čo svedčí o demineralizácii kostí pokusných zvierat.

Vplyv simulovanej mikrogravitácie a mikrogravitácie vo vesmíre na organizmus živočíchov skúmalo viacero autorov. Zaznamenali nielen negatívny vplyv mikrogravitácie na vápnikový metabolizmus ľudí (Whedon a Rambaut, 2005; Smith a kol., 1999), prestavbu kostí (Saxena a kol., 2007; Fleming a kol., 2002), ale aj na zmeny v ultraštruktúre kostných buniek (Rodionova kol., 2002). Morfológické zmeny v štruktúre špongiózneho kostného tkaniva a v ultraštruktúre kostných buniek japonských prepelíc vo svojich experimentoch pozorovali aj Zibrín a kol. (2003) a Almášiová a kol. (2010). Nepriaznivý vplyv simulovanej mikrogravitácie na Zemi a vo vesmíre pozorovali aj v iných tkanivách a orgánoch, napr. v tenkom čreve (Lenhardt a kol., 2001), v slezine, pľúcach a kostnej dreni (Zibrín a kol., 2005) v obličkách a semenníkoch (Cigánková a kol., 1993) a v kostrovej svalovine (Holovská a kol., 2010).

POĎAKOVANIE

Práca je súčasťou riešenia grantovej úlohy VEGA 1/0334/09.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Almášiová, V., Holovská, K., Cigánková, V., Tarabová, L., Račková, E.: Vplyv simulovanej mikrogravitácie na štruktúru kostného tkaniva japonských prepelíc. Martinský morfológický zborník 2010, p. 5-7.
- Baumgartner J., Hetényi L.: Prepelica japonská. Výskumný ústav živočíšnej výroby. vydavateľstvo Slovenský chov, Nitra, 2001, s.7-8
- Bod'a K.: Kozmická biológia a veterinárna medicína. Slov.Vet. Čas. 22, 3. 1997, s.125-126
- Cigánková, V., Kočišová, J., Bod'a, K., Tomajková, E., Dadasheva, O.A.: Morphological changes in tissue of the testes and kidneys in Japanese quail exposed to microgravity. Acta Veterinaria Brno. 1993; vol. 62, p. 69-71.

- Holovská K., Almášiová V., Cigánková V., Tarabová L., Račková E.: Ultraštruktúralne zmeny v kostrovej svalovine japonských prepelíc vplyvom hypodynamie. *Martinský morfológický zborník* 2010, Martin, 2010
- Fleming, O.S., Reddy, S., Mantalaris, A.: Advances in the study of bone development in simulated microgravity. *European Cells and Materials*. 2002; vol. 4, p.123-124.
- Korim P., Bugarský A., Juriš P., Hadbavný M., Korimová M.: Ochrana pokusných zvierat. *Slov. Vet. Čas.* 28, 1, 2003, s.10-12
- Lenhardt, L., Cigánková, V., Zibrín, M., Kočíšová, J., Tomajková, E., Sabo, V., Boďa, K., Dadasheva, O.A., Gurieva T.S., Mozeš Š.: Functional development of small intestine of Japanese quail hatched on Mir orbital station. *Acta Vet Brno*. 2001; vol. 70, p. 127-131.
- Rodionova N.V., Oganov V.S., Zolotova N.V.: Ultrastructural changes in osteocytes in microgravity conditions. *Adv. Space Res.* 30, 2002, s.765-770
- Saxena, R., Pan, G., Mc Donald, J.M.: Osteoblast and osteoclast differentiation in modeled microgravity. *Ann NY Acad Sci*.2007; vol. 1116, p. 494-498.
- Smith S.M., Wastney M.E., Morukov B.V., Larina I.M., Nyquist L.E., Abrams S.A., Taran E.N., Shih Ch.Yu, Nillen J.L., Davis-Street J.E., Rice B.L., Lane H.W.: Calcium metabolism before, during and after a 3-mo space flight: kinetic and biochemical changes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1999; vol. 277, p. 1-10.
- Škrobánek, P., Hrančová, M.: Adaptability of Japanese quail chicks to conditions of simulated weightlessness. *Acta Veterinaria Brno*. 2003; vol. 2, p. 347-351.
- Whedon G.D., Ramabaut P.C.: Effects of long – duration space flight on calcium metabolism: Review of human studies from Skylab to present. *Acta Astronautica*. 2005; vol.58, p. 59-81
- Zibrín, M., Boďa, K., Cigánková, V., Kočíšová, J., Tomajková, E., Komorová, T., Ssabo, V., Pivko, J.: Long-term experimental hypodynamy affects the structure of spongy bone and osteoclasts in Japanese quail. *Acta Veterinaria Brno*.2003; vol. 72, p. 143-149.
- Zibrín, M., Cigánková, V., Kočíšová, J., Tomajková, E., Komorová, T., Boďa, K., Weissman, P., Dadasheva, O.A., Gurieva, T.S.: Effect of short –term space flight on structure of liver, lungs, bone and bone marrow of Japanese quail hatched on orbital station Mir. *Acta Veterinaria Brno*. 2005; vol.74, p. 167-174.

KULTIVOVATEĽNÉ MIKROORGANIZMY Z GUANA NETOPIEROV

Vandžurová A.¹, Bačkor P.², Júdová J.², Pristaš, P.^{1,2}

¹ Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

² Univerzita Mateja Bela, Katedra biológie a ekológie, Banská Bystrica

ABSTRAKT

Baktérie rodu *Staphylococcus* sú gram-pozitívne, v prírode veľmi rozšírené baktérie známe ako významné ľudské a zvieracie patogény. V našej práci sme analyzovali tridsať náhodne vybraných bakteriálnych izolátov pochádzajúcich z guana netopierov. Všetky izoláty sú tvorené grampozitívnymi koagulázo negatívnymi kokmi a pomocou MALDI-TOF boli zväčša identifikované ako *S. nepalensis*, doteraz známy len z klinického materiálu, a tak guáno nahromadené v blízkosti alebo priamo v ľudských obydliaoch a stavbách môže predstavovať významné zdravotné riziko.

ÚVOD

Netopiere (*Chiroptera*) sú tajuplné, veľmi zaujímavé a ešte aj dnes málo poznané živočíchy, patriace medzi cicavce. Na Slovensku bolo doteraz zaznamenaných 28 druhov netopierov. Majú množstvo veľmi špecifických adaptácií, sú jediné cicavce so schopnosťou aktívneho letu a majú aj ďalšiu výnimočnú vlastnosť – echolokáciu, vďaka ktorej dokážu viesť "nočný život" a tak plniť nenahraditeľnú funkciu v prírode. Vďaka svojej nočnej aktivite počas dňa netopiere využívajú pestrú škálu či už prirodzených ako napr. podzemné dutiny, jaskyne, bútl'avé stromy, ale aj antropogénnych úkrytov ako veže kostolov a dutiny v domoch. Vďaka opakovanému a dlhoročnému používaniu tých istých úkrytov sa na dne úkrytov tvorí z výlučkov netopierov (moč a trus) guáno. Zloženie guána sa môže meniť v závislosti na potrave netopierov, lovných biotopoch a iných faktoroch. V tejto chvíli existuje len minimum informácií o mikroflóre tráviaceho traktu netopierov. Väčšina informácií pritom pochádza z neotropickej oblasti (Klite, 1965). Štúdiu mikroflóry netopierov paleoarktickej oblasti sa venovali napr. Di Bella a kol. (Di Bella a kol., 2003), ktorí v truse 6 druhov netopierov identifikovali celkom 29 bakteriálnych druhov, prevažne patriacich do čeľade *Enterobacteriaceae*, len výnimočne sa identifikovali druhy čeľadi *Pseudomonadaceae* a *Enterococcaceae*.

Vzhľadom na to, že netopiere môžu slúžiť ako rezervoár, alebo prenášače viacerých zoonóz, cieľom tejto práce bolo rozšíriť poznatky o kultivovateľných mikroorganizmoch pochádzajúcich z guana netopierov.

MATERIÁL A METODIKA

Pôvod a spracovanie vzoriek. Guano z netopierov použité v našich experimentoch pochádzalo z guána letnej kolónie netopierov z veže kostola v Slovenskej Ľupči. Vzorky guána sa odobrali v decembri 2010 a analyzovali na prítomnosť kultivovateľných baktérií. Ku vzorke guána (0,5 g) sa pridalo 10 ml sterilného PBS a po 20 min inkubácií za intenzívneho miešania sa aliquoty vysiali na neselektívne kultivačné médium (Nutrient agar No. 2, Oxoid, USA). Kultivácia prebiehala v aeróbných podmienkach pri 37 °C v teplovzdušnom termostate. Podľa normy ISO 10390 sa stanovilo pH guána.

Základná mikrobiologická charakterizácia izolátov. Po opakovaných subkultiváciách a kontrole na čistotu sa vybrané izoláty identifikovali pomocou analýzy proteínových profilov prístrojom MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Germany) a farbením podľa Grama. Produkcia koagulázy sa testovala s použitím koagulázového testu firmy Fluka-Analytical (Fluka, Switzerland).

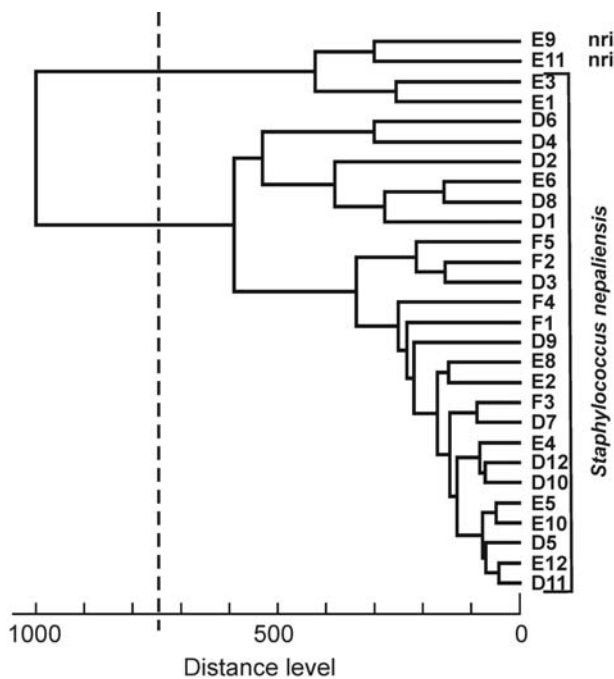
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vzorky guána pochádzali z letnej kolónie netopierov z veže kostola v Slovenskej Ľupči a po odobraní vzoriek boli transportované na Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV v Košiciach a analyzované. V tejto lokalite sa pravidelne vyskytuje kolónia do 200 exemplárov netopierov (samičky s juvenilnými jedincami) s výraznou prevahou druhu *Myotis myotis* (85%) sprevádzaného druhom *M. blythii* (Bačkor a kol., 2007). Odhadovaný vek vzoriek guána je 6 rokov. Guáno je tvorené hnedými až čiernymi peletami o veľkosti 5 – 8 mm, pH guána sme stanovili na 7,75. Kultiváciou na neselektívnom agare sme získali kultivovateľné baktérie s početnosťou približne $2 \cdot 10^5$ cfu na gram guána. Po opakovaných subkultiváciách sme tridsať náhodne vybraných izolátov identifikovali pomocou MALDI-TOF analýzy (Obr. 1).

AnalyteName	AnalyteID	Organism(best match)	ScoreValue	Organism(second best match)	ScoreValue
1 (+)	D1	Staphylococcus nepalensis	1.894	Staphylococcus nepalensis	1.8
2 (++)	D2	Staphylococcus nepalensis	2.003	Staphylococcus nepalensis	1.712
3 (+)	D3	Staphylococcus nepalensis	1.96	not reliable identification	1.552
4 (+)	D4	Staphylococcus nepalensis	1.9	not reliable identification	1.559
5 (+)	D5	Staphylococcus nepalensis	1.964	not reliable identification	1.572
6 (++)	D6	Staphylococcus nepalensis	2.052	not reliable identification	1.564
7 (+)	D7	Staphylococcus nepalensis	1.731	not reliable identification	1.595
8 (+)	D8	Staphylococcus nepalensis	1.764	not reliable identification	1.585
9 (+)	D9	Staphylococcus nepalensis	1.865	not reliable identification	1.552
10 (-)	D10	not reliable identification	1.602	not reliable identification	1.599
11 (+)	D11	Staphylococcus	1.721	not reliable	1.40

Obr. 1: Identifikácia izolátov z guána netopierov pomocou MALDI-TOF analýzy

Len dva izoláty (E9 a E11) sa nepodarilo touto metódou identifikovať. Všetky ostatné izoláty sa pomocou MALDI-TOF identifikovali ako *Staphylococcus nepalensis*. Porovnanie MALDI-TOF profilov študovaných izolátov potvrdilo, že prevažná väčšina izolátov sa grupuje do skupiny patriacej k druhu *S. nepalensis* (Obr. 2). Len 4 izoláty v skonštruovanom strome vykazovali genetickú vzdialenosť väčšiu ako 750, ktorá je arbitrárne stanovená ako maximálna vzdialenosť medzi izolátmi toho istého druhu (Dubois a kol., 2010). Mimo skupinu *S. nepalensis* sa zaradili izoláty E9 a E11, neidentifikovateľné pomocou MALDI-TOF a izoláty E3 a E1, taktiež identifikované ako *S. nepalensis*, ale s nízkym identifikačným skóre. Podobné ako izoláty skupiny *S. nepalensis* sú však aj tieto 4 izoláty tvorené koaguláza negatívnymi grampozitívnymi kokmi rastúcimi v zhlukoch, čo je typickou črtou stafylokokov.



Obr. 2: MSP Dendrogram izolátov z guána netopierov vytvorený porovnaním MALDI-TOF profilov

Nezvyčajne nízka variabilita kultivovateľných baktérií v študovanej vzorke guána je v príkrom rozpore s variabilitou baktérií v truse netopierov (Di Bella a kol., 2003) ako aj s výsledkami štúdií mikrobiológie guána. Vo väčšine štúdií sa však autori venovali guánu z jaskýň. Kyslé guáno z tohto prostredia (pH 3.5) osídľujú najmä mikromycéty (*Actinomyces*, *Arcanobacteria* a *Nocardia*), menej baktérie - našli sa v ňom zástupcovia rodov *Pseudomonas*, *Streptomyces* a *Stenotrophomonas* (Elhottová a kol., 2003). V podobnej štúdií z Poľska (Konieczna a kol., 2007) pozorovali v guáne netopierov; včítane druhu *M. myotis*; využívajúcich ako letné úkryty kostoly aj *S. aureus* a *S. sciuri*, ale dominantnými kultivovateľnými druhmi boli podľa ich pozorovania gramnegatívne enterobaktérie. Samotná izolácia druhu *S. nepalensis* z guána netopierov je prekvapujúca. Baktérie rodu *Staphylococcus* sú grampozitívne v prírode často sa vyskytujúce baktérie, vyskytujúce sa aj v tráviacom trakte a fekáliách teplokrvných živočíchov (Simonová a kol., 2006). Mnohé z nich sú známe ako významné ľudské a zvieracie patogény. Rod *Staphylococcus* obsahuje najmenej 38 druhov (Vernozy-Rozand a kol., 2000). Druh *S. nepalensis* je relatívne novým druhom tohto rodu. Bol pôvodne izolovaný a popísaný z kôz so zápalom pľúc z Himalájskeho regiónu (Spergser a kol., 2003) a v súčasnosti je o ňom dostupných len minimum informácií. Okrem pôvodného záchytu bol tento druh detegovaný len raz a to z humánneho klinického materiálu (Nováková a kol., 2006). Z našich experimentov vyplýva, že väčšina kultivovateľných baktérií z guána netopierov patrí k druhu *S. nepalensis*. Keďže tento druh je aj humánnym patogénom, môže tak guáno nahromadené v blízkosti, alebo priamo v ľudských obydlíach a stavbách predstavovať významné zdravotné riziko. Ďalšie experimenty, ako napr. testovanie biologickej aktivity a antibiotickej rezistencie sú potrebné pre posúdenie rizík spojených s výskytom guána.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla za podpory grantu VEGA 2/0066/11.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bačkor P., Uhrin M., Benda P.: Netopiere v podkrovných priestoroch Horehronia (stredné Slovensko). *Vespertilio*. 2007, 11: 3–12.
- Di Bella C., Piraino C., Caracappa S., Fornasari L., Violani C., Zava B.: Enteric microflora in Italian Chiroptera. *Journal of Mt. Ecology*. 2003, 7: 221–224.

- Dubois D., Leyssene D., Chacornac J.P., Kostrzewa M., Schmit P.O., Talon R., Bonnet R., Delmas J.: Identification of a Variety of *Staphylococcus* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48: 941–945.
- Klite P.D.: Intestinal bacterial flora and transit time of three neotropical bat species. *J. Bacteriol.* 1965, 90: 375-379.
- Konieczna I., Durlík M., Kwinkowski M., Domański J., Markowski J., Kaca W.: Properties of bacterial microflora isolated from bat guano. *Medycyna Wet.* 2007, 63: 1626-1629.
- Nováková D., Pantůček R., Petrás P., Koukalová D., Sedláček I.: Occurrence of *Staphylococcus nepalensis* strains in different sources including human clinical material. *FEMS Microbiol Lett.* 2006, 263: 163-168.
- Simonová M., Stropfová V., Marciňáková M., Lauková A., Vesterlund S., Moratalla M.L., Bover-Cid S., Vidal-Carou C.: Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. In *Meat Sci.* 2006, 73: 559-564.
- Spergser J., Wieser M., Täubel M., Rosselló-Mora R.A., Rosengarten R., Busse H.J.: *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003, 53: 2007-2011.
- Vernozy-Rozand C., Mazuy C., Meugnier H., Bes M., Lasne Y., Fiedler F., Etienne J., Frenay J.: *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000, 50: 1521-1527.

VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV

2011

Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Bod'ua

VI. ročník

Zostavil: MVDr. Dušan Fabian, PhD.

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

Tlač: Ústav vedeckých informácií a knižnica UVLF, Komenského 73, 04001 Košice

Prvé vydanie. 160 strán.

ISBN 978-80-968618-7-3

EAN 9788096861873

ISBN 978-80-968618-7-3