



# **VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2012**

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

**VII. ročník**

**Košice, 10.-11. september 2012**



Zborník príspevkov prezentovaných na  
Seminári doktorandov venovanom pamiatke akademika Boďu  
10.-11. september 2012  
v Košiciach

*Usporiadali:*

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach  
Ústav fyziológie hospodárskych zvierat Slovenskej akadémie vied  
Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta  
Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu, Východoslovenská pobočka

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

**ISBN 978-80-968618-9-7**

# OBSAH

- 1. SALAMANDRA ŠKVRNITÁ (*SALAMANDRA SALAMANDRA*) NA SLOVENSKU: ANALÝZA VÝSKYTOVÝCH ÚDAJOV V MAKRO A MEZO POHĽADE**  
Balogová M.<sup>1</sup>, Kaňuk J.<sup>2</sup>, Kaľavský J.<sup>3</sup> & Uhrin M.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Ústav biologických a ekologických vied, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice  
<sup>2</sup> Ústav geografie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice 11
- 2. DRUHOVÁ SKLADBA A SEZÓNNA DYNAMIKA LARIEV KOMÁROV V KOŠICKEJ KOTLINE**  
Bocková, E., Kočišová, A., Hlavatá, H.  
<sup>1</sup> Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach  
<sup>2</sup> Slovenský hydrometeorologický ústav Bratislava, Regionálne stredisko Košice 15
- 3. DETEKCIA VIRULENTNÝCH FAKTOROV, MOBILNÝCH GÉNOVÝCH ELEMENTOV A ATB REZISTENCIE U TELACÍCH KMEŇOV *E.COLI***  
Drugdová Z.  
Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice 19
- 4. DETEKCIA RESTRIKČNO-MODIFIKAČNÝCH SYSTÉMOV U VYBRANÝCH MLIEČNYCH BAKTÉRIÍ**  
Dubíková K.<sup>1,2</sup>, Vandžurová A.<sup>2</sup>, Šulák M.<sup>2</sup>,  
<sup>1</sup> Univerzita P.J Šafárika v Košiciach, Katedra biochémie, Košice,  
<sup>2</sup> Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice 23
- 5. ZMENY V AKTIVITE ANTIOXIDAČNÝCH ENZÝMOV V HLAVNÝCH METABOLIZUJÚCICH ORGÁNOCH POTKANOV PO APLIKÁCI VYSOKOTUKOVEJ DIÉTY A VYBRANÝCH ÚČINNÝCH LÁTOK**  
Fejercáková, A.<sup>1</sup>, Vašková, J.<sup>1</sup>, Salaj, R.<sup>2</sup>, Vaško, L.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Ústav lekárskej chémie a klinickej biochémie a LABMED, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice  
<sup>2</sup> Ústav experimentálnej medicíny, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice 26
- 6. ZHODNOTENIE A POROVNANIE CITLIVOSTI METÓDY STAR A NAT TESTU NA TETRACYKLÍNOVÉ ANTIBIOTIKÁ**  
Gondová, Z., Kožárová, I.  
Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach 30
- 7. VPLYV OBEZITY, LIPIDOVÝCH ANOMÁLIÍ NA ATEROGENITU V SKUPINE UNIVERZITNÝCH ŠTUDENTOV**  
Hertelyová, Z., Vaško L.  
Ústav lekárskej a klinickej biochémie a LABMED, a. s., LF UPJŠ Košice 34
- 8. ANTIPROLIFERATÍVNY ÚČINOK SYNTETICKÝCH DERIVÁTOV INDOLOVÝCH FYTOALEXÍNOV**  
Chripková M., Pilátová M., Drutovič D., Zigo F.<sup>1</sup>, Kutschy P.<sup>2</sup>, Mirossay L., Mojžiš J.  
Ústav farmakológie, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice  
<sup>1</sup> Ústav chovu zvierat, UVLF, Košice  
<sup>2</sup> Katedra organickej chémie, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice 38

- 9. DRUHOVÁ VARIABILITA A VLASTNOSTI ENTEROKOKOV A STAFYLOKOKOV Z BOBROV (*CASTOR FIBER*)**  
 Imrichová, J.<sup>1</sup>, Kandričáková, A.<sup>1</sup>, Belzecki, G.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice  
<sup>2</sup>Kielanowski Inštitút fyziológie a výživy živočíchov, Poľská akadémia vied, Jablona 42
- 10. VPLYV ŤAŽKÝCH KOVOV A INFEKCIE *ASCARIS SUUM* NA T LYMFOCYTY MYŠÍ**  
 Jalčová M., Dvorožňáková E.  
 Parazitologický ústav, SAV, Košice 46
- 11. SELEKCIA GRAM-POZITÍVNYCH BAKTÉRIÍ Z TRUSU PŠTROSOV**  
 Kandričáková A., Imrichová J.  
 Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice 50
- 12. AKUMULÁCIA RESVERATROLU A JEHO METABOLITOV V MAMÁRNOM NÁDOROVOM TKANIVE PO CHEMICKEJ INDUKČII RAKOVINY MLIEČNEJ ŽIAZY POTKANOV**  
 Kisková T.<sup>1</sup>, Maier-Salamon M.<sup>2</sup>, Thalhammer T.<sup>3</sup>, Kassayová M.<sup>1</sup>, Jäger W.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Katedra fyziológie živočíchov, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice  
<sup>2</sup>Katedra patofyziológie a alergológie, Centrum patofyziológie, Lekárska univerzita, Viedeň  
<sup>3</sup>Katedra klinickej farmácie a diagnostiky, Prírodovedecká fakulta, Viedenská univerzita, Viedeň 54
- 13. PERCEPCIA A PRIORITIZÁCIA FARIEB U DENNÝCH MOTÝĽOV (*LEPIDOPTERA: PAPILIONOIDEA, HESPERIOIDEA*)**  
 Kočíková L.  
 Univerzita P.J. Šafárika v Košiciach, Katedra fyziológie živočíchov, Košice 58
- 14. VPLYV EXPOZÍCIE TRIAZOLOVÝCH PESTICÍDOV NA AKTIVITU BOVINNEJ BUTYRYLCHOLÍNESTERÁZY**  
 Kolesárová, V., Šiviková, K.  
 Ústav genetiky, Katedra biológie a genetiky UVLF, Košice 61
- 15. PRIESKUM PARAZITOFAUNY HOLUBOV (*Columba livia domestica*) V URBÁNNEJ OBLASTI MOLDAVY n/BODVOU**  
 P. Komorová<sup>1</sup>, A. Kočíšová<sup>1</sup>, B. Víchová<sup>2</sup>, Z. Hurníková<sup>1</sup>, E. Hap<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Ústav parazitológie UVLF v Košiciach  
<sup>2</sup>Parazitologický ústav SAV v Košiciach 65
- 16. MAPOVANIE DYNAMIKY ZMIEN V POŠKODENEJ MIECHE**  
 Korimová A., Vanický I.  
 Neurobiologický ústav, SAV, Košice 68
- 17. ÚLOHA POLO-LIKE 1 KINÁZY POČAS PRVEJ MITÓZY PREIMPLANTAČNĚHO EMBRYA**  
 Kovaříková V.  
 Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice 71
- 18. ELEKTROFORETICKÁ ANALÝZA VYBRANÝCH HADÍCH JEDOV**  
 Kravcová Z., Petrilla V., Sopková D.  
 Katedra anatómie, histológie a fyziológie, Ústav fyziológie, UVLF, Košice 75

- 19. DYNAMIKA VYBRANÝCH MARKEROV ENERGETICKÉHO METABOLIZMU DOJNÍC**  
 Krempaský M., Maskal'ová I., Bujňák L., Vajda V.  
*Katedra výživy, dietiky a chovu zvierat, UVLF, Košice* 79
- 20. RAMUS OVARICUS – VETVA VAJEČNÍKOVEJ ŽILY U POTKANA**  
 Krešáková L., Petrovová E., Maloveská M.  
*Katedra anatómie, histológie a fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice* 83
- 21. PROANGIOGÉNNY ÚČINOK ERYTROPOETÍNU A STIMULÁCIA JEHO TVORBY PÔSOBNÍM 17  $\beta$ -ESTRADIOLU V OVARIÁLNYCH NÁDOROVÝCH BUNKÁCH**  
 Kriška J., Solár P., Fedoročko P.  
*Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied* 87
- 22. POROVNANIE METÓD TESTOVANIA FAGOCYTÁRNEJ AKTIVITY VO VETERINÁRSKEJ IMUNOLÓGII**  
 Kšonžeková P., Mudroňová D., Forbes E., Tkáčiková L.  
*Ústav imunológie, Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice* 90
- 23. VPLYV OBEZITY NA PREIMPLANTAČNÝ VÝVIN EMBRYA**  
 Kubandová J.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 94
- 24. FENOTYP PROLIFERUJÚCICH BUNIEK VO VÝSTELKE CENTRÁLNEHO KANÁLA MIECHY POTKANA V SKOROM POSTNATÁLNOM OBDOBÍ**  
 Kútna V., Ševc J., Matiašová A., Daxnerová Z.  
*Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach* 97
- 25. TESTOVANIE ÚČINNOSTI VČELÍCH PROBIOTICKÝCH LAKTOBACILOV V IN VIVO PODMIENKACH**  
 Kuzyšinová K.<sup>1</sup>, Mudroňová D.<sup>2</sup>, Molnár L.<sup>1</sup>, Toporčák J.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Klinika vtákov a exotických zvierat, UVLF, Košice*  
<sup>2</sup>*Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice* 101
- 26. VPLYV DEPREENYLU NA SELEKTÍVNE VULNERABILNÉ OBLASTI MOZGU**  
 Lalkovičová M.<sup>1</sup>, Mihálik J.<sup>2</sup>, Danielisová V.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Neurobiologický ústav, SAV, Košice*  
<sup>2</sup>*Ústav anatómie, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice* 105
- 27. VPLYV VETERNEJ KALAMITY NA SPOLOČENSTVÁ PÔDNYCH ČLÁNKONOŽCOV NA KALAMITNÝCH PLOCHÁCH SMREKOVÉHO LESA V TANAP-E**  
 Lóšková J.<sup>1</sup>, Čuchta P.<sup>1</sup>, Miklisová D.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>*Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice*  
<sup>2</sup>*Parazitologický ústav, SAV, Košice* 108
- 28. MOLEKULOVÝ SKRÍNING MITOCHONDRIÁLNYCH COX1 HAPLOTYPOV CHORVÁTSKÝCH POPULÁCIÍ *FASCIOLOIDES MAGNA* METÓDOU HRM**  
 Malčická M.<sup>1</sup>, Bazsalovicsová E.<sup>1</sup>, Radvánszky J.<sup>2</sup>, Králová-Hromadová I.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, Košice*  
<sup>2</sup>*Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Vlárská 5, Bratislava* 112

- 29. POROVNANIE EFEKTIVITY ZNAČENIA PROLIFERUJÚCICH BUNIEK PO INTRAPERITONEÁLNOU A PERORÁLNOU PODANÍ BRDU U POTKANA.**  
Matiašová A., Ševc J, Mikeš J., Jendželovský R., Kútna V., Daxnerová Z., Fedoročko P.  
*Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach* 115
- 30. PODIEL NEKASPÁZOVEJ DRÁHY V MECHANIZME PROGRAMOVANEJ BUNKOVEJ SMRTI PO FOTODYNAMICKEJ TERAPII S HYPERICÍNOM**  
Mikešová L., Mikeš J., Valeková B., Vargová J., Fedoročko P.  
*Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ Košice* 120
- 31. MEMBRÁNOVÉ ZNAČENIE MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK KOSTNEJ DRENE V PODMIENKACH *IN VITRO***  
Nagyová M., Slovinská L., Gruľová I., Čížková D.  
*Neurobiologický ústav SAV, Košice* 124
- 32. LOKALIZÁCIA A EXPRESIA RECEPTOROV ANGIOTENZÍNU II V SPINÁLNYCH GANGLIÁCH**  
Oroszová Z, Hricová E, Lukáčová N, Pavel J.  
*Neurobiologický ústav SAV, Košice* 128
- 33. HYPERICÍN, CISPLATINA A ICH KOMBINOVANÝ ÚČINOK V BUNKÁCH OVARIÁLNEHO ADENOKARCINÓMU**  
Papčová Z., Jendželovský R., Kovaľ J., Mikeš J., Hil'ovská L., Fedoročko P.  
*Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach* 133
- 34. BIZARNÉ FORMY ŽIVOTA**  
Renčko A., Špalková M., Toropila M., Ondrašovičová S., Daňová D.  
*Katedra biológie a genetiky, Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVLF* 137
- 35. ANTIOXIDAČNÝ ÚČINOK ŠALVIOVEJ SILICE U KURČIAT**  
Ryzner M.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 141
- 36. RELATÍVNA ABUNDANCIA DRUHOV Z *OBSOLETUS* KOMPLEXU STANOVENÁ MULTIPLEX PCR ITS-1 A ITS-2 SEGMENTU A DETEKCIA BTV A EHDV**  
Sarvašová A.<sup>1</sup>, Goffredo M.<sup>2</sup>, Kočišová A.<sup>1</sup>, Sopoliga I.<sup>3</sup>  
<sup>1</sup> *Ústav parazitológie UVLF Košice*  
<sup>2</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell Abruzzo e del Molise „G. Caporale“ Teramo, Italy*  
<sup>3</sup> *UZ UVLF Rozhanovce* 145
- 37. BAKTERIÁLNE SPOLOČENSTVO DRENÁŽNEJ VODY SKLÁDKY HNEDEHO KALU V ŽIARI NAD HRONOM**  
Stramová, Z.<sup>1,2</sup>, Júdová, J.<sup>3</sup>, Remenár, M.<sup>3</sup>  
<sup>1</sup> *Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice*  
<sup>2</sup> *Katedra biochémie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice*  
<sup>3</sup> *Katedra biológie a ekológie, Univerzita Mateja Bela, Banská Bystrica* 149
- 38. VÝSKYT OCHORENÍ U OKRASNÝCH DRUHOV RÝB IMPORTOVANÝCH Z ÁZIE**  
Šmiga E.<sup>1</sup>, Košuthová L.<sup>1</sup>, Košuth P.<sup>1</sup>, Letková V.<sup>2</sup>, Mihok T.<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup> *Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, UVLF, Košice*  
<sup>2</sup> *Ústav parazitológie, UVLF, Košice* 152



39. **ÚČINOK *THYMUS VULGARIS* NA ZDRAVOTNÝ STAV TRÁVIACEHO TRAKTU U HYDINY**  
 Takáčová J.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 155
40. **GDF-15 AKO FAKTOR POTENCIÁLNE OVPLYVŇUJÚCI ÚČINNOSŤ FOTODYNAMICKEJ TERAPIE S HYPERICÍNOM**  
 Valeková, B., Mikeš, J., Vargová, J., Mikešová, L., Fedoročko, P.  
*Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta Univerzity P. J. Šafárika v Košiciach* 159
41. **EKTOMIKROFLÓRA KLIÉŠTIKA VČELIEHO (*Varroa destructor*)**  
 Vaníková S.<sup>1,2</sup>, Nosková A.<sup>3</sup>, Júdová J.<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice*  
<sup>2</sup>*Katedra genetiky, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice*  
<sup>3</sup>*Katedra biológie a ekológie, Univerzita Mateja Bela, Banská Bystrica* 163
42. **VPLYV FAKTOROV PROSTREDIA NA VARIABILITU OČKÁŇOV RODU *EREBIA***  
 Varcholová K.  
*Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied, Katedra zoológie* 166
43. **REGULÁCIA IMUNITNEJ ODPOVEDE PERITONEÁLNYCH MAKROFÁGOV POČAS INFEKCIE CESTÓDOM *MESOCESTOIDES VOGAE* U MYŠÍ**  
 Vendeľová M., Hrčková G.  
*Parazitologický ústav, SAV, Košice* 169
44. **VPLYV RÔZNYCH ZDROJOV MANGÁNU V DIÉTE NOSNÍC NA PRODUKCIU A VYBRANÉ PARAMETRE VAJEC**  
 Venglovská K.<sup>1</sup>, Mellen M.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>*Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice*  
<sup>2</sup>*Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Nitra* 173



# SALAMANDRA ŠKVRNITÁ (*SALAMANDRA SALAMANDRA*) NA SLOVENSKU: ANALÝZA VÝSKYTOVÝCH ÚDAJOV V MAKRO A MEZO POHĽADE

Balogová M.<sup>1</sup>, Kaňuk J.<sup>2</sup>, Kaľavský J.<sup>3</sup> & Uhrin M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav biologických a ekologických vied, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Moyzesova 11, 040 01 Košice

<sup>2</sup> Ústav geografie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Jesenná 5, 040 01 Košice

## ABSTRAKT

Salamandra škvrnitá patrí medzi bežné druhy obojživelníkov na Slovensku. Obýva prevažne zalesnené oblasti (najmä staré bučiny) v stredných polohách. Absentuje štúdiá, ktorá by skompletizovala roztrúsene údaje o rozšírení salamandry na Slovensku. Excerptovali sme dáta zo 70 publikovaných prác a prístupných internetových zdrojov. Databáza tiež obsahuje nepublikované údaje z ISTB Štátnej ochrany prírody. Spracovaním v Quantum GIS (1.7.0) a záverečnou sumarizáciou sa potvrdila preferencia lesného biotopu. Najčastejší výskyt druhu bol zaznamenaný v nad. výške 200-800 m.n.m. Určili sme tiež najfrekventovanejšie orografické celky a klimatickú oblasť s najpočetnejším záznamom lokalít. Detailný pohľad na habitat salamandry škvrnitej bol umožnený výskumom realizovaným od októbra 2006 - apríla 2010 na území LHC Železná studienka. Celková hustota populácie v záujmovom území predstavovala 0,77 ex/ha. Určili sme veľkosť home range u jedincov s viac ako dvoma retrapmi. Samice vykazovali menšiu priemernú vzdialenosť od najbližšej vodnej plochy. Zisťovali sme tiež charakter úkrytov a vplyv sklonu svahu na výskyt salamandry škvrnitej.

## ÚVOD

Salamandra škvrnitá (*Salamandra salamandra*) má široký areál výskytu v strednej, západnej a južnej Európe (Meiكل a kol., 2010). Na Slovensku je rozšírený nominálny poddruh *S. s. salamandra*, ktorý predstavuje jediného zástupcu rodu *Salamandra* na našom území (Dungel a Řehák, 2011). K typickým habitatom salamandry patria vlhké listnaté alebo zmiešané lesy (predovšetkým bučiny) stredných polôh s nad. výškou 200 – 600 m.n.m. (Dungel a Řehák, 2011). Limitujúcim faktorom výskytu je taktiež teplota a vlhkosť, resp. úhrn zrážok (Moravec, 1994).

Hoci *S. salamandra* patrí k najbežnejším druhom obojživelníkov na Slovensku, vedomosti o jej biológii a ekológii sú stále nedostatočné. Absentuje tiež štúdiá, ktorá by kompletizovala roztrúsene faunistické údaje v slovenskej časti Karpát. Cieľom tejto práce je analyzovať dostupné údaje o rozšírení salamandry škvrnitej na Slovensku.

## MATERIÁL A METODIKA

### **Získavanie dát pre analýzu celkového rozšírenia salamandry škvrnitej na Slovensku**

Dostupné údaje boli získavané z publikovaných prác (70 publikácií, viac ako 420 bibliografických jednotiek) a prístupných internetových zdrojov. Databáza obsahuje taktiež 301 nepublikovaných údajov z Informačného systému taxónov a biotopov (ISTB) Štátnej ochrany prírody (Banská Bystrica) a vlastné nepublikované údaje.

### **Spracovanie dát**

Miesto výskytu *S. salamandra* bolo spracované v súradnicovom systéme jtsk. Pomocou programu Quantum GIS (1.7.0) a vektorových máp, sme priradili každej lokalite príslušný kataster, nadmorskú výšku, orografický celok, DFS štvorec, klimatickú oblasť, kód areálu a úhrn žiarenia na horizontálnu plochu. Excerptovaným údajom bol tiež pridelený dátum záznamu, počet videných jedincov a ich vývinové štádium, typ biotopu a autor legitimácie.

### **Zber a spracovanie údajov pre detailnejší pohľad na habitat salamandry škvrnitej v južnej časti Malých Karpát**

Výskum bol realizovaný v sledovanom období október 2006 - apríl 2010 na území LHC Železná studienka o celkovej rozlohe 472 ha. Bolo uskutočnených 58 návštev, 43 s pozitívnym nálezom (1 alebo viac dohľadaných jedincov). Použitou metodikou výskumu bola metóda celoplošného terénneho pozorovania a odchyty jedincov na vybraných lokalitách. Pri odchyte každého jedinca bol zaznamenaný čas nálezu, presná lokácia pomocou GPS Garmin 60 CSx a jeho biometrické údaje.

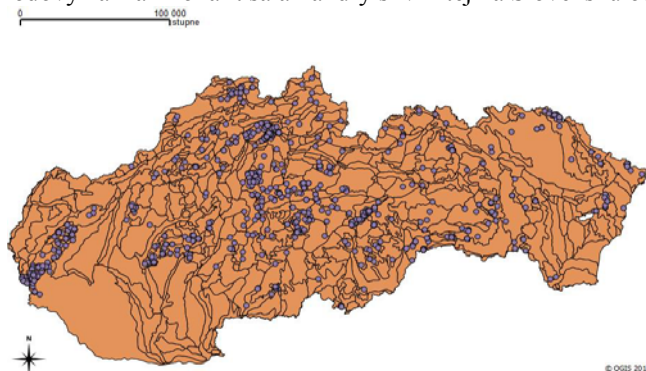
Na identifikáciu jedinca, bola uskutočnená fotodokumentácia dorzálnej strany (metóda individuálneho značenia modifikovaná od Opatrného, 1983). Bol realizovaný taktiež zápis charakteru výskytu a ďalšie ekologické faktory (aktivita jedinca, charakter okolitej vegetácie, sklon svahu, meteorologické charakteristiky).

Súradnice každého identifikovaného jedinca boli neskôr prenesené do programu Map Source ver. 6.15, ktorý umožnil bodové zobrazenie v ortofotomape záujmového územia. Výpočet hustoty, ako aj všetky namerané vzdialenosti u retrapov boli vypočítané v programe Google Earth 2010. Na grafické spracovanie údajov bol použitý program Microsoft Excel. Stredová os pre kategórie sklonov bola zisťovaná regresnou analýzou s použitím polynomickeho, mocninového a exponenciálneho modelu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkovo bolo excerpovaných 803 údajov výskytu salamandry škvrnitej zo 68 orografických celkov (Obr.1). Najvyšší počet lokalít zaznamenal Spišsko-gemerský kras (88 záznamov), avšak početný výskyt bol tiež v orografických celkoch Malé Karpaty a Malá Fatra. Pozorovaný altitudinálny rozsah lokalít bol 200–800 m n. m, pričom došlo k postupnému znižovaniu výskytu nad hranicou tohto rozpätia. Výskyt pod 200 m n. m. bol ojedinelý (10 lokalít). Prevažná časť zaznamenaných lokalít bola situovaná v listnatých alebo zmiešaných lesoch.

**Obr.1.** Bodový záznam lokalít salamandry škvrnitej na Slovensku od roku 1956 - 2012



Až 43 % databázových lokalít sa nachádzalo v chladnej klimatickej oblasti, 38 % v mierne teplej a 19 % v teplej klimatickej oblasti. Najvyšší počet lokalít (326 údajov z celkového počtu 803) pripadalo do chladnej klimatickej oblasti s mierne chladným, veľmi vlhkým charakterom okrsku a klimatickými znakmi: júl 12 °C – 16 °C.

Celkový počet odchytených jedincov počas monitoringu na území LHC Železná studienka bol 388, z ktorých sa podarilo identifikovať a okódovať 363 exemplárov. Bolo uskutočnených 69 retrapov (19,0 % z celkového počtu) u 52 jedincoch.

### **Preferované miesta a miesta nevhodné pre výskyt druhu**

Najvhodnejším miestom pre výskyt *S. salamandra* sa ukázalo byť úpätie svahu medzi prítokom Bystrička a prítokom vtekajúcom do Vydrice pri hoteli Veronika. Toto územie sa vyznačovalo súvislou prítomnosťou cca 50 ročného bukoveho porastu s minimálnym zápojom

krovinnnej etáže, nízkou strmosťou svahu a hojnou prítomnosťou podzemných úkrytov. Za nevhodné pre výskyt salamandier boli zhodnotené lokality, ktoré sa vyznačovali častou fragmentáciou alebo absenciou lesných porastov, prípadne prítomnosťou zmladeného lesného porastu s vysoko rozvinutou krovinnou etážou, či absenciou lesných prítokov a zastavanosťou územia.

### Hustota populácie

Celková hustota populácie v záujmovom území predstavovala 0,77 ex/ha. Rozmiestnenie jedincov v rôznych dielcoch územia však nebolo rovnomerné. Z celkového počtu, 363 identifikovaných jedincov sa až 76,7% exemplárov (t.j. 280 ex.) nachádzalo na území veľkosti 14,4 ha, t.j. na 3,05% celkovej plochy záujmového územia. Hustota dohľadanej populácie v tomto území bola 19,44 ex/ha. Len 7,16% jedincov z celkového počtu bolo dohľadaných v iných lokalitách.

### Home range

Veľkosť home range bola určovaná podľa Schulteho a kol. (2007) u jedincov, ktoré boli počas doby výskumu odchytené viac ako 2-krát, t.j. u 5 samíc a 8 samcov. Priemerná veľkosť home range bola stanovená na 372,8 m<sup>2</sup>. U samcov bola priemerná plocha stanovená na 511,3 m<sup>2</sup>. Hodnoty minima a maxima sa pohybovali od 3,32 m<sup>2</sup> do 3200 m<sup>2</sup>. U samíc bola priemerná plocha home range stanovená na 151,3 m<sup>2</sup>. Hodnoty minima a maxima sa pohybovali od 23,4 m<sup>2</sup> do 443 m<sup>2</sup>.

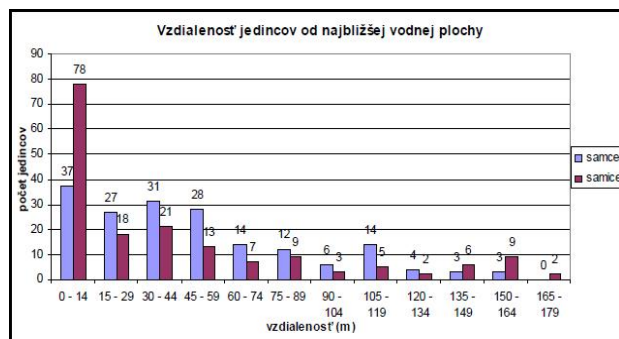
### Vzdialenosť od vody

Priemerná vzdialenosť samíc od najbližšej vodnej plochy bola 39,7 m, u samcov 49,4 m. Hodnoty minima a maxima sa pohybovali od 0 m po 178 m, pričom 17,33% všetkých nálezov sa nachádzalo priamo v lesnom prítoku.

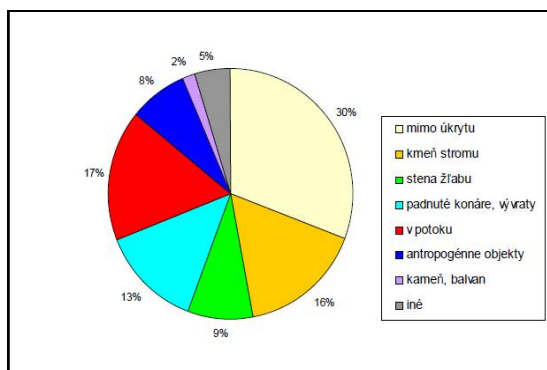
### Charakter úkrytov

Väčšina jedincov bola dohľadaná vo vnútri lesného porastu, alebo na jeho okraji v blízkosti prítoku. Často boli jedince pozorované voľne roztrúsené v teréne bez blízkosti úkrytu (30% z celkového počtu), alebo priamo v lesnom prítoku (17%), no väčšina z nich sa v dobe nálezu nachádzala v bezprostrednej blízkosti úkrytu, do ktorého pri vyrušení aktívne unikali.

**Graf.1.** Vzdialenosť samcov a samíc od najbližšej vodnej plochy



**Graf.2.** Percentuálne zastúpenie rôznych typov úkrytov u dohľadaných jedincov



### Sklon svahu

Jedince sa nachádzali v teréne s rôznym stupňom strmosti. Na rovine, najčastejšie v oblasti alúvia bočných prítokov v blízkosti ústia do Vydrice s 0° sklonom, sa nachádzalo 24% všetkých jedincov. Zastúpenie v ďalších kategóriách malo výrazne klesajúcu tendenciu.

Po celkovej analýze excerpovaných údajov sme zistili, že prevažná časť zaznamenaných lokalít bola situovaná v zalesnených oblastiach s nad. výškou 200 – 800 m.n.m. s mierne chladným a veľmi vlhkým charakterom okrsku.

Gregor (1986) poukazuje na všeobecný trend úbytku početnosti salamandry škvrnitej vo všetkých orografických celkoch Slovenska. Na monitorovanom území LHC Železná studienka boli salamandry dohľadané len v niektorých lokalitách, aj napriek tomu, že väčšina miest spĺňala biotopové predpoklady výskytu.

Zdá sa, že vysoká fidelita (vernosť) k miestu a malý home range sú charakteristickým znakom salamandier. Nami zistená plocha home range sa pohybovala v rozmedzí 151 – 511 m<sup>2</sup>, no tieto hodnoty výrazne kolísali pri každom jedincovi, preto na základe pomerne malej štatistickej vzorky nemožno vyvodzovať jednoznačné závery.

Prvý záznam o silnej fidelite k ohraničenej oblasti rozšírenia salamandry škvrnitej uvádza Joly (1963), ktorý dokazuje, že dospelé jedince zostávali v území veľkom len 68 m<sup>2</sup> po dobu až 7 rokov. Silná fidelita k miestu v kombinácii s malým home range bola tiež dokázaná u alpských salamandier, *Salamandra atra* a *Salamandra lanzai* (Schulte a kol., 2007).

V monitorovanej oblasti samice vykazovali takmer o 10 m menšiu priemernú vzdialenosť od najbližšej vodnej plochy ako samci. Táto užšia viazanosť vznikla pravdepodobne v dôsledku dôležitosti vodných plôch pre samice na kladenie lariev.

Na základe typu biotopu, v ktorom boli jedince dohľadané možno usudzovať, že väčšinu času mimo úkrytu, trávajú salamandry v jeho bezprostrednej blízkosti a len 30% všetkých nálezov bolo nájdených mimo bezprostrednej blízkosti úkrytu. 7% jedincov bolo dohľadaných v tesnej blízkosti antropogénnych objektov – najčastejšie sa jednalo o steny budov, múriky a bunkre. Pri týchto objektoch boli jedince pozorované najmä v jesennom a zimnom období, čo potvrdzujú údaje z literárnych zdrojov (Stojanová, 1987), že salamandry javia isté známky synantropizácie v období hľadania vhodných zimovísk.

Z hľadiska sklonu svahu bola zistená významná nepriama úmera. S narastajúcim sklonom svahu výrazne klesal počet jedincov.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dungel J, Řehák Z. *Atlas ryb, obojživelníků a plazů České a Slovenské republiky*. Academia, Praha. 2005: 182 pp.
- Gregor J. Salamandra škvrnitá (*Salamandra salamandra*). Pp.: 74–77. In: Možnosti SZOPK pri ochrane fauny SSR, Metodicko-námetová príručka č. 6. UV SZOPK, Bratislava. 1986: 201 pp.
- Joly J. La sédentarité et le retour au gîte chez la Salamandre tachetée, *Salamandra salamandra* quadrigata. *Comptes Rendus Acad. Sci.*, Paris, 256, 16: 3510 – 3512. In: BARUŠ, V., et al., 1992: Obojživelníci – Amphibia. Fauna ČSFR, sv. 25, Academia, Praha. 1963: 338 pp.
- Meikl M, Reinthaler- Lottermoser U, Weinke E, Schwarzenbacher R. Collection of Fire Salamander (*Salamandra salamandra*) and Apline Salamander (*Salamandra atra*) distribution data in Austria using a new, community-based approach. *eco.mont.* 2010; 2: 59 – 65.
- Moravec J. *Atlas rozšíření obojživelníků v České republice*. Národní muzeum, Praha. 1994: 136 pp.
- Opatrný E. Individuelle Identifikation vom Feuersalamander, *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758), nach den Hautpigmentzeichnungen. *Acta Univ. Palackiana Olomucensis, Facultas Rerum Naturalium, Biologica.* 1983; 78: 107 – 111.
- Schulte U, Küsters D, Steinfartz S. A PIT tag based analysis of annual movement patterns of adult fire salamanders (*Salamandra salamandra*) in a Middle European habitat. *Amphibia-Reptilia.* 2007; 28: 531 – 536.
- Stojanová T, Opatrný E. Obojživelníci okolí Rožnova pod Radhoštěm. *Acta Univ. Palackiana Olomucensis, Facultas Rerum Naturalium, Biologica.* 1987; 90: 199 – 210.

## DRUHOVÁ SKLADBA A SEZÓNNA DYNAMIKA LARIEV KOMÁROV V KOŠICKEJ KOTLINE

<sup>1</sup>Bocková, E., <sup>1</sup>Kočišová, A., <sup>2</sup>Hlavatá, H.

<sup>1</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81, SR

<sup>2</sup>Slovenský hydrometeorologický ústav Bratislava, Regionálne stredisko Košice, Ďumbierska 26, 041 17, SR

### ABSTRAKT

V rokoch 2010 a 2011 sme na 6 lokalitách Košickej kotliny odchytili celkovo 17 520 lariev 15 druhov komárov (*Aedes vexans*, *Ae. cinereus* (resp. *Ae. rossicus*), *Ae. (Finlaya) geniculatus*, *Ae. refiki*, *Ae. rusticus*, *Ochlerotatus sticticus*, *Oc. punctor*, *Oc. cataphylla*, *Oc. cantans* (resp. *Oc. annulipes*), *Oc. communis*, *Oc. flavescens*, *Oc. leucomelas*, *Culiseta annulata*, *Culex pipiens* (resp. *Cx. torrentium* a *Anopheles maculipennis*) a sledovali sme ich distribúciu, denzitu a vplyv zmeny klimatických faktorov na ich rozšírenie na urbánnych a suburbánnych lokalitách. Larvy sme lovili sitkom, šmýkaním po vodnej hladine, vylovené larvy sme fixovali 96% alkoholom a determinovali v laboratóriu stereolupou. Druhové zloženie lariev ako aj ich distribúcia a denzita sa na oboch typoch lokalít výraznejšie nelíšila.

### ÚVOD

Väčšia časť výskumu komárov Slovenska je sústredená na strednú a západnú časť krajiny, aj navzdory tomu, že východná časť krajiny, vrátane Košickej kotliny bola ešte v polovici minulého storočia endemickou oblasťou pre výskyt malárie, kde sa ochorenie vyskytovalo približne u 10-30 % obyvateľstva (Dziuban, 1949). Vynikajúce ekologické podmienky (teplé leto kontinentálneho typu, veľké množstvo stojatých vôd a močiarov, časté záplavy a s nimi súvisiace opakované premnoženia komárov) sa ukázali ako vhodné aj pre šírenie dirofilariózy, ktorá predstavuje najrýchlejšie sa hmyzom prenášanú chorobu zoonózneho charakteru (Genchi a kol., 2005). Cieľom nášho výskumu bolo zistiť druhovú diverzitu lariev v oblasti Košickej kotliny, sledovať ekologické nároky a vplyv zmeny klímy na ich rozšírenie. Výsledky v predložennom príspevku sú čiastkové a pochádzajú z prvých dvoch sezón výskumu.

### MATERIÁL A METODIKA

#### **Sledované územie**

Za modelovú oblasť sme si zvolili Košickú kotlinu. Celková rozloha kotliny je 1 153 km<sup>2</sup> a klimaticky patrí k oblastiam s teplou a mierne suchou klímou. Priemerný ročný úhrn zrážok sa pohybuje v rozmedzí 600-850 mm, vlhkosť vzduchu sa drží v priemere na 60-70 %. Pre takmer celé územie je charakteristický pomerne včasný nástup jari, letá sú relatívne dlhé (52-60 dní) s vysokými priemernými dennými teplotami (18-20 °C), zimy sú mierne, s priemernými dennými teplotami -3 až -6 °C, krátke, s malým počtom dní so snehovou prikrývkou (do 50 dní). Maximálna hĺbka premrzania je 1,2 – 1,4 m, priemerná 0,45 m. Dlhodobá priemerná denná ročná teplota sa pohybuje na úrovni 8,7°C (www.shmu.sk).

#### **Zber vzoriek**

Larvy komárov sme odchytili v pravidelných týždenných intervaloch na 6 stabilných lokalitách ležiacich v rôznych oblastiach Košickej kotliny (Ťahanovce, Šebastovce, Rozhanovce, Paňovce, Medzev, Perín Chým) v jarných a letných mesiacoch (apríl – august) rokov 2010 a 2011. Zber lariev sme robili štandardným spôsobom (Kramář, 1958). Druhovou determináciu sme uskutočnili v laboratóriu pomocou stereomikroskopu a determinačných kľúčov (Kramář, 1958; Becker a kol., 2010).

### **Environmentálne dáta**

Lokality sme rozdelili na oblasti urbánne (Ťahanovce, Paňovce, Medzev) a suburbánne (Šebastovce, Rozhanovce, Perín-Chým). V rámci každej zvolenej lokality nám ako odberové miesta slúžili rôzne typy vodných biotopov – jazerá, odvodňovacie kanály, dočasné mláky vzniknuté po zrážkach, lesné priekopy naplnené dažďovou vodou, zaplavené biotopy v blízkosti riek. S každým odberom sme zaznamenávali vybrané ekologické parametre – teplotu vody, teplotu vzduchu a relatívnu vlhkosť vzduchu.

### **Analýza dát**

1. Distribúcia – percento lokalít, na ktorých sme zaznamenali daný druh.

$$C = \frac{n}{N} \cdot 100$$

C = distribúcia; n = počet lokalít výskytu daného druhu;  
N = počet všetkých lokalít

Distribúciu sme na základe výsledku rozdelili do nasledujúcich tried (Dziêczkowski, 1972):

C1 – sporadický (0-20 %); C2 – menej častý (20,1 – 40 %); C3 – stredne častý (40,1 – 60 %); C4 – častý (60,1 – 80 %); C5 – konštantný (80,1 – 100 %)

2. Denzita - počet jedincov daného druhu k celkovému počtu všetkých jedincov vyjadrený v percentách, podľa vzorca:

$$D = \frac{1}{L} \cdot 100 \%$$

D = denzita; 1 – počet jedincov daného druhu;  
L – počet všetkých jedincov

Denzitu na základe výsledkov sme rozdelili do týchto tried (Trojan, 1992):

satelitné druhy (D < 1 %); subdominantné druhy (1 < D < 5 %); dominantné druhy (D > 5 %).

### **VÝSLEDKY A DISKUSIA**

Za jarne a letné obdobie rokov 2010 a 2011 bolo celkovo odchytených 17 520 lariev 16 druhov komárov. V sezóne 2010 sme najviac lariev zachytili v júli (33,5 %), v auguste (28,5 %) a júny (18,9 %), najmenej v máji (2,4 %). V apríli 2010 sme odchytili 1659 ks (16,7 %) lariev komárov. V sezóne 2011 sme najvyššiu abundanciu lariev zaznamenali v apríli (81,9 %), najnižšiu v auguste (0,5 %). V mesiacoch máj (12,3 %), jún (1,8 %) a júl (3,5 %) došlo ku kolísaniu abundancie lariev.

Odchytové lokality sme rozdelili na oblasti urbánne a suburbánne (Lieszewski a Maik, 2000). V urbánnych oblastiach sme celkovo zdiagnovali 8778 ks lariev 13 druhov (Tab. 1), dominantné zastúpenie mali druhy *Ae. cinereus* (resp. *rossicus*), *Cx. pipiens* (resp. *torrentium*), *Oc. cantans* (resp. *annulipes*), *Oc. cataphylla*, *Oc. punctor* a subdominantné zastúpenie druhy *Ae. vexans*, *Oc. communis*, *Oc. flavescens*, *Oc. leucomelas*. Satelitnými druhmi boli druhy *Ae. rusticus*, *An. maculipennis*, *Cs. annulata* a *Oc. sticticus*.

Na suburbánnych lokalitách sme celkovo určili 8742 lariev 12 druhov komárov (Tab. 2), s dominantným zastúpením *Ae. vexans*, *Cx. pipiens*, *Oc. cantans*, *Oc. sticticus*; subdominantným zastúpením u druhov *Ae. cinereus* (resp. *rossicus*), *An. maculipennis*, *Oc. flavescens* a satelitným zastúpením u 4 druhov, t.j. *Ae. (Finlaya) geniculatus*, *Ae. refiki*, *Cs. annulata* a *Oc. punctor*. Z klimatického hľadiska patrí Košická kotlina k oblastiam s priaznivými podmienkami pre vývin komárov. Obidve odchytové sezóny sa z meteorologického pohľadu značne líšili. Sezóna 2010 bola charakteristická nadmernými mesačnými úhrnmi zrážok, ktoré výrazne presahovali dlhodobé priemerné hodnoty. Od apríla do prvej polovice júna boli na väčšine územia Slovenska, vrátane skúmaného územia intenzívne, niekoľkodňové zrážky, ktoré viedli k rozsiahlym záplavám, čo umožnilo vytvorenie dostatočného množstva vhodných biotopov a teplotných pomerov pre vývin lariev.



Podľa očakávania, podobne ako v iných regiónoch Slovenska (Brestovský a Jalili, 2001) a zahraničia (Rettich a kol., 2010) v čase záplav, aj v nami zachytenej druhovej skladbe lariev komárov prevládali predovšetkým druhy kalamitné (*Ae. vexans* 36,8 %; *Oc. sticticus* 6,06 %) a druhy s tendenciou premnoženia sa po záplavách (*Cx. pipiens/Cx. torrentium* 47,9 % a *Oc. cantans/Oc. annulipes* 4,57 %). Sezóna 2011 bola protikladom predchádzajúceho roka. Jarné obdobie bolo na väčšine územia Slovenska suché a teplé, s malým množstvom atmosférických zrážok (136,3 mm za obdobie od 21.3.-21.6.2011), s priemernou mesačnou teplotou vzduchu 12 °C. Leto bolo horúce, s priemernými dennými teplotami 19,5 °C (jún, júl) až 20,9 °C (august). V uplynulej letnej sezóne bolo zaznamenaných aj niekoľko po sebe nasledujúcich tropických dní, s teplotami nad 30 °C (júl 6 dní, august 6 dní). Nízky úhrn zrážok a predovšetkým ich nepravidelné rozloženie, horúce letné a tropické dni ovplyvnili tak druhovú diverzitu ako aj abundanciu lariev komárov. Množstvo odberových miest v podobe mlák a odvodňovacích kanálov na stabilných lokalitách vyschlo. Larvy niektorých druhov komárov tak aj napriek veľmi priaznivým teplotným podmienkam nestihli ukončiť svoj vývin, resp. vývin z dôvodu nedostatku vody ani nezačali. Navzdory zrážkovo suchej jari (apríl 8,4 mm; máj 68,1 mm; jún 54,3 mm) sme práve v tomto období zachytili najviac lariev a to 81,9 % lariev z celkového počtu v danom roku. Druhová diverzita a konečná abundancia lariev komárov na oboch typoch lokalít bola relatívne zhodná. Prevládali druhy antropofilné, s výnimkou prevažne ornitofilného druhu *Cx. pipiens*, ktorý však v niektorých oblastiach Slovenska cícia aj na človeku a *An. maculipennis*, ktorý ma afinitu prevažne k zvieratám. Najvyššia abundancia lariev bola zaznamenaná v apríli až máji. Habitaty v ktorých sme nachádzali larvy či už v oblastiach urbánnych, alebo suburbánnych, mali podobný charakter a zhodujú sa s dostupnými poznatkami o bionómii daných druhov uvedených v literatúre (Becker a kol., 2010; Kramář, 1958).

**Tabuľka 1: Celkové druhové zastúpenie, denzita a distribúcia lariev komárov na urbánnych lokalitách (2010-2011).**

DRUH	Reálny počet odchytených jedincov	Lokalita	Denzita D [%]	Vyjadrenie denzity	Distribúcia C [%]	Vyjadrenie distribúcie
<i>Ae. vexans</i>	108	P	1,23	SD	33,33	MČ
* <i>Ae. cinereus</i> / <i>Ae. rossicus</i>	929	P	10,6	D	33,33	MČ
<i>Ae. rusticus</i>	1	P	0,011	S	33,33	MČ
<i>An. maculipennis</i>	35	Ť	0,40	S	33,33	MČ
* <i>Cx. pipiens</i> / <i>Cx. torrentium</i>	2216	Ť+P	25,24	D	66,66	Č
<i>Cs. annulata</i>	17	P	0,19	S	33,33	MČ
* <i>Oc. cantans</i> / <i>Oc. annulipes</i>	2873	Ť+P+M	32,72	D	100	K
<i>Oc. communis</i>	151	P	1,72	SD	33,33	MČ
<i>Oc. cataphylla</i>	792	P+M	9,02	D	66,66	Č
<i>Oc. flavescens</i>	221	P	2,51	SD	33,33	MČ
<i>Oc. leucomelas</i>	244	P	2,8	SD	33,33	MČ
<i>Oc. punctor</i>	1155	P	13,15	D	33,33	MČ
<i>Oc. sticticus</i>	36	P	0,41	S	33,33	MČ
<b>SPOLU</b>	<b>8778</b>		<b>100%</b>			

S- satelitný druh, SD- subdominantný, D- dominantný

Ť- Ťahanovce, P- Paňovce, M- Medzev

Č- častý, MČ- menej častý, K- konštantný

\* Druhy *Ae. cinereus* /*Ae. rossicus*; *Cx. pipiens* / *Cx. torrentium* a *Oc. cantans* /*Oc. annulipes* nie je možné v larválnom štádiu spoľahlivo rozlíšiť, preto ich počet uvádzame spoločne

**Tabuľka 2: Celkové druhové zastúpenie, denzita a distribúcia lariev komárov na suburbánných lokalitách (2010-2011).**

DRUH	Reálny počet odchytených jedincov	Lokalita	Denzita [D] %	Vyjadrenie denzity	Distribúcia [C] %	Vyjadrenie distribúcie
<i>Ae. vexans</i>	3547	Š+PCH	40,60	D	66,66	Č
* <i>Ae. cinereus</i> / <i>Ae. rossicus</i>	141	Š+PCH	1,61	SD	66,66	Č
<i>Ae. geniculatus</i>	6	R	0,068	S	33,33	MČ
<i>Ae. refiki</i>	2	Š	0,022	S	33,33	MČ
<i>An. maculipennis</i>	238	Š+R+PCH	2,72	SD	100	K
* <i>Cx. pipiens</i> / <i>Cx. torrentium</i>	2908	Š+R+PCH	33,26	D	100	K
<i>Cs. annulata</i>	9	R	0,10	S	33,33	MČ
* <i>Oc. cantans</i> / <i>Oc. annulipes</i>	691	Š	7,90	D	33,33	MČ
<i>Oc. cataphylla</i>	292	Š	3,34	SD	33,33	MČ
<i>Oc. flavescens</i>	143	Š	1,63	SD	33,33	MČ
<i>Oc. punctor</i>	6	Š	0,068	S	33,33	MČ
<i>Oc. sticticus</i>	759	Š	8,70	D	33,33	MČ
<b>SPOLU</b>	<b>8742</b>		<b>100%</b>			

S- satelitný druh, SD- subdominantný, D- dominantný Š-Šebastovce, R- Rozhanovce, PCH- Perín Chým  
Č- častý, MČ- menej častý, K- konštantný

\* Druhy *Ae. cinereus* /*Ae. rossicus*; *Cx. pipiens* / *Cx. torrentium* a *Oc. cantans* /*Oc. annulipes* nie je možné v larválnom štádiu spoľahlivo rozlíšiť, preto ich počet uvádzame spoločne

#### POĎAKOVANIE

Práca je realizovaná v rámci riešenia grantovej úlohy VEGA č. 1/0236/12 a základného výskumu NRL UVLF pre pesticídy.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C H, Kaiser A. Mosquitoes and their control. Second edition., Sprienger –Verlag Berlin, Heidelberg, 2010; 577.
- Brestovský J, Jalili N. Mosquitoes of the Ipel' river floodplain in the surroundings of the Šahy town after the floods in 1999. Acta Zoologica Universitatis. 2001; 44: 79-84.
- Dzięczkowski A. Badania iloeciowe olimaków buczyn pozudniowo-zachodniej Polski. (Quantitative researches of the beech malacofauna in south-west of Poland). Studium ekologiczno faunistyczne. Prace Komisji Biologicznej PTPN. 1972; 35: 243-332.
- Dziuban M. Ako sa vyvíjal problém malárie na Slovensku. Bratislav. lek. Listy. 1949; 29: 741 – 748.
- Genchi C, Rinaldi L, Cascone C, Mortarino M, Cringoli G. Is heartworm disease really spreading in Europe? Vet. Parasitol. 2005; 133 (2-3):137- 148.
- Kramář J. Komáři bodaví – *Culicinae* (Biting mosquitoes – Culicinae). Fauna ČSR Nakladatelství Československé akademie věd Praha. 1958; 425.
- Lieszewski S, Maik W. Osadnictwo. Wielka encyklopedia geografii świata. Krupisz, Poznań.2000; 350.
- Rettich F, Imrichová K, Šebesta O, Pazdziora E, Mudra R. Povodňe roku 2010 a komáři. Zprávy epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha)2010; 19 (11), 338 – 342.
- Trojan P. Analiza struktury fauny (The analysis of the fauna structure). Memorabilia Zoologica. 1992; 47: 1-120.
- www.shmu.sk

# DETEKCIA VIRULENTNÝCH FAKTOROV, MOBILNÝCH GÉNOVÝCH ELEMENTOV A ATB REZISTENCIE U TEĽACÍCH KMEŇOV *E. COLI*

Drugdová Z.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

## ABSTRAKT

Cieľom nášho výskumu bolo odhalenie prítomnosti virulentných faktorov, detekcia antimikrobiálnej rezistencie u 17 vybraných teľacích *E.coli* kmeňov izolovaných v priebehu roku 2012 z rektálnych výterov teliat zo slovenských fariem a následná detekcia mechanizmov rezistencie a prítomnosti mobilných génových elementov (integrónov). Taktiež sme u spomenutých kmeňov určili fylogenetické skupiny (Clermont, O. a kol., 2000). Kmene *E.coli* sme vyšetrili metodikou stanovenia MIC hodnoty a polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) s využitím primerov virulentných génov *iutA*, *iss*, *cvaC*, *tsh*, *papC*, *kpsII*, *ibeA*, toxínov *stx1*, *stx2*, *LT*, *ST*, integrázových génov *Int1*, *Int2*, génových kaziet *dfr (IA a II)*, *aad (aad)* a génov *sul*. Na základe interpretatívneho odčítania MIC hodnôt ceftriaxonu, ceftazidímu, ceftiofuru a ceftazidímu s kyselinou klavulanovou sme zaznamenali výskyt 8 ESBL – produkujúcich kmeňov. Spomedzi virulentných génov dominoval *papC* a *iutA* a vôbec sa nevyskytovali *ibeA* a *iss*. Najčastejšie sa vyskytujúca integráza je *Int1* s génovou kazetou *aad*. Analýza fylogenetických skupín potvrdila výlučné zastúpenie komenzálov zo skupiny A. U teľacích *E.coli* kmeňov sme potvrdili prítomnosť génov rezistencie, virulentných faktorov a mobilných génových elementov, nie však v takom rozsahu ako u kuracích kmeňov.

## ÚVOD

Rezistentné baktérie *E.coli* (či už komenzálne alebo patogénne) predstavujú potenciálny rezervoár mobilných génových elementov a génových kaziet (Khachatryan a kol., 2004) a zvyšuje sa riziko transferu rezistencie medzi genómami. Virulentné faktory sú ďalším atribútom prispievajúcim ku zvýšenej rezistencii a patogenite. Patogénne kmene sa od komenzálnych líšia v získaní chormozomálnych, alebo extrachromozomálnych virulentných operónov. Avšak delécie a iné bodové mutácie zvyšujú patogenitu kmeňa a patria k stratégiám genómovej plasticity, vďaka ktorým sa komenzálne kmene stávajú patogénnymi (Duriez a kol., 2001). V tejto práci sme sa zamerali na výskum rezistencie, virulencie a prítomnosti mobilných génových elementov vo vzťahu ku fylogenetickej skupine u fekálnych *E.coli* mladých teliat, nakoľko u *E.coli* mladých zvierat je preukázateľne vyššia rezistencia ako u dospelých (Hoyle a kol., 2005).

## MATERIÁL A METODIKA

**Kultivácia a identifikácia baktérii.** Vyšetrili sme 17 kmeňov *E.coli* (rok 2012) a rektálne tampóny z teľacích slovenských fariem boli resuscitované v peptónovej vode (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) a naočkované na McConkey agar (Oxoid). Identifikácia bola prevedená za pomoci Uriselect agaru (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) a Maldi-Biotyperu (Bruker, USA). Bakteriálnu DNA sme izolovali za pomoci kitu (Qiagen, USA).

**Polymerázová reťazová reakcia.** Skríning izolátov *E.coli* na prítomnosť virulentných génov sme vykonali pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) amplifikáciou *iutA* – receptoru pre aerobaktín (annealingová teplota 63°C, amplikónová veľkosť 300bp) (Johnson a kol., 2000), *cvaC* kolicínu V (63°C, 680bp) (Johnson a kol., 2000), *kpsII* – kapsulárnej polysialicovej kyseliny (63°C, 272bp) (Johnson a kol., 2000), *iss* – séra zvýšeného prežívania (61°C, 760bp) (Foley a kol., 2000), *tsh* – teplotne senzitivného 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)

(Germon a kol., 2005). Skrining na prítomnosť integráz 1 a 2 bol vykonaný amplifikáciou *Int1* (annealingová teplota 62°C, ampikónová 483 bp), *Int2* (annealingová teplota 62 °C, ampikónová veľkosť 788 bp) (Mazel a kol., 2000), skrining na prítomnosť génových kaziet *dfr* (Navia a kol., 2003), *aadA* (Hollingshead a kol., 1985) a génov *sul* 1, 2 (annealingová teplota 69 °C, ampikónová veľkosť 433 bp a 293 bp) (Kern et al., 2002) a *sul3* (annealingová teplota 51°C, ampikónová veľkosť 990 bp) (Guerra a kol., 2004). Skrining na prítomnosť génov rezistencie bol vykonaný za pomoci primerov *CIT* (61°C, 462 bp) (Pérez-Pérez a kol., 2002), *qnrS* (53°C, 417) (Robicsek a kol., 2006), *bla<sub>CTX-M1</sub>* (58°C, 940 bp) (Carattoli a kol., 2008), *floR* (55°C, 868 bp) (Guerra a kol., 2001). Analýza fylogenetických skupín bola prevedená prostredníctvom triplex-PCR (Clermont a kol., 2000). PCR bola prevedená v celkovom objeme 25 µl. 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, USA).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Všetky kmene boli po fylogenetickej analýze zaradené do komezálnej skupiny A, čomu zodpovedá aj znížená virulencia. U teľacích kmeňov *E.coli* sme zaznamenali najvýraznejší výskyt virulentných génov *papC* a *iutA*, vôbec sa nevyskytovali *iss* a *ibeA* (Tab.1), čo korešponduje s výsledkami Durieza (Duriez a kol., 2001).

**Tab. 1** Výskyt virulentných génov u 17 teľacích izolátov.

Virulentné faktory	Počet kmeňov
<i>papC</i> , <i>iutA</i> , <i>cvaC</i> , <i>tsh</i>	1
<i>papC</i> , <i>iutA</i> , <i>cvaC</i>	2
<i>papC</i> , <i>iutA</i>	6
<i>kps</i> , <i>cvaC</i>	1
<i>iutA</i>	1
-	3

Typický ETEC a STEC patotyp obsahuje najmä toxíny ako *stx1*, *stx2*, či *LT* a *ST* (Ghanbarpour a kol., 2012), naše kmene však neobsahovali ani jeden zo spomínaných faktorov. Ako vidno v tabuľke 2, integráza 1 sa vyskytovala u 4 zo 17 kmeňov. Ako uvádza výskum Dua (Du a kol., 2005), až u 59% teľacích *E.coli* sa vyskytoval gén *Int1*. Integrón 1 je nositeľom viacerých génov rezistencie ako *dfr* (rezistencia na trimetoprim) a *aad* (rezistencia na aminoglykozidy), čo sa čiastočne potvrdilo aj naším výskumom. Gén *aad* sa spolu s *Int1* vyskytoval u dvoch zo štyroch streptomycín rezistentných kmeňov. Integráza 2 sa nevyskytovala u žiadneho kmeňa a potvrdil sa výskyt dvoch integrázových génov 1 bez prítomnosti génových kaziet. Zaznamenali sme tiež výskyt troch génov *sul* kódujúcich rezistenciu na sulfonamidy, taktiež viazaných na *Int1*, menovite *sul1*, *sul2* (obidva u jedného zo štyroch cotrimoxazol-rezistentných kmeňov), aj *sul3*.

Na základe interpretatívneho odčítania MIC hodnôt ceftriaxonu, ceftazidímu, ceftiofuru a ceftazidímu s kyselinou klavulanovou sme zaznamenali výskyt 8 ESBL - produkujúcich kmeňov. Multirezistencia (rezistencia na viac ako tri antibiotiká) bola odhalená u 11 kmeňov. Voči ampicilínu bolo rezistentných 11 kmeňov (tri z nich sa vyznačovali prítomnosťou *CIT* génu), voči tetracyklínu tak isto 11 kmeňov, voči chloramfenikolu 8 kmeňov a voči florfenikolu 7 kmeňov (tri z nich sa vyznačovali prítomnosťou *floR* génu). U jedného kmeňa sa napriek rezistencii voči fluorochinolónom (enrofloxacín a ciprofloxacín) nepotvrdil výskyt plazmidicky kódovaného génu *qnrS*, čo indikuje mutáciu chromozomálne kódovaných génov

(*parC*, *gyrA*). Rezistencia komenzálnych baktérií sama o sebe nieje až tak veľkým problémom, komplikácia nastáva pri transfere rezistentných elementov na patogény v rámci tráviaceho traktu (Hoyle a kol., 2005). Takéto riziko možno predpokladať aj u našich dvoch multirezistentných kmeňov, kde sa vyskytla rezistencia typu Amp-C s prítomnosťou integráz, génových kaziet a virulentných faktorov. Vlastnosti všetkých kmeňov sú prehľadne zhrnuté v tabuľke 2.

**Tab.2** Prehľad vlastností komenzálnych telacích kmeňov *E.coli*.

Fenotyp	Detegované gény		Počet kmeňov
	Gény rezistencie	Mobilné genetické elementy a génové kazety	
-			2
A			1
Cot	<i>CIT</i>	<i>Int1</i>	1
Flo	<i>floR</i>		1
St			1
Tc		<i>Int1</i>	1
A N Tc			1
A Flo Tc			1
A N Flo Tc			1
A N Flo Tc	<i>floR</i>		1
A St Tc Cot			2
A N Flo Tc			1
A St Tc Cot	<i>CIT</i>	<i>Int1, sul1, sul2, aadA</i>	1
A St N Flo Tc	<i>CIT, floR</i>	<i>Int1, sul3, aadA</i>	1
A St N En Ci Tc	<i>CIT</i>		1

A-ampicilín, Cot-cotrimoxazol, Flo-florfenikol, St-streptomycín, Tc-tetracyklín, N-kyselina nalidixová, En-enrofloxacín, Ci-ciprofloxacín

Napriek tomu, že tráviaci trakt telacieho dobytku je primárnym zdrojom STEC kmeňov, neodhalili sme ich prítomnosť v našich vzorkách. Potvrdili sme výskyt viacerých ESBL-produkujúcich kmeňov, virulentných faktorov a mobilných génových elementov, nie však v takom rozsahu ako u kuracích kmeňov. No aj tak je možné skonštatovať, že slovenské telacie kmene *E.coli* sú rezervoárom génov rezistencie a ich rozšírenie pomocou mobilných génových elementov ostáva naďalej zdravotným rizikom.

#### POĎAKOVANIE

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

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Carattoli A, Fernández AG, Varesi P, Fortini D, Gerardi S, Penni A, Mancini C, Giordano A. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum B-lactamases isolated in Rome, Italy. *J.Clin.Microbiol.* 2008; 46:103-108.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl.Enviro.Microbiol.* 2000; 66:4555-4558.

- 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.
- Dua X, Shena Z, Wua B, Xiaa S, Shen J. Characterization of class 1 integrons-mediated antibiotic resistance among calf pathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.Lett*. 2005; 245:295-295.
- Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventre A, Elion J, Picard B, Denamur E. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*. 2001; 147:1671-1676.
- Foley SL, Horne SM, Giddings CW, Robinson M, Nolan LK. *Iss* from a virulent avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*. 2000; 44:185-191.
- Germon P, Chen YH, He L, Blanco JE, Brée A, Schouler S. H. *IbeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2005; 151: 1179-1186.
- Ghanbarpour R, Oswald E. Characteristics and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from septicemic calves in southeast of Iran. *Trop.Anim.Health Prod*. 2009; 41:1091-1099.
- Guerra B, Junker E, Helmut R. 2004. Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene *sul3* among german *Salmonella enterica* strains isolated from livestock and food. *Antimicrob. Agents Chemother*. 48:2712-2715.
- Guerra B, Soto SM, Arguelles JM, Mendoza MC. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:2]. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 2001; 45:1305-1308.
- Hollingshead S, Vapnek D. Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase. *Plasmid*. 1985; 13:17-30.
- Hoyle DV, Yates CM, Chase-Topping ME, Turner EJ, Davies SE, Low JC, Gunn GJ, Woolhouse MEJ, Amyes SGB. Molecular epidemiology of antimicrobial-resistant commensal *Escherichia coli* strains in a cohort of newborn calves. *Appl.Environ.Microbiol*. 2005; 71:6600-6688.
- Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J.Infect.Dis*. 2000; 181:261-272.
- Kern MB, Klemmensen T, Frimodt-Moller N, Espersen F. Susceptibility of danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. *J. Antimicrob. Chemother*. 2002; 50:513-516.
- Khachatryan AR, Hancock DD, Besser TE, Call DR. Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. *Appl.Environ.Microbiol*. 2004; 70: 752-757.
- Le Bouguéne 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.Clin.Microbiol*. 1992; 30: 1189-1193.
- Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. Antibiotic resistance in the ECOR collection: Integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob.Agents Chemother*. 2000; 44: 1568-1574.
- Navia MM, Ruiz J, Sanchez-Cespedes J, Vila J. Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2003; 46:295-298.
- Peréz-Peréz FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J.Clin.Microbiol*. 2002; 40:2153-2162.
- Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. *Qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob.Agents. Chemother*. 2006; 50:2872-2874.

## DETEKCIA RESTRIKČNO-MODIFIKAČNÝCH SYSTÉMOV U VYBRANÝCH MLIEČNYCH BAKTÉRIÍ

Dubíková K.<sup>1,2</sup>, Vandžurová A.<sup>2</sup>, Šulák M.<sup>2</sup>,

<sup>1</sup> Univerzita P.J Šafárika v Košiciach, Katedra biochémie, Košice,

<sup>2</sup> Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4-6, Košice

### ABSTRAKT

V práci sme sa zamerali na detekciu a charakterizáciu restrikčno-modifikačných systémov, ako jedného z obranných mechanizmov voči bakteriofágovým infekciám u vybraných mliečnych baktérií. Bakteriálne kmene izolované z mlieka boli identifikované pomocou MALDI-TOF analýzy a zaradené do rodov *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Lactobacillus*. Baktérie rodu *Enterococcus* boli testované na citlivosť voči bakteriofágom MSF1, MSF2 a M4, pričom u šiestich kmeňov sme detegovali prítomnosť jednej z troch restrikčných endonukleáz, identifikovaných ako izoschizoméry HaeIII, SduI a NciI. Všetky testované kmene rodu *Lactobacillus* boli senzitivne voči bakteriofágu *L. plantarum*. Z baktérií rodu *Lactococcus* sme detegovali päť izolátov vykazujúcich rezistenciu voči bakteriofágu *L. lactis* P008.

### ÚVOD

Výsledkom bakteriofágových infekcií pri výrobe fermentovaných mliečnych výrobkov a syrov je nedostatočná produkcia kyseliny mliečnej sprevádzaná zníženou proteolýzou. Strata kontinuity fermentačného procesu narušená fágovou infekciou, často vedie k technologickým problémom a veľkým ekonomickým stratám. V oblasti mliekarenskej výroby, je problém fágovej infekcie veľmi častý. Odhadovaný počet infikovaných fermentačných procesov pri spracovaní mlieka a výrobe mliečnych produktov je až do 10%, pričom objem jedného fermentačného tanku je aj niekoľko tisíc litrov. V priebehu evolúcie došlo u baktérií k vzniku viacerých mechanizmov, ktoré bakteriálnym bunkám zaisťujú ochranu voči bakteriofágom. Baktérie môžu bakteriofágovú infekciu blokovať vo všetkých jej štádiách a sú založené či už na znemožnení väzby fága na povrch bunky, blokácii penetrácie fágovej nukleovej kyseliny do bunky alebo v prípade úspešného prieniku až do cytoplazmy hostiteľa na jej degradácii pomocou restrikčno-modifikačných systémov. Ďalej môžu prebiehať aj tzv. abortívne infekcie, pri ktorých dochádza k zablokovaniu niektorého z kľúčových krokov replikácie, transkripcie či translácie fágovej DNA. Abortívne infekcie však majú za následok smrť nielen fága ale aj samotnej hostiteľskej bakteriálnej bunky.

Cieľom tejto štúdie bola detekcia restrikčno-modifikačných systémov u vybraných bakteriálnych druhov mliečnych baktérií izolovaných priamo z mlieka a mliečnych výrobkov.

### MATERIÁL A METODIKA

*MALDI TOF identifikácia:* rastúce bakteriálne kolónie sme po krátkom spracovaní naniesli na MALDI doštičku a prekryli mikroobjemom matrixového roztoku a po uschnutí ožiarili laserom. Ako MALDI matrixový roztok je doporučený nasýtený roztok HCCA (alfa-kyano-4-hydroxy kyselina škoricová) v organickom rozpúšťadle (OS), ktoré je zložené z 50% acetonitrilu (ACN), 2,5% trifluorooctovej kyseliny (TFA) a destilovanej vody. Hmotnostné spektrá sme získali s využitím FLEX rady MALDI-TOF hmotnostného spektrometra v lineárnom pozitívnom režime pri maximálnej frekvencii (20 až 200 Hz) (Maier a kol., 2006). Získané spektrá sme následne porovnali s databázou referenčných spektier.

*Testovanie na citlivosť voči bakteriofágom:* Podľa double-layer agar metódy (Santos a kol., 2009) sme malý objem bakteriofágovej suspenzie (0,1 µl) a malé množstvo hostiteľských buniek s vysokou hustotou po krátkej inkubácii zmiešali v 2,5 ml 0,7 % soft-agaru pri teplote 46°C. Výslednou suspenziou sme následne prekryli vopred pripravené agarové platne

a vznikla tak tenká vrchná vrstva, ktorá imobilizuje baktérie. Počas inkubácie sa neinfikované baktérie ďalej množia a vytvárajú film na povrchu platne. Každá infikovaná baktéria, ale po krátkom čase uvoľní zrelé fágové potomstvo, ktoré ďalej infikuje okolité baktérie. Táto „reťazová reakcia“ sa šíri ďalej a výsledkom je viditeľná kruhová zóna rozpadnutých bakteriálnych buniek nazývaná „plak“.

Vybrané bakteriálne kmene sme testovali na prítomnosť restriktívnej aktivity v hrubých bunkových extraktoch podľa metódy Javorský, Vanát (1992) s následnou purifikáciou a charakterizáciou detegovaných restriktívnych endonukleáz.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Restriktívno-modifikačné (R-M) systémy predstavujú účinný spôsob, ako baktérie môžu regulovať prenos genetickej informácie. Ich hlavnou funkciou je zabrániť príjmu nežiadúcej DNA, ktorá je pre bunku potenciálne nebezpečná a jej expresia zaťažuje bunkový metabolizmus alebo priamo ohrozuje jej život. Pozostávajú z enzýmov, ktoré sa líšia enzýmovými aktivitami: restriktívnej endonukleázy a DNA metyltransferázy (Pingout A., Jeltsch A., 2000). Modifikačná zložka modifikuje vlastnú DNA baktérie metyláciou adenínu alebo cytozínu v rozpoznávacej sekvencii a restriktívny systém potom degraduje cudzorodú, teda nemodifikovanú DNA bakteriofága. Citlivosť baktérií na bakteriofágy môže byť v niektorých prípadoch nežiadúca a to obzvlášť v mliekarenskom priemysle. Vnímavosť baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu na všadeprítomné bakteriofágy v mliečnom prostredí môže mať vážne dôsledky pre mliekarenský priemysel.

Pomocou MALDI-TOF analýzy bolo 116 bakteriálnych kmeňov izolovaných z mlieka zaradených do rodov *Enterococcus* (61), *Lactococcus* (32), *Lactobacillus* (23).

Baktérie rodu *Enterococcus* boli testované na citlivosť voči bakteriofágom MSF1, MSF2 a M4 (izolovaných z mlieka na UFHZ SAV), pričom všetky izoláty vykazovali rezistenciu k najmenej jednému z týchto bakteriofágov. U siedmich kmeňov sme detegovali prítomnosť jednej z troch restriktívnych endonukleáz, identifikovaných ako izoschizoméry HaeIII, SduI a NciI (Tabuľka 1).

Z celkového počtu 23 bakteriálnych kmeňov rodu *Lactobacillus*, boli po testovaní na citlivosť voči zbierkovému bakteriofágu *Lactobacillus plantarum phage* (ATCC® No. 8014-B1) všetky testované kmene senzitivné. Prítomnosť restriktívnej aktivity v hrubom bunkovom extrakte bola po otestovaní všetkých kmeňov taktiež negatívna.

Z baktérií rodu *Lactococcus*, ktoré boli klasifikované výhradne do druhu *L. lactis*, sme detegovali päť izolátov vykazujúcich rezistenciu voči bakteriofágu *L. lactis* P008. U jedného z týchto kmeňov sme zaznamenali prítomnosť restriktívnej aktivity v hrubom bunkovom extrakte. Naše ďalšie experimenty budú zamerané na charakterizáciu tohto restriktívno-modifikačného systému ako aj na charakterizáciu iných mechanizmov rezistencie voči bakteriofágom potenciálne prítomných u ďalších štyroch kmeňov *L. lactis*.



**Tabuľka 1:** Prehľad výskytu R-M systémov u baktérií rodu *Enterococcus* (+ kmeň citlivý voči bakteriofágu, - kmeň rezistentný voči bakteriofágu)

Bakteriálny kmeň	MSF2	M4	MSF1	Izoschizomér RE
<i>E. sp.</i> 21/b/2	-	-	-	HaeIII
<i>E. faecium</i> 19/B/2	-	-	+	HaeIII
<i>E. sp.</i> 21/b/1	+	+	-	HaeIII
<i>E. faecalis</i> 16/B/2	-	-	-	SduI
<i>E. sp.</i> 18/B/2	-	-	+	SduI
<i>E. faecalis</i> 16/B/1	-	-	-	SduI
<i>E. faecium</i> 1/1/2010	+	-	+	NciI

## POĎAKOVANIE

*Táto práca vznikla s podporou projektu ITMS 26220220065*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bujňáková D, Kmeť V., Functional properties of Lactobacillus strains isolated from dairy products, In Folia Microbiol., 2012;57(4):263-7.
- Javorský P., Vanát I., Deoxyribonuclease activity in Streptococcus bovis. In Lett Appl Microbiol., 1992; 14:108-111.
- Kmeť V, Drugdová Z., Antimicrobial susceptibility of microflora from ovine cheese, In Folia Microbiol., 2012;57(4):291-3.
- Maier T., Klepel S., Renner U. And Kostrzewa M., Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. In Nature Methods 3., 2006
- Pingout A., Jeltsch A., Structure and function of Type II restriction endonucleases. In Nucleic Acids Res., 2000; 29, 3705-3727.
- Santos S. B., Carvalho C. M., Sillankorva S., Nicolau A., Ferreira E.C., and Azeredo J., The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique, In BMC Microbiol., 2009; 9: 148.

# ZMENY V AKTIVITE ANTIOXIDAČNÝCH ENZÝMOV V HLAVNÝCH METABOLIZUJÚCICH ORGÁNOCH POTKANOV PO APLIKÁCI VYSOKOTUKOVEJ DIÉTY A VYBRANÝCH ÚČINNÝCH LÁTOK

Fejerčáková, A.<sup>1</sup>, Vašková, J.<sup>1</sup>, Salaj, R.<sup>2</sup>, Vaško, L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej chémie a klinickej biochémie a LABMED, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

<sup>2</sup>Ústav experimentálnej medicíny, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

## ABSTRAKT

Práca bola zameraná na sledovanie vplyvu vysokotukovej diéty so širokým pomerom polyénových mastných kyselín  $\omega$ -6 ku  $\omega$ -3 (610:1) a jej kombinácie s probiotikami a výťažkom z pagaštana konského na aktivitu antioxidačných enzýmov a hladinu glutatiónu v izolovaných mitochondriách pečene a obličiek potkanov. Do pokusu bolo zaradených 60 kusov 4-mesačných potkanov kmeňa *Sprague-Dawley* rozdelených do 6 pokusných skupín: kontrolná, skupina s vysokotukovou diétou so širokým pomerom  $\omega$ -6 ku  $\omega$ -3 PNMK, skupiny s prídavkom ľanového oleja, probiotika, extraktu z pagaštana konského a skupina s diétou kombinácie ľanového oleja a výťažku z pagaštana konského aplikovaných do vysokotukovej diéty. Vybrané účinné látky ovplyvnili oxidačný stav zvýšením aktivít sledovaných enzýmov v pečeni a obličkách, čo môže mať priaznivý efekt pri adaptácii organizmu voči oxidatívne stresu. Nárast enzýmovej aktivity GR a naopak pokles v aktivite GPx naznačuje na aktiváciu iných antioxidačných mechanizmov. Zistený pokles aktivít enzýmov v experimentálnych skupinách naznačuje, že v organizme pravdepodobne nedochádza k nadprodukcii reaktívnych foriem kyslíka.

## ÚVOD

Tuky sú hlavným zdrojom polynenasýtených mastných kyselín (PNMK). Ich oxidačné deriváty eikozanoidy zasahujú do regulácie každého deja v organizme, tak za fyziologických ako i patologických podmienok. Dôležitým faktorom je nielen absolútny príjem PNMK, ale aj vzájomný pomer medzi  $\omega$ -6 (n-6)  $\omega$ -3 (n-3) PNMK, ktorý by mal byť 10-4:1. Pri konzumovaní stravy so širokým pomerom n-6 ku n-3 PNMK stúpa v populácii úmrtnosť na kardiovaskulárne ochorenia (Simopoulos, 2003). Kľúčovú úlohu v etiológii a prevencii aterosklerózy zohráva hladina LDL cholesterolu ovplyvnená množstvom a zložením tukov v potrave. Pozitívny účinok probiotík a prebiotík na organizmus zvierat a človeka bol dokázaný nielen v prípade porúch trávenia, ale aj zlepšovania pomeru HDL/LDL cholesterolu (Chen a kol., 2010; Ooi a Liong, 2010), čím sa podieľajú na znižovaní rizika vzniku aterosklerózy a srdcovocievnych ochorení. Funkčný stav organizmu je možné ovplyvňovať aj rôznymi prírodnými látkami, napr. fytoextraktmi. Sledovanie účinku kombinácie probiotík a rastlinných extraktov je významné z hľadiska symbiotického vzťahu spektra baktérií s rastlinami pri osídľovaní tráviaceho traktu, následkom čoho dochádza k nárastu funkčnej biologickej populácie mikroorganizmov tráviacej sústavy a tým k zlepšeniu vstrebávania živín z krmiva, pričom sa zlepšuje zdravotný stav a produkcia zvierat (Tannock, 2002; Chrastinová et al. 2008). PNMK sú mimoriadne citlivé na oxidatívne poškodenie. Účinok PNMK v hepatocytoch pri redukcii tvorby aterogénnych lipoproteínov vyžaduje ich intracelulárnu konverziu na lipidové peroxidy stimulujúce predsekretolyckú proteolýzu ich proteínových častí a teda samotná oxidácia PNMK sa takto podieľa na znižovaní sekrécie lipoproteínov z pečene do krvi (Vašková, Vaško, 2010). Súčasná suplementácia antioxidantov môže mať preto aj negatívny dosah. Cieľom našej práce bolo sledovanie vplyvu vysokotukovej diéty so širokým pomerom PNMK  $\omega$ -6 ku  $\omega$ -3 (610:1) a jej kombinácie s probiotikami a výťažkom z pagaštana konského na aktivitu antioxidačných enzýmov a hladinu glutatiónu v izolovaných mitochondriách pečene a obličiek potkanov.

## MATERIÁL A METODIKA

Do pokusu bolo zaradených 60 kusov 4-mesačných potkanov kmeňa *Sprague-Dawley* rozdelených do 6 pokusných skupín. Kontrolná skupina (K) bola kŕmená štandardnou diétou. Skupine s vysokotukovou diétou (HFD) bol aplikovaný sľečnicový olej (20 %) so širokým pomerom  $\omega$ -6 ku  $\omega$ -3 PNMK (610:1). Diéta skupiny HFD+PRO bola doplnená o mliečnu stravu s obsahom  $10^9$  cfu. $1\text{ml}^{-1}$  probiotických mikroorganizmov *Lactobacillus plantarum*. V experimentálnej skupine HFD+LO bol do vysokotukovej diéty aplikovaný ľanový olej. Diéta skupiny HFD+R bola obohatená o suchý extrakt z pagaštana konského (*Aesculus hippocastanum*) v množstve 2%. Pokusná skupina HFD+LO+R bola kŕmená kombináciou vysokotukovej diéty, ľanového oleja a výťažku z pagaštana konského. Zvieratá boli chované v štandardných laboratórnych podmienkach a počas trvania pokusu mali prístup ku kŕmnej zmesi a vode v množstve *ad libitum*. Po 6 mesiacoch trvania pokusu boli potkany usmrtené v súlade s pravidlami stanovenými etickou komisiou. Izolácia mitochondrií pečene a obličiek bola vykonaná pri 4 °C podľa Fernández-Vizarra a kol. (2010). Koncentrácia celkových bielkovín bola stanovená modifikovanou BCA metódou podľa Smitha a kol. (1985). Aktivita glutatión peroxidázy (GPx, E.C. 1.19.1.9) bola stanovená podľa Flohé a Gunzlera (1984) a glutatión reduktázy (2010) podľa Carlberga a Mannervika (1985). Aktivita superoxidodismutázy (SOD, E.C. 1.15.1.1) bola meraná prostredníctvom SOD-Assay Kit-WST (Fluka). Hladina GSH bola stanovená podľa Floreani a kol. (1997) s použitím Ellmanovho činidla. Štatistická významnosť výsledkov bola stanovená t-testom.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Namerané hodnoty SOD v pečeni a obličkách ukázali mierny pokles aktivity s výnimkou aktivity SOD v mitochondriách pečene v skupine s prídavkom pagaštana konského (HFD+R), kde sme naopak zaznamenali nárast oproti kontrolnej skupine (Tab. 1, Tab. 2). SOD eliminuje tvorbu superoxidového radikálu za vzniku neradikálových molekúl, peroxidu vodíka a kyslíka. Týmto mechanizmom chráni organizmus pred oxidačným poškodením významných biomolekúl, napríklad aj lipidov. Zistený pokles v aktivite enzýmu po aplikácii účinných látok naznačuje, že v organizme nedochádza k nadprodukcii reaktívnych foriem kyslíka. Obdobný efekt bol zaznamenaný aj v aktivite enzýmu GPx, ktorý redukuje peroxidy prostredníctvom redukovaného glutatiónu (GSH). Vysokotuková diéta (HFD), rovnako ako aj jej kombinácia s ľanovým olejom (HFD+LO) neovplyvnila aktivitu enzýmu v pečeni, naopak v mitochondriách obličiek bol pozorovaný výrazny pokles. Bolo preukázané, že ľanový olej ako zdroj  $\omega$ -3 PNMK, má antioxidačný a protizápalový efekt (Prasad, 2009). Kyslíkové radikály, ktoré sa v mitochondriách tvoria aj za normálnych okolností vyvolali oxidáciu oxidolabilných PNMK, čím bola znížená tvorba peroxidov, ktoré by musela GPx konvertovať na vodu oxidáciou glutatiónu. Je známe, že oxidované lipidy v krvnom riečisku sú škodlivé a iniciujú aterosogénu, v pečeni sú naopak užitočné a iniciujú odbúravanie lipoproteínov (Vašková, Vaško, 2010). Signifikantný nárast aktivity GPx v pečeni bol zaznamenaný v skupine HFD+PRO, rovnako ako aj v skupine HFD+R v oboch orgánoch. Zistená zvýšená aktivita GPx môže byť dôsledkom zvýšenej produkcie reaktívnych kyslíkových radikálov, resp. ich kumulácie, čo môže viesť k indukcii oxidačného stresu. Hodnoty aktivity GR v pečeni a obličkách kontrolnej skupiny boli porovnateľné vzájomne a taktiež aj so skupinou s prídavkom extraktu z pagaštana konského (HFD+R). V ostatných experimentálnych skupinách sme zaznamenali pokles v aktivite GR, s výnimkou skupiny HFD v obličkách, kde došlo k nárastu oproti kontrole. GR katalyzuje premenu oxidovanej formy glutatiónu späť na jeho redukovanú formu. Nárast v aktivite naznačuje zvýšenú mieru oxidácie GSH v organizme. Pagaštan konský je bohatý na glykozid aesculín a predovšetkým escín, ktorý má priaznivý vplyv na tonus cievnych stien (Kücükkurt, 2010). Tento efekt je spôsobený schopnosťou escínu zvyšovať permeabilitu bunkových membrán pre vápnik, čo zároveň vedie

k zvýšeniu aktivity syntázy oxidu dusnatého a zvýšenej tvorbe samotného oxidu dusnatého (NO) (Carrasco a Vidrio, 2007). V katalytickom centre GPx je seleno-cysteín, ktorý môže byť modifikovaný účinkom vytvoreného NO (Asahi a kol., 1995) a ovplyvniť tak aktivitu GPx. V kontrolnej skupine obličiek sme zaznamenali vyššiu hladinu GSH v porovnaní s hladinou zistenou v pečeni. Glutatión zabezpečuje biotransformáciu a detoxikáciu xenobiotík, preto možno predpokladať aj zmeny jeho hladín po aplikácii exogénnych látok. V obličkách bol pozorovaný pokles hladiny GSH vo všetkých experimentálnych skupinách, čo môže súvisieť s poklesom jeho syntézy v cytozóle a následným prenosom do mitochondrie. V mitochondriách pečene bol zistený nárast hladín GSH vo všetkých sledovaných skupinách, s výnimkou skupiny HFD, pričom najvýraznejší bol v skupine s probiotikom a výťažkom z pagaštana konského.

**Tab. 1** Aktivita antioxidantných enzýmov a hladina GSH v mitochondriách pečene potkanov

PEČEŇ	SOD $\mu\text{kat/g}_p$	GPx $\mu\text{kat/g}_p$	GR nkat/g <sub>p</sub>	GSH nmol/mg <sub>p</sub>
K	6,52 $\pm$ 0,66	0,080 $\pm$ 0,034	49,78 $\pm$ 0,68	4,63 $\pm$ 1,74
HFD	5,18 $\pm$ 1,36	0,098 $\pm$ 0,022	11,20 $\pm$ 2,24***	2,23 $\pm$ 1,37*
HFD + LO	6,10 $\pm$ 0,19	0,073 $\pm$ 0,043	23,37 $\pm$ 2,32***	9,94 $\pm$ 3,18**
HFD + PRO	6,28 $\pm$ 0,81	0,338 $\pm$ 0,028***	10,57 $\pm$ 2,15***	32,97 $\pm$ 5,43***
HFD + R	7,67 $\pm$ 0,44 ***	0,195 $\pm$ 0,010***	35,64 $\pm$ 8,35**	38,97 $\pm$ 2,04***
HFD + R + LO	6,58 $\pm$ 0,07	0,015 $\pm$ 0,008***	28,81 $\pm$ 5,58***	9,48 $\pm$ 1,99**

**Tab. 2** Aktivita antioxidantných enzýmov a hladina GSH v mitochondriách obličiek potkanov

OBLIČKY	SOD $\mu\text{kat/g}_p$	GPx $\mu\text{kat/g}_p$	GR nkat/g <sub>p</sub>	GSH nmol/mg <sub>p</sub>
K	5,93 $\pm$ 0,12	0,278 $\pm$ 0,042	36,17 $\pm$ 3,23	14,14 $\pm$ 2,13
HFD	5,27 $\pm$ 0,15**	0,063 $\pm$ 0,020***	68,98 $\pm$ 8,01***	2,0 $\pm$ 1,85***
HFD + LO	5,67 $\pm$ 0,44	0,062 $\pm$ 0,019***	22,82 $\pm$ 2,31	9,14 $\pm$ 2,48***
HFD + PRO	4,65 $\pm$ 0,11***	0,132 $\pm$ 0,037***	15,23 $\pm$ 3,65***	11,2 $\pm$ 0,60**
HFD + R	5,22 $\pm$ 0,09**	0,389 $\pm$ 0,038***	32,38 $\pm$ 4,81	7,31 $\pm$ 1,26***
HFD + R + LO	4,73 $\pm$ 0,16***	0,164 $\pm$ 0,051**	23,13 $\pm$ 5,27***	12,8 $\pm$ 1,28

\* štatistická významnosť pri  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

## POĎAKOVANIE

Práca bola financovaná z grantov VEGA č. 1/0799/09 a 1/0372/10

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Asahi, M., Fujii, J., Suzuki, K., et al. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide: Implication for cytotoxicity. *J Biol Chem.* 1995; 270:21035–21039.
- Carlberg, I., Mannervik, B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.*, 1985; 113: 484-490.
- Carrasco, O. F., Vidrio, H. Endothelium protectant and contractile effects of the antivaricose principle escin in rat aorta. *Vascul. Pharmacol.* 2007; 47(1): 68-73.
- Fernández-Vizorra, E., Ferrin, G., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Zeviani, M., Enríquez, J.A. Isolation of mitochondria for biogenetical studies: An update. *Mitochondrion.* 2010; 10(3), 253-262.

- Flohe, L., Gunzler, W. A. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984; 105, 114-121.
- Floreani, M., Petrone, M., Debetto, P., Palatini, P. A comparison between different methods for the determination of reduced and oxidized glutathione in mammalian tissues. *Free Radic. Res.* 1997; 26,449-455
- Chen, L.S. Screening for the Potential Probiotic Yeast Strains from Raw Milk to Assimilate Cholesterol. *Dairy Science and Technology*, 2010; 90(5), 537-548.
- Chrastinová, E., Chrenková, M., Lauková, A. a kol. Probiotiká a rastlinné silice vo výžive králikov. *Dni výživy zvierat*. Nitra:SPU, 2008, 108-113.
- Kücük Kurt, I., Ince, S., Kele, H., et al. Beneficial effects of *Aesculus hippocastanum* L. seed extract on the body's own antioxidant defense system on subacute administration. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010; 129, 18-22
- Ooi, LG and Liong MT. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of in vivo and in vitro findings. *Int. J. Mol. Sci.* 2010; 11: 2499-2522.
- Prasad, K. Dietary flax seed in prevention of hypercholesterolemic atherosclerosis. *Dietary Atherosclerosis*. 1997; 132, 69-76.
- Simopoulos, A.P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr.* 2003; 54, 438-463.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 1985; 150, 76-85.
- Tannock, G. W. Probiotics and prebiotics: Where are we going? Otago: Caister Academic Press, 2002. 336 s.
- Vašková J., Vaško, L. Ateroskleróza, 2010, 3-4, 42-47.

## ZHODNOTENIE A POROVNANIE CITLIVOSTI METÓDY STAR A NAT TESTU NA TETRACYKLÍNOVÉ ANTIBIOTIKÁ

Gondová, Z., Kožárová, I.

*Katedra hygieny a technológie potravín*

*Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach*

### ABSTRAKT

Predmetom našej štúdie bolo stanovenie a porovnanie detekčnej citlivosti dvoch mikrobiálnych inhibičných testov (MIT), screeningového testu na stanovenie rezíduí antibiotík (metóda STAR) s použitím testovacieho kmeňa *Bacillus cereus* ATCC 11778 a „the Nouws Antibiotic Test“ (NAT) s použitím testovacieho kmeňa *Bacillus cereus* ATCC 11778 na tri látky zo skupiny tetracyklínových antibiotík: tetracyklín (TTC), oxytetracyklín (OXY) a chlór tetracyklín (CL). Detekčnú citlivosť oboch MIT sme hodnotili na základe stanovenia detekčného limitu metód (LOD) pre jednotlivé sledované látky. Na základe stanoveného maximálneho limitu rezíduí (MRL) boli sledované látky testované v koncentráciách 50; 60; 70; 80; 90; 100; 200; 300; 400; 500 a 600  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . LOD metódy STAR bol pre TTC a CL 50  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , a pre OXY 90  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . LOD NAT testu bol pre TTC a OXY 90  $\mu\text{g.l}^{-1}$  a pre CL 60  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Z uvedených výsledkov vyplýva, že detekčná citlivosť oboch metód je vzájomne porovnateľná. Metódou STAR a NAT testom boli spoľahlivo detegované všetky sledované látky zo skupiny tetracyklínových antibiotík na požadovanej úrovni, dokonca aj v hladinách nižších, ako sú stanovené MRL pre jednotlivé sledované látky. V záujme ochrany zdravia ľudí je citlivosť mikrobiálnych inhibičných testov pre screening rezíduí na úrovni MRL nevyhnutná.

### ÚVOD

Tetracyklíny patria medzi antibiotiká so širokým spektrom účinku vykazujúce aktivitu proti  $G^+$  a  $G^-$  baktériám a protozoám. Chlór tetracyklín je najstarším tetracyklínom, po orálnej aplikácii sa najhoršie resorbuje a rovnako ako oxytetracyklín a tetracyklín sa používa na liečbu infekcií močového a dýchacieho systému (Chopra a Roberts, 2001; Šnirc a kol., 2007; Neuschl, 2008). Výsledkom používania týchto antibiotík je však nevyhnutne prítomnosť ich rezíduí v tkanivách potravinových zvierat 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 rezíduá na príslušnej úrovni. „Príslušnou úrovňou“ rozumieme koncentráciu látky vo vzorke, ktorá je dôležitá na určenie jej zhody s právnymi predpismi, t. j. na úrovni MRL. Pojmom MRL je charakterizovaná 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 vykonávaný pomocou mikrobiálnych inhibičných testov. Princíp týchto metód je založený na inhibícii rastu testovacieho kmeňa v prítomnosti inhibujúcej látky (rezídua), ktorá sa prejavuje tvorbou inhibičných zón (IZ) alebo zmena farby testovacieho agaru nie je pozorovaná.

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<sup>®</sup>TEST, KALIDOS TB, MP a ECLIPSE 50.

Metóda STAR (CH 12.19, 2006) pozostáva z piatich testovacích platní. Každá z platní je špecificky určená pre inú skupinu antibiotík: *Bacillus subtilis* BGA - aminoglykozidy, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 – makrolidy a beta-laktámové antibiotiká, *Bacillus cereus* ATCC 11778 – 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 konfirmáciu. NAT test nepatrí medzi úradné metódy schválené na stanovenie rezíduí antimikrobiálnych látok v produktoch živočíšneho pôvodu a rovnako ako pri metóde STAR, na stanovenie tetracyklínových antibiotík je určený testovací kmeň *Bacillus cereus* ATCC 11778.

Predmetom našej práce bolo porovnanie detekčnej citlivosti testovacieho kmeňa *Bacillus cereus* ATCC 11778 metódy STAR a NAT testu na tetracyklínové antibiotiká. LOD oboch metód sme porovnávali s MRL stanovenými pre tetracyklínové antibiotiká nariadením Komisie (EÚ) č. 37/2010 (TTC 100  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , OXY 100  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  a CL 100  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

## MATERIÁL A METODIKA

**Štandardné roztoky.** Zásobné roztoky štandardov (1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) TTC (61HO6085), OXY (H - 3) a CL (51HO0225), zakúpených od firmy Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) boli pripravené rozpustením 10 mg štandardu v 10 ml deionizovanej sterilnej vode a 1 - 2 ml 0,1 M HCl (A080068/01, Mikrochem, Česká republika). Pracovné roztoky štandardov boli pripravené ďalším riedením na výsledné koncentrácie 50; 60; 70; 80; 90; 100; 200; 300; 400; 500 a 600  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

**Testovacie kmene a kultivačné médiá.** STAR – *Bacillus cereus* ATCC 11778 (CCM, Brno, Česká republika), testovací agar pH 6 (Merck 10663, Darmstadt, Nemecko). NAT – *Bacillus cereus* ATCC 11778 (CCM, Brno, Česká republika), testovací agar Iso-sensitest agar pH 6,0 (Oxoid L.t.D., Basingstoke, Veľká Británia).

**Príprava kultivačných médií a testovanie štandardných roztokov.** STAR – kultivačné médium bolo naočkované *Bacillus cereus* ATCC 11778 s finálnou koncentráciou spór  $3\cdot 10^4$  spór. $\text{ml}^{-1}$ . Disky z filtračného papiera ( $\varnothing$  9 mm, Whatman No. 1, L.t.D., Maidstone, Veľká Británia) boli napustené 30  $\mu\text{l}$  štandardov TTC, OXY a CL a aplikované na povrch stuhnutého kultivačného média v Petriho miske. Takto pripravené platne sa inkubovali v termostate pri teplote  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  16 – 18 hodín.

NAT – kultivačné médium bolo naočkované *Bacillus cereus* ATCC 11778 v množstve  $10^5\cdot\text{ml}^{-1}$ . Kultivačné médium obsahovalo prídavok chloramfenikolu (CAP 16785; Serva; Seron Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemecko) v koncentrácii 625  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , ktorý sa pridával do 100 ml agaru. Disky z filtračného papiera ( $\varnothing$  12,7 mm, Whatman 1, Schleicher&Schuell 2668) boli nasiaknuté 100  $\mu\text{l}$  štandardných roztokov TTC, OXY a CL a aplikované do otvorov v stuhnutom kultivačnom médiu s priemerom 14 mm, vytvorených pomocou sterilného korkovrtu. K diskom sa pridával 0,1 M platňovo špecifický tlmivý roztok s pH 6,0 (200  $\mu\text{l}$ ). Takto pripravené platne sa inkubovali v termostate pri teplote  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  16 – 18 hodín.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Detekčná schopnosť metódy (LOD) je rozhodnutím Komisie 2002/657/ES definovaná ako najnižší obsah látky, ktorý môže byť vo vzorke detegovaný. V prípade 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 TTC, OXY a CL sú prezentované v Tabuľkách 1 – 2. Veľkosti IZ sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  smerodajná odchýlka (SD) jedenástich meraní (Microsoft Office Excel 2007).

Pri metóde STAR sme zaznamenali inhibíciu rastu testovacieho kmeňa *Bacillus cereus* ATCC 11778 tvorbou IZ pri reziduálnej koncentrácii štandardov TTC a CL 50  $\mu\text{g.l}^{-1}$  a pri OXY pri reziduálnej koncentrácii 90  $\mu\text{g.l}^{-1}$  (Tab. 1). Uvedené reziduálne koncentrácie predstavujú LOD metódy STAR s testovacím kmeňom *Bacillus cereus* ATCC 11778 pre sledované látky.

**Tab. 1 Veľkosti IZ  $\pm$  SD (mm) vytvorené reziduálnymi koncentraciami štandardov TTC, OXY a CL pri metóde STAR s testovacím kmeňom *Bacillus cereus* ATCC 11778**

$\mu\text{g.l}^{-1}$	50	60	70	80	90	<b>100 (MRL)</b>	200	300	400	500	600
<b>TTC</b>	3,21 $\pm$ 1,43	1,34 $\pm$ 0,15	2,46 $\pm$ 0,56	1,97 $\pm$ 0,5	2,13 $\pm$ 0,22	<b>2,73</b> $\pm$ <b>0,68</b>	2,97 $\pm$ 1,2	3,25 $\pm$ 0,76	5,58 $\pm$ 2,55	5,42 $\pm$ 0,54	5,86 $\pm$ 0,57
<b>OXY</b>	-	-	-	-	3,28 $\pm$ 0,46	<b>2,95</b> $\pm$ <b>1,16</b>	3,36 $\pm$ 0,33	3,86 $\pm$ 1,53	3,12 $\pm$ 0,99	4,05 $\pm$ 0,71	4,78 $\pm$ 0,47
<b>CL</b>	2,89 $\pm$ 1,18	3,71 $\pm$ 1,58	3,05 $\pm$ 0,74	4,45 $\pm$ 1,25	3,46 $\pm$ 1,53	<b>4,32</b> $\pm$ <b>1,45</b>	6,41 $\pm$ 2,3	7,17 $\pm$ 0,64	7,16 $\pm$ 0,85	6,64 $\pm$ 0,39	9,96 $\pm$ 0,63

Pri NAT teste sme zaznamenali inhibíciu rastu testovacieho kmeňa *Bacillus cereus* ATCC 11778 tvorbou IZ pri reziduálnej koncentrácii TTC a OXY 90  $\mu\text{g.l}^{-1}$  a pri CL pri reziduálnej koncentrácii 60  $\mu\text{g.l}^{-1}$  (Tab. 2). Uvedené reziduálne koncentrácie predstavujú LOD NAT testu s testovacím kmeňom *Bacillus cereus* ATCC 11778 pre sledované látky.

**Tab. 2 Veľkosti IZ  $\pm$  SD (mm) vytvorené reziduálnymi koncentraciami štandardov TTC, OXY a CL pri NAT teste s testovacím kmeňom *Bacillus cereus* ATCC 11778**

$\mu\text{g.l}^{-1}$	50	60	70	80	90	<b>100 (MRL)</b>	200	300	400	500	600
<b>TTC</b>	-	-	-	-	19,35 $\pm$ 0,18	<b>19,86</b> $\pm$ <b>0,41</b>	21,85 $\pm$ 1,93	21,21 $\pm$ 2,14	20,9 $\pm$ 1,37	19,91 $\pm$ 1,54	22,66 $\pm$ 1,63
<b>OXY</b>	-	-	-	-	18,29 $\pm$ 0,38	<b>21,91</b> $\pm$ <b>1,45</b>	18,17 $\pm$ 0,82	18,68 $\pm$ 2,43	20,81 $\pm$ 0,64	21,17 $\pm$ 0,88	19,71 $\pm$ 0,66
<b>CL</b>	-	17,69 $\pm$ 0,06	17,69 $\pm$ 0,06	19,7 $\pm$ 1,57	17,71 $\pm$ 0,48	<b>20,42</b> $\pm$ <b>1,85</b>	24,68 $\pm$ 0,87	25,07 $\pm$ 0,18	27,4 $\pm$ 2,59	27,26 $\pm$ 1,26	28,8 $\pm$ 3,02

Z pohľadu MRL stanovených pre jednotlivé látky zo skupiny tetracyklínových antibiotík konštatujeme, 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 *Bacillus cereus* ATCC 11778 pre OXY a TTC 75  $\mu\text{g.l}^{-1}$  a CL 50  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Nami dosiahnuté výsledky avšak poukazujú na vyššie LOD metódy NAT s testovacím kmeňom *Bacillus cereus* ATCC 11778 pre všetky sledované látky zo skupiny tetracyklínových antibiotík, však stále v hladinách záujmu.



## ZÁVER

Monitoring rezíduí antibiotík v živočíšnych produktoch, ako aj vývoj nových metód detekcie antibiotík je veľmi dôležitý z pohľadu ochrany verejného zdravia. Obidve porovnávané metódy patria medzi platňové difúzne metódy, kde sa prítomnosť inhibujúcej látky (rezíduum) prejaví tvorbou čirej zóny inhibície. Z vyššie uvedených výsledkov vyplýva, že testovací kmeň *Bacillus cereus* ATCC 11778 oboch MIT spoľahlivo zachytával reziduálne koncentrácie štandardných roztokov tetracyklínových 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 MŠ SR VEGA 1/0939/12.

## 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.
- CHOPRA, I. ROBERTS, M.: Tetracycline antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular biology, and Epidemiology of Bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 2, 2001, s. 232 - 260.
- 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.
- 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.
- NEUSCHL, J. : Tetracyklíny. In: ČONKOVÁ, E. a kol. :Veterinárska farmakológia I. diel 1. vyd. Košice : Viena s. r. o. 2008, s. 54 – 63. 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.
- ŠNIRC, J., SOKOL, J., SEGINKO, J., HERA, A : Léčiva používané při léčbě infekčních onemocnění. In: Klinická veterinárna farmakológia, Martin, Neografia a. s., 2007, s. 107 – 137. ISBN 978-80-88892-75-5
- 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.

# VPLYV OBEZITY, LIPIDOVÝCH ANOMÁLIÍ NA ATEROGENITU V SKUPINE UNIVERZITNÝCH ŠTUDENTOV

Hertelyová, Z., Vaško L.

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

## ABSTRAKT

Odborníci v súčasnosti poukazujú na relatívne vysoký výskyt významných kardiovaskulárnych rizík v populácii Slovenska. Obezita, zvýšená hladina cholesterolu (najmä frakcia LDL) a nízka hladina frakcie HDL sú považované za významné rizikové faktory vzniku kardiovaskulárnych ochorení. Cieľom našej práce bolo hľadať vzájomné korelácie obezity, jednotlivými parametrami lipidového profilu a aterogénnych indexov v sledovanej skupine. Krvné séra boli získané od študentov (n=200) UPJŠ Košice v mesiacoch máj-jún 2012. Priemerný vek mužov (n=100) a žien (n=100) bol 23,19±4,36 rokov.

Obezitu sme stanovili tromi spôsobmi: BMI, určením percentuálneho zastúpenia telesného tuku v tele a meraním obvodu pásu. Lipidový profil (TC, HDL a TAG) bol stanovený spektrofotometricky enzymatickou metódou na biochemickom analyzátore COBAS MIRA.

Aterogénne indexy sme získali takisto výpočtom. Štatistické vyhodnotenie boli urobené pomocou programu SPSS 16,0. Získané výsledky reprezentujú priemer±SD u mužov a žien, percentuálne zastúpenie biochemických parametrov rizikových faktorov (RF) KVO a korelačné vzťahy medzi sledovanými parametrami. Zistené údaje hodnôt cholesterolu (TC, HDL a LDL), obezity a aterogénnych indexov nabádajú k potrebe širokého záberu prevencie a zvýšeného úsilia v oblasti nefarmakologického ovplyvňovania rizikových faktorov vyplývajúcich zo spôsobu života VŠ študentov.

## ÚVOD

Vysokoškolská mládež nie je podľa sociologicko-profesionálneho zaradenia najohrozenejšou skupinou obyvateľstva z hľadiska výskytu civilizačných ochorení, ale je nevyhnutné cielene zlepšovať jej vzdelávanie v zmysle zásad zdravého životného štýlu podľa odporúčaní svetovej zdravotníckej organizácie (World Health Organisation – WHO) s cieľom prispieť k zlepšeniu zdravia celej populácie (Allender a kol., 2008, Jurkovičová a kol., 2005). Slovenská republika dlhodobo patrí ku krajinám s najvyššou chorobnosťou a úmrtnosťou na kardiovaskulárne ochorenia (KVO) v Európe. Chronické ochorenia – najmä KVO, nádorové, diabetes mellitus, obezita a ochorenia dýchacieho systému – majú u nás vedúce postavenie spomedzi všetkých príčin smrti (Kamenský a kol., 2008).

Cieľom našej práce bolo vypočítať priemerné hodnoty a ich štandardné odchýlky sledovaných (meraných aj vypočítaných) parametrov v sledovanej skupine, hľadať vzájomné korelácie obezity a jednotlivými parametrami lipidového profilu a aterogénnych indexov a porovnať medzi pohlaviami. Ďalším cieľom bolo určiť percentuálny výskyt obezity podľa kritérií NCEP–ATP III a IDF, obsah tuku, abdominálnej obezity a rizikových hodnôt lipidových a aterogénnych parametrov u mužov a žien.

## MATERIÁL A METODIKA

Krvné séra boli získané od študentov (n=200) UPJŠ Košice v mesiacoch máj-jún 2012. Priemerný vek mužov (n=100) a žien (n=100) bol 23,19±4,36 rokov.

Obezitu sme stanovili tromi spôsobmi: BMI (body mass index), ako pomer telesnej hmotnosti (kg) a mocniny výšky (m<sup>2</sup>); určením percentuálneho zastúpenia telesného tuku v tele (použili sme bioimpedačnú metódu) a meraním obvodu pásu (Bernasovská, 2010). Obvod pásu sme hodnotili podľa kritérií NCEP–ATP III (muži: <102 cm, ženy <88 cm) a IDF platné pre Európsku populáciu (muži <94 cm, ženy <80 cm) (Galajda, 2007; Petrášová, 2010).

Lipidový profil (TC, HDL a TAG) bol stanovený spektrofotometricky enzymatickou metódou na biochemickom analyzátoe COBAS MIRA. Diagnostické reagentie pre kvantitatívne in vitro stanovenia sme získali z laboratória BioVendor – Laboratórní medicína, a.s. Brno. Ostatné lipidové parametre, ako non HDL, LDL boli stanovené výpočtom: non HDL = TC – HDL; LDL Friedelwaldovou rovnicou = TC – HDL – (TG/2.2).

Aterogénne indexy, ako % HDL k TC, AIP, AT1 a AT2 sme získali takisto výpočtom: AIP =  $\log(\text{TAG}/\text{HDL})$  (Dobiášová, 2007); AT1: TC/HDL, AT2: TAG/HDL (Jurkovičová a kol., 2010, Švandová a kol., 2010).

Štatistické vyhodnotenie boli urobené pomocou programu SPSS 16,0. Získané výsledky reprezentujú priemer $\pm$ SD u mužov a žien, percentuálne zastúpenie biochemických parametrov rizikových faktorov (RF) KVO a korelačné vzťahy medzi sledovanými parametrami.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tabuľka 1 prezentuje priemerné hodnoty a štandardné odchýlky parametrov obezity. V nasledujúcej tabuľke (tab. 2) sú uvedené parametre lipidového profilu – TC, HDL, non HDL, LDL a TAG. V tabuľke 3 sú uvedené hodnoty priemerov a ich štandardných odchýlok určujúcich aterogenitu.

Tab.1: Priemerné a štandardné odchýlky parametrov obezity v sledovanej skupine

	<b>Parametre obezity</b>				
	<b>Priemer<math>\pm</math>štandardné odchýlky</b>				
<b>Pohlavie</b>	<b>Hmotnosť'</b>	<b>Výška</b>	<b>BMI</b>	<b>Obvod pásu</b>	<b>% tuku</b>
<b>Spolu</b>	70,99 $\pm$ 15,49	174,12 $\pm$ 9,48	23,28 $\pm$ 4,06	79,81 $\pm$ 11,80	20,34 $\pm$ 8,08
<b>Muži</b>	79,96 $\pm$ 13,96	181,11 $\pm$ 6,95	24,36 $\pm$ 3,92	85,60 $\pm$ 11,23	17,49 $\pm$ 6,96
<b>Ženy</b>	62,00 $\pm$ 11,21	167,13 $\pm$ 5,82	22,21 $\pm$ 3,93	74,01 $\pm$ 9,26	26,93 $\pm$ 6,56

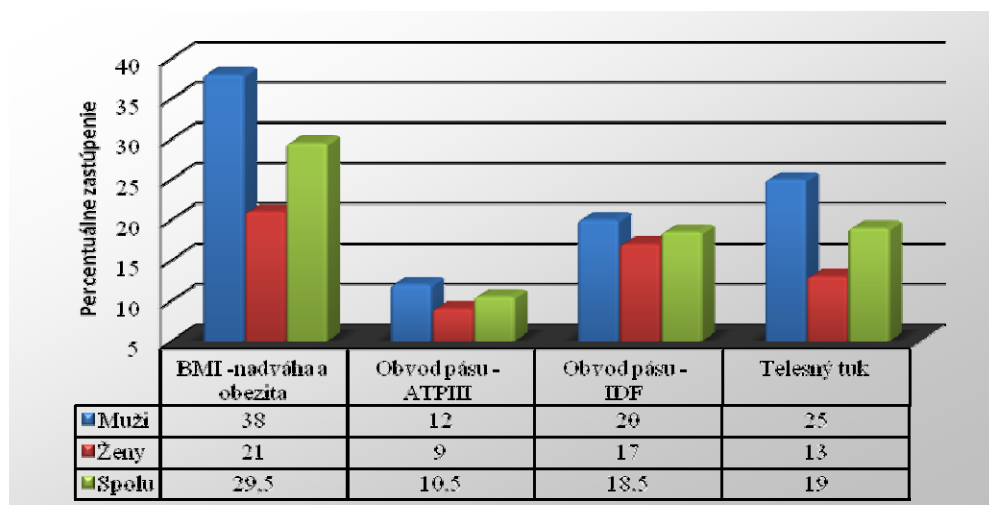
Tab.2: Priemerné a štandardné odchýlky parametrov lipidového profilu v sledovanej skupine

	<b>Parametre lipidového profilu</b>				
	<b>Priemer<math>\pm</math>štandardné odchýlky</b>				
<b>Pohlavie</b>	<b>TC</b>	<b>HDL</b>	<b>non HDL</b>	<b>LDL</b>	<b>TAG</b>
<b>Spolu</b>	4,64 $\pm$ 0,98	1,21 $\pm$ 0,37	3,43 $\pm$ 0,86	2,97 $\pm$ 0,78	1,03 $\pm$ 0,57
<b>Muži</b>	4,35 $\pm$ 0,86	1,06 $\pm$ 0,23	3,30 $\pm$ 0,85	2,85 $\pm$ 0,76	0,99 $\pm$ 0,47
<b>Ženy</b>	4,93 $\pm$ 1,00	1,36 $\pm$ 0,42	3,57 $\pm$ 0,85	3,08 $\pm$ 0,78	1,07 $\pm$ 0,65

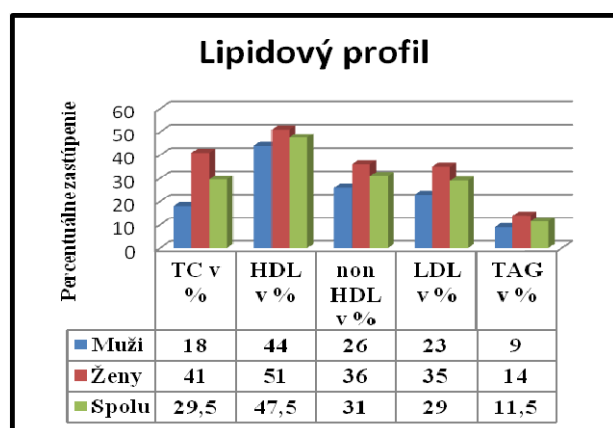
Tab.1: Priemerné a štandardné odchýlky parametrov aterogenity v sledovanej skupine

	<b>Parametre aterogénnych indexov</b>				
	<b>Priemer<math>\pm</math>štandardné odchýlky</b>				
<b>Pohlavie</b>	<b>LDL/HDL</b>	<b>AIP</b>	<b>%HDL/TC</b>	<b>AT1</b>	<b>AT2</b>
<b>Spolu</b>	2,63 $\pm$ 0,91	-0,10 $\pm$ 0,24	26,37 $\pm$ 6,67	4,05 $\pm$ 1,09	0,94 $\pm$ 0,65
<b>Muži</b>	2,81 $\pm$ 0,94	-0,06 $\pm$ 0,25	25,00 $\pm$ 6,40	4,28 $\pm$ 1,17	1,03 $\pm$ 0,70
<b>Ženy</b>	2,44 $\pm$ 0,84	-0,14 $\pm$ 0,23	27,75 $\pm$ 6,67	3,82 $\pm$ 0,96	0,85 $\pm$ 0,60

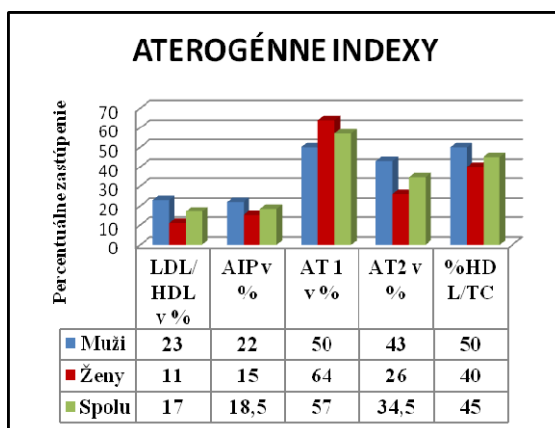
Grafy 1,2 a 3 znázorňujú percentuálne zastúpenie respondentov, ktorí mali rizikové hodnoty sledovaných parametrov.



Graf 1: Grafické vyjadrenie anomálnych hodnôt obezity v %



Graf 2: Zastúpenie lipidového profilu v %



Graf 3: Zastúpenie aterogenity v %

V našej práci sme zistili nasledovné korelačné vzťahy u mužov medzi obvodom pásu a BMI (22,10), obvodom pásu a HDL(4,69), obvodom pásu a telesným tukom (13,91), obvodom pásu a TAG (7,60), obvodom pásu a AIP (12,49), obvodom pásu a %HDL k TC (11,13), obvodom pásu a AT1 (11,24), obvodom pásu a AT2 (13,11) a obvodom pásu a pomerom LDL/HDL (9,59) pri  $p < 0,001$ ; obvodom pásu a LDL (2,67) pri  $p < 0,01$ . U žien sme našli korelačné vzťahy pri  $p < 0,001$  medzi obvodom pásu a BMI (22,51), obvodom pásu a telesným tukom (10,56), (7,60), obvodom pásu a AIP (7,33), obvodom pásu a %HDL k TC (5,55), obvodom pásu a AT1 (6,08), obvodom pásu a AT2 (7,63) a obvodom pásu a pomerom LDL/HDL (4,86) a pri  $p < 0,01$  medzi obvodom pásu a TAG (3,34). U žien nekorelovali vzťahy medzi obvodom pásu a HDL a obvodom pásu a LDL.

## ZÁVER

Aterosklerózou podmienené KVO sú hlavnou príčinou morbidity a mortality takmer vo všetkých priemyselne rozvinutých krajinách sveta (Allender a kol., 2008). Hlavnými RF KVO v populácii vysokoškolských študentov sú zvýšená hladina cholesterolu (TC, LDL, HDL), TAG a aterogénnych indexov v krvi, a pod., t.j. faktory, ktoré nebolia a nemajú príznaky. Každý človek by mal mať taktiež záujem poznať hladinu cholesterolu a ostatných RF, a mal by si ich dať vyšetriť aspoň každých 5 rokov (Švandová a kol., 2010). Takisto je potrebné

jednoznačne zlepšiť uvedomenie aj u mladých ľudí, pretože v posledných rokoch sa RF KVO stávajú problémom aj v nižších vekových kategóriách (Kamenský a kol., 2008). Zistené údaje hodnôt cholesterolu (TC, HDL a LDL), obezity a aterogénnych indexov nabádajú k potrebe širokého záberu prevencie a zvýšeného úsilia v oblasti nefarmakologického ovplyvňovania rizikových faktorov vyplývajúcich zo spôsobu života VŠ študentov.

#### POĎAKOVANIE

Predkladaná práca bola finančne podporená výskumnými grantami GSD 1/2011, GSS 1/2011, GSS 3/2011, GSS 4/2011 a VEGA 1/1236/12.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Allender, S., Scarborough, P., Peto, V. a kol. European cardiovascular disease statistics. British Heart Foundation Health Promotion Research Group, 2008, 112.
- Jurkovičová, J. Vieme zdravo žiť? Zdravotný stav slovenskej populácie 1999 – 2004 a prevencia kardiovaskulárnych a civilizačných ochorení. Bratislava: UK, 2005: 166. ISBN 80-223-2132-X.
- Jurkovičová, J., Štefániková, Z., Sobotová, L., Ševčíková, E. Prevalencia a trendy vývoja rizikových faktorov kardiovaskulárnych chorôb u vysokoškolákov. Životné podmienky a zdravie. 2010, 142-151.
- Kamenský, G. a kol. Národný kardiovaskulárny program Slovenskej republiky. Bratislava: MZ SR, 2008, 46.
- Švandová, M., Jakušová, V., Benková, E. Hodnoty celkového cholesterolu, HDL a LDL cholesterolu u 18- až 26-ročných klientov v základnej poradni zdravia v Liptovskom Mikuláši. Životné podmienky a zdravie, 2010, 172-178.
- Galajda, P. Metabolický syndróm, kardiovaskulárne a metabolické riziká. Via practica, 2007, roč. 4 (S4), 5–9. ISSN 1336-4790.
- Bernasovská, K. a kol. Prevalencia nadhmotnosti a obezity u medikov. Životné podmienky a zdravie. 2010, 166-171. ISBN 978-80-7159-176-4
- Petrášová, M. a kol. Obvod pásu alebo BMI? Životné podmienky a zdravie. 2010, 166-171. ISBN 978-80-7159-176-4.

## ANTIPROLIFERATÍVNY ÚČINOK SYNTETICKÝCH DERIVÁTOV INDOLOVÝCH FYTOALEXÍNŮV

Chripková M., Pilátová M., Drutovič D., Zigo F.<sup>1</sup>, Kutschy P.<sup>2</sup>, Mirossay L., Mojžiš J.

Ústav farmakológie, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

<sup>1</sup>Ústav chovu zvierat, UVLF, Košice

<sup>2</sup>Katedra organickej chémie, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice

### ABSTRAKT

Indolové fytoalexíny, izolované z čeľade kapustovité, sú svojou štruktúrou neobvyklé prírodné látky, ktoré poskytujú priestor pre vznik stále nových konformácii vyznačujúcich sa biologickou aktivitou, vrátane antiproliferatívneho účinku. Brasinín patrí medzi najvýznamnejšie a prvé izolované indolové fytoalexíny. Cieľom práce bolo zistiť možný antiproliferatívny účinok testovaných derivátov brasinínu na nádorových bunkových líniách kolorektálneho a hepatocelulárneho karcinómu a zaoberať sa štúdiom potenciálneho mechanizmu účinku najúčinnnejšej látky. Pomocou kolorimetrického MTT testu sme stanovili antiproliferatívny efekt študovaných látok. Spomedzi testovaných derivátov vykazoval najvyššiu antiproliferatívnu aktivitu 1-metoxybrasinín na nádorovej bunkovej línii HepG2 (IC<sub>50</sub> 5,5 μmol.l<sup>-1</sup>). Tento antiproliferatívny účinok sme potvrdili aj systémom Xcelligence. Analyzovaním fragmentácie DNA pomocou gélovej elektroforézy sme zistili, že 1-metoxybrasinín spôsobuje fragmentáciu DNA buniek HepG2 už po 24 h inkubácii.

### ÚVOD

Každoročne na Slovensku pribúda viac ako 21-tisíc novodiagnostikovaných zhubných nádorových ochorení. V súčasnej dobe existuje len obmedzené množstvo protinádorových liečiv, ktoré by mali vyslovene kuratívny účinok. Príroda je atraktívnym zdrojom terapeutických zlúčenín, ktoré sú vhodné pre dnešný molekulovo orientovaný prístup v liečbe onkologických ochorení (Cibíková a kol., 2010). Z prírodných látok s potenciálnymi antiproliferatívnymi a chemopreventívnymi účinkami tvoria zaujímavú skupinu indolové fytoalexíny. Sú to antimikrobiálne sekundárne metabolity kapustovitých rastlín s nízkou molekulovou hmotnosťou produkované rastlinami „*de novo*“ po vystavení biologickému (baktérie, plesne, vírusy), fyzikálnemu (UV žiarenie, teplotný šok, poranenie), či chemickému (ťažké kovy) stresu. V súčasnosti je známych okolo 44 rôznych druhov. Brasinín bol medzi prvými izolovanými indolovými fytoalexínmi (Pedras a kol., 2000). U tejto látky bola zistená antiproliferatívna aktivita a chemopreventívne pôsobenie v iniciačnej a promočnej fáze karcinogenézy (Mehta a kol., 1995). Medzi ďalšie významné indolové fytoalexíny vyznačujúce sa antiproliferatívnymi účinkami patria cyklobrasinín, 1-metoxybrasinín, spirobrasinín, brasilexín, kamalexín, 1-metoxyspirobrasinín, 1-metoxyspirobrasinol, 1-metoxyspirobrasinol metyl éter a iné. Mechanizmus ich antiproliferatívneho účinku je stále neobjasnený (Pedras a kol., 2003).

V našej štúdií sme sledovali antiproliferatívny účinok derivátov brasinínu na vybraných nádorových bunkových líniách.

### MATERIÁL A METÓDY

Testovali sme antiproliferatívny efekt brasinínu a jeho 17 substitučných derivátov. Látky boli syntetizované na Katedre organickej chémie PF UPJŠ pod vedením Doc. RNDr. P. Kutschyho, PhD. Experimenty s testovanými látkami boli realizované na nádorových bunkových líniách: HepG2 (hepatocelulárny karcinóm) a HCT-116 (kolorektálny karcinóm). Bunky boli kultivované v kultivačnom médiu RPMI 1640 (Life Technologies) obohateného o 10 % fetálneho bovinného séra a 1 % penicilínu/streptomycínu (100 μg.ml<sup>-1</sup>) v atmosfére s 5 % CO<sub>2</sub> pri 37°C.

Ako skriningovú metódu na zistenie antiproliferatívneho účinku testovaných látok sme použili kolorimetrický MTT test podľa Mosmanna (1983). MTT testom sme stanovili strednú inhibičnú koncentráciu ( $IC_{50}$ ) jednotlivých derivátov. Antiproliferatívny efekt najúčinnnejšej látky bol potvrdený aj systémom Xcelligence (Roche). Metóda je založená na meraní impedancie buniek (elektrický odpor pre striedavý prúd) a je použiteľná pre bunky, ktoré sú schopné adhérencie. Hodnoty elektrickej impedancie sú zobrazované ako bunkový index meraný v určitých časových intervaloch. Pokiaľ sú bunky zle prichytené, alebo nie sú vôbec prítomné, hodnota elektrického odporu sa rovná 0.

Štúdium potenciálneho mechanizmu sme vykonali analyzovaním fragmentácie DNA pomocou gélovej elektroforézy.

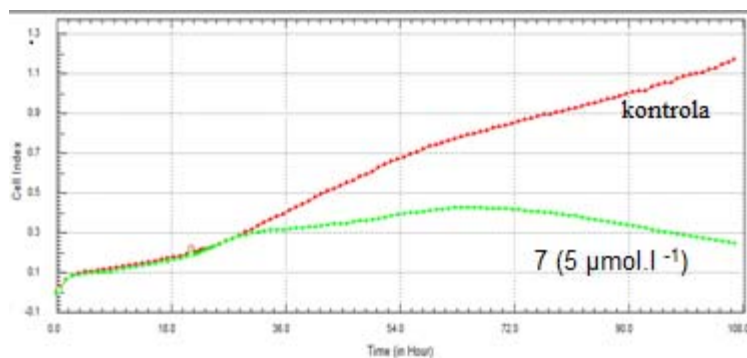
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pomocou MTT testu sme zaznamenali, že najvyšší inhibičný efekt vykazovala látka s kódovým označením 7, teda 1-metoxybrasínin, na bunkách HepG2 ( $IC_{50}$  5,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Na nádorovú bunkovú líniu HCT-116 bola najúčinnnejšia látka K118 s  $IC_{50}$  8,3  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  (Tab. 1).

Tab. 1 Hodnoty  $IC_{50}$  ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) testovaných látok. Hodnoty sú znázornené spolu s vyjadrením smerodajných odchýlok ( $\pm$  SD) vypočítaných z troch nezávislých experimentov

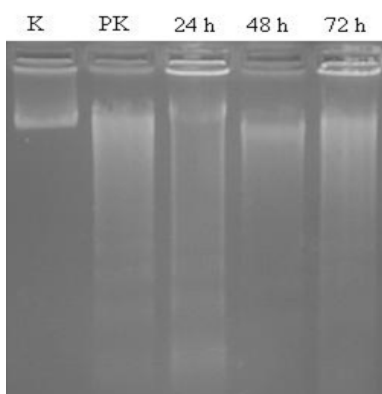
Testované látky	$IC_{50}$ ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	
	HepG2	HCT-116
<b>1</b>	>100	>100
<b>7</b>	5,5 ( $\pm$ 1,6)	>100
<b>K1</b>	21,3 ( $\pm$ 2,3)	27,3 ( $\pm$ 1,8)
<b>K2</b>	>100	>100
<b>K9</b>	80,6 ( $\pm$ 0,5)	>100
<b>K10</b>	>100	>100
<b>K51</b>	35,5 ( $\pm$ 2,8)	41,6 ( $\pm$ 1,3)
<b>K54</b>	32,0 ( $\pm$ 1,5)	28,6 ( $\pm$ 0,5)
<b>K88</b>	>100	>100
<b>45</b>	>100	>100
<b>46</b>	>100	>100
<b>47</b>	>100	>100
<b>K60</b>	7,8	9,3 ( $\pm$ 0,4)
<b>K104</b>	36,0 ( $\pm$ 1,3)	37,6 ( $\pm$ 2,1)
<b>K118</b>	16,5 ( $\pm$ 0,6)	8,3 ( $\pm$ 0,3)
<b>K119</b>	24,8 ( $\pm$ 3,2)	29,1 ( $\pm$ 1,3)
<b>K123</b>	59,8 ( $\pm$ 2,8)	42,2 ( $\pm$ 2,0)
<b>K124</b>	54,9 ( $\pm$ 1,2)	30,7 ( $\pm$ 2,9)

Systémom Xcelligence sme zistili, že vplyvom sledovanej látky bunkový index HepG2 buniek postupom času klesá, čo je znakom odumierania a odlepovania buniek (Obr. 1).



Obr. 1 Vplyv 1-metoxybrasinínu na bunkový index HepG2 buniek.

Jedným zo znakov apoptózy na úrovni jadra je štiepenie DNA na nukleozomálne jednotky. Už po 24 hodinovej inkubácii buniek HepG2 s látkou 7 došlo k viditeľnej fragmentácii DNA a tento účinok pretrvával aj po 48 a 72 hodinovej inkubácii (Obr. 2).



Obr. 2 Účinok 1-metoxybrasinínu na prítomnosť DNA fragmentov v HepG2 bunkách. K–kontrola, PK–pozitívna kontrola (cisplatina 50 µmol.l<sup>-1</sup>), 24, 48, 72 h inkubácia s 1-metoxybrasinínom (5 µmol.l<sup>-1</sup>).

1-methoxybrassinín vykazoval zaujímavé antiproliferatívne účinky aj v štúdií Pilátovej a kol. (2005) na bunkovej línii Jurkat (ľudská akútna T-lymfoblastická leukémia) s IC<sub>50</sub> 10 µmol.l<sup>-1</sup>. Brassinín v našich experimentoch nevykazoval antiproliferatívny efekt ani pri najvyššej koncentrácii (100 µmol.l<sup>-1</sup>) na testovaných nádorových bunkových líniiach. U tejto látky bol zaznamenaný chemopreventívny efekt na modeli DMBA (7,12- dimetylbenzantracén) indukovanej karcinogenézy prsnej žľazy myší, kde inhiboval formovanie preneoplastických prsníkových lézií na 73 % (Mehta a kol., 1995).

O protinádorovom účinku brasinínu a ďalších indolových fytoalexínov existuje v súčasnosti veľmi málo údajov, čo je veľkou motiváciou pre ďalší výskum týchto pozoruhodných fytochemikálií.

#### POĎAKOVANIE

Práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0325-07, VEGA grantom 1/0302/10; 1/0304/10 SEPO (ITMS kód: 26220120039) a SEPO (ITMS kód: 26220120024). Poďakovanie patrí aj spoločnosti Roche za zapožičanie prístroja Xcelligence.



## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Cibíková P, Šturdíková M, Maruna M. Přírodní látky rostlinného pôvodu a ich využitie v terapii onkologických ochorení. *Chem. Listy*. 2010; 104: 12-0.
- Mehta RG, Jinfang L, Constantinou A et al. Cancer chemopreventive activity of brassinin, a phytoalexin from Cabbage. *Carcinogenesis*. 1995; 16: 399-4.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*. 1983; 65: 55.
- Pedras C, Jha M, Ahiahonu PW. The synthesis and biosynthesis of phytoalexins produced by cruciferous plants. *Current Organic Chemistry*. 2003; 7: 635-7.
- Pedras M S C, Okanga FI, Zaharia IL et al. Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis and biotransformation. *Phytochemistry*. 2000; 53: 161-6.
- Pilátová M, Šarišský M, Kutschy P et al. Cruciferous phytoalexins: antiproliferative effects in T-Jurkat leukemic cells. *Leukemia Research*. 2005; 29: 415-1.

## DRUHOVÁ VARIABILITA A VLASTNOSTI ENTEROKOKOV A STAFYLOKOKOV Z BOBROV (*CASTOR FIBER*)

<sup>1</sup>Imrichová, J., <sup>1</sup>Kandričáková, A., <sup>2</sup>Belzecki, G.

<sup>1</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4-6, 04001 Košice, Slovenská republika

<sup>2</sup>Kielanowski Instytut fyziologii a żywienia zwierząt, Polska Akademia Nauk, 05-110 Jabłona, Polska

### ABSTRAKT

V práci sme sa zamerali na záchyt, identifikáciu a niektoré vlastnosti stafylokokov a enterokokov z črevného traktu bobrov. Naším cieľom je prispieť k rozšíreniu základných informácií o bakteriálnej flóre bobrov ako možného zdroja bakteriocín-produkujúcich baktérií. Vzorky trusu, slepého čreva a hrubého čreva boli získané z 12 jedincov oboch pohlaví vo veku 4-5 rokov. Priemerné počty enterokokov v truse bobrov dosahovali  $3,23 \pm 1,79$  (log<sub>10</sub>) KTJ/g, v hrubom čreve  $3,22 \pm 1,79$  KTJ/g a v slepom čreve  $2,43 \pm 1,55$  KTJ/g. Izoláty boli na základe identifikácie MALDI Biotyper taxonomicky priradené k druhom *Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *E. thailandicus*, *E. hirae*, *E. faecium*. Najvyššie počty stafylokokov boli v hrubom čreve  $2,89 \pm 1,70$  KTJ/g, v truse boli počty  $2,73 \pm 1,16$  KTJ/g a v slepom čreve  $1,87 \pm 0,37$  KTJ/g. Identifikované kolónie (38) boli taxonomicky zaradené k druhom *Staphylococcus capitis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lentus*, *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. pasteurii*, *S. cohnii*, *S. vitulinus*. Enterokoky a stafylokoky boli zväčša citlivé na antibiotiká. Kyselina mliečna u enterokokov dosahovala hodnoty v priemere  $1,19 \pm 0,23$  mol/l; u stafylokokov  $1,22 \pm 0,37$  mmol/l. Jeden kmeň bol želatináza pozitívny. Enterokoky netvorili hemolýzu. Štyri kmene prejavili inhibičnú aktivitu na indikátorový kmeň *S. aureus* SA5 (8-16mm). Štrukturálne gény pre produkciu Ent B mal vo svojom genóme *E. hirae* 4Hč2, pre produkciu Ent L50A/L50B *E. faecium* 4Hč1; pre Ent A kmene *E. faecium* Hč 13/1, Hč 7/3, 4 Hč 1; pre Ent P kmene *E. faecium* 4Hč1, *E. hirae* 4Hč2. Získané poznatky predstavujú originálne výsledky a ponúkajú možnosti detailnejšieho štúdia bakteriocín-produkujúcich izolátov z bobrov, čím prispievajú k poznatkom základnej mikrobiológie.

### ÚVOD

Bobor vodný (*Castor fiber*) je zaradený do triedy cicavcov (Mammalia), radu hlodavce (Rodentia) a čeľade bobrovité (Castoridae). Bobre patria do skupiny herbivorných živočíchov. Na Slovensku bobre patria k zákonom chráneným živočíchom (Zbierka zákonov č. 24/2003). Majú značný vplyv na hydrologické podmienky území, ktoré obývajú, či už v pozitívnom alebo negatívnom zmysle (Valachovič a kol., 2008). Naše pracovisko zaujal tento živočích z hľadiska štúdia mikroflóry v rámci základného výskumu, nakoľko intestinálna mikroflóra bobrov nie je zatiaľ dostatočne popísaná resp. len veľmi sporadicky. V spolupráci s našimi poľskými kolegami bol vykonaný odchyt bobrov v oblasti, kde došlo k ich premnoženiu (Województwo-Province, Podlaskie, Gmina-Wizajny). Naša štúdia je zameraná predovšetkým na záchyt, identifikáciu a čiastočnú charakterizáciu vlastností (produkcia kyseliny mliečnej a želatinázy, antibiotický profil, detekcia génov pre produkciu bakteriocínov) enterokokov a stafylokokov z tráviaceho traktu bobrov, nakoľko na našom pracovisku sa práve týmito bakteriálnymi rodmi zaoberáme už viac rokov. Naším cieľom je prispieť k rozšíreniu základných informácií o bakteriálnej flóre bobrov ako možného zdroja bakteriocín-produkujúcich baktérií.

## MATERIÁL A METODIKA

Odchyt zvierat a následne odber materiálu bol zabezpečený našimi poľskými kolegami v severovýchodnej časti Poľska (Województwo-Provincie Podlaskie Gmina-Wizajny, GPS:22° 52E:54°22N). Odchytených bolo 12 jedincov oboch pohlaví vo veku 4-5 rokov. Manipulácia so zvieratami, ako aj celý experiment prebiehali v súlade s predpismi a ustanoveniami pre prácu so zvieratami. Vzorky trusu (12), hrubého čreva (12) a slepého čreva (6) boli po transporte spracované na ÚFHZ SAV, Košice. Navážené vzorky trusu a obsahu slepého a hrubého čreva (1g) boli spracované štandardnou mikrobiologickou metódou (ISO), riedením v Ringerovom roztoku (Merck, Nemecko). Následne boli jednotlivé riedenia vysiate na príslušné médiá: M-Enterococcus agar (Difco, USA) pre záchyt enterokokov a Mannitol Salt agar (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) pre záchyt stafylokokov a platne boli inkubované 48 hod. pri kultivačnej teplote 37 °C. Počty baktérií boli vyjadrené v KTJ/g  $\pm$  SD (kolónie tvorné jednotky na 1 g média; aritmetický priemer  $\pm$  smerodajná odchýlka,  $x \pm$  SD). U odpichnutých kolónií bola skontrolovaná purita a následne boli identifikované použitím MALDI Biotyper™ systému. Táto identifikácia je založená na analýze spektra bakteriálnych bielkovín. Vzorky boli pripravené podľa doporučení výrobcu (Bruker Daltonics, 2008). U identifikovaných zástupcov rodov Enterococcus a Staphylococcus bola testovaná citlivosť/rezistencia na antibiotiká agarovou difúznou metódou (CLSI, 2008) na Brain Heart agare (BHA; Oxoid) s použitím antibiotických diskov (s koncentráciou antibiotík bežne používaných vo veterinárnej praxi). Inhibičné zóny boli vyjadrené v mm a vyhodnotené podľa tabuľkových hodnôt. U jednotlivých kmeňov stafylokokov a enterokokov bola stanovená produkcia kyseliny mliečnej (KM) podľa štandardného protokolu (Pryce, 1969). Výsledky boli vyjadrené v mmol/l. U enterokokov bola testovaná produkcia želatinázy. Použitý bol Bacto™ Todd Hewitt agar (Becton & Dickinson) s prídavkom želatíny (30g/l; Gelatin, Extra Pure, Biomark), na ktorom boli inokulované jednotlivé kmene enterokokov. Po 48 hod. inkubácii pri 37 °C boli tieto kmene zalievané vyvíjacím roztokom a vyhodnotené po krátkej difúzii pri 4 °C. Tvorba hemolýzy bola testovaná agarovým testom (BHA s 5 % obsahom defibrinovanej baranej krvi). Produkcia bakteriocínov-enterocínov bola kvalitatívne stanovená agarovou difúznou metódou podľa Skalku a kol. (1983) na BHA. Ako indikátorové kmene boli použité *Staphylococcus aureus* SA 5 a *Enterococcus avium* EA5 (mastitídne mlieko, trus ciciaka, ÚFHZ SAV). Veľkosť inhibičnej zóny bola vyjadrená v mm. Štrukturálne gény pre produkciu enterocínov (*Ent*) A, P, B a L50A/L50B u enterokokov boli amplifikované použijúc priméry podľa Aymerich a kol. (1996), Cintasa a kol. (1997, 1998), Casaus a kol. (1997) a stanovené polymerázovou reťazovou reakciou (PCR; Techgene, KRD Thermocycler-Techne, Anglicko). PCR produkty boli vizualizované elektroforézou s použitím 2% agarózového gélu (Sigma, Nemecko), ktorý bol pufrovaný s 1xTAE (Merck) s obsahom 1  $\mu$ g/ml etidium bromidu (Sigma). PCR master mix bol pripravený podľa inštrukcií výrobcu. Ako pozitívna kontrola boli použité kmene *E. faecium* EK13-CCM7419 (Mareková a kol., 2003) pre *Ent* A; *E. faecium* AL41 (Lauková a kol., 2003) pre *Ent* P; *E. faecium* 55 (Strompfová a kol., 2003) pre *Ent* L50A/L50B a B.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Priemerné počty enterokokov detegovaných vo fekálnych vzorkách dosahovali  $3,23 \pm 1,79$  (log<sub>10</sub>) KTJ/g, v hrubom čreve ich počty dosiahli  $3,22 \pm 1,79$  KTJ/g a v slepom čreve  $2,43 \pm 1,55$  KTJ/g. Mikrobiálne zastúpenie v intestinálnom trakte bobrov je veľkou neznámou i v rámci Gram-pozitívnych baktérií, a preto je zaujímavé aj zistenie, že stanovené počty enterokokov vo všeobecnosti zodpovedajú detegovanému počtu enterokokov v truse iných zvierat (Lauková, 1992). Kolónie (17), 5 z trusu a 12 z hrubého čreva boli detegované a taxonomicky priradené ku nasledovným druhom: *E. durans* (2 kmene z trusu), *E. faecalis* (1 kmeň z trusu) a *E. thailandicus* (2 kmene z trusu). V hrubom čreve boli detegované 3 druhy:

*E. hirae* (2 kmene), *E. faecium* (5 kmeňov) a *E. thailandicus* (4 kmene). Kolónie odpichnuté zo slepého čreva neboli potvrdené ako enterokoky. Z hľadiska základného výskumu je zaujímavé detegovanie druhu *E. thailandicus*. Je to nový druh, ktorý bol prvýkrát popísaný Tanasupawatom a kol. (2008), pričom tento izolát pochádzal z thailandskej fermentovanej salámy. Najvyššie počty stafylokokov boli detegované v hrubom čreve  $2,89 \pm 1,70$  KTJ/g, vo vzorkách trusu  $2,73 \pm 1,16$  KTJ/g a  $1,87 \pm 0,37$  KTJ/g v slepom čreve. V slepom čreve je vo všeobecnosti u väčšiny zvierat detegované nižšie mikrobiálne zastúpenie než v hrubom čreve (Lauková a kol., 2009a), s výnimkou hydiny (Lauková a kol., 2009b). Identifikovaných bolo 38 kolónií stafylokokov. Z nich 14 kolónií z trusu, 9 zo slepého čreva a 15 z hrubého čreva. Izoláty z trusu boli taxonomicky zatriedené ku 7 druhom: *S. capitis* (1 kmeň), *S. epidermidis* (5 kmeňov), *S. haemolyticus* (1 kmeň), *S. hominis* (4 kmene), *S. lentus* (1 kmeň), *S. xylosus* (1 kmeň), *S. warneri* (1 kmeň). V slepom čreve bolo taxonomicky detegovaných 9 kmeňov patriacich ku 4 druhom stafylokokov: *S. hominis* (4 kmeňov), *S. haemolyticus* (3 kmene), *S. xylosus* (1 kmeň), *S. pasteurii* (1 kmeň). Z hrubého čreva bolo 15 izolátov zaradených ku 7 druhom: *S. cohnii* (2 kmene), *S. haemolyticus* (5 kmeňov), *S. hominis* (3 kmene), *S. xylosus* (2 kmene), *S. warneri* (1 kmeň), *S. epidermidis* (1 kmeň) a *S. vitulinus* (1 kmeň). Všetky izoláty patria medzi koaguláza-negatívne stafylokoky. Izolované enterokoky a stafylokoky boli zväčša citlivé na testované antibiotiká (ATB) s výnimkou penicilínu (PNC) a ampicilínu (AMP) u stafylokokov; až 35 z 38 kmeňov bolo rezistentných na PNC a 27 na AMP. Stafylokoky aj enterokoky patria medzi kyselinu mliečnu produkujúce baktérie. Hodnoty KM, ktorá má antimikrobiálny charakter dosiahla u enterokokov v priemere  $1,19 \pm 0,23$  mmol/l. V prípade stafylokokov boli hodnoty KM vyššie, v priemere  $1,22 \pm 0,37$  mmol/l. Želatináza je extracelulárna metaloendopeptidáza, ktorá sa radí k faktorom virulencie. Sledovanie jej prítomnosti, či absencie u enterokokov má teda význam z aplikačného hľadiska daného kmeňa. Produkcia želatinázy bola zo 17 testovaných kmeňov enterokokov zaznamenaná len u kmeňa *E. faecalis* 9TR1. Enterokoky netvorili hemolýzu, čo má z aplikačného hľadiska pozitívny význam. Enterokoky sú známe produkciou bakteriocínov, antimikrobiálnych substancií proteínového charakteru s inhibičným účinkom proti viac, či menej príbuzným druhom baktérií (Nes a kol., 2000). Testované kmene neinhibovali rast kmeňa *E. avium* EA5, avšak 4 kmene (*E. faecalis* 9Tr1, *E. thailandicus* TR10/1, *E. thailandicus* TR10/2, *E. thailandicus* Hč10/1) prejavili inhibičnú aktivitu na indikátorový kmeň *S. aureus* SA5 pri veľkosti inhibičnej zóny 8-16mm. Prítomnosť štruktúrneho génu pre produkciu *Ent B* bola zistená u kmeňa *E. hirae* 4Hč2, gén pre produkciu *Ent L50A/L50B* obsahoval genóm kmeňa *E. faecium* 4Hč1; gén pre produkciu *Ent A* obsahovali kmene *E. faecium* Hč 13/1, Hč 7/3, 4Hč1 a pre *Ent P* kmene *E. faecium* 4Hč1 a *E. hirae* 4Hč2. *E. faecium* 4Hč1 obsahuje gény pre 3 enterocíny (*Ent L40A/L50B*, A a P) a *E. hirae* 4Hč2 obsahuje gény pre produkciu *Ent B* a P. Tieto poznatky predstavujú originálne výsledky a ponúkajú možnosti detailnejšieho štúdia bakteriocínov, ale tiež iných vlastností izolátov z bobrov, čím prispievajú k poznatkom základnej mikrobiológie.

## POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola podporená projektom VEGA 2/0002/11 Slovenskej vedeckej grantovej agentúry a projektom NN311-510-139 Ministerstva vedy a vyššieho vzdelávania (Poľská republika). Ďakujeme za spoluprácu pani Margite Bodnárovej, Mgr. Kataríne Dubíkovej, Renate Miltko a Barbare Kowalik.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

Aymerich T, Garriga M, Ylla J, Vallier J, Monfort JM a Hugas M (2000). Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *Journal of Food Protection* 63:721-726.

Baele M, Vaneechoutte M, Storms, V, Butaye P, Devriese LA, Verschraegen G, Gillis M,

- Haesebrouck F (2000). Application of tDNA-PCR for the identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 4201–4207.
- Casaus P, Nilsen T, Cintas LM, Nes IF, Hernández PE a Holo H (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143:2287-2294.
- Cintas LM, Casaus P, Havarstein LS, Hernández PE a Nes IF (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied Environmental Microbiology* 63:4321-4330.
- Cintas LM, Casaus P, Holo H, Hernández PE, Nes IF a Havarstein LS (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50 are related to staphylococcal haemolysins. *Journal of Bacteriology* 180:1988-1994.
- Lauková A (1992). Biochemical and physiological properties of enterococci isolated from the rumen of calves. *Journal of Animal Production (Czech)* 37 (10): 857-860.
- Lauková A, Pogány-Simonová M, Plachá I, Stropfiová V, Čobanová K, Szabóová R, Chrastinová L (2009a). Comparing the effect of probiotic enterococci and their enterocins in rabbits in relation to microbiological status and phagocytic activity. In Levkut M. a kol. *Intestinal barrier in animals and alternative methods its influencing, „Science for practice“*. Edičné stredisko UVL, Košice, Slovensko 22-26.
- Lauková A, Stropfiová V, Michlovičová G, Plachá I, Čobanová K, Pogány-Simonová M, Faix, Š (2009b). Model experiment testing new enterocin M-producing probiotic *Enterococcus faecium* AL41 in chicken. In Levkut, M. a kol. *Intestinal barrier in animals and alternative methods its influencing „Science for practis“*. Edičné stredisko UVL, Košice, Slovensko 27-30. ISBN 978-80-8077-129-4
- Lauková A, Stropfiová V, Skrivanová V, Volek Z, Jindřichová E, Marounek M (2006). Bacteriocin-producing strain of *Enterococcus faecium* EK 13 with probiotic character and its application in the digestive tract of rabbits. *Biologia, Bratislava* 61/6:779-782.
- Lauková A, Turek P, Mareková M, Nagy J (2003). Use of ent M, new variant of ent P to control *Listeria innocua* in experimentally contaminated Gombasek sausage. *Archiv Lebensmittelhygiene* 54:25-48.
- Mareková M, Lauková A, DeVuyst I, Skaugen M, Nes IF (2003). Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. *Journal of Applied Microbiology* 94: 523-530.
- Nes IF a Holo, H (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Inc. Biopoly* 55:50-61.
- Pryce JD (1969). Modification of the Barker-Summerson Method for the determination of lactic acid. *Analyst* 94:1151-1152.
- Skalka B, Pillich J, Pospíšil L (1983). Further observations on *Corynebacterium renale* as an indicator organism in the detection of exfoliation-positive strains of *Staphylococcus aureus*. *Zen-tralblatt fur Bakteriologie. Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* A256:168-174.
- Stropfiová V, Lauková A, Mudroňová D (2003). Effect of bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* EF 55 on the composition of avian gastrointestinal microflora. *Acta Veterinaria Brno* 72:559-564.
- Tanasupawat S, Sukontasing S, Lee JS (2008). *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage (‘mum’) in Thailand *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1630–1634.
- Valachovič D, Šíbl, J, Adamec, M. Banská Bystrica: Štátna ochrana prírody Slovenskej republiky, Program záchrany bobra vodného (*Castor fiber* Linné 1758) (2008); 1-4.

# VPLYV ŤAŽKÝCH KOVŮV A INFEKČIE *ASCARIS SUUM* NA T LYMFOCYTY MYŠÍ

Jalčová M., Dvorožňáková E.

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

## ABSTRAKT

Myši boli chronicky intoxikované olovom, kadmiom a ortuťou a na 21. deň intoxikácie infikované 1000 vajíčkami *Ascaris suum*/myš. Proliferačná odpoveď slezinových T lymfocytov bola hodnotená spektrofotometricky – MTT testom. Na stanovenie CD4+ a CD8+ T lymfocytov bola použitá metóda prietokovej cytometrie. Bearmanovou metódou z pečene a pľúc infikovaných myši boli získané larvy *A. suum*. Cieľom tejto práce bolo charakterizovať lymfocytárnu odpoveď myši pri intoxikácii olovom, kadmiom a ortuťou a experimentálnej larválnej askarióze, keďže oba faktory sú významnými modulátormi imunitných reakcií. Samotná intoxikácia ťažkými kovmi znížila funkčnú aktivitu T lymfocytov, ale následná infekcia *A. suum* mierne stimulovala proliferáciu T lymfocytov. Intoxikácia Pb a Cd redukovala subpopuláciu CD4+ T lymfocytov. Intoxikácia Hg prvé 2 týždne zvýšila počty CD4+ T buniek, ale od 3. týždňa bola zistená redukcia počtov týchto buniek. Následná infekcia *A. suum* intoxikovaných myši zvýšila počty CD4+T buniek, ale tie nedosiahli zvýšené hodnoty zistené u myši infikovaných bez intoxikácie. Najvýraznejšie rozdiely boli zistené pri subpopulácii CD8+T lymfocytov. Intoxikácia Pb znížila počty CD8+ T lymfocytov, Cd zvýšilo počty týchto buniek a prvotná stimulácia buniek do 2. týždňa pri intoxikácii Hg bola vystriedaná inhibíciou až do konca experimentu. U myši intoxikovaných Pb a Hg a následne infikovaných *A. suum* boli počty CD8+ buniek nižšie v porovnaní s len infikovanými myšami. Len u myši intoxikovaných Cd boli počty týchto buniek stimulované.

Získané výsledky ukazujú, že u myši intoxikovaných ťažkými kovmi a následne infikovaných *A. suum* boli zistené rozdiely v intenzite parazitárnej infekcie v závislosti od druhu ťažkého kovu. Najväčšia parazitárna záťaž bola zistená u myši intoxikovaných Pb, redukcia lariev *A. suum* bola u myši intoxikovaných Cd a najnižšie počty lariev *A. suum* boli zistené u myši intoxikovaných Hg.

## ÚVOD

Koncentrácie ťažkých kovov predstavujú vážny ekologický problém, keďže vstupujú do potravinového reťazca a cez rastliny a telá živočíchov sa dostávajú až do ľudského organizmu. Môžu vyvolať výrazné zmeny vo fyziológii buniek a majú schopnosť modulovať funkcie imunitného systému. Imunotoxicita ťažkých kovov je závislá od dávky a spôsobu aplikácie, vyvoláva zmeny v bunkovej aj protilátkovej odpovedi (Dan et al. 2000), postihuje T lymfocyty, NK bunky, indukuje apoptózu a autoimunitné ochorenia (Lafuente et al. 2004, Pathak a Khandelwal 2008). Expozícia organizmov ťažkým kovom môže oslabiť ich imunokompetenciu a tak zvyšovať vnímavosť k parazitárnym infekciám. Helminty, vrátane *Ascaris suum*, usmerňujú imunitnú odpoveď hostiteľa do Th2 cytokínového profilu, ktorý sa vyznačuje zníženou reaktivitou imunitného systému, z časti sprostredkovanou regulačnými cytokínmi TGF- $\beta$  a IL-10 produkovanými T bunkami (Maizels a Yazdanbakhsh, 2003). Prevažná časť imunitnej odpovede hostiteľa na infekciu *A. suum* je vyvolaná migrujúcimi larvami, ktoré ovplyvňujú humorálne aj celulárne zložky imunity. Larvy *A. suum* môžu zanechávať štáديو-specifické antigény v čreve, pečeni aj v pľúcach, produkujú exkréčno-sekrecčné produkty a proteolytické enzýmy, ktoré im pomáhajú invadovať tkanivá hostiteľa (Frontera et al., 2004).

Cieľom tejto práce bolo charakterizovať lymfocytárnu odpoveď myši pri intoxikácii olovom, kadmiom a ortuťou a experimentálnej larválnej askarióze, keďže oba faktory sú významnými modulátormi imunitných reakcií.

## MATERIÁL A METODIKA

V práci boli realizované 3 experimenty: I. Experiment –intoxikácia olovom (Pb) + infekcia *A. suum*. II. Experiment –intoxikácia kadmiumom (Cd) + infekcia *A. suum*. III. Experiment –intoxikácia ortuťou (Hg) + infekcia *A. suum*. Inbredné myši kmeňa BALB/c boli rozdelené do skupín: 1. skupina (n=18) -kontrola, myši bez infekcie a intoxikácie. 2. skupina (n=18) - myši intoxikované /Pb- per os  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  100 mg/l pitnej vody //Cd- per os  $\text{CdCl}_2$  100 mg/l pitnej vody /// Hg- subkutánne  $\text{HgCl}_2$  1mg/kg živej hmotnosti denne. 3. skupina (n=12) - myši infikované perorálne 1000 vajčkami *A. suum*/myš na 21. deň experimentu. 4. skupina (n=12) - myši intoxikované Pb, Cd alebo Hg a na 21. deň experimentu infikované 1000 vajčkami *A. suum*/myš.

Bearmanovou metódou z pečene a pľúc infikovaných myší boli získané larvy *A. suum*. Proliferačná odpoveď slezinových T na ConA bola hodnotená spektrofotometricky – MTT testom. Na stanovenie CD4+ a CD8+ T lymfocytov bola použitá metóda prietokovej cytometrie (BD Biosciences).

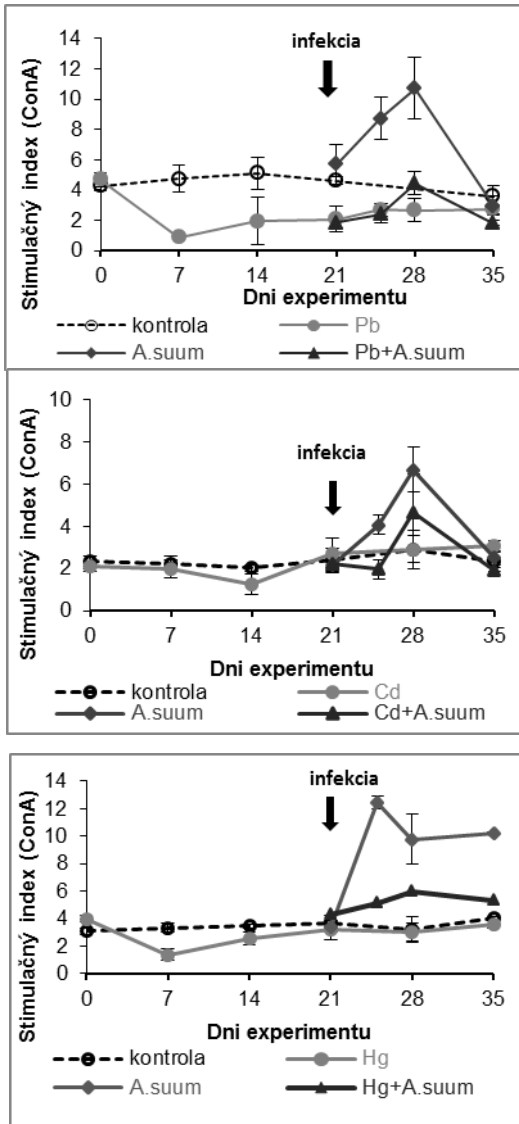
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Slezina je jedným zo základných orgánov, kde sa iniciuje väčšina primárnych imunitných odpovedí, aktivácia T a B lymfocytov a tvorba protilátok. Proliferačná aktivita slezinových T lymfocytov (graf 1) u myší intoxikovaných Pb bola výrazne znížená počas celého experimentu, intoxikáciou Cd a Hg významne neovplyvnila proliferáciu lymfocytov. Parazitárna infekcia *A. suum* stimulovala proliferáciu T buniek na 7. deň p.i., pravdepodobne aktiváciou migrujúcimi larvami. U myší Cd a Hg intoxikovaných a následne infikovaných došlo k miernej stimulácii proliferácie T lymfocytov, ale u Pb intoxikovaných myší len na úroveň hodnôt v kontrole – reštaurovanie suprimovanej proliferácie lymfocytov účinkom parazitárnej infekcie.

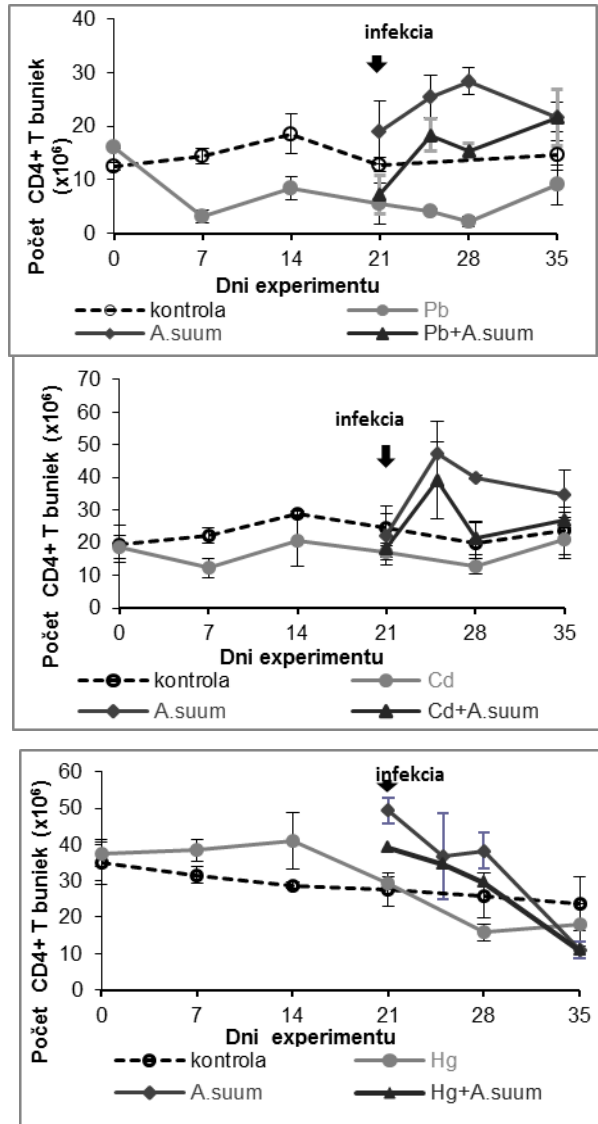
Aj keď neboli pozorované výrazné zmeny v proliferácii T buniek, pomerné zastúpenie subpopulácii CD4+ a CD8+T buniek v slezine intoxikovaných myší bolo pozmenené. CD4<sup>+</sup> je jednoreťazový glykoproteín, prítomný na pomocných T bunkách. Je to antigén viažuci molekuly MHC II. triedy antigén prezentujúcich buniek. Rozpoznanie antigénu T bunkou má za následok prenos rôznych intracelulárnych signálov, ktoré vedú ku proliferácii T buniek, k syntéze lymfokínov a receptorov pre tieto lymfokíny. CD8+ je antigén, prítomný na cytotoxických T lymfocytoch, viaže molekuly MHC I. triedy na antigén prezentujúcich bunkách. Najvýraznejší pokles počtov CD4+ T lymfocytov bol pozorovaný po intoxikácii Pb (graf 2), v menšej miere pri intoxikácii Cd a po 4 týždňoch intoxikácie Hg. Následná infekcia intoxikovaných myší znásobila počty týchto buniek, ale len pod úroveň kontroly. Po intoxikácii Pb boli počty cytotoxických CD8+ T buniek (graf 3) výrazne znížené prvé 2 týždne, naopak Cd a Hg zvýšili počty týchto buniek. Následná infekcia *A. suum* u Cd intoxikovaných myší udržala vysoké počty cytotoxických lymfocytov, ale u Hg intoxikovaných myší klesli ich počty pod úroveň kontroly.

V experimente s Pb bola zistená vyššia parazitárna záťaž u myší intoxikovaných oproti neintoxikovaným infikovaným myšiam (Tab. 1). Naopak, v experimente s Cd bola zistená nižšia parazitárna záťaž v pečeni myší, čo možno vysvetliť vyšším počtom efektorových CD8+T lymfocytov zúčastňujúcich sa na deštrukcii lariev. Počty lariev v pľúcach sa medzi skupinami nelíšili. Podobne aj u myší intoxikovaných Hg, boli počty lariev izolovaných z pečene výrazne redukované v porovnaní s neintoxikovanými myšami, nízky bol aj záchyt lariev v pľúcach intoxikovaných myší. Avšak, myši intoxikované Hg trpeli značnou kachexiou a po infekcii *A. suum* boli vo veľmi zlom kondičnom stave.

Graf 1. Proliferčná odpoveď T lymfocytov na ConA u myši intoxikovaných ťažkými kovmi a infikovaných *A. suum*



Graf 2. Počet CD4+ T lymfocytov v slezine myši intoxikovaných ťažkými kovmi a infikovaných *A. suum*



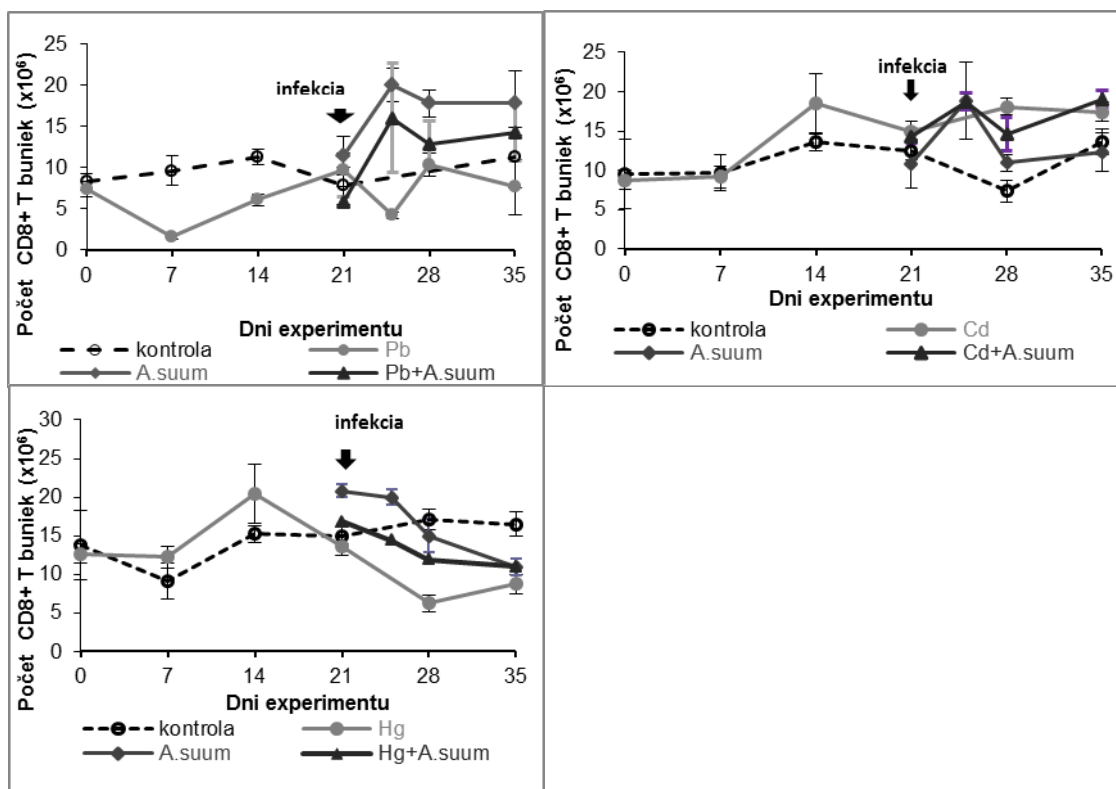
Tabuľka č. 1. Izolácia lariev *A. suum* u myši intoxikovaných ťažkými kovmi a infikovaných *A. suum*

Ťažký kov	Deň experimentu	<i>A.suum</i>		Ťažký kov + <i>A. suum</i>	
		pečeň (priemer±SD)	pľúca (priemer±SD)	pečeň (priemer±SD)	pľúca (priemer±SD)
Exp. I. <b>Pb</b>	25. (4. p.i.)	133,0±47,0		151,3±12,2	
	28. (7. p.i.)	3,3±1,5	66,7±15,9	2,6±3,8	86,3±17,5
Exp. II. <b>Cd</b>	25. (4. p.i.)	335,5±65,8		*121,3±70,2	
	28. (7. p.i.)	7,3±3,5	31,7±23,6	2,3±4,0	33,3±2,1
Exp. III. <b>Hg</b>	25. (4. p.i.)	179,3±40,5		*70,0±24,0	
	28. (7. p.i.)	4,3±3,2	25,7±6,1	4,3±4,2	7,3±3,2

\*P<0.05



Graf 3. Počet CD8+ T lymfocytov v slezine myši intoxikovaných ťažkými kovmi a infikovaných *A. suum*



## POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená Slovenskou grantovou agentúrou VEGA 2/0093/11.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dan, G., Lall, S.B., Rao, D.N.: Humoral and cell mediated immune response to cadmium in mice. In: Drug and Chemical Toxicology. 2000; 23: 349-360.
- Frontera E., Roepstorff A., Serrano F.J., Gázquez A., Reina D., Navarrete I.: Presence of immunoglobulins and antigens in serum, lung and small intestine in *Ascaris suum* infected and immunised pigs, *Vet. Parasitol.* 2004; 119: 59-71.
- Lafuente, A., Gonzáles-Carracedo, A., Esquifino, A.I.: Differential effects of cadmium on blood lymphocyte subsets. In: *BioMetals*. 2004; 17: 451-456.
- Maizels R.M. and Yazdanbakhsh M.: Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms, *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 733-744.
- Pathak N., Khandelwal S.: Impact of cadmium in T lymphocyte subsets and cytokine expression: differential regulation by oxidative stress and apoptosis, *Biomaterials*, 2008; 21: 179 – 187.

## SELEKCIA GRAM-POZITÍVNYCH BAKTÉRIÍ Z TRUSU PŠTROSOV

Kandričáková A., Imrichová J.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

### ABSTRAKT

V ostatných rokoch sa chovatelia čoraz častejšie zameriavajú na chov takých druhov hydiny, ktoré sa v minulosti bežne v našich podmienkach nechovali napr. na chov pštrosov. Poznanie mikrobiálneho zastúpenia u pštrosov je dôležité nielen z hľadiska základného výskumu, ale aj pre výber prípadných aditívnych baktérií v rámci ich potencionálneho využitia pre zdravie v chovoch. O mikroflóre pštrosov sú dostupné len limitované informácie. Črevná mikroflóra však zohráva dôležitú úlohu napr. v rozvoji imunity; dominantné postavenie majú najmä kyselinu mliečnu produkujúce baktérie, medzi ktoré zaraďujeme aj enterokoky a stafylokoky. Preto sme sa v tejto práci zamerali na testovanie výskytu stafylokokov a enterokokov v truse pštrosov, na ich identifikáciu a niektoré vlastnosti v rámci základného výskumu ako aj z hľadiska selekcie prípadných probiotických či bakteriocín-produkujúcich izolátov zo pštrosov. Počty stafylokokov vo všetkých vzorkách dosahovali v priemere  $4,30 \pm 0,63$  KTJ/g (log 10). Z 81 kmeňov 24 izolátov bolo priradených ku 8 druhom. Najviac izolátov bolo detegovaných ako *Staphylococcus equorum* (25%), nasledované druhmi *S. xylosus* (20,8%), *S. epidermidis* (16,7%), *S. haemolyticus* (12,5%), *S. cohnii*, *S. succinus* (8,3%), *S. warneri*, *S. hominis* (4,2%). Priemerný počet enterokokov vo vzorkách dosahoval  $4,59 \pm 0,58$  KTJ/g. Izoláty boli priradené ku druhom *Enterococcus hirae*, *E. mundtii* a *E. faecium*. Nameraná priemerná hodnota kyseliny mliečnej u stafylokokov bola  $3,06 \pm 0,35$  mmol/l a u enterokokov  $1,98 \pm 0,30$  mmol/l. Stafylokoky aj enterokoky preukázali prevažne citlivosť ku testovaným antibiotikám ako aj ku enterocínom pri inhibičnej aktivite od 100 do 25 600 AU/ml.

### ÚVOD

V ostatných rokoch sa chovatelia čoraz častejšie zameriavajú na chov takých druhov hydiny, ktoré sa v minulosti bežne v našich podmienkach nechovali napr. na chov pštrosov. Chov pštrosov sa na Slovensku traduje od roku 1992. V decembri 1995 bol pštros v zmysle paragrafu 8 ods. 1 zákona č. 110/1972 o plemenitbe hospodárskych zvierat preradený z kategórie exotických zvierat do kategórie hospodárskych zvierat. Pštrosie mäso považujeme za súčasť tzv. racionálnej výživy. Obsahuje totiž esenciálne aminokyseliny a má nízky obsah cholesterolu. Chovom pštrosov sa získava najmä vysokokvalitné mäso, ale aj vajcia. A preto, záujmom chovateľov je udržiavať zdravé chovy. Pštrosy majú vcelku dobre vyvinutý imunitný systém, ale o ich mikroflóre existujú len limitované informácie. Dôležitú úlohu v rozvoji imunity zohráva bežná črevná mikroflóra, ktorou sú aj Gram - pozitívne baktérie (hlavne kyselinu mliečnu produkujúce). Preto sme sa v tejto práci zamerali na výskyt stafylokokov a enterokokov z trusu pštrosov, na ich identifikáciu a vlastnosti z hľadiska základného výskumu ako aj z hľadiska zistenia vlastností pre selekciu prípadných probiotických či bakteriocín-produkujúcich kmeňov v rámci pštrosích izolátov, ktoré môžu byť využité pri podpore zdravia v chove.

### MATERIÁL A METODIKY

Zmesné vzorky trusu (54) boli izolované zo 140 zvierat z troch vekových kategórií; z každej vekovej kategórie od 18 zvierat: 1. veková kategória- tri týždne staré jedince, 2. veková kategória - šesť až deväť týždňov staré jedince a 3. veková kategória- dvanásť až šestnásť mesiacov staré jedince. Pštrosy boli kŕmené krmivom 1567 Pštros MINI-Energys (De Heus a.s., Vyškov, Česká Republika). Vzorky trusu boli spracované štandardnou mikrobiologickou metódou- ISO; vyriedené v Ringerovom roztoku (1:9). Príslušné riedenia boli vysievané na Mannitol Salt Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) a M-Enterococcus agar (Difco,

Maryland, USA, ISO 15214) a následne inkubované pri teplote 37°C 24- 48 hodín na záchyt počtu baktérií. Bakteriálne počty boli vyjadrené v KTJ/g  $\pm$  SD (kolóniu tvoriaca jednotka na gram). Jednotlivé kolónie boli kontrolované na puritu a taxonomicky typizované pomocou MALDI BioTyper TM systému (Bruker Daltonics, USA), ktorý je založený na analýze bakteriálnych proteínov. Lyzáty bakteriálnych buniek boli pripravené podľa inštrukcií výrobcu (Bruker Daltonics, 2008). U identifikovaných druhov Gram-pozitívnych baktérií boli testované základné vlastnosti; produkcia kyseliny mliečnej, citlivosť na antibiotiká (metódou CLSI, 2008); u enterokokov aj citlivosť ku enterocínom (použili sme semi-purifikované proteínové substancie produkované baktériami *Enterococcus faecium* ruminálneho, enviromentálneho a iného pôvodu, ktoré boli izolované v našom Laboratóriu živočíšnej mikrobiológie, ÚFHZ SAV, Košice). Bolo použitých 8 enterocínov (*Ent* EM 41, *Ent* EM 42, *Ent* A (P), *Ent* 55, *Ent* 2019, *Ent* M3a, *Ent* 4231, *Ent* M); pričom *Ent* EM 41, EM 42 sú produkované kmeňmi *E. faecium* EM 41 a EM 42 zo pštroša. Citlivosť jednotlivých kmeňov ku *Ent* bola testovaná kvantitatívnym tzv. agar spot testom (De Vuyst a kol., 1996) s použitím Mozgovo-srdcového agaru (BHA, Becton a Dickinson, Cockeysville, USA) a vyjadrená bola v AU/ml (arbitrárna jednotka na ml).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Priemerný počet stafylokokov vo všetkých vzorkách trusu bol  $4,30 \pm 0,63$  KTJ/g (log 10). V 1. vekovej kategórii dosiahol priemerný počet stafylokokov  $3,99 \pm 0,99$  KTJ/g, v 2. vekovej kategórii to bolo  $4,63 \pm 0,66$  KTJ/g a v 3. vekovej kategórii  $6,26 \pm 0,71$  KTJ/g. Počty stafylokokov v truse pštrosov v podstate dosahovali hodnoty aké sú zväčša detegované aj v truse kurčiat; napr. Yang (1991) popisuje, že intestinálnu mikroflóru kurčiat tvorili zväčša Gram-pozitívne baktérie patriace do rodov *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptococcus* a *Streptococcus*. Lauková a kol. (2012) zaznamenali u bažantov výskyt stafylokokov, enterokokov a laktobacilov. Ich priemerný počet sa výrazne neodlišoval od počtu u pštrosov. Vyskytli sa minimálne rozdiely v druhovom zastúpení oboch rodov, kde u stafylokokov okrem spomínaných druhov pribudli druhy *S. hyicus* a *S. lentus* a u enterokokov *E. faecalis*. Ale napr. podľa Xu Shulina (1998) dominantnú mikroflóru u bažantov tvorili baktérie z rodov *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Peptococcus*. Stafylokoky aj enterokoky sa delia na základe 16s rRNA sekvencií do skupín tzv. klusterov. V súčasnosti rod *Staphylococcus* zahŕňa vyše 40 druhov; sú to fakultatívne anaeróbne, nepohyblivé, kataláza-pozitívne koky. V našej štúdii bolo z 81 kmeňov 24 izolátov priradených ku 8 druhom. Najviac detegovaným bol druh *Staphylococcus equorum* (25%), nasledovaný druhmi *S. xylosus* (20,8%), *S. epidermidis* (16,7%), *S. haemolyticus* (12,5%), *S. cohnii*, *S. succinus* (8,3%) a *S. warneri*, *S. hominis* (4,2%). Identifikované druhy stafylokokov patria medzi koaguláza – negatívne stafylokoky a sú zaradené do 4 skupín (klusterov); do skupiny *S. epidermidis* (*S. epidermidis*), do skupiny *S. haemolyticus* (*S. haemolyticus*, *S. hominis*), do skupiny *S. warneri* (*S. warneri*) a do skupiny *S. saprophyticus* (*S. cohnii*, *S. equorum*, Takahashi a kol., 1999). Z taxonomického hľadiska rod *Staphylococcus* zaraďujeme do domény *Bacteria*, oddelenia *Firmicutes*, triedy *Bacilli*, radu *Bacillales*, čeľade *Staphylococcaceae* (Bergeys Manual, 2009). Zaujímavá je značná variabilita detegovaných druhov stafylokokov, čo umožňujú práve modernejšie identifikačné metódy a zároveň nám táto druhová variabilita otvára možnosti pre charakterizovanie nových vlastností niektorých druhov ako aj pre výber ďalších druhov z hľadiska ich aditívneho využitia. Priemerný počet enterokokov vo všetkých vzorkách dosahoval  $4,59 \pm 0,58$  KTJ/g. V 1. vekovej kategórii bol priemerný počet enterokokov  $5,43 \pm 0,64$  KTJ/g, v 2. vekovej kategórii to bolo  $5,31 \pm 0,47$  KTJ/g a v 3. vekovej kategórii  $3,03 \pm 0,63$  KTJ/g. Zaznamenané počty enterokokov zodpovedajú vo všeobecnosti detegovanému počtu enterokokov aj v truse iných zvierat vrátane kurčiat (Lauková, 1992; Lauková a kol., 2008b). Rod *Enterococcus* tiež zaraďujeme do domény *Bacteria*, oddelenia *Firmicutes*, triedy *Cocci*, radu *Lactobacillales*

a čeľade *Enterococcaceae* (Bergeys Manual, 2009). Enterokoky v súčasnosti zahŕňajú celkovo 37 druhov a delia sa do 6 skupín (Sistek a kol., 2012, Tanasupawat a kol., 2008). Sú to tiež nepohyblivé kataláza-negatívne, fakultatívne anaeróbne baktérie. Zo 71 izolovaných kmeňov bolo 53 izolátov priradených ku 3 druhom (*Enterococcus hirae*- 77,3%, *E. faecium*- 18,9% a *E. mundtii*- 3,8%), ktoré patria do skupiny *E. faecium*. Obyčajne najčastejšie detegovaným druhom v truse zvierat je *E. faecium* či *E. faecalis* (Lauková, 1992; Lauková a kol., 2008a). V truse pŕstrosov dominoval *E. hirae*, ktorý je však z hľadiska fylogenetického vývoja najbližšie druhu *E. faecium* (Franz a kol., 1999).

Ako stafylokoky, tak i enterokoky patria medzi kyselinu mliečnu produkujúce baktérie, keďže hlavným konečným produktom fermentácie glukózy je kyselina mliečna (Bergeyho Manuál, 2009). U stafylokokov sa hodnoty kyseliny mliečnej (KM) pohybovali od 1, 03 do 4, 66 mmol/l; priemerná hodnota KM bola  $3, 06 \pm 0, 35$  mmol/l a priemerné hodnoty KM u jednotlivých druhov boli nasledovné: *S. epidermidis* ( $4, 14 \pm 0, 50$  mmol/l), *S. xylosus* ( $2, 83 \pm 0, 41$  mmol/l), *S. equorum* ( $2, 73 \pm 0, 38$  mmol/l), *S. warneri* ( $3, 76 \pm 0, 40$  mmol/l), *S. cohnii* ( $4, 08 \pm 0, 14$  mmol/l), *S. succinus* ( $2, 45 \pm 0, 46$  mmol/l), *S. hominis* ( $1, 61 \pm 0, 30$  mmol/l), *S. haemolyticus* ( $3, 27 \pm 0, 33$  mmol/l). Najvyššia hodnota KM bola zaznamenaná u kmeňa *S. cohnii* 210 ( $4, 66 \pm 0, 15$  mmol/l), najnižšia hodnota u kmeňa *S. xylosus* 3172 ( $1, 03 \pm 0, 16$  mmol/l). U enterokokov sa hodnoty kyseliny mliečnej pohybovali od 0, 65 do 3, 77 mmol/l; priemerná hodnota KM bola  $1, 98 \pm 0, 30$  mmol/l, priemerná hodnota KM u izolátov *E. faecium* bola  $1, 84 \pm 0, 03$  mmol/l, u izolátov *E. mundtii*  $1, 54 \pm 0, 29$  mmol/l a *E. hirae*  $2, 30 \pm 0, 25$  mmol/l. Najvyššia hodnota KM bola u kmeňa *E. hirae* 211 ( $3, 90 \pm 0, 30$  mmol/l), najnižšia u kmeňa *E. hirae* 1161 ( $0, 65 \pm 0, 01$  mmol/l). Dosiahnuté hodnoty KM u stafylokokov izolovaných z trusu pŕstrosov boli vyššie než je zvyčajne detegované u stafylokokov izolovaných z iných zvierat (Lauková a Kmeť, 1992; Lauková a kol., 2011). Naproti tomu hodnoty KM u enterokokov z trusu pŕstrosov sú porovnateľné s hodnotami zaznamenanými u enterokokov izolovaných z trusu iných zvierat (Lauková, 1992; Lauková a kol., 2008b). Z 21 testovaných kmeňov boli citlivé na všetky testované antibiotiká 4 kmene rôzneho druhového zastúpenia (*S. epidermidis* 273, *S. haemolyticus* 371, *S. hominis* 3112, *S. succinus* 3162); 10 kmeňov bolo rezistentných na fosfomycín; všetky kmene (21) boli citlivé na chloramfenikol a vankomycín. Citlivosť na antibiotiká je povzbudivý výsledok z hľadiska vylúčenia génov rezistencie na antibiotiká pri výbere aditívnych baktérií. Z 53 testovaných enterokokov bolo citlivých na všetky testované antibiotiká 15 kmeňov; 12 kmeňov *Enterococcus hirae* (*E. hirae* 152, *E. hirae* 161/cl, *E. hirae* 210, *E. hirae* 291, *E. hirae* 292, *E. hirae* 1181, *E. hirae* 1182, *E. hirae* 2162, *E. hirae* 2171, *E. hirae* 2172, *E. hirae* 2181, *E. hirae* 2182), ako aj kmeň *E. mundtii* 123/sch a 2 kmene *E. faecium* 35, 3131. Z hľadiska citlivosti je dobrým výsledkom citlivosť kmeňov *E. hirae*, nakoľko tento druh môže spôsobovať hnačkové ochorenia (Etheridge a kol., 1988). Všetky testované kmene boli citlivé na chloramfenikol a erytromycín, 35 kmeňov bolo rezistentných na kanamycín, avšak enterokoky sú prirodzene chromozomálne rezistentné na kanamycín; 4 enterokoky boli rezistentné na penicilín, 1 kmeň na vankomycín a 1 na novobiocín. Prevažovala teda citlivosť izolátov ku testovaným antibiotikám; izoláty sa tak stávajú zaujímavými pre ich možné testovanie za účelom aditív (s výnimkou *E. hirae* napriek ich citlivosti). Izolované enterokoky boli následne testované aj na citlivosť ku enterocínom. Všetky kmene enterokokov izolované zo pŕstrosov boli citlivé ku enterocínom s inhibičnou aktivitou od 100 po 25 600 AU/ml. Najcitlivejšie boli kmene *E. hirae* (EH 152; 161/Cl; 212; 221) ku všetkým použitým enterocínom s inhibičnou aktivitou 25 600 AU/ml. Najmenej citlivý bol kmeň *E. faecium* 2152 ku Ent EM 41 (izolát zo pŕstrosa) s inhibičnou aktivitou 100 AU/ml.

Poznanie mikrobiálnej variability je dôležité ako z hľadiska základného výskumu, tak aj z hľadiska zdravia zvierat, ale aj ako už bolo spomínané pre výber bakteriocín produkujúceho alebo probiotického kmeňa. Izoláty sú v procese testovania ďalších vlastností.

## POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom VEGA No. 2/0002/11. Ďakujeme za pomoc pri príprave médií pani Margite Bodnárovej a za asistenciu pri Maldi Biotyperu Mgr. Katke Dubíkovej.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Second Eds., Springer, New York, Vol. 3, Ed De Vos, Garrif, Jones, Krieg, Ludwig, Rainey, Schleifer, Wiley. 2009, ISBN 0- 387- 95041-9.
- De Vuyst L, Callewart R, Pot B. Characterization of antagonistic activity of *Lactobacillus amylovorus* DCE471 and large- scale isolation of its bacteriocin amylovorin L471. *Syst. Appl. Microbiology* 1996; 19: 9-20.
- Etheridge ME, Yolken RH, Vonderfecht SL. Enterococcus hirae implicated as a cause of diarrhea in suckling rats. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 1741-1744.
- Franz CMAP, Worobo RWW, Quadri LEN, Schillinger U, Holzappel WH, Vederas JC, Stilles ME. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: 2170- 2178.
- Lauková A. Biochemical and physiological properties of enterococci isolated from the rumen of calves. *Anim. Prod. (Czech)* 1992; 37 (10): 857-860.
- Lauková A, KMEŤ V. The biochemical and physiological traits of the coagulase-negative rumen staphylococci and of those producing bacteriocin. *Anim. Prod. (Czech)* 1992; 37 (2):103-108.
- Lauková A, Stropfiová V, Simonová M, Štyriak I, Swiecicka I. Species of *Enterococcus faecalis* associated with free-living rodents. *Folia Microbiol.* 2008a; 53: 173-178.
- Lauková A, Simonová M, Stropfiová V, Štyriak I, Ouwehand AC, Várady M. Potential of enterococci isolated from horses. *Anaer.* 2008b; 14 (4): 234-236.
- Lauková A, Stropfiová V, Pogány-Simonová M, Szabóová R. Methicilin-resistant *Staphylococcus xylosus*, isolated from horses and their sensitivity to enterocins and herbal substances. *Slov. J. Anim. Sci.* 2011; 44 (4): 167-171.
- Lauková A, Kandričáková A, Stropfiová V, Imrichová J. Species of staphylococci, enterococci and lactobacilli detected in faeces of common pheasants (*Phasianus colchicus*). *Slov. J. Anim. Sci.* 2012; 38 (2): 92-93.
- Shulin X, Xiuli S. Normal bacterial floras in intestinal tract of ring- necked pheasant. *J. Forestry Res.* 1998; 9: 105- 107.
- Sistek V, Maheux A, Boissinot M, Bernhard KA, Cantin P, Cleerwerck I, De Vos P, Bergeron MG. Two novel species, *Enterococcus ureasiticus* sp. nov. and *Enterococcus quebecensis* sp. nov. isolated from water. *Inter. J. Syst. and Evolut. Microbiol.* in press; doi:10.1099/ijs.0.029033-0.
- Takahashi T, Satoh I, Kikuchi N. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 1999; 49 (2): 725–728.
- Tanasupawat S, Sukontasing S, Lee JS. Enterococcus thailandicus sp. nov., isolated from fermented sausage (‘mum’) in Thailand. *Inter. J. Syst. and Evolut. Microbiol.* 2008; 58: 1630–1634.
- Yang J. Micro-ecology For Medicine. Heilongjiang Press 1991: 184-191.

# AKUMULÁCIA RESVERATROLU A JEHO METABOLITOV V MAMÁRNOM NÁDOROVOM TKANIVE PO CHEMICKEJ INDUKCII RAKOVINY MLIEČNEJ ŽIAZY POTKANOV

Kisková T. <sup>1</sup>, Maier-Salamon M. <sup>2</sup>, Thalhammer T. <sup>3</sup>, Kassayová M. <sup>1</sup>, Jäger W. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Katedra fyziológie živočíchov, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice*

<sup>2</sup> *Katedra patofyziológie a alergológie, Centrum patofyziológie, Lekárska univerzita, Viedeň*

<sup>3</sup> *Katedra klinickej farmácie a diagnostiky, Prírodovedecká fakulta, Viedenská univerzita, Viedeň*

## ABSTRAKT

Resveratrol je prírodnou látkou so známymi antikarcinogénnymi účinkami. Cieľom práce bolo sledovať hladiny resveratrolu a jeho metabolitov v krvnej plazme a vo vybraných vzorkách mamárnych nádorov samíc potkanov Sprague-Dawley pomocou metódy HPLC. Mamárna karcinogenéza bola vyvolaná dvoma intraperitoneálnymi dávkami N-metyl-N-nitrozourey. Resveratrol v dávke 100 mg/kg telesnej hmotnosti/deň/ bol aplikovaný *per os* vo vodnom roztoku s etanolom. Po 16-týždňovom podávaní potkanom boli odobraté vzorky plazmy a mamárnych nádorov na ďalšie analýzy. Hladina voľného resveratrolu v plazme zvierat dosiahla 1% parentálneho resveratrolu. Metabolity resveratrolu, resveratrol-4'-O-glukuronid, 3-O-glukuronid a resveratrol-3-O-sulfát, boli po prvýkrát pozorované vo vyššom zastúpení v mamárnom nádorovom tkanive. Akumulácia resveratrolu a jeho metabolitov vo vzorkách nádorov naznačuje, že ich pôsobenie na úrovni tkanív môže byť dlhodobejšie ako jeho účinok v krvnej plazme.

## ÚVOD

Resveratrol (RES) je polyfenol vyskytujúci sa v mnohých rastlinách, hlavne v červenom ovocí (červené hrozno, moruše, brusnice, čučoriedky) (Shankar a kol., 2007). Širokej verejnosti je známy predovšetkým v súvislosti s červeným vínom a jeho pozitívnymi účinkami.

Doposiaľ bolo zistené, že po orálnej aplikácii sa tento polyfenol významne akumuluje v tkanive žalúdka, čreva, pečene a obličiek myši, čo pravdepodobne súvisí s miestami jeho intenzívnej absorpcie a metabolizácie (Vitrac a kol., 2003). Po jednorazovom intravenóznom podaní potkanom boli najvyššie koncentrácie RES a jeho metabolitov namerané v obličkách, najnižšie v mozgovom tkanive (Juan a kol., 2010). Akumulácia RES v nádorovom tkanive, napríklad mamárnom, doposiaľ nebola študovaná, preto cieľom našej práce bolo zamerať sa na akumuláciu RES a jeho metabolitov v nádorovom tkanive mliečnej žľazy.

RES má dokázané antioxidantné, protizápalové, anti-aterosklerotické a protinádorové účinky, pričom pôsobí rozličnými mechanizmami a ovplyvňuje mnohé signálne cesty v bunkách (Amri a kol., 2012). Na druhej strane je to látka s nízkou rozpustnosťou, krátkym biologickým polčasom, rýchlo podliehajúca metabolizácii, vyznačuje sa nízkou biologickou dostupnosťou a jeho efekt je výrazne časovo a dávkovo závislý.

Metabolizmus RES je komplexný proces zahŕňajúci niekoľko ciest, predovšetkým konjugáciu na glukuronidy a sulfáty vo fáze II. Oba izoméry RES podliehajú glukuronidácii prostredníctvom enzýmu uridín-difosfát-glukuronozyltransferáza (UGT) na dva korešpondujúce glukuronidy: 3-O-glukuronid a 4'-O-glukuronid. Okrem toho RES podlieha aj sulfátovej konjugácii pomocou sulfotransferáz za vzniku resveratrol-3-O-sulfátu. V organizme potkana boli identifikované viaceré iné sulfátové konjugáty (4'-sulfát, 3,5- disulfát, 3,4'-disulfát, 3,4',5-trisulfát) (Athar a kol., 2007).

## MATERIÁL A METODIKA

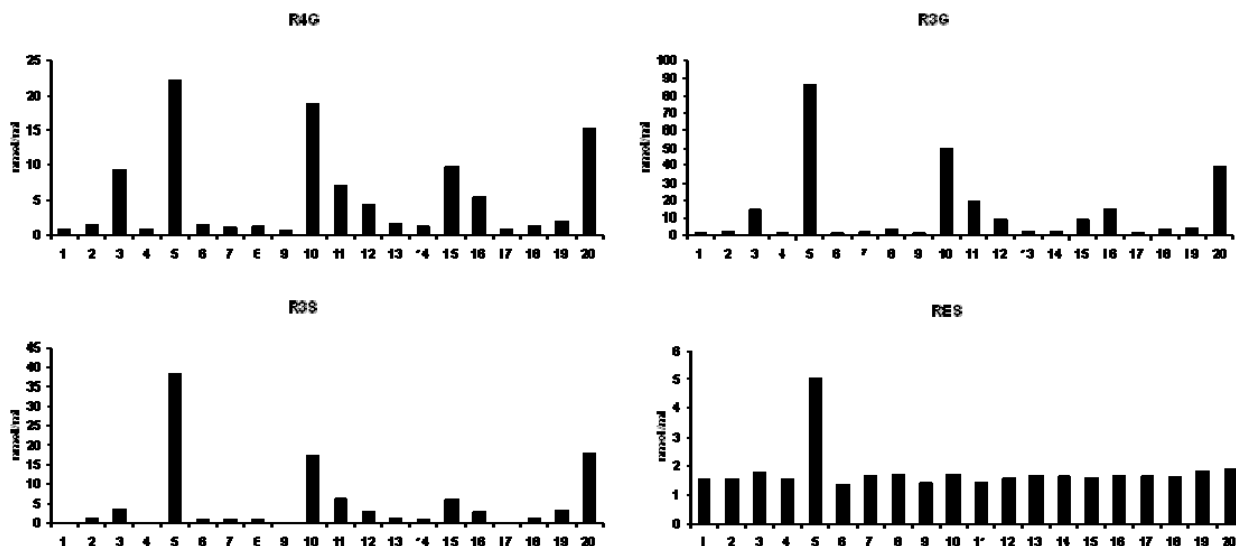
V experimente sme použili 25 samíc potkanov kmeňa Sprague-Dawley (AnLab, Praha, Česká Republika) vo veku 31 dní s telesnou hmotnosťou 100-130 g. Zvieratá boli chované v plexitových klietkach po 2-4 kusy. Boli adaptované na štandardné podmienky zverinca s teplotou 20-24°C, relatívnou vlhkosťou vzduchu 45-65% a umelým svetelným režimom svetlo:tma = 12h:12h. RES (Carbosynth, Compton, Veľká Británia) bol denne čerstvo pripravovaný tesne pred podaním v 10% etanole a podávaný v koncentrácii 100 mg/kg telesnej hmotnosti v čase 14:30-15:00 *per os*. Päť zvierat slúžilo ako kontrola. Mamárna karcinogéza bola vyvolaná dvoma intraperitoneálne podanými dávkami chemického karcinogénu N-metyl-N-nitrozourey (NMU, Sigma, Deisenhofen, Nemecko) v koncentrácii 50 mg/kg hmotnosti zvierat. Karcinogén bol rozpustený vo fyziologickom roztoku bezprostredne pred použitím a aplikovaný v objeme 0,5 ml/zviera.

Zmrazené vzorky plazmy boli roztopené pri izbovej teplote a centrifugované pri 13,000 x g na 5 min. Do 100 µl plazmy sme pridali 200 µl metanolu a za nezmenených podmienok centrifugovali. Použili sme systém Merck "La Chrom" (Merck, Darmstadt, Nemecko) vybavený injektorom L-7250, pumpou L-7100, stabilizátorom teploty kolóny (nastavený na 15°C), medzičlánkom D-7000 a UV detektorom L-7400 (vlnová dĺžka 307nm). Chromatografická separácia RES a jeho metabolitov bola vykonaná pomocou kolóny Hypersil BDS-C18 (5µm, 250 x 4,6 mm I.D. Astmoor, Anglicko) a predkolóny Hypersil BDS-C18 (5µm, 10 x 4,6 mm I.D.), za prietoku 1ml/min. Mobilná fáza pozostávala z lineárneho gradientu (5 mM octan amónny/kyselina octová, pH 7.4 - mobilná fáza, metanol - mobilná fáza B) na elúciu RES a metabolitov podľa ich lipofily. Objem vstreknutej vzorky krvnej plazmy bol 80 µl. Okrem krvnej plazmy sme stanovili koncentráciu RES a jeho metabolitov vo vybraných vzorkách mamárnych nádorov. 400 mg tkaniva sme zhomogenizovali v 800 µl 50 mM fosfátového pufru, pH 7.4. Vzorky boli lyzované opakovaným zmrazovaním v tekutom dusíku a topené pri izbovej teplote. K 100 µl vzorky sme pridali 200 µl metanolu. Po 5 min. centrifugácii pri 13000 x g sme vstrekli 80 µl supernatantu do HPLC kolóny. Na meranie kalibračnej krivky sa použili štandardy RES a jeho metabolitov (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Nemecko) pri koncentráciách od 5 ng/ml to 1 µg/ml. Kalibračná krivka bola zostrojená ako závislosť koncentrácie od nameraných plôch pík (mA.V.s-1).

Výsledky boli vyhodnocované pomocou štatistického programu GraphPad Prism 4.0 analýzou variancie (ANOVA) doplnenou Kruskal-Wallisovým a Tukeyho post-testom.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Koncentráciu RES a jeho metabolitov sme stanovovali v krvnej plazme a nádoroch samíc použitím HPLC. Koncentrácia RES v krvnej plazme sa pohybovala v rozmedzí od 1,32 nmol/ml (samica 6) po 5,02 nmol/ml (samica 5 Obrázok 1). Metabolit resveratrolu vznikajúci glukuronidáciou - resveratrol-4'-O-glukuronid (R4G) sa v krvnej plazme nachádzal v koncentráciách od 0,76 nmol/ml (samica 9) do 21,955 nmol/ml (samica 5) a resveratrol-3-O-glukuronid (R3G) v koncentráciách od 0,97 nmol/ml (samica 17) do 85,835 nmol/ml (samica 5). Pôsobením sulfotransferáz vzniká z resveratrolu resveratrol-3-O-sulfát (R3S), ktorého koncentrácia varíovala od 0 nmol/ml (samice 1-4) do 38,32 nmol/ml (samica 20).



Obrázok 1: Koncentrácia resveratrolu (RES) a jeho metabolitov: resveratrol-4'-O-glukuronid (R4G), resveratrol-3-O-glukuronid (R3G) a resveratrol-3-O-sulfát (R3S) v krvnej plazme. Hodnoty sú uvedené ako koncentrácie namerané v krvnej plazme jednotlivých zvierat v nmol/ml.

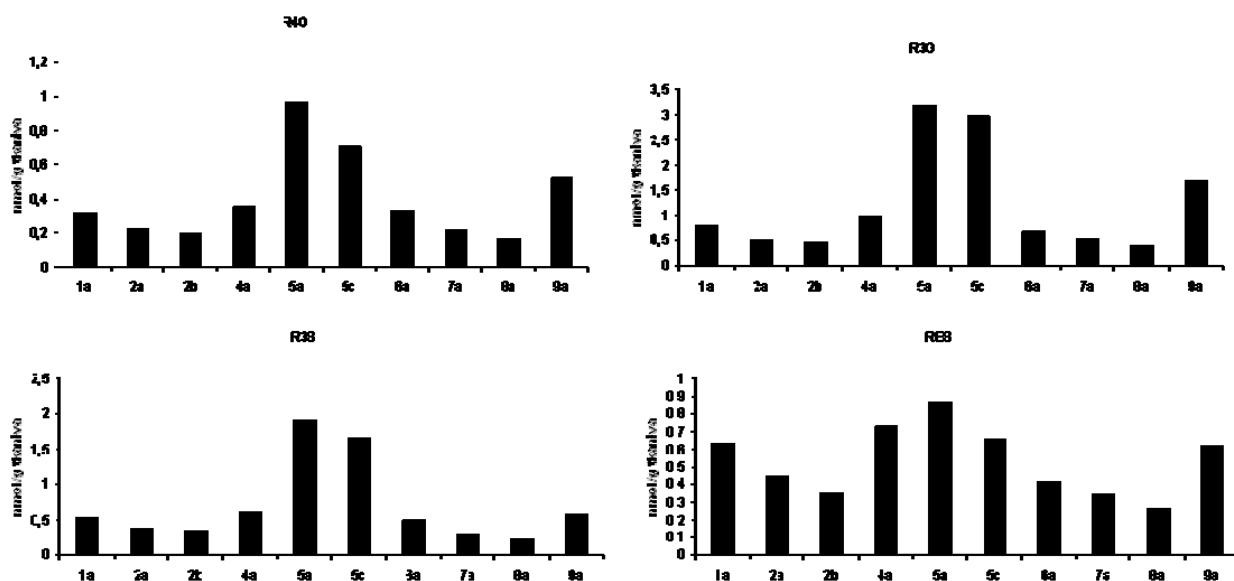
Na sledovanie akumulácie RES a jeho metabolitov v nádorovom tkanive sme zvolili 10 mamárnych neoplázií (1a, 2a, 2b, 4a, 5a, 5c, 6a, 7a, 8a a 9a) a stanovili sme v nich koncentrácie RES a jeho metabolitov R4G, R3G a R3S. V nádorovom tkanive mliečnej žľazy sa RES akumuloval v koncentráciách 0,261-0,864 nmol/g. Koncentrácia R4G sa pohybovala v rozmedzí 0,162-0,964 nmol/g a R3G v rozpätí 0,401-3,189 nmol/g. Koncentrácia R3S kolísala v rozmedzí hodnôt 0,218-1,912 nmol/g tkaniva (Obrázok 2).

RES je z cirkulácie odbúraný veľmi rýchlo. Akumulácia RES v nádorových vzorkách naznačuje, že jeho pôsobenie na úrovni tkanív môže byť dlhodobejšie ako v krvnej plazme. Hoci systémová biodostupnosť RES je veľmi nízka, jeho akumulácia v epiteliálnych bunkách pozdĺž zažívacieho traktu a pravdepodobne aj vo vzdialených tkanivách spolu s potenciálne aktívnymi metabolitmi môže stále vyvolávať protinádorové a iné benefičiálne účinky (Walle et al., 2004).

Vzhľadom na výraznú metabolizáciu, podiel nekonjugovaného parentálneho RES v plazme a v nádorovom tkanive bol nižší ako 1% z použitej dávky. Plazmatické hladiny resveratrolu boli niekoľkokrát vyššie ako koncentrácie v nádorovom tkanive, čo by mohlo byť spôsobené saturáciou jeho metabolických ciest pri dlhodobo opakovanom podávaní (Walle, 2011). Interindividuálne rozdiely hladín resveratrolu a jeho metabolitov v plazme aj v nádoroch v korelácii s počtom nádorov v jednotlivých zvieratách naznačujú, že neexistuje korelácia medzi koncentráciou resveratrolu a jeho metabolitov a počtom nádorov, ktoré sa zvieraťu vytvorili. Je to pravdepodobne spôsobené rozdielmi v absorpcii a v expresii enzýmov zapojených do transformácie resveratrolu (Walle, 2011).

Metabolity resveratrolu majú podobné účinky ako samotný resveratrol a predpokladá sa, že v niektorých procesoch by mohli byť ešte efektívnejšie. Sulfáty a glukuronidy resveratrolu preukázali podobné, resp. silnejšie antioxidantné vlastnosti ako resveratrol, porovnateľnú až vyššiu COX-1/COX-2 inhibíciu, inhibičný efekt na produkciu ROS a i. (Kondratyuk et al., 2011; Hoshino et al., 2010; Calamini et al., 2010). Protinádorová aktivita metabolitov resveratrolu zatiaľ nie je dostatočne preštudovaná.





Obrázok 2: Koncentrácia resveratrolu (RES) a jeho metabolitov: resveratrol-4'-O-glukuronid (R4G), resveratrol-3-O-glukuronid (R3G) a resveratrol-3-O-sulfát (R3S) vo vybraných mamárnych nádoroch. Hodnoty sú uvedené v nmol/g nádorového tkaniva.

## POĎAKOVANIE

Experiment bol realizovaný s finančnou podporou firmy Pfizer Luxembourg SARL Slovakia (projekt č. WS 1512122/2011).

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2004; 24: 3-60.
- Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, et al. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J Cont Rel.* 2012; 158:182-93.
- Athar M, Back JH, Tang X, et al. Resveratrol: A review of pre-clinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharm.* 2007; 224:274-83.
- Calamini B, Ratia K, Malkowski MG, et al. Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *Biochem J.* 2010; 429:273-82.
- Hohsino J, Park EJ, Kondratyuk TP, et al. Selective synthesis and biological evaluation of sulfate-conjugated resveratrol metabolites. *J Med Chem.* 2010; 53: 5033-43.
- Juan ME, González-Pons E, Planas JM. Multidrug resistance proteins restrain the intestinal absorption of trans-resveratrol in rats. *J Nutr.* 2010; 140:489-95.
- Kondratyuk TP, Park EJ, Marler LE, et al. Resveratrol derivatives as promising chemopreventive agents with improved potency and selectivity. *Mol Nutr Food Res.* 2011; 55: 1249-65.
- Shankar S, Singh G, Srivastava RK. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front Biosci.* 2007; 12: 4839-54.
- Vitrac X, Desmouliere A, Brouillaud B, et al. Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.* 2003; 72: 2219-33.
- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos.* 2004; 32:1377-82.
- Walle T. Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1215: 9-15.

# PERCEPCIA A PRIORITIZÁCIA FARIEB U DENNÝCH MOTÝĽOV (LEPIDOPTERA: PAPILIONOIDEA, HESPERIOIDEA)

Kočíková L.

*Univerzita P.J. Šafárika v Košiciach, Katedra fyziológie živočíchov, Košice*

## ABSTRAKT

Cieľom výskumu bolo zistenie preferencie farby kvetov a jej príčiny u stredoeurópskych denných motýľov pri vyhľadávaní potravných zdrojov na študovanej lokalite. Pre zistenie príčiny preferenčných vlastností bola použitá metóda farebných vodných pascí. Odchytený materiál bol determinovaný a štatisticky spracovaný podľa druhu a pohlavia odchytených jedincov v prislúchajúcej farbe. Za obdobie rokov 2010 až 2011 boli zistené zmeny správania sa u denných motýľov, ktoré sa prejavovali uprednostňovaním určitej farby voči ostatným. Výskum ukázal, že najatraktívnejšou farbou pre motýle bola žltá a najmenej červená farba.

## ÚVOD

Rad motýle (Lepidoptera) patrí do významnej skupiny opel'ovačov mnohých druhov kultúrnych i divorastúcich rastlín. V posledných desaťročiach však bol zaznamenaný výrazný pokles ich početnosti. Pre lepšiu druhovú ochranu je preto potrebné nielen poznanie biologického a ekologického významu jednotlivých druhov, ale najmä porozumenie podstaty ich zložitých vzťahov v ekosystéme. Ako príklad môže slúžiť vzájomný vzťah kvet - opel'ovač, pri ktorom je tzv. jazyk kvetov zrozumiteľný len skupine hmyzu, ktorá ich opel'uje. Herbivorný hmyz hľadajúci potravný zdroj alebo miesto na ovipozíciu, zakladá svoj výber na množstve kritérií, zahŕňajúcich napríklad koncentráciu CO<sub>2</sub>, volatilné látky, kontaktné chemikálie, tvar a farba listov, veľkosť, výška rastliny a v neposlednom rade farba kvetov (Lehrer, 1999). A práve farebný vzhľad rastliny sa zdá byť najdôležitejším faktorom pri orientácii motýľov v prírode. Hmyz, vrátane skupiny motýľov, je schopný nielen vnímať farby a rozlišovať ich, ale v mnohých prípadoch bola dokázaná aj jeho výrazná farebná preferencia. Zmyslový aparát motýľov na rozlišovanie signálov rastlín je dokonale vyvinutý. Podstatou farebnej percepcie je prítomnosť minimálne dvoch typov fotoreceptorov (Frentiu a Briscoe, 2008), hoci v jednom ommatídiu môže byť prítomných u niektorých druhov až 5 typov fotoreceptorov (Arikawa, 1987). Zistilo sa, že motýle sú schopné zachytiť vlnové dĺžky už v ultrafialovej časti (maximálna senzitivita 350 nm), až po červenú oblasť spektra (maximálna senzitivita cca 600 nm). Na základe tejto percepcie sú schopné porovnávať krátke a dlhé vlnové dĺžky, čo im umožňuje vytvoriť farebný obraz prostredia (Pichaud a kol., 1999). Preferencia farby u motýľov sa vo všeobecnosti sledovala a bola potvrdená v dvoch behaviorálnych súvislostiach: pri hľadaní potravného zdroja a pri hľadaní miesta na kladenie vajíčok. Takáto preferencia môže byť dvojakého typu: vrodená a naučená (Scherer a Kolb 1987; Lunau a Maier 1995). Cieľom môjho výskumu bolo zistiť preferenciu farby kvetov a jej príčinu u stredoeurópskych denných motýľov pri vyhľadávaní potravných zdrojov na študovanej lokalite.

## MATERIÁL A METODIKA

Výskum prebiehal v k.ú. obce Beniakovce, 4 km SV od mesta Košice na lúčnom biotope s krovinatou vegetáciou. Na zistenie farebnej preferencie bola použitá metóda Moerickeho farebných vodných pascí (Moericke, 1951). Na ploche o rozlohe približne 20 ha bolo rozmiestnených 10 skupín pascí, pričom každá skupina bola umiestnená na ploche 2m<sup>2</sup> a obsahovala 5 pascí (vrchný priemer: 12 cm, hĺbka: 6 cm), každá inej farby (biela, žltá, modrá, fialová a červená), naplnené vodou s detergentom do výšky 2 cm. Pasce boli umiestnené na drôtených držiakoch vo výške vegetácie. Na spodku každej bielej pasce bol umiestnený datalogger na zaznamenávanie teploty. Pasce boli na lokalite rozmiestnené

v priebehu mesiacov apríl - september 2010 a 2011. V každom mesiaci boli exponované po dobu 10 dní. V 2-3 dňových intervaloch boli pasce kontrolované a odchytený materiál odobratý.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V dobe trvania výskumu sa pomocou farebných vodných pascí podarilo odchytiť 406 jedincov, prislúchajúcich do 6 čeľadí a 37 druhov (Tab.1.). Najviac navštevovaná farba bola žltá (132 jedincov), následne biela (120 jedincov), modrá (76 jedincov), fialová (60 jedincov) a najmenej atraktívna farba bola červená (18 jedincov). Čistá preferencia na úrovni čeľadí bola zistená u Hesperidae – modrá, fialová farba; Pieridae - biela; Riodinidae - biela a u Lycaenidae – žltá (Tab.2.). Čo sa týka pomeru pohlaví u odchytených motýľov, prevažovali samci (245♂, 161♀).

Pomocou Spearmanovho testu závislosti sa nezistil pozitívny vzťah medzi počtom odchytených jedincov v jednotlivých farbách a farebnou reprezentáciou kvetov na študovanej lokalite.

Percepcia a tým aj preferovanie farby je závislé na prítomnosti určitých typov fotoreceptorov v ommatídiách. Najmenej atraktívnou farbou bola červená, čoho príčinou je absencia červeného fotoreceptora u viacerých druhov stredoeurópskych motýľov (Briscoe a Chittka, 2001). Dôvod prioritizácie určitej farby môžeme nájsť v schopnosti učenia sa motýľov, vo vrodenej preferencii, mimikrách, alebo v prípade samcov v hľadaní vhodnej samičky na párenie.

Tab. 1. Prehľad odchytených druhov vo farebných vodných pasciach

P.č.	Druhy	Čeľaď	B	M	F	Ž	Č	Σ
1.	Pyrgus malvae	Hesperidae	1	4	4			9
2.	Carterocephalus palaemon			5	5			10
3.	Thymelicus sylvestris		2	3	4	4		13
4.	Thymelicus lineola			6	3	5		14
5.	Ochlodes venatus			7	4			11
6.	Iphiclides podalirius	Papilionidae			1			1
7.	Leptidea sinapis	Pieridae	1	1	1			3
8.	Pieris brassicae		3					3
9.	Pieris rapae		29	2	8	6		45
10.	Pieris napi		8	2				10
11.	Gonepteryx rhamni		6	1	3	1	3	14
12.	Hamearis lucina	Riodinidae	7					7
13.	Lycaena dispar	Lycaenidae	1				1	2
14.	Thecla betulae					1	1	2
15.	Satyrium acaciae		13			66		79
16.	Satyrium pruni		1					1
17.	Callophrys rubi			1	1			2

18.	Maculinea arion			1			1
19.	Cyaniris semiargus				1		1
20.	Inachis io	4	2	1	13		20
21.	Vanessa atalanta		1				1
22.	Araschnia levana	16	2		4		22
23.	Argynnis paphia		2		3		5
24.	Boloria selene			1	1	1	3
25.	Issoria lathonia		1				1
26.	Boloria dia	2	3	3	6	3	17
27.	Melitaea athalia	1		2	4	6	13
28.	Melitaea aurelia	1	1		1	1	4
29.	Melanargia galathea		1				1
30.	Minois dryas	2	7	3	1		13
31.	Erebia medusa	4	5	7		1	17
32.	Maniola jurtina	5	6	2	11		24
33.	Aphantopus hyperanthus		4	1	2		7
34.	Coenonympha pamphilus	4	1	2			7
35.	Coenonympha arcania		1	1	1		3
36.	Coenonympha glycerion	8	6	2	1	1	18
37.	Lasiommata maera	1	1				2
<b>Σ</b>		<b>120</b>	<b>76</b>	<b>60</b>	<b>132</b>	<b>18</b>	<b>406</b>

Tab. 2. Prehľad farebnej preferencie na úrovni čeľadí

Čeľad	B	M	F	Ž	Č
Hesperiidae	3	25	20	9	0
Papilionidae	0	0	1	0	0
Pieridae	47	6	12	6	3
Riodinidae	7	0	0	0	0
Lycaenidae	15	1	2	68	2
Nymphalidae	48	45	25	48	13

## POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantami I-10-001-00-F-VVGS, VVGS-PF-2012-19, VEGA 1/0477/10.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Arikawa K, Inokuma K, Eguchi E. Pentachromatic Visual System in a Butterfly. *Naturwissenschaften* 1987; 74: 297-298.
- Briscoe L, Chittka L. The evolution color vision in insect. *Annu. Rev. Entomol.* 2001; 46: 471-510.
- Frentiu F D, Briscoe A D. A butterfly eye's view of birds. *Bio Essays.* 2008; 30: 1151-1162.
- Lehrer M. Shape perception in the honeybee: Symmetry as a global framework. *Int. J. Plant. Sci.* 1999; 160: 51-65.
- Moericke V. Eine Farballer zur Kontrolle des Fluges von Blattläusen. *Nachr.-Bl. Dtsch. Pfl.-Schutzdienst, Stuttgart* 1951; 3: 23-24.
- Pichaud F, Briscoe A, Desplan C. Evolution of color vision. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1999; 9: 622-627.
- Scherer C, Kolb G. Behavioral experiments on the visual processing of color stimuli in *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera). *J. Comp. Physiol. A.* 1987; 160: 645-656.

## VPLYV EXPOZÍCIE TRIAZOLOVÝCH PESTICÍDOV NA AKTIVITU BOVINNEJ BUTYRYLCHOLÍNESTERÁZY

Kolesárová, V., Šiviková, K.

Ústav genetiky, Katedra biológie a genetiky UVLF, Košice

### ABSTRAKT

Triazolové fungicídy s účinnou látkou tebukonazol (Orius 25EW a Prosaro<sup>®</sup>) sa používajú na ošetrovanie porastov pšenice, jačmeňa a repky ozimnej proti hubovitým ochoreniam. Ich fungicídne vlastnosti sú založené na inhibícii enzýmu 14- $\alpha$ -demetylázy (CYP 51), ktorý reguluje syntézu ergosterolu nevyhnutného pre tvorbu bunkovej steny húb. Hodnota aktivity cholinesteráz je jedným z ukazovateľov kontaminácie životného prostredia. V krvi sa nachádzajú dva typy cholinesteráz: acetylcholinesteráza a butyrylcholinesteráza (BChE), ktorá sa taktiež zúčastňuje na prenose nervových vzruchov.

Cieľom našej práce bolo spektrofotometricky stanoviť zmeny aktivity BChE v plazme krížencov slovenského strakatého dobytká po expozícii fungicídmi *in vitro* v koncentráciách 25 - 300  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Stanovenie aktivity cholinesteráz patrí medzi často používané metódy detekcie expozície zvierat a ľudí anticholinesterázovým látkam. Štatistickým vyhodnotením získaných zmien absorbancie ( $\Delta A\cdot\text{min}^{-1}$ ) sme v korelácii k použitým koncentráciám tebukonazolu potvrdili vysoko štatisticky významnú inhibíciu aktivity BChE ( $p < 0,001$ ) od koncentrácie 150  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  u oboch testovaných fungicídov.

### ÚVOD

Triazolové fungicídy patria do skupiny aktuálne používaných pesticídov (CUP – current used pesticides). Sú chemicky syntetizované a aplikované predovšetkým v poľnohospodárstve a na pastvinách (Konwick a kol., 2006). Mechanizmus účinku triazolov je založený na inhibícii lanosterol 14- $\alpha$ -demetylázy, ktorá reguluje syntézu ergosterolu nevyhnutného pre tvorbu bunkovej steny húb (Zarn a kol., 2003). Na rozdiel od organochlórových zlúčenín, ktoré nahradili, sa vyznačujú nižšou kumuláciou v organizme a kratšou perzistenciou v prostredí.

Tebukonazol (účinná látka fungicídnych prípravkov Orius 25EW a Prosaro 250EC<sup>®</sup>) sa v našich podmienkach osvedčil pri ošetrovaní listov a klasov pšenice a jačmeňa a proti hubovitým ochoreniam repky ozimnej. Vyznačuje sa nízkou akútnou toxicitou. Testami karcinogenity a teratogenity sa zistilo, že tebukonazol indukoval tumory v pečeni myši, u psov očné lézie a vývinové anomálie u hlodavcov (myši, potkanov a králikov) (U.S.EPA 1999, 2010).

Stanovenie aktivity cholinesteráz patrí medzi rýchle a často používané metódy detekcie otravy alebo expozície anticholinesterázovým látkam cicavcov, vtákov a rýb (Harlin a Ross, 1990).

V krvi cicavcov sa nachádzajú dva základné typy cholinesteráz: acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BChE), označovaná aj ako nepravá alebo plazmová cholinesteráza. Fyziologická funkcia BChE je doteraz neobjasnená. Predpokladá sa, že BChE slúži ako ko-regulátor cholinergnej neurotransmisie (Mesulam a kol., 2002) a vplyva aj na reguláciu bunkovej proliferácie a diferenciáciu neurónov (Mack a Robitzki, 2000).

Na rozdiel od mnohých literárnych zdrojov uvádzajúcich zmeny aktivity cholinesteráz po expozícii organofosfátovým, resp. karbamátovým pesticídom, existuje len veľmi málo údajov o vplyve triazolových pesticídov na aktivitu cholinesteráz. Toni a kol. (2011) zistili zvýšenú aktivitu AChE v mozgu *Cyprinus carpio* po expozícii tebukonazolu.

Cieľom našej práce bolo spektrofotometricky stanoviť zmeny aktivity BChE *in vitro* v plazme hovädzieho dobytká po expozícii rôznymi koncentráciami technických triazolových fungicídov.

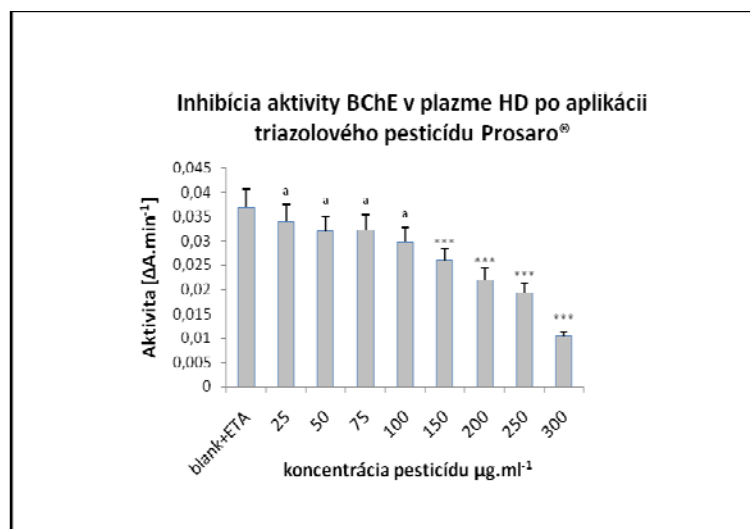
## MATERIÁL A METODIKA

Fungicídy obsahujúce účinnú látku tebukonazol, Orius 25EW ( $\alpha$  - terc.butyl -  $\alpha$  - {4-chlorophenylethyl} -1 H -1,2,4 - triazolyl-ethanol, 25% tebukonazolu) a Provaro 250EC ((2-(2-(1-chlorocyclopropyl)-3-(2-chlorphenyl)-2-hydroxypropyl)-1,2-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione);12,5% prothiokonazol plus 12,5% tebukonazol) boli rozpustené v 96% etanole a použité v koncentráciách 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 a 300  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Všetky merania boli vykonané v 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátovom tlmivom roztoku (pH 7,4) s reakčným činidlom DTNB (kys. 5,5'- dithiobis(2-nitrobenzoová), 0,3  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  pri 25°C spektrofotometrickou metódou podľa *Ellmana a kol.* (3) s použitím 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  acetylthiocholínu (ATCh), ktorý je substrátom cholinesteráz. Ako negatívnu kontrolu sme použili 96% etanol (maximálne 4% celkového objemu vzorky). Plazmu sme získali z celej krvi krížencov slovenského strakatého dobytká zo Školského poľnohospodárskeho podniku Zemplínska Teplica (6 býčkov, vek 6 mesiacov) centrifugáciou pri 1200 rpm. Na základe spontánnej aktivity BChE v plazme bolo použité finálne, 25-100 násobné zriedenie plazmy v reakčnej zmesi. Zmeny absorbancie ( $\Delta A\cdot\text{min}^{-1}$ ) boli merané pri 412 nm na spektrofotometri CARY 300 s vlastnou kontrolou teploty (Varian Inc., Australia). Výsledky boli štatisticky vyhodnotené nelineárnou regresnou rovnicou a ANOVA testom a rozdiely v aktivite BChE v experimentálnych skupinách oproti kontrole boli porovnávané Tukeyho porovnávacím testom v programe Graph Pad Prism®.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

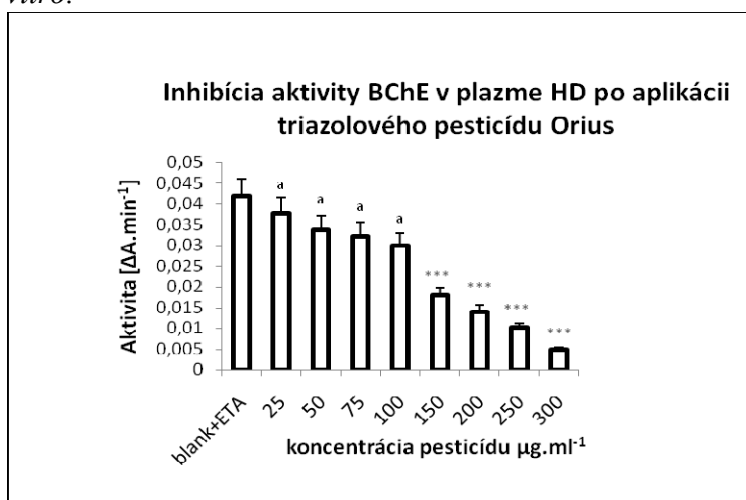
Vplyv triazolových fungicídov na aktivitu BChE hovädzieho dobytká bol stanovený spektrofotometricky, a to zmenou hodnoty absorbancie v čase ( $\Delta A\cdot\text{min}^{-1}$ ). Priemerné hodnoty absorbancie od šiestich kusov dobytká sú uvedené v grafoch 1a 2. Štatisticky významný pokles absorbancie ( $p < 0,001$ ) bol pozorovaný od koncentrácie 150  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pri oboch testovaných fungicídach. Následne sme výsledky nášho experimentu vyhodnotili nelineárnou regresnou rovnicou (graf 3 a 4). Získanými výsledkami sme potvrdili, že skupina 6 zvierat bola dostačujúca pre súhrnnú štatistickú analýzu a inhibícia BChE bola štatisticky významná ( $p < 0,001$ ).

Graf 1. Inhibícia aktivity BChE v plazme hovädzieho dobytká (HD) po aplikácii triazolového fungicídu Provaro® *in vitro*.



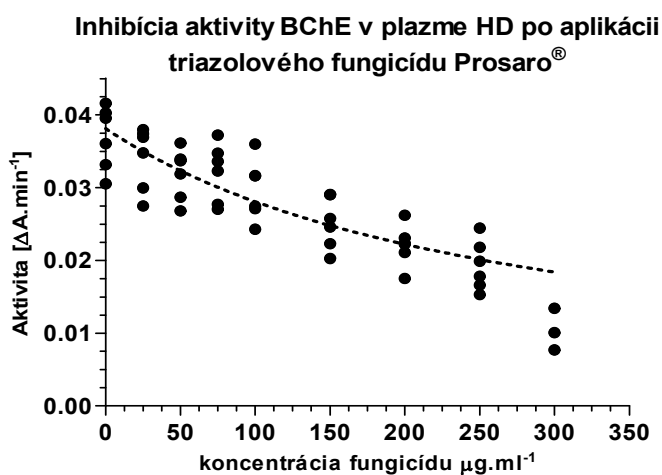
\*\*\*- štatisticky významné údaje ( $p < 0,001$ ) ANOVA test+Tukeyho porovnávací test  
<sup>a</sup> - údaje bez štatistickej významnosti  
blank+ETA – negatívna kontrola s etanolom

Graf 2. Inhibícia aktivity BChE v plazme HD po aplikácii triazolového fungicídu Orius *in vitro*.

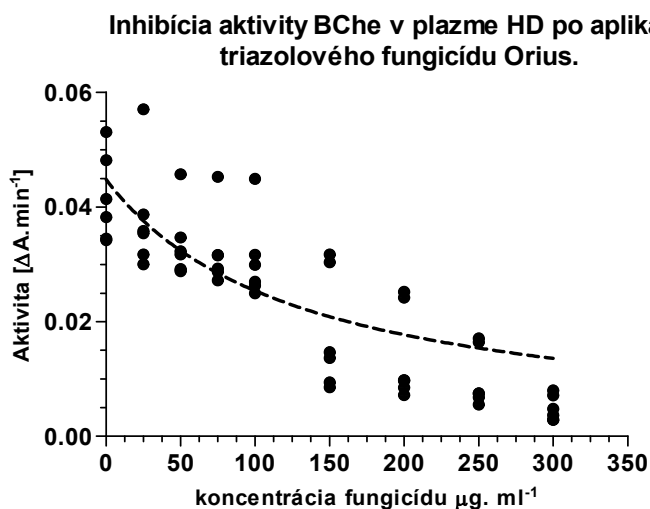


\*\*\*- štatisticky významné údaje ( $p < 0,001$ ) ANOVA test+Tukeyho porovnávací test  
<sup>a</sup> - údaje bez štatistickej významnosti  
 blank+ETA – negatívna kontrola s etanolom

Graf 3. Inhibícia aktivity BChE v plazme HD po aplikácii triazolového fungicídu Prosaro® *in vitro*-nelineárny regresný model.



Graf 4. . Inhibícia aktivity BChE v plazme HD po aplikácii triazolového fungicídu Orius *in vitro* – nelineárny regresný model.



V súčasnosti existuje len málo literárnych odkazov o účinku triazolových fungicídov na aktivitu BChE hospodárskych zvierat. Jedným z dôvodov je, že nepatria medzi typické inhibítory cholinesteráz, ako napr. karbamáty (Dorko a kol., 2011) a organofosfáty. Toni a kol. (2011) poukázali na zvýšenie aktivity AChE v mozgu kapra obyčajného po expozícii tebukonazolu avšak súčasne vo svalovine nedošlo k štatisticky významnej zmene aktivity.

Hovädzí dobytok sa považuje za vhodný objekt pre overenie genotoxicity prostredia. Je to najčastejšie chované hospodárske zviera, ktoré je prostredníctvom rastlinnej potravy priamo exponované chemickými látkami a kumulácia reziduí xenobiotík v mäse naznačuje možnosť zvýšenia genetického rizika pre človeka potravinovým reťazcom. Naše výsledky poukazujú na to, že fungicídy s účinnou látkou tebukonazol sú schopné inhibovať aktivitu BChE v plazme hovädzieho dobytká. Aktivita BChE oproti kontrolnej hodnote sa postupne znižovala od najnižšej koncentrácie testovaných fungicídov, od koncentrácie 150 µg.ml<sup>-1</sup> bola zaznamenaná inhibícia štatisticky významná (p<0,001). Prezentované výsledky inhibície aktivity cholinesteráz, či už v celej krvi alebo jej jednotlivých zložkách (plazma, erytrocyty), vhodne doplnia testy zamerané na overenie genotoxicity uvedených triazolových fungicídov.

#### POĎAKOVANIE

Práca vznikla fin. podporou grantu VEGA 1/0125/11 a vďaka odb. usmerneniu Institute of Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Chorvátsko v rámci pobytu CEEPUS .

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dorko F., Danko J., Flešárová S., Boroš E., Sobeková A. Effect of pesticide bendiocarbamate on distribution of acetylcholine and butyrylcholine-positive nerves in rabbit's thymus. *Eur. J. Histochem.* 2011; 55:206-9.
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr., Featherstone R. M. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7:88-95.
- Harlin K. S., Ross P. S. Enzymatic spectrophotometric method for determination of cholinesterase activity in whole blood: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1990;73:616-9.
- Konwick B. J., Garrison A. W., Avants J. K., Fisk A. T. Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 2006; 80:372-81.
- Mack A., Robitzki A. The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'butyrylcholinesterase-DNA study. *Prog. Neurobiol.* 2000; 60:607-28.
- Mesulam M. M., Guillozet A., Shaw P., Levey A., Duysen E. G., Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 2002; 110:627-39.
- Toni C., Loro V. L., Santi A., de Menezes C.C., Cattaneo R., Clasen B. E., Zanella R. Exposure to tebuconazol in rice field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.* 2011; 153:128-32.
- U.S. Environmental Protection Agency. Tebuconazole, Pesticide Tolerance. *Federal Register* 1999; 64:1132-38.
- U.S. Environmental Protection Agency. Tebuconazole, Pesticide Tolerances. *Federal Register* 2010; 75:24421-28.
- Zarn J. A., Bruschweiler B. J., Schlatter J. R. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha demethylase and aromatase. *Environ. Health Perspect.* 2003; 111:255-61.



## **PRIESKUM PARAZITOFAUNY HOLUBOV (*Columba livia domestica*) V URBÁNEJ OBLASTI MOLDAVY n/BODVOU**

P. Komorová<sup>1</sup>, A. Kočišová<sup>1</sup>, B. Víchová<sup>2</sup>, Z. Hurníková<sup>1</sup>, E. Hap<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav parazitológie UVLF v Košiciach,

<sup>2</sup>Parazitologický ústav SAV v Košiciach

### **ABSTRAKT**

Výskum bol zameraný na detekciu endo- a ektoparazitov holubov (*Columba livia domestica*), ktoré boli usmrtené za účelom regulácie počtu urbánnych populácií týchto vtákov v meste Moldava n/Bodvou počas marca 2012. Vyšetřili sme spolu 85 jedincov, z toho 53 samcov a 32 samíc. Po izolácii ektoparazitov z peria vyšetřovaných vtákov, sme každého jedinca podrobili parazitologickej pitve, odobrali a vyšetřili sme trus na prítomnosť vajčiek helmintov a oocýct kokcií, svalstvo sme vyšetřili použitím tráviacej metódy na detekciu cýst *Sarcocystis* spp. a pre stanovenie krvných patogénov sme použili metódu polymerázovej reťazovej reakcie. Podrobné vyšetřenie všetkých usmrtených holubov na prítomnosť parazitov nám poskytlo komplexné informácie o stave populácie týchto vtákov z hľadiska zamorenia parazitmi v rámci študovanej lokality východného Slovenska.

### **ÚVOD**

Holub, patriaci do radu holubotvaré (Columbiformes), je bežne sa vyskytujúci druh vtáka, ktorého možno nájsť na celom svete v mestských aj vidieckych oblastiach. Spolužitie ľudí a holubov v mestách a na vidieku môže pre človeka predstavovať zdravotné riziko kvôli patogénom, ktoré holuby prenášajú. Mnohé ochorenia, ktoré postihujú holuby, majú zoonóznny charakter. Preto sa regulácia počtu holubov, najmä v oblastiach, kde sú premnožené, často stáva nevyhnutnou z hľadiska ochrany verejného zdravia.

Cieľom nášho prieskumu bolo určiť diverzitu parazitov a mieru zamorenia u vybranej vzorky mestských holubov pochádzajúcich z oblasti Moldavy nad Bodvou, získať tak cenné informácie o stave tejto urbánnej populácie z hľadiska výskytu ekto- a endoparazitov a následne zhodnotiť potenciálne riziko v súvislosti s prenosom pôvodcov zoonóz.

### **MATERIÁL A METODIKA**

Vyšetřili sme spolu 85 jedincov holubov, ktoré boli usmrtené cervikálnou dislokáciou v rámci riadenej regulácie mestskej populácie v Moldave nad Bodvou.

Ektoparazity sme z tiel všetkých 85 holubov odobrali systematickým vytriasaním peria nad filtračným papierom. Následne sme zachytené ektoparazity pomocou stereolupy určili na úroveň druhu.

Po izolácii ektoparazitov sme každého jedinca podrobili úplnej parazitologickej pitve, pri ktorej sme oddelili tráviacu sústavu. Jednotlivé orgány (žalúdok, tenké črevo, hrubé črevo) sme otvorili a vyšetřili metódou opakovaného premývania. Po sedimentácii žalúdočných a črevných obsahov sme zlievky vyšetřovali pod stereolupou.

Trus na koprologické vyšetřenie bol odobraný post mortem z tráviaceho traktu vyšetřovaných vtákov. Použili sme štandardnú flotačnú metódu podľa Kozáka a Mágrovej.

Vzorku 15 g prsnej svaloviny, odobranej pri helmintologickej pitve, sme vyšetřili trávením v 0,25 % roztoku trypsínu na prítomnosť cýst *Sarcocystis* spp. a vyšetřili pod mikroskopom.

Za účelom stanovenia prítomnosti krvných parazitov sme vyšetřovaným vtákom odobrali pečene, tkanivo ktorých sme použili na izoláciu DNA. Metódu polymerázovej reťazovej reakcie sme aplikovali na detekciu vektormi prenášaných patogénov z rodov *Anaplasma*, *Borrelia* a *Babesia*. Na izoláciu DNA z tkaniva pečene bol použitý NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue Kit (Macherey-Nagel, Nemecko). V prvej fáze amplifikácie boli na detekciu všetkých

druhov čeľade Anaplasmataceae použité primery ge3a, ge10r. Jeden µl PCR produktu z prvej fázy bol použitý ako templát pre druhú reakciu s párom primerov ge9f a ge2 na zistenie *Anaplasma phagocytophilum* (Massung et al., 1998). Na prítomnosť *Borrelia burgdorferi* sensu lato boli vzorky vyšetrené amplifikáciou časti 5S (rrfA) – 23S (rrlB) intergénového medzerníka rDNA (Derdáková a kol., 2003). Na detekciu DNA *Babesia* spp. boli použité primery Bab1/Bab4, ktoré amplifikujú úsek 18S rRNA génu *Babesia* spp. dlhý približne 400 bp (Hilpetshauer a kol., 2006).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Ektoparazity boli prítomné u 44,71 % holubov. Zistené boli štyri druhy švol (Mallophaga):

- *Goniocotes hologaster* (60,5 %),
- *Goniodes gigas* (31,6 %),
- *Lipeurus caponis* (23,68 %),
- *Cuclotogaster heterographus* (7,89 %).

Prvé dva z vyššie uvedených druhov dosiahli najvyššiu intenzitu výskytu. Najčastejšie bolo zmiešané zamorenie druhmi *Goniocotes hologaster* a *Goniodes gigas* v kombinácii s *Lipeurus caponis*.

Helmintologickou pitvou sme prítomnosť parazitov v tráviacom trakte zistili iba v jednom z vyšetovaných holubov. V tenkom čreve tohto jedinca bol nájdený jeden exemplár *Capillaria* spp. V podobnej štúdií Radfar a kol. (2011) uvádza 16,66 % výskyt druhov patriacich do kmeňa Nematoda, Natala a kol. (2009) a Marques a kol. (2007) zistili 3,2 % a 32,56 % jedincov nakazených nematódami tráviaceho traktu.

Koprologické vyšetrenie odhalilo u 51 % holubov výskyt oocýst *Eimeria* spp. Podobné výsledky dosiahol Natala a kol. (2009), ktorý uvádza 49,2 % výskyt z celkového počtu vyšetovaných holubov. V porovnaní s tým Marques a kol. (2007) vo svojej štúdií zistila až 86,05 % prevalenciu eimeriôzy holubov.

Vyšetrenie na sarkocystózu nepreukázalo prítomnosť makro- ani mikrocýst v svalovine nami vyšetovaných holubov. Tento nález nie je prekvapujúci, pretože hoci holuby môžu slúžiť ako medzihostiteľ tohto protozoárneho parazita, bývajú infikované len zriedka (Odening, 1998; Ecco a kol., 2008; Olias a kol., 2009).

Molekulárnymi metódami sme nedetegovali prítomnosť krvných patogénov z rodov *Anaplasma*, *Borrelia* a *Babesia*. Úloha vtákov v prenose kliešťami prenášaných patogénov je málo preskúmaná. Skotarczak a kol. (2006) považuje vtáky za možný rezervoár *A. phagocytophilum*, ale jeho výskum to nepreukázal. Absencia týchto infekcií môže pravdepodobne súvisieť s tým, že holuby nie sú kompetentným rezervoárom týchto patogénov, alebo nepredstavujú vhodného hostiteľa pre kliešte ako ich vektory. Alekseev a kol. (2001) a Bjoersdorff a kol. (2001) v rozsiahlych štúdiách zistili len malé percento vtákov napadnutých kliešťami.

Holuby sú vo všeobecnosti považované za významný rezervoár viacerých zoonózných patogénov. Naše výsledky prekvapivo nepreukázali prítomnosť žiadnych medicínsky významných druhov parazitov, ani krvných patogénov. Prítomnosť kokcií a ektoparazitov však predstavuje riziko nakazenia domáceho vtáctva.

## POĎAKOVANIE

Tento výskum bol podporený grantmi VEGA 1/0702/12 a VEGA 1/0236/12.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

De Lima V.Y., Langoni H., da Silva A.V., Bergamaschi Pezerico S., de Castro A.P.B., da Silva R.C., Araújo Jr. J.P. *Chlamydomphila psittaci* and *Toxoplasma gondii* infection in pigeons (*Columba livia*) from Sao Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 175. 2011; 9-14

- Derdáková M., Beati L., Peřko B., Stanko M., Fish D. Genetic Variability within *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies Established by PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of the rrfA-rrlB Intergenic Spacer in *Ixodes ricinus* Ticks from the Czech Republic. Environ. Microbiol. 2003; vol.69 no. 1 509-516
- Ecco R., Lupi M.M., Malta M.C., Araujo M.R., Guedes R.M., Shivaprasad H.L. An outbreak of sarcocystosis in psittacines and a pigeon in a zoological collection in Brazil. Avian Dis. 2008; 52:706-10
- Gryczyńska A., Zgódka A., Ploski R., Siemiatkowski M. *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in passerine birds from the Mazurian Lake region (Northeastern Poland). Avian Pathology. 2004; 69-75
- Hilpertshausen H., Deplazes P., Schnyder M., Gern L., Mathis A. *Babesia* spp. Identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland. Institute of Parasitology, Medical and Veterinary Faculty of the University of Zurich, Switzerland
- Massung R.F., Slater K., Owens J.H., Nicholson W.L., Mather T.N., Solberg V.B., Olson J.G. Nested PCR Assay for Detection of Granulocytic Ehrlichiae. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(10):6503-7
- Marques S.M.T., de Quadros R.M., da Silva C.J., Baldo M. Parasites of pigeons (*Columba livia*) in urban areas of lages, Southern Brazil. Parasitol Latinoam 62. 2007; 183-187
- Natala A.J., Asemadahun N.D., Okubanjo O.O., Ulayi B.M., Owolabi Y.H., Jato I.D., Yusuf K.H. A Survey of Parasites of Domesticated Pigeon (*Columba livia domestica*) in Zaira, Nigeria. International Journal of Soft Computing 4 (4). 2009; 148-150
- Odening K. The present state of species-systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). Syst Parasitol. 1998; 41:209-33
- Olias P., Gruber A.D., Heydorn A.O., Kohls A., Mehlhorn H., Hafez H.M., et al. A novel *Sarcocystis*-associated encephalitis and myositis in racing pigeons. Avian Pathol. 2009; 38: 121-8
- Radfar M.H., Fathi S., Asl E.N., Dehagi M.M., Seghinsara H.R. A Survey of Parasites of Domestic Pigeons (*Columba livia domestica*) in South Khorasan, Iran. Veterinary Research 4 (1). 2011; 18-23
- Skotarczak B., Rymaszewska A., Wodecka B., Sawczuk M., Adamska M., Maciejewska A. PCR detection of granulocytic *Anaplasma* and *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks and birds in west-central Poland. Ann Agric Environ Med. 2006; 13, 21-23

## MAPOVANIE DYNAMIKY ZMIEN V POŠKODENEJ MIECHE

Korimová A., Vanický I.

*Neurobiologický ústav, SAV, Košice*

### ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo štúdium sekundárneho poškodenia tkaniva miechy zamerané na vývoj deštrukčných procesov z časového hľadiska. Výsledky stanovené na kompresnom modeli poranenia miechy potvrdili sekundárny nárast rozsahu poškodenia v priebehu prvých 24-48 hodín po inzulte. Tieto údaje nám zároveň slúžili ako podklad pre časové nasmerovanie ďalších intervencií. V krátkom posttraumatickom období sme pozorovali prítomnosť kľúčovej zložky komplementovej kaskády C3 zložky. Vzhľadom na selektívnu lokalizáciu C3 komponentu v ložisku poškodenia, sa aktivácia komplementu pravdepodobne nepodieľa priamo na sekundárnom zväčšovaní lézie.

### ÚVOD

Časový priebeh degeneratívnych zmien po poranení miechy (PM) nie je jasne definovaný. V experimentálnych prácach je rozvoj sekundárnych zmien opisovaný v priebehu mnohých hodín až dní. Niektorí autori uvádzajú postupný vývoj degeneratívnych zmien až v priebehu niekoľkých týždňov po poranení. V klinickej terminológii napríklad nie sú jasne definované časy akútnych, subakútnych a chronických zmien. Jednou z príčin je existencia veľkej diverzity jednotlivých typov poranení, ktoré zrejme ovplyvňuje časový priebeh sekundárnych zmien. V našej štúdií sme sa preto zamerali na analýzu lézie s cieľom merať jej predozadný rozmer ako aj na imunohistochemické zobrazenie prítomnosti C3 komponentu komplementu ako súčasť zápalovej reakcie v tkanive poškodenej miechy vo fáze rozvoja poškodenia. V tkanivách CNS sú prítomné všetky zložky, ktoré môžu aktivovať komponentovú kaskádu. Zároveň môžu prestupovať pri porušení hematospinálnej bariéry do tkaniva z krvnej plazmy, ktorá obsahuje rádovo vyššie koncentrácie komplementu. Pri poranení miechy sa dá predpokladať, že aktivovaný komplement zohráva úlohu pri sekundárnych zmenách tkaniva. Cieľom imunohistochemickej štúdie bola teda i detekcia prítomnosti komponentu C3 v okolí primárnej lézie.

### MATERIÁL A METODIKA

Všetky experimenty boli založené na modely kompresného PM, ktorý predstavuje overený a ľahko reprodukovateľný model PM spojený s deštrukciou hlavných spinálnych traktov v mieste najväčšieho poškodenia. Za účelom minimalizovania anatomických rozdielov medzi zvieratami ako aj pre dosiahnutie štandardizácie kompresného modelu poranenia miechy boli v experimente použité len samce potkana kmeňa *Wistar* s hmotnosťou v rozmedzí 300-330 g . Zvieratá boli určené na:

(A) analýzu rozvoja lézie pri kompresnom PM u potkana v 5 prežívacích časoch: 1 hodinu a následne 1, 2, 3 a 4 dni po PM (n=5 v každom intervale)

(B) mapovanie distribúcie C3 komponentu komplementovej kaskády v tkanive po kompresnom PM u potkana s prežívacím časovým intervalom 24 hodín (n=8) a 48 hodín (n=8)

#### (A) Vývoj zmien v poškodenej mieche

Samotné kompresne PM bolo prevedené v inhalačnej anestézii (1,5% halotan) pomocou 2-Fogartyho katétra vsunutého do epidurálneho priestoru cez malý otvor vyvítaný 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 µl destilovanej vody po dobu 5 minút (Vanický a kol., 2001). Po sfúknutí balónika sme mäkké tkanivá zašili a zvieratá umiestnili do kliebok. Po uplynutí sledovaných časových intervalov (1 hodina, 1, 2, 3 a 4 dni

po PM) sme zvieratá v hlbokoj 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 chrbticového kanála. Po 1-dňovej kryoprotekcii v 30% sacharóze sme miechy zaliali do proteínového matrixu a krájali pomocou kovovej matrice a mikrotómovej žiletky. Tento spôsob spracovania umožnil krájanie 1mm hrubých rezov, z ktorých bolo možné priamo odčítať rozsah poškodenia. Sériu rezov prakticky celej miechy (približne 100 rezov) sme uložili jednotlivo vo fixačnom roztoku. Natívne rezy sme fotili zostavou pre makrofotografiu.

#### (B) C-3 imunohistochemické farbenie

Po uplynutí 24 a 48 h od kompresného PM, po transkardiálnej perfúzii fyziologickým roztokom a 4% paraformaldehydom v 0,1M PBS, disekcii miechy z chrbticového kanála a odstránení pevných obalov boli miechy fixované 3 hodiny v 4 % paraformaldehyde a následne cez noc v 30% roztoku sacharózy pri teplote 4°C. Z každej miechy boli vyčlenené 3 samostatné časti: 1-cm segment obsahujúci miesto najväčšieho poškodenie v centrálnej časti, t.j. 0,5 cm kraniálne a 0,5 cm kaudálne od epicentra poškodenia a ďalšie dva 1 cm segmenty ako jeho priame pokračovanie v kraniálnom i kaudálnom smere. Každá vzorka bola ďalej narezaná na kryostate (Leica) na sériu 30- $\mu$ m hrubých transverzálnych rezov, pripravených pre imunohistochemickú vizualizáciu C3 zložky komplementu a následné dofarbenie hematoxylínom a eozínom.

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Viaceri autori opísali záhadné centrálné lézie v dorzálnych rohoch miechy šíriace sa do veľkej vzdialenosti od centrálného poškodenia (Dusart a Schwab, 1994; Guth a kol., 1994). Guth a kol. (1994) nazvali toto poškodenie „sekundárne lézie dorzálnych povrazcov“ a predpokladali, že sú vyvolané rozsiahlou Wallerovou degeneráciou, ktorá spôsobí nekrotizujúce zmeny v okolí. Dusart a Schwab (1994) opísali podobný obraz, a postrehli, že tieto zmeny nemôžu byť následkom toxického pôsobenia makrofágov, pretože vznik nekrózy predchádzal masovú infiltráciu makrofágov do týchto oblastí.

Charakteristický obraz akútnej fázy poškodenia predstavuje hemoragická nekróza, čo umožňuje pomerne presné odlíšenie poškodeného a intaktného tkaniva na natívnych rezoch. Analýza natívnych rezov poškodenej miechy nám umožnila sledovať dynamiku vývoja sekundárneho poškodenia. Našou snahou bolo kvantifikovať rozsah lézie a jej vývoj v čase po poranení, so zámerom odpovedať na otázku, ako dlho trvá zväčšovanie primárneho poškodenia v nami používanom modeli a intenzite poškodenia. Prekvapivý obraz sa vytvoril 1 a 2 dni po poranení. Centrálné ložisko zostalo v hrubých rysoch zachované, v jeho bezprostrednej blízkosti však vznikli ďalšie izolované hemoragické ložiská, často nepravidelne umiestnené. Najvýraznejším prvkom však boli prísne symetrické okrúhle lézie umiestnené v centrálnej časti dorzálnych povrazcov, ktoré zasahovali extrémne ďaleko kraniálne aj kaudálne. Maximálne rozvinuté lézie tak dosahovali dĺžku 4-5cm. Hlavný nárast veľkosti lézie tak vznikol v priebehu 1. dňa. Ďalšie menej výrazné predĺženie bolo pozorované v priebehu 2. dňa, v ďalších prežívacích časoch sme pozorovali postupnú resorpciu nekrotického tkaniva a vytváranie kavít. Tieto zistenia zároveň slúžili ako podklad pre ďalší experiment – imunohistochemický dôkaz C3 zložky komplementu v časovom horizonte 24 a 48 hodín po PM.

Hoci sú účinky komplementu vo všeobecnosti považované za skoré, nie sú však okamžité. Jeho pôsobenie prostredníctvom jednotlivých fragmentov priamo v mieste poranenia miechy sa odhaduje na akútnu až subakútnu fázu PM (Alexander a kol., 2008), t.j. zvyčajne v priebehu prvých 48hodín po poranení (Bellander a kol., 1996). V prípade PNS je kaskáda komplementu aktivovaná počas 1. hodiny po traume, a to lokálne v mieste poranenie (de

Jonge a kol., 2004) ale aj ako spätná odpoveď v jadrách motoneurónov a senzorickej projekcii v CNS (Liu a kol., 1998; Törnquist a kol., 1996). Naše histologické analýzy poškodeného tkaniva po PM potvrdili prítomnosť C3 zložky aktivácie komplementu v mieste najväčšieho poškodenia. Jednotlivé segmenty tkaniva z kraniálnych ako aj kaudálnych oblastí vzhľadom k miestu priameho zásahu rovnako preukázali prítomnosť C3 komponentu, s prekvapivo intenzívnejšou reakciou v kaudálnej časti lézie. Najvýraznejšia C3 imunoreaktivita však bola pozorovaná priamo v lézii, príľahlé tkanivo v bezprostrednom okolí ani imunopozitívne štruktúry vo vzdialenejších nepoškodených oblastiach miechy nevykazovali voči kontrole žiadne zmeny. Prítomnosť C3 komponentu sme zároveň detegovali v cievach predných a zadných rohov. Stanovená imunoreaktivita tkaniva miechy na C3 zložku kaskády komplementu súvisí preto najskôr s prítomnosťou nekrózy v tkanive miechy a s najväčšou pravdepodobnosťou i s akumuláciou makrofágov v mieste lézie. Naše pozorovania zároveň demonštrovali prítomnosť C3 zložky komplementu už 24 h po kompresnom PM ako aj 48 h po kompresnom PM. Samotná distribúcia tohto komponentu v tkanive poškodenej miechy však naznačovala priamu súvislosť skôr s nekrotickým ložiskom. V bezprostrednom okolí lézie ani v intaktných oblastiach miechy sme nepozorovali zmeny v rozložení ani v intenzite imunopozitívnych štruktúr. Distribúcia C3 zložky v našom experimente tak nenaznačuje že by aktivácia komplementu v okolí primárneho ložiska predchádzala sekundárnemu rozširovaniu lézie.

#### POĎAKOVANIE

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

#### POUŽITÁ LITERATÚRA:

- Alexander JJ, Anderson AJ, Barnum SR, Stevens B, Tenner A. The complement cascade: Yin-Yang in neuroinflammation- and neuro-protection and -degeneration. *J Neurochem.* 2008;107: 1169-1187
- Bellander BM, von Holst H, Fredman P, Svensson M. Activation of the complement cascade and increase of clusterin in the brain following a cortical contusion in the adult rat. *J Neurosurg.* 1996; 85: 468-475
- de Jonge R, van Schaik IN, Vreijling JP, Troost D, Baas F. Expression of complement s in the peripheral nervous system. *Human Molecular Genetics,* 2004; 13: 295-302
- Dusart I, Schwab ME. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci.* 1994; 6:712-724
- Guth L, Zhang Z, Steward O. The unique histopathological responses of the injured spinal cord. Implications for neuroprotective therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 890:366-384
- Liu L, Persson JKE, Svensson M, Aldskogius H. Glial cell responses, complement, and clusterin in the central nervous system following dorsal root transection. *Glia,* 23:221-238
- Törnqvist E, Liu L, Aldskogius H, Holst HV, Svensson M. Complement and clusterin in the injured nervous system. *Neurobiol Aging.* 1998; 17:695-705
- Vanický I, Urdzíková 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

# ÚLOHA POLO-LIKE 1 KINÁZY POČAS PRVEJ MITÓZY PREIMPLANTAČNÉHO EMBRYA

Kovaříková V.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice, Slovenská republika*

## ABSTRAKT

Polo-like kináza 1 (Plk1) patrí do skupiny serín/treonínových proteín kináz a hrá dôležitú úlohu vo viacerých krokoch počas mitózy. Zúčastňuje sa regulácie zrenia centrozómu, tvorby deliaceho vretienka a následnej cytokinézy. Naše experimenty boli zamerané na úlohu Plk1 počas prvej mitózy jednobunkového embrya myši. Aktivita Plk1 bola inhibovaná špecifickým inhibítorom BI2536. Experimenty ukázali, že expresia Plk1 stúpla v 24 hodinovom intervale po aplikácii hCG, pričom najvyššia hladina bola zaznamenaná 27 až 32 hodín po aplikácii hCG. Tesne pred rozpadnutím obalu prvojadier sa Plk1 kináza aktivovala aktiváciou na Treoníne 210. Fosforylovaná Plk1 (pThr210 Plk1) bola lokalizovaná tak v samčom ako aj samičom prvojadre a tiež centrozomálnych štruktúrach (MTOCs). Počas metafázy, sa pThr210 Plk1 lokalizovala na kondenzovaných chromozómoch a oboch póloch deliaceho vretienka. Špecifická inhibícia Plk1 pomocou BI2536 viedla k vytvoreniu bipolárneho deliaceho vretienka s narušeným usporiadaním mikrotubúl. Hoci, takto inhibované jednobunkové embryá vstúpili do prvého mitotického cyklu jednobunkového embrya, neboli schopné prvé delenie dokončiť. „Life cell imaging“ technológia nám odhalila, že počas metafázy Plk1 inhibovaných embryí boli kondenzované chromozómy dynamicky mislokované v štádiu metafázy a tieto embryá nevstupovali do štádia anafázy. Pritom po aplikácii Reverzínu (inhibitor Mps1) Plk1 inhibované embryá neprekonali kontrolný bod - SAC („spindle assembly checkpoint“) v tomto štádiu mitózy.

Naše výsledky dokumentujú, že Plk1 nehrá kľúčovú úlohu pri vstupe oplodneného oocyту do prvej embryonálnej mitózy. Aktivita Plk1 kinázy je však nevyhnutná pre tvorbu deliaceho vretienka a prechod zo štádia metafázy do anafázy resp. cytokinézy.

## ÚVOD

Bezprostredne po fertilizácii sa formuje samčie a samičie prvojadro. Pred syngamiou oboch prvojadier dochádza ku rozpadu jadrovej membrány (NEBD) a chromátin kondenzuje a kondenzované chromozómy sa usporiadajú do metafázickej roviny. Mikrotubulín organizačné centrá (MTOCs) sa zúčastňujú tvorby mitotického vretienka (Li a kol., 2010). Trvanie prvej embryonálnej mitózy ovplyvňuje prvá metafáza, pričom Sikora-Polaczek a kol. (2006) ukázali, že táto metafáza nezávisí od kontrolného bodu vytvárania deliaceho vretienka (SAC). Tento kontrolný mechanizmus je aktivovaný neúplným pripojením mikrotubulov na kinetochóry, čo má za následok početné mislokácie kondenzovaných chromozómov.

Plk1 kináza sa zúčastňuje mnohých procesov, ktoré sú rozhodujúce pre úspešný prechod bunky jednotlivými štádiami bunkového cyklu (Donaldson a kol., 2001). Aktivita Plk1 je regulovaná jej aktivačnou fosforyláciou na Treoníne 210. Na somatických bunkách bol po inhibícii aktivity Plk1 kinázy prezentovaný tzv. „polo“ fenotyp monopolárneho deliaceho vretienka. Detailný mechanizmus jeho vzniku však zatiaľ nie je známy. Pritom je však veľmi pravdepodobné, že hlavná aktivita Plk1 kinázy je zameraná na zrenie centrozomálnych štruktúr a formovanie stabilných pripojení mikrotubúl na kinetochorové oblasti prometafázových resp. metafázových chromozómov (Lens a kol., 2010). V priebehu mitózy má lokalizácia Plk1 dynamický charakter, čo je dôležité pre úspešný priebeh bunkového cyklu. Ukázalo sa, že dynamická relokácia Plk1 je markerom pre jej viaceré kinázové substráty v rámci mitotického cyklu, čo potvrdujú aj údaje, že Plk1 sa môže zúčastňovať mechanizmov kontrolujúcich reparačné procesy po poškodení DNA (Kishi a kol., 2009).

Cieľom práce bolo štúdium úloh Plk1 počas priebehu prvej mitózy u deliaceho sa myšieho embrya a tiež pri znovuoživení prvej mitózy po jej zastavení.

## MATERIAL A METÓDY

### Izolácia a kultivácia embryí

Myšie samice vo veku 6-8 týždňov boli superovulované s 5IU PMSG, a následne o 46-47 hodín neskôr 5IU hCG a fertilizované *in vivo*. Oplodnené jednobunkové embryá boli získané z ampuly vaječníka 17 hodín post hCG a následne kultivované *in vitro*. Kumulárne bunky boli odstránené s hyaluronidázou (1 mg/ml). Embryá boli kultivované *in vitro* v definovanom KSOM médiu (Millipore Co., USA) bez použitia minerálneho oleja pri 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>. V každom experimente boli embryá rozdelené na kontrolnú skupinu a embryá inhibované. Kontrolná skupina bola kultivovaná v KSOM médiu. Experimentálne embryá boli kultivované v KSOM médiu s prídavkom 500nM BI2536 (Axon Medchem, Netherlands) resp. 1000nM Reverzinu (Selleck Chemicals LLC, USA) a tiež s prídavkom zmesi 500nM BI2536-1000nM Reverzín. Inhibítor BI2536 bol pridaný (1) po izolácii embryí v čase 17 hodín po aplikácii hCG, (2) v intervale 25 hodín po aplikácii hCG, (3) v intervale 27 hodín po aplikácii hCG. Zmes Reverzin-BI2536 bola pridaná do kultivačného média v intervale 25 hodín po aplikácii hCG. Embryá boli kultivované 24 hodín (do intervalu 41 hodín po aplikácii hCG).

### Western blot

Embryá boli spracované pre imunoblot (1) v intervale 17 hodín po aplikácii hCG; (2), v intervale 25 hodín po aplikácii hCG, (3) v intervale 27 hodín po aplikácii hCG a (4) 32 hodín po aplikácii hCG. Embryá boli zbierané do SDS pufru (62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8, at 25°C, 2%, w/v, SDS, 10%, v/v, glycerol, 0.01%, w/v, Bromophenol Blue and 5%, v/v, 2-mercapthoethanol) a zmrazené na -70°C až do použitia. Vzorky boli zahriate na 95°C po dobu 3 minút a proteíny boli rozdelené pomocou SDS-PAGE (5% „stacking gel“ a 12% „separating gel“, pri 180V, 25 mA, 1 hodina) a prenesené na PVDF membránu ((Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA, U.S.A.; pore size 0.45 μm) pomocou semidry blotovacieho systému (25 minút, 10°C). Membrána bola blokovaná po dobu 1 hodiny v 5% (v/v) BSA (Sigma) v T-TBS (Tris/HCl-buffered saline (pH 7.6) s 0.05% Tween 20). Nasledovala inkubácia s protilátkou proti Plk (sc-55504, Santa Cruz Biotechnology Inc., U.S.A.) celú noc pri 4 °C, 1:200, v 5% (v/v) BSA v T-TBS. Po premytí membrány v T-TBS (3x10 min) bola táto inkubovaná so sekundárnou protilátkou (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) riedenej v 5% odtučnenom mlieku (Sigma) v T-TBS, 1:10000. Nakoniec boli membrány premyté v T-TBS (3x10 min) a chemiluminiscenčný signál vyvolaný pomocou Luminata Crescendo (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.).

### Imunofluorescencia

Pre metódu afinitnej imunocytochémie boli embryá kultivované fixované v intervale 32 hodín po aplikácii hCG resp. 41 hodín po aplikácii hCG. Embryá boli fixované v 3.7% paraformaldehyde 50-60 minút pri izbovej teplote. Po premytí v PBS boli embryá permeabilizované v 0.5% Triton X-100 a následne inkubované s inaktivovaným 2% kozím sérom (Sigma) 2 hodiny pri izbovej teplote. Embryá boli inkubované 20 hodín pri 4°C s primárnymi protilátkami anti-phospho Plk1/Thr-210 (Santa Cruz, 135706) riedená 1:100, anti-phospho Aurora-A/Thr-288 (Novus Biological, NB100-2371) riedená 1:200, α-tubulin (Sigma, T7451) riedená 1:1000, γ-tubulin (Biolegend,620901) riedená 1:200 a pericentrin (BD Biosciences,611851) riedená 1:50. Po premytí boli imunoreakcie primárnej protilátky detekované špecifickými protilátkami konjugovanými s fluorescencióm (FITC resp.



TexasRed) 60 min pri izbovej teplote. Pre farbenie DNA bol použité DAPI a embyá boli zaliate do Mowiolu a hodnotené fluorescenčným mikroskopom Nikon Eclipse-90i.

#### Time-lapse recording

Pre experimentálne pozorovanie živých buniek, bol použitý transgénny kmeň myší exprimujúci H2B-GFP fúzny proteín. Kultivované embyrá boli umiestnené v plastových kultivačných komôrkach (Lab-Tek II chambered coverglass, Nunc) a prenesené do kultivačného boxu konfokálneho mikroskopu Leica SP5. Celkový priebeh prvého delenia a fenotypické zmeny chromatinu boli zaznamenávané po dobu 16 hodín v 5 minútových intervaloch. Dáta boli spracované softwarom FIJI.

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

V úvode našej štúdie time-lapse recording živých jednobunkových embyrií umožnil špecifikovať intervaly pre aplikáciu špecifických inhibítorov. V súlade s predošlými poznatkami sme stanovili časový priebeh pronukleárnej fázy, štádium rozpadu obalu oboch prvojadier (NEBD) a nástup anafázy. V myších jednobunkových embyrách sa DNA replikácia začína súčasne v samčom aj samičom prvojadre a to 8-9 hodín po oplodnení, teda 21 hodín po aplikácii hCG. Táto embyronálna S-fáza trvá približne 6 hodín (27 hodín post hCG) a je nasledovaná 4-hodinovou G2 fázou (do 31 hodín post hCG). Následne sa membrány prvojadier rozpadávajú a jednobukové embyrio vstupuje do prvého mitotického cyklu. Kondenzované chromozómy sa konfigurujú do metafázickej roviny a po korektnom formovaní deliaceho vretienka embyrio vstupuje do anafázy. Prvá mitóza je ukončená približne 34 hodín po aplikácii hCG a to rýchlou cytokinézou. Ukázalo sa, že takto všeobecne akceptované časovanie vývoja jednobunkového myšieho embyria sa zhoduje s našimi úvodnými experimentami. Takto aplikácia inhibítorov bola načasovaná ešte pred zahájením S-fázy (17 hodín po aplikácii hCG), alebo už v čase zahájenej S-fázy (25 hodín po aplikácii hCG), resp. na je konci (27 hodín po aplikácii hCG).

Naše výsledky dokumentujú, že aktivita Plk1 kinázy nie je nevyhnutná pre vstup do prvej mitózy jednobunkového myšieho embyria, ale pre vytvorenie deliaceho vretienka a vstup do anafázy. Ukázali sme, že vstup oplodneného oocyту do prvej embyronálnej mitózy nie je blokovaný inhibíciou aktivity Plk1 pomocou inhibítora BI2536. Na druhej strane takto inhibované jednobukové embyrio nebolo schopné dokončiť delenie. Prvá mitóza tu bola zastavená pred vstupom do anafázy. Takto sa naše výsledky zhodujú s údajmi publikovanými na somatických bunkách (Seong a kol., 2002, Meraldi a kol., 2002). Je zrejmé, že BI2536 indukuje aktiváciu SAC v cyklujúcich sa somatických bunkách a aj v deliacich sa jednobunkových embyrách. Pritom sme ukázali, že Plk1 hrá dôležitú úlohu v korektnom uchytení mikrotubulov na kinetochóry počas metafázy jednobunkového embyria, pretože time-lapse recording odhalil dynamické mislokalizácie kondenzovaných chromozómov počas tvorby metafázického vretienka v embyrách s inhibovanou aktivitou Plk1 kinázy. Ani aplikácia Reverzínu (SAC inhibítora) neprekonalala zablokovaný vstup embyria do anafázy. Inhibítora BI2536 účinne a selektívne inhibuje enzýmovú aktivitu Plk1 v nízkych (50nM) koncentráciách (Steggmaier a kol., 2007).

Na rozdiel od somatických buniek, kde inhibícia Plk1 vyvolá vznik monopolárneho deliaceho vretienka (Lenart a kol., 2007), sme v našich experimentoch dokumentovali vznik bipolárneho vretienka po inhibícii Plk1. Western blot ukázal zvýšenú expresiu Plk1 v intervale 25 hodín po aplikácii hCG. Expresia Plk1 je stabilná počas maturácie myších oocytov, ale postupne sa znižuje hneď po fertilizácii (Tong a kol., 2002). Zhao a kol. (2010) detekovali nízku hladinu Plk1 proteínu 16 hodín po aplikácii hCG. Hladina stúpila od 24 hodín po aplikácii hCG. Signifikantne vyššia hladina Plk1 bola popísaná 32 hodín po aplikácii hCG. Takto sa zdá, že hladina Plk1 sa postupne zvyšuje počas S-fázy jednobunkového

embrya a maximálnu hladinu dosiahne v čase zahájenia prvej mitózy. Tieto naše výsledky potvrdzujú výsledky Zhao a kol. (2010), ukazujúce nízku hladinu Plk1 proteínu pred začiatkom S-fázy, ako tiež prezentujú Tong a kol. (2002). Imunocytochemické analýzy ukázali, že  $\gamma$ -tubulín a Aurora-A kináza sa neakumulujú na MTOC centrách a ani póloch deliaceho vretienka po supresii Plk1 aktivity inhibítorom BI2536. Bipolárne deliace vretienko sa formuje aj napriek blokovanej akumulácii  $\gamma$ -tubulínu a Aurora-A kinázy, v jednobunkových embryách po inhibícii Plk1 je však usporiadanie mikrotubúl vretienka silne narušené. Kondenzované chromozómy sa mislokalizujú mimo metafázickej roviny. Na druhej strane predchádzajúce štúdie na somatických bunkách ukazujú že Plk1 je nutná pre tvorbu bipolárneho vretienka. Plk1- deficientné somatické bunky (zastavené v prometafáze) neboli schopné oddeliť centrozómy a neformovali bipolárne vretienka (Van Vugt a kol., 2004). V závere možno konštatovať, že Plk1 aktivita nie je nevyhnutná pre vstup oplodneného oocyty do prvej mitózy, ale hrá kľúčovú úlohu pri zrení MTOCs a formovaní centrozomálnych štruktúr deliaceho vretienka. Výsledky jasne dokumentujú, že aktivita Plk1 kinázy je dôležitá pre pokračovanie mitózy, kedy kontroluje prechod do anafázy.

#### POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantom APVV-0237-10.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Donaldson MM, Tavares AA, Hagan IM, Nigg EA, Glover DM. The mitotic roles of Polo-like kinase. *J Cell Sci* 2001; 114, 2357-2358.
- Kishi K, van Vugt MATM, Okamoto K, Hayashi Y, Yaffe MB. Fuctional dynamic of polo-like kinase 1 at the centrosome. *Mol Cell Biol* 2009; 29:3134-3150.
- Lenart P, Pentroczi M, Steegmaier M, Di Fiore B, Lipp JJ, Hoffmann M, Retting WJ, Kraut N, Peters JM. The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr Biol* 2007; 17:304-315.
- Lens SMA, Voest EE, Medena RH. Shared and separate function of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nature Reviews – Cancer* 2010; 10:825-841.
- Li L, Zheng P, Dean J. Maternal control of early mouse development. *Development* 2010; 137:859-870.
- Meraldi P, Nigg EA. The centrosome cycle. *FEBS Letters* 2002; 521:9-13.
- Seong, Y. S. et al. A spindle checkpoint arrest and a cytokinesis failure by the dominant-negative polo-box domain of Plk1 in U-2 OS Cells. *J Biol Chem* 2002; 277:32282-32293.
- Sikora-Polaczek M, Hupalowka A, Polanski Z, Kubiak JZ, Ciemerych MA. . The first mitosis of the mouse embryo is prolonged by transitional metaphase arrest. *Biol Reprod* 2006; 74:734-743.
- Steegmaier M, Hoffmann M, Baum A, Lenart P, Petronczki M, Krssak M, Gurtler U, Garin-Chesa P, Lieb S, Quant J, Grauert M, Adolf GR, Kraut N, Peters JM, Rettig W. BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr Biol* 2007; 17:316-322.
- Tong C, Fan HY, Li SW, Chen DY, Schatten H, Sun QY. Polo-like kinase-1 is a pivotal regulator of microtubule assembly during mouse oocyte meiotic maturation, fertilization, and early embryonic mitosis. *Biol Reprod* 2002; 67:546-554.
- Van Vugt MATM, van de Weerd BCM, Vader G, Janssen H, Calafat J, Klompmaker, Wolthuis RMF, Medena RH. Polo-like kinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis. *J Biol Chem* 2004; 279:36841-36854.
- Zhao Y, Ai J, Zhang H, Zhu G. Polo-like kinase-1 regulates first cleavage of the one-cell embryos in culture during assisted reproduction. *Saudi Med* 2010; 31:247-252.

## ELEKTROFORETICKÁ ANALÝZA VYBRANÝCH HADÍCH JEDOV

Kravcová Z., Petrilla V., Sopková D.

Katedra anatómie, histológie a fyziológie, Ústav fyziológie, UVLF, Košice

### ABSTRAKT

Plávajúce kobry rodu *Naja* (*N. nigricollis*, *N. aschei*) boli donedávna považované za jednotný druh, no genetickou analýzou sa zistili rozdiely medzi týmito druhmi. V našej práci sme sa zamerali na potvrdenie rozdielov v zložení jedu medzi týmito dvoma druhmi a to pomocou elektroforetickej analýzy bielkovín, kde sme zaznamenali výrazne rozdiely.

### ÚVOD

Čeľaď korálovcovité (*Elapidae*) má niekoľko plávajúcich a neplávajúcich hadích druhov rodu *Naja* a *Hemachatus*, ktorých jedová žľaza sa vyvinula zo sánkovej slinnej žľazy (*glandula maxillaris*), od ktorej je úplne oddelená (Kornalík, 1967). Plávajúce kobry majú prevažne cytotoxický jed (Warrell, 2010), čo 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 enzýmovej 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). Cieľom našej práce bolo sledovanie bielkovinového spektra hadích jedov, konkrétne jedu druhov *Naja nigricollis* a *Naja ashei* pomocou zónovej elektroforézy na agarózových gélových platniach.

### MATERIÁL A METODIKA

V experimente boli použité vzorky jedu afrických kobier: *N. nigricollis* a *N. aschei* (odchytené v Tanzánii). 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 následne uskladnených v hlbokomraziacom boxe pri -70°C. Pred elektroforetickou analýzou bol jed centrifugovaný pri 600 g. Vo vzorkách sme spektrofotometrickým prístrojom Alizé (Lisabio, Francúzsko) stanovili množstvo celkových bielkovín. Jednotlivé frakcie sme stanovovali elektroforetickým multiparametrickým prístrojom Hydrasys (Sebia, Francúzsko). Použili sme komerčnú súpravu Hydragel 7 PROTEINE (Ecomed, Slovenská republika), kde sa bielkoviny delili v pufri s pH 9,2 a farbili amidočernou. Na šablónku sme aplikovali 10 µl vzorky, uložili sme ju na 5 min. do vlhkej komory (0,1% vodný roztok Na<sub>3</sub>N), v migračnej komore prístroja prebehla migrácia (7°C/20 min.) a sušenie (50°C/10 min.), chladenie (20°C/5 min.). Gél bol uložený do držiaka, následne prebehlo farbenie (roztok obsahuje 0,4 g/dl amidočerňne) a odfarbovanie (roztok obsahuje 0,05 g/dl kyseliny citrónovej). Suché gély boli hodnotené vizuálne aj denzitometricky (570 nm), čím boli získané presné relatívne hodnoty jednotlivých zón.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Elektroforéza proteínov je analytická metóda pre charakteristiku zloženia vzorky, molekulovej hmotnosti, izoelektrického bodu bielkovín a je vhodná aj pre prípravu malého množstva vzorky pre nasledujúce analýzy. Postupne sa vyvíjali rôzne modifikácie tejto metódy, aby vyhovovali vybraným účelom (Westermeeier a Naven, 2002).

Porovnávaním hadích jedov na základe elektroforetickej analýzy bielkovín druhu *Microvipera lebetina* z Cypru a Južnej Anatólie sa zaoberali Göçmen a kol. (2006), ktorí zistili signifikantné rozdiely bielkovinového spektra. V našej práci sme sa zamerali na porovnanie jedov afrických kobier *N. nigricollis* a *N. aschei*. Z nameraných výsledkov vyplýva, že existujú výrazné rozdiely v zastúpení jednotlivých frakcií bielkovín. U *N. aschei* boli zamerané 2 frakcie v oblasti výskytu albumínu, z ktorých jedna presahuje možnosti elektroforetického delenia na agarózovom gély a v oblasti globulínov sme zachytili 7 frakcií. Kvantifikácia jednotlivých frakcií je znázornená v tabuľke č. 1. Bielkoviny jedu *N. nigricollis* mali podobné zastúpenie, teda 2 frakcie v oblasti albumínu a 7 frakcií v oblasti globulínov, ale ich kvantita je rozdielna (tab. 2), čo môžeme vidieť na elektroforetogramoch (obr. 1 a obr.2). Naše výsledky potvrdili odlišnú štruktúru jedov, čo poukazuje na druhové rozdiely medzi hadmi *N. aschei* a *N. nigricollis*.

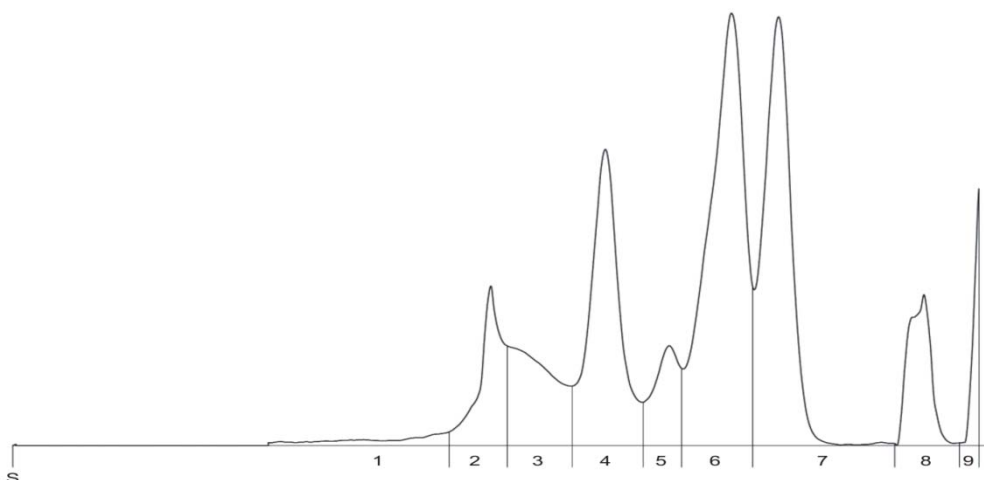
**Tab. 1 Zastúpenie frakcií bielkovín jedu *Naja ashei***

Názov frakcie		Podiel bielkovín	
		%	g/l
Globulínom podobné frakcie	1	1,7	4,6
	2	7	19,1
	3	8,5	23,2
	4	16,4	44,8
	5	4,9	13,4
	6	29,3	80,1
	7	22,3	61
Albumínu podobné frakcie	8	6,7	18,3
	9	3,2	8,7

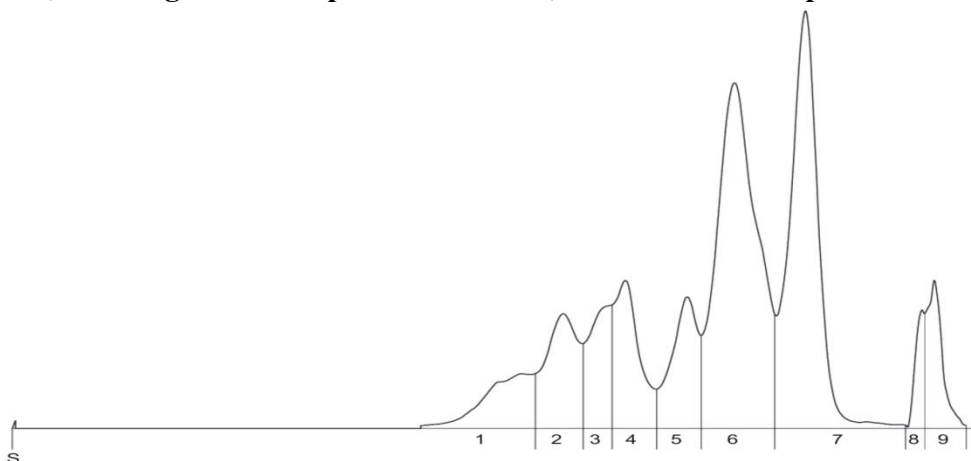
**Tab. 2 Zastúpenie frakcií bielkovín jedu *Naja nigricollis***

Názov frakcie		Podiel bielkovín	
		%	g/l
Globulínom podobné frakcie	1	6,1	15,8
	2	8,2	21,2
	3	6	15,5
	4	7,9	20,4
	5	7,7	19,9
	6	30,9	79,8
	7	25,9	66,9
Albumínu podobné frakcie	8	2,6	6,7
	9	4,7	12,1

**Obr.1 Elektroforetogram bielkovín hadieho jedu *N. ashei* (S = start = aplikačný bod; 1 – 7 = globulínom podobné frakcie; 8 – 9 = albumínu podobné frakcie)**



**Obr. 2 Elektroforetogram bielkovín hadieho jedu *N. nigricollis* (S = start = aplikačný bod; 1 – 7 = globulínom podobné frakcie; 8 – 9 = albumínu podobné frakcie)**



#### POĎAKOVANIE

Práca bola vypracovaná v rámci riešenia projektov VEGA 1/0706/12 a VEGA 1/0579/12. Ďalej ďakujeme kolektívu Viperafarm Ltd. Slovakia a kolektívu Tropicový 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

- Göçmen B, Arıkan H, Marmer A, Langerwerf B, Bahar H. Morphological, Hemipenial and Venom Electrophoresis Comparisons of the Levantine Viper, *Macrovipera lebetina* (Linnaeus, 1758), from Cyprus and Southern Anatolia. *Turk J Zool.* 2006; 30: 225-234.
- Kornalík F. Živočišné 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.
- Westermeeier R, Naven T. Proteomics in practice: A laboratory manual of proteome analysis, Wiley-VCH Verlag GmbH. 2002.

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.

## DYNAMIKA VYBRANÝCH MARKEROV ENERGETICKÉHO METABOLIZMU DOJNÍC

Krempaský M., Maskaľová I., Bujňák L., Vajda V.

*Katedra výživy, dietiky a chovu zvierat, UVLF, Košice*

### ABSTRAKT

Sérové hodnoty neesterifikovaných mastných kyselín (NEMK) odrážajú mieru lipomobilizácie a spolu s hodnotami kyseliny  $\beta$ -hydroxymaslovej (BHM) a kyseliny acetoctovej (AOAC) vyjadrujú stupeň metabolickej transformácie tukov a stupeň negatívnej energetickej bilancie a metabolickej záťaže v peripartálnej a prvej fáze laktácie dojníc. Stupeň adaptácie energetického metabolizmu spolu s rýchlosťou ketogenézy, resp. syntézy lipidov v hepatocytoch, vytvárajú tlak na funkčnú záťaž pečene, sprevádzanú aktiváciou pečevných enzýmov, ktoré odrážajú stav a mieru záťaže pečene a narušenia metabolizmu dojníc. V predloženej práci je v chovateľských podmienkach hodnotená úroveň výživy vo vzťahu ku bachorovej fermentácii a jej vplyv na adaptáciu energetického metabolizmu sacharidov a tukov, miera lipomobilizácie a metabolickej transformácie NEMK v smere hodnotenia funkčného stavu pečene v dvoch skupinách dojníc vo fáze pred pôrodom a po pôrode v závislosti od úrovne a technologickej disciplíny fázovej výživy dojníc. Do I. skupiny zvierat bolo začlenených 6 chovov s charakterom krmnej dávky a úrovňou bachorovej fermentácie objemového typu s priemerným obsahom kyseliny propiónovej pod  $20 \text{ mmol.l}^{-1}$ . V II. skupine boli začlenené zvieratá kŕmené koncentrovanejším typom TMR a intenzívnou úrovňou fermentácie s hodnotami kyseliny propiónovej nad  $20 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Vyšetrením bachorového obsahu a podielu kyseliny propiónovej sme diagnostikovali mieru lipomobilizácie v I. hodnotenej skupine chovov s hladinou kyseliny propiónovej v bachorovej tekutine v priemernej hodnote  $16,44 \pm 2,54 \text{ mmol.l}^{-1}$  na úrovni NEMK  $0,52 \pm 0,18 \text{ mmol.l}^{-1}$  a v II. hodnotenej skupine chovov s hladinou kyseliny propiónovej v bachorovej tekutine v priemernej hodnote  $21,32 \pm 2,13 \text{ mmol.l}^{-1}$  na úrovni NEMK  $0,24 \pm 0,04 \text{ mmol.l}^{-1}$ , čo potvrdzuje výrazne nižšiu mieru lipomobilizácie v II. skupine hodnotených chovov.

### ÚVOD

Charakteristickou črtou prechodného obdobia dojníc sú dramatické zmeny v požiadavkách na živiny, ktoré sú riadené koordináciou metabolizmu pre pokrytie potrieb mliečnej žľazy na energiu, glukózu, aminokyseliny (AMK) a vápnik (Ca) v nastupujúcej laktácii. Rozdiel medzi potrebou živín na 250 deň gravidity a 4 deň laktácie indikuje približne dvojnásobne vyššie potreby AMK (Bell a kol., 1995), štvornásobne vyššie potreby Ca (Horst a kol., 1997), päťnásobne vyššie potreby NEMK a najmä trojnásobne vyššie potreby glukózy (Bell a kol., 1995), ktorá okrem toho že, zabezpečuje syntézu laktózy a určuje pôdoj mlieka je určujúcim činiteľom miery lipomobilizácie a prísunu NEMK do pečene, kde po prekročení metabolickej kapacity oxidácie NEMK hepatocytmi dochádza ku tvorbe ketonových látok a reverzibilným alebo ireverzibilným zmenám v parenchýme pečene v dôsledku ukladania tuku. Glukóza je u prežúvavcov v hlavnej miere syntetizovaná z kyseliny propiónovej, ktorá sa po absorpcii cez bachorovú stenu dostáva portálnou žilou do pečene. Počas tranzitného obdobia je prínos kyseliny propiónovej na glukoneogenéze odhadovaný na úrovni 50 – 60%. Glukóza je tiež syntetizovaná z kyseliny mliečnej (10 – 15%) a z glycerolu (2 – 4%). Dôležitú úlohu v tejto fáze negatívnej energetickej bilancie, nízkej žravosti a nedostatku prekursorov pre syntézu glukózy zohrávajú AMK, ktoré vstupujú do metabolizmu z proteolýzy svalov, ale najmä optimálnym prívodom AMK v TMR a môžu stabilizovať energetický metabolizmus až na úrovni 20 – 30% (Reynolds a kol., 2003). Overton a kol. (1998) uvádza dvojnásobne vyššiu kapacitu pečene pre konverziu alanínu na glukózu v prvý deň po pôrode oproti 21. dňu pred pôrodom. Hoci glukogénne AMK v tranzitnom období zrejme nie sú rozhodujúce a určujúce

z pohľadu množstva syntetizovaného mlieka, zohrávajú dôležitú úlohu pri stabilizácii energetického metabolizmu, vytváraním a zvyšovaním „poolu“ substrátov schopných konverzie na glukózu v postpartálnom období dojníc (Overton a Waldron, 2004).

Prechodné obdobie dojníc a jeho zvládnutie je limitujúcou fázou výživy dojníc z pohľadu produkcie mlieka a výskytu metabolických porúch. Zvýšenie obsahu energie v TMR počas peripartálnej fázy dojníc je asociovaná z poklesom nadmernej lipomobilizácie a tvorby ketónových látok, kedy ústredným nástrojom prevencie je podpora glukoneogenézy a fyziologická hladina glukózy v krvi. Hlavným substrátom pre tvorbu glukózy v pečenie je kyselina propionová, ktorá vzniká najmä počas fermentácie rýchlo fermentovateľných sacharidov v bachore. Obsah živín a najmä koncentrácia ľahko fermentovateľných a vláknitých sacharidov je dôležitým kritériom optimalizácie a posudzovania kvality kŕmnych dávok v príprave na pôrod s cieľom maximalizácie tvorby kyseliny propiónovej v bachore a stabilizácie metabolizmu glukózy.

## MATERIÁL A METODIKA

V 12 chovov dojníc s ročnou produkciou 8 000 l mlieka sme hodnotili úroveň bachorovej a metabolickej adaptácie v peripartálnom období a vplyv skrmovaných TMR, kde hodnotiacim parametrom bola skladba kŕmnej dávky – objemový a koncentrovaný typ a jej vplyv na úroveň bachorovej fermentácie analyticky hodnotená molárnym a percentuálnym zastúpením UMK a ich vplyv na úroveň hladiny NEMK a ketónových látok s následným hodnotením funkčného stavu pečene. U všetkých hodnotených stád dojníc boli sumarizované a hodnotené TMR a bachorový profil ako priama odpoveď na prijaté krmivo a vzťah na energetický metabolizmus, úroveň lipomobilizácie a metabolickú záťaž pečene u zvierat.

Biologickou kontrolou úrovne výživy dojníc na farmách prevažne v nížinnej produkčnej oblasti, kde objemová zložka kŕmnej dávky bola tvorená kukuričnou a lucernovou silážou, sme vyhodnotili 12 chovov dojníc, spolu 69 dojníc. V I. skupine zvierat bolo začlenených 6 chovov s charakterom kŕmnej dávky a úrovňou bachorovej fermentácie objemového typu s priemerným obsahom kyseliny propiónovej pod 20 mmol.l<sup>-1</sup>. V II. skupine boli začlenené zvieratá kŕmené koncentrovanejším typom TMR a intenzívnou úrovňou fermentácie s hodnotami kyseliny propiónovej nad 20 mmol.l<sup>-1</sup>.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

*Hodnotenie TMR v príprave na pôrod:* V hodnotených chovov v I. skupine bol analyzovaný obsah NDV na úrovni v priemere 394,1 g/kg suš., keď doporučenú hornú hranicu obsahu NDV v TMR prípravy na pôrod 380 g/kg suš. prekročilo päť zo šiestich chovov. V týchto sledovaných chovoch bola koncentrácia NVS v priemere 372 g/kg suš. a polovica sledovaných chovov prekračuje doporučenú hornú hranicu 350 g/kg suš. V hodnotených chovov v II. skupine bol obsah NDV v priemere 382 g/kg suš, kde doporučenú hornú hranicu obsahu NDV v TMR prípravy na pôrod 380 g /kg suš, prekročila jedná tretina chovov.

Tabuľka č. 1. Analyzovaný obsah živín v TMR v príprave na pôrod.

Ukazovateľ	doporučené hodnoty	I. skupina	II. skupina
Sušina	g/kg (450 – 500)	<b>465,3</b> (394 - 544)	<b>425,4</b> (352 - 498)
Nl	g/kg S (130 – 150)	<b>136,0</b> (102 - 157)	<b>124,7</b> (107 - 145)
Tuk	g/kg S	<b>38,1</b> (31 - 47)	<b>35,8</b> (26 - 55)
NDV	g/kg S (320 – 380)	<b>394,1</b> (366 - 406)	<b>382,8</b> (333 - 435)
ADV	g/kg S (230 – 250)	<b>237,3</b> (179 - 258)	<b>222,5</b> (188 - 263)
NVS	g/kg S (300 – 350)	<b>372,9</b> (314 - 434)	<b>390,9</b> (346 - 467)
Škrob	g/kg S	<b>245,6</b> (182 - 299)	<b>269,6</b> (222 - 337)
NEL	MJ/kg S (6,2 – 6,5)	<b>6,4</b> (6,15 - 6,71)	<b>6,5</b> (6,27 - 6,68)



Koncentrácia NVS v priemere 391g/kg suš. aj individuálne prekračuje hornú hranicu NVS v TMR prípravy na pôrod 350 g/kg suš. v 66% sledovaných chovoch.

Medzi podstatne rozdiely v hodnotených skupinách z porovnania TMR vystupuje to, že I. skupina sledovaných chovov s vyšším zastúpením NDV má tendenciou ku objemovému charakteru a naopak v II. skupine sú TMR koncentrovanejšieho charakteru.

*Analyzovaná úroveň bachorového profilu* ako reakcia bachorového prostredia na prijaté živiny v TMR prípravy na pôrod je sumarizovaná podľa sledovaných skupín v tabuľke č. 2. V prvej skupine dojníc acidita bachorového obsahu tak v priemere  $6,80 \pm 0,15$ , ako aj individuálne u 65% dojníc má hodnoty pH nad hornú referenčnú hodnotu pre prípravu na pôrod. V II. skupine priemerná hodnota pH bachora ako aj individuálne hodnoty u 71% dojníc dosahovali optimálne referenčné hodnoty pre prípravu na pôrod. Zastúpenie celkového obsahu UMK, ktoré odrážajú úroveň bachorovej fermentácie a bachorovú transformáciu sacharidov, bola priemerná hodnota v I. skupine na dolnej hranici  $86,4 \pm 12,83 \text{ mmol.l}^{-1}$ , z individuálne zníženými hodnotami u 44% vyšetrených zvierat pod dolnú referenčnú hranicu  $80 \text{ mmol.l}^{-1}$ . V II. skupine je priemerná hodnota UMK na strednej úrovni  $104,45$  a individuálne 88% zvierat vykazuje hodnoty UMK v rámci referenčného rozpätia. Analyzovaný obsah kyseliny propiónovej v I. skupine dosahuje v priemere hodnotu  $16,44 \text{ mmol.l}^{-1}$  (s kolísaním priemerných hodnôt chovov od  $7,83$  až  $19,87 \text{ mmol.l}^{-1}$ ). Z celkového počtu analyzovaných zvierat v I. skupine vykazuje hodnotu kyseliny propiónovej v bachorovom obsahu pod  $20 \text{ mmol.l}^{-1}$  61,8% dojníc. V tejto sledovanej skupine až u 32% zvierat nepresahuje produkcia kyseliny propiónovej v bachorovej tekutine hodnotu  $15,0 \text{ mmol.l}^{-1}$ , respektíve až 20% ma hodnotu pod  $10,0 \text{ mmol.l}^{-1}$ . V druhej sledovanej skupine je priemerná hodnota kyseliny propiónovej  $21,32 \pm 2,33 \text{ mmol.l}^{-1}$ , zo zníženou hodnotou pod  $20 \text{ mmol.l}^{-1}$  u 25,6%. Podstatné rozdiely bachorovej fermentácie medzi sledovanými skupinami sú v celkovej sume UMK a v pomernom zastúpení  $C_3:C_2$  v rozpätí 1:3,75 v I. skupine a 1:3,29 v II. skupine.

Tabuľka č. 2. Analyzované hodnoty bachorového metabolizmu v sledovaných skupinách

Bachorový obsah	Referenčné hodnoty	I. Skupina	II. Skupina
pH	6,4 - 6,6	$6,80 \pm 0,15$	$6,52 \pm 0,14$
NH <sub>3</sub> mg/100ml	15 - 25	$17,49 \pm 3,05$	$16,46 \pm 3,64$
Suma UMK mmol/l	80 - 130	$86,37 \pm 12,83$	$104,45 \pm 10,20$
Kys. propiónová mmol/l; P<0,0001	nad 20	$16,44 \pm 2,54$	$21,32 \pm 2,13$
Kys. octová mmol/l		$59,37 \pm 9,60$	$69,76 \pm 7,64$
Kys. octová %	60 - 65	$68,71 \pm 1,82$	$66,54 \pm 1,79$
Kys. propiónová %	20 - 25	$18,84 \pm 1,30$	$20,55 \pm 1,52$
Kys. maslová %	10 - 20	$12,45 \pm 1,44$	$12,90 \pm 0,98$
$C_3:C_2$	1 : 2,5 - 3,0	$3,75 \pm 0,34$	$3,29 \pm 0,34$

*Hodnotenie energetického metabolizmu vnútorného prostredia* kvantifikuje mieru lipomobilizácie, ktorej priamym markerom je analytické stanovenie NEMK. V I. skupine zvierat s signifikantne nižším podielom kyseliny propiónovej v bachorovom obsahu bola analyzovaná priemerná hodnota NEMK  $0,52 \pm 0,18 \text{ mmol.l}^{-1}$ , individuálne zvýšené hodnoty NEMK u 70% zvierat s metabolickou záťažou pečene – zvýšené hodnoty AST 52,9% a bilirubínu 61,7% dojníc, kým v II. skupine dojníc s obsahom kyseliny propiónovej nad 20 mmol bola vyšetrená priemerná hodnota NEMK na úrovni  $0,24 \pm 0,04 \text{ mmol.l}^{-1}$  s zvýšenými hodnotami AST u 31,4% a bilirubínu u 34,3% dojníc. U dojníc v prvej sledovanej skupine, ktoré mali hodnotu kyseliny propiónovej pod 20 mmol/l v bachorovom obsahu (61,8% z vyšetrených zvierat v prvej hodnotenej skupine) bola potvrdená vysoká miera lipomobilizácie, 86% dojníc malo zvýšené hodnoty NEMK nad  $0,35 \text{ mmol.l}^{-1}$  a taktiež záťaž

pečene - 66% zvierat malo zvýšené hodnoty AST (nad 1,38 ukat.l<sup>-1</sup>) a 48 % dojníc malo hodnoty bilirubínu nad referenčné maximum (5,13umol.l<sup>-1</sup>).

Tabuľka č. 3. Analyzované sérové hladiny energetického metabolizmu dojníc v príprave na pôrod vo vyšetrených stádach s nižším a vyšším obsahom kyseliny propiónovej v bachorovej tekutine.

Krvné sérum	Referenčné hodnoty	I. skupina		II. skupina	
		x	Std.	x	Std.
Glukóza mmol/l	2,2 - 4,1	3,00	0,38	3,32	0,32
Cholesterol mmol/l	2,3 - 4,2	2,24	0,39	2,39	0,37
NEFA mmol/l; P<0,0001	do 0,35	0,52	0,18	0,24	0,04
AOAC mmol/l	do 0,5	0,30	0,08	0,28	0,09
BHM mmol/l	0,2 - 1,24	0,75	0,14	0,53	0,14
AST ukat/l; P<0,0001	0,76 - 1,38	0,80	0,12	1,35	0,24
Bilirubín umol/l; P<0,01	0,17 - 5,13	5,33	2,18	3,33	1,37

Rýchla fermentácia a produkcia kyseliny propiónovej podporuje hepatálnu glukoneogézu a taktiež syntézu mikrobiálnej bielkoviny pre poskytnutí dostatočného a synchronizovaného prívodu bachorovo degradovateľných bielkovín. Zvýšenie obsahu NVS v TMR v peripartálnom období ma za cieľ pokryť zvýšené nároky živín, hlavne glukózy na rast plodu v poslednej tretine gravidity a na začiatku laktácie v post partálnom období dojníc. Táto adaptácia metabolizmu glukózy je pod významným homeoretickým vplyvom, čo maximalizuje glukoneogézu v pečeni a minimalizuje využívanie glukózy periférnymi tkanivami (Reynold a kol, 2003), kedy je glukóza cielene nasmerovaná do mliečnej žľazy na podporu syntézy laktózy, ktorá v konečnom dôsledku rozhoduje o objeme pôdoja. Hlavným substrátom pre glukoneogézu v pečenie je kyselina propionová, vznikajúca najmä fermentáciou rýchlo fermentovateľných sacharidov v bachore s čím súvisí podpora syntézy inzulínu, ktorý ma významný antilipolytický efekt, čo môže viesť ku zníženiu lipomobilizácie a metabolickej záťaže pečene (Curtis a kol., 1985). Hladina glukózy v krvi a s tým súvisiaca hladina inzulínu a glukagónu sa javí ako ústredný bod zvládnutia metabolickej adaptácie a prevencie metabolických porúch. V porovnaní sledovaných skupín, v I. hodnotenej skupine chovov s objemovým typom TMR a s hladinou kyseliny propiónovej v bachorovej tekutine v priemernej hodnote 16,44 ± 2,54 mmol. l<sup>-1</sup> bolo potvrdená výrazne vyššia miera lipomobilizácie a metabolickej záťaže pečene, ako v II. hodnotenej skupine dojníc s produkciou kyseliny propiónovej v bachore nad doporučenú hladinu 20 mmol.l<sup>-1</sup>.

#### POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0970/11.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bell, A. W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.*73:2804–2819.
- Curtis, C. R., H. N. Erb, C. H. Sniffen, R. D. Smith, and D. S. Kronfeld.1985. Path analysis of dry period nutrition, postpartum metabolic and reproductive disorders, and mastitis in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 68:2347–2360.
- Horst, R. L., J. P. Goff, T. A. Reinhardt, and D. R. Buxton. 1997.Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*80:1269–1280.
- Overton, T. R., J. K. Drackley, G. N. Douglas, L. S. Emmert, and J.H. Clark. 1998. Hepatic gluconeogenesis and whole-body protein metabolism of periparturient dairy cows as affected by source of energy and intake of the prepartum diet. *J. Dairy Sci.* 81(Suppl.1):295. (Abstr.)
- Overton, T. R., Waldron M.R. 2004. Nutritional Management of Transition Dairy Cows: Strategies to Optimize Metabolic Health. *J. Dairy Sci.* 87:(E. Suppl.):E105–E119
- Reynolds, C. K., P. C. Aikman, B. Lupoli, D. J. Humphries, and D. E.Beever. 2003. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *J. Dairy Sci.*86:1201–1217.

## **RAMUS OVARICUS – VETVA VAJEČNÍKOVEJ ŽILY U POTKANA**

Krešáková L., Petrovová E., Maloveská M.

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

### **ABSTRAKT**

Vaječnicková žila (*v. ovarica*) je v posledných rokoch predmetom mnohých výskumov súvisiacich s dilatáciou žíl v panvovej dutine, varikóznymi žilami a chronickými bolesťami v panve. Pri štúdiu varikózných ovariálnych žíl predstavuje potkan vhodný experimentálny model. V našej práci sme sa zamerali na pozorovanie variácií vaječnickovej žily a jej vetiev na korozívnych preparátoch potkana. Zároveň sme overovali prítomnosť *r. ovaricus* ako tretej samostatnej vetvy *v. ovarica*. Korozívne preparáty sme pripravili s použitím nástrekovej hmoty Spofacryl®, ktorú sme injikovali do kaudálnej dutej žily po perfúzii cievneho systému fyziologickým roztokom a benzínalkoholom. Prítomnosť *r. ovaricus* ako jednej samostatnej vetvy sme zistili v 9,1%. Dve vetvy vystupovali z vaječníka v 68,2% a tri v 22,7%. Medzi jednotlivými vetvami *v. ovarica* sme pozorovali anastomózy.

### **ÚVOD**

*Vv. ovariace* sú párové žily, ktoré odvádzajú krv z vaječnickovej splete, zo žilovej splete vajcovodu a maternice (Karaosmanoglu a kol., 2009). Vznikajú sútokom vetiev – *ramus tubarius* a *ramus uterinus* (Popesko a kol., 1990). Krinke (2000) a Nikitin a kol. (2012) udávajú u potkana prítomnosť tretej vetvy – *ramus ovaricus*. Pravá vaječnicková žila (*v. ovarica dextra*) vedie krv do *v. cava caudalis*, kaudálne od *v. renalis dextra*. Ľavá vaječnicková žila (*v. ovarica sinistra*) sa vlieva do *v. renalis sinistra* (Popesko a kol., 1990; Navrátilová a kol., 1992; Nikitin a kol., 2012). Spojenie *v. renalis sinistra* a *v. ovarica sinistra* môže spôsobiť u človeka problémy pri chlopňovej dysfunkcii alebo jej vrodenej absencii (15% z vyšetrenej populácie; Gültaplıy a kol., 2006), čo je jednou z príčin vzniku varikózných žíl v panvovej oblasti. Varikózne žily v panve sa vyskytujú u 10% ženskej populácie a u viac ako polovice žien s chronickými bolesťami panvy (Giacchetto a kol., 1990; Park a kol., 2004). Varikozita *v. ovarica* je v posledných rokoch predmetom mnohých výskumov (Florio a kol., 1993; Giacchetto a kol., 1990; Ascuitto, 2010; Bachar a kol., 2003). Hoci sú invazívne metódy vyšetovania (transuterinná venografia, retrográdna flebografia) nahradené v súčasnosti transabdominálnou ultrasonografiou, CT alebo MRI (Gültaplıy a kol., 2006), intenzita používania laboratórných zvierat pre vedecké účely je vysoká. Podľa Gokdeniza a kol. (1999) potkan predstavuje adekvátny zvierací model pri štúdiu varikózných ovariálnych žíl a je jedným z najpoužívanejších experimentálnych druhov laboratórných zvierat v humánnej i veterinárnej medicíne (Vdoviaková a kol., 2011; Maženský a kol., 2011). Cieľom tejto práce bolo pozorovať vaječnickovú žilu, jej vetvy a variabilitu na korozívnych preparátoch potkana. Zisťovali sme prítomnosť *ramus ovaricus* ako tretej, samostatnej vetvy *v. ovarica*.

### **MATERIÁL METODIKA**

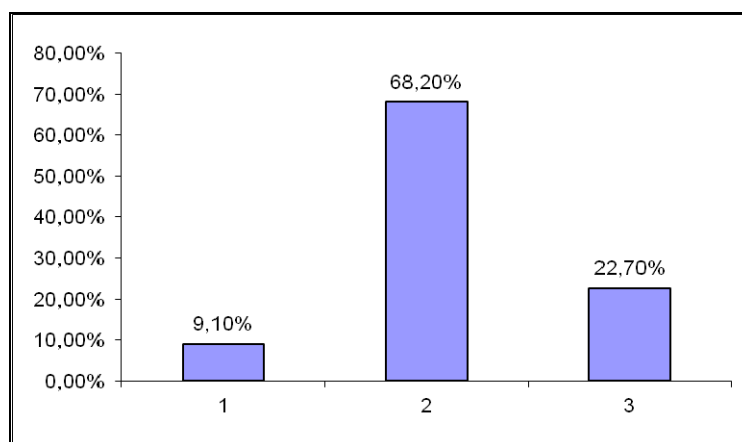
V práci sme použili 15 samíc potkanov plemena Wistar, multipary, s priemernou hmotnosťou 350 g – 450 g vo veku 1 rok, u ktorých sme pozorovali 22 vaječnickových žíl. Po eutanázii a kanylácii ľavej komory srdca sme vykonali perfúziu cievneho systému fyziologickým roztokom (Vdoviaková, 2008). Následne sme prepláchlí cievny systém benzínalkoholom a po 3 hodinách pristúpili k nástreku venózneho systému. Ako nástrekové médium sme zvolili komerčne vyrábanú, samopolymerizujúcu, dentálnu živicu Spofacryl® (Spofa – Dental, ČR). Hmotu sme injikovali po ligatúre kanyly zavedenej do *v. cava caudalis*.

Macerácia mäkkých tkanív prebehla v 2 - 4 % roztoku KOH počas 3 dní pri teplote 60 - 70°C (Maženský a kol., 2010). Pri pomenovaní jednotlivých žíl sme použili posledné vydanie NAV (Danko a kol., 2011). Korozívne preparáty vaječníkových žíl a ich vetvy sme pozorovali operačným mikroskopom Leica M 320, pod zväčšením 10, 16 a 25.

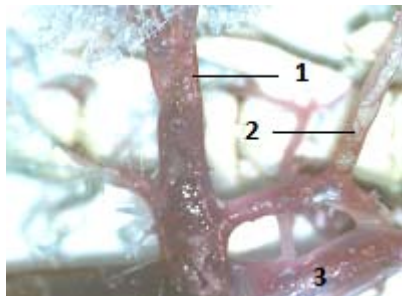
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

*V. ovarica dextra* u potkana vstupovala do *v. renalis dextra* vo všetkých pozorovaných prípadoch, čo zodpovedá pozorovaniam Popeska a kol. (1990) a Navrátilovej a kol. (1992). *V. ovarica sinistra* vstupovala do *v. renalis sinistra*, pričom v jednom prípade (4,5%) sa pred vyústením rozdeľovala na 2 vetvy, z ktorých jedna sa vlievala do *v. renalis sinistra* a druhá do *v. cava caudalis* (Obr. 1). Podľa Popeska a kol. (1990) vzniká *v. ovarica* sútokom dvoch vetiev – vajcovodovej (*ramus tubarius*) a maternicovej (*ramus uterinus*). *Ramus uterinus* odvádza venóznú krv z kraniálnej časti rohov maternice a kaudálne anastomózuje s *ramus uterinus* od *v. vaginalis* (Popesko a kol., 1990). *Ramus tubarius* privádza venóznú krv z vajcovodu a vaječníka. Existenciu tretej vetvy vaječníkovej žily - *ramus ovaricus* u potkana udáva Krinke (2000) a Nikitin a kol., (2012). Prítomnosť *r. ovaricus* ako samostatnej vetvy *v. ovarica* sme zaznamenali v 9,1 % (Obr.2). Dve vetvy vystupovali z vaječníka v 68,2%. Vlievali sa variabilne do *v. ovarica*, do *r. tubarius* alebo *r. uterinus*. Dve žily vstupovali do *r. tubarius* v 27%, jedna do *r. tubarius* a druhá do *r. uterinus* v 23% (Obr.3). V 18,2% jedna vetva z vaječníka vstupovala do *r. tubarius* a druhá do *v. ovarica* (Obr. 4). Tri vetvy vystupovali z vaječníka v 22,7 %, pričom v 18,2% odvádzali krv do *r. tubarius* a v 4,5% vstupovala jedna vetva do *r. tubarius* a dve do *r. uterinus*. Anastomózy boli pozorované medzi *r. ovaricus* a *r. tubarius* v 18,2% prípadov a medzi *r. ovaricus* a *r. uterinus* v 4,5%. Na základe uvedených výsledkov môžeme konštatovať vysokú variabilitu *ramus ovaricus* ako vetvy *v. ovarica*.

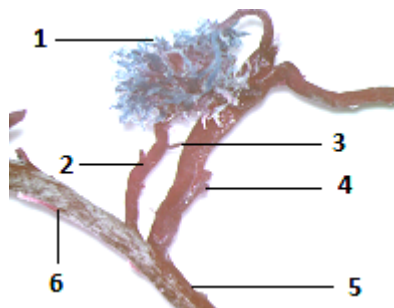
Graf.1 Percentuálne zastúpenie vetiev vystupujúcich z vaječníka v počte 1 - 3.



Obr.1 *V. ovarica sinistra* vstupujúca do *v. renalis sinistra* a *v. cava caudalis*, dorzálny pohľad.  
1- *v. renalis sinistra*, 2 – *v. ovarica sinistra*, 3 – *v. cava caudalis*



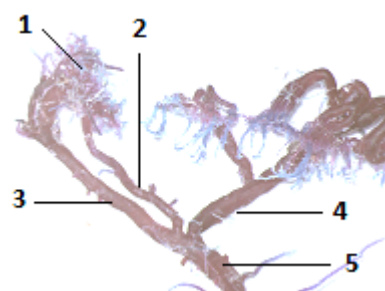
Obr. 2 Ventrálny pohľad na žily pravého vaječníka a anastomózu medzi *r. ovaricus* a *r. tubarius*  
1- vaječníková spleť, 2 – *r. ovaricus*  
3 – anastomóza, 4 – *r. tubarius*,  
5 – *v. ovarica*, 6 – *ramus uterinus*



Obr. 3 Ventrálny pohľad na žily pravého vaječníka, jedna vetva vstupuje do *r. tubarius*, druhá do *r. uterinus*. 1, 2 – *r. ovaricus*, 3 – anastomóza medzi *r. ovaricus* a *r. tubarius*, 4 – *r. tubarius*, 5 – *r. uterinus*, 6 – *v. ovarica*



Obr. 4 Ventrálny pohľad na žily ľavého vaječníka a samostatnú vetvu - *r. ovaricus*. 1 – vaječníková spleť 2 – *r. ovaricus*, 3 – *r. tubarius* 4 – *r. uterinus*, 5 - *v. ovarica*



## POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom ŠF EU, Code ITMS 26220220032.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Asciutto G, Mumme A, Asciutto KC., Geier B Oestradiol levels in varicose vein blood of patients with and without pelvic vein incompetence (PIV): Diagnosis implications. *Eur J Vasc Endovasc Surg* . 2010; 40: 117-121.
- Bachar GN, Belenky A, Greif F, Atar E, Gat Y, Itkin M, Verstanding A Initial experience with Ovarian vein embolization for the treatment of chronic pelvic pain syndrome. *IMAJ*. 2003; 5: 843-846.
- Danko J, Šimon F, Artimová J *Nomina Anatomica Veterinaria*. UVLF Košice, 2011; 138-158.
- Florio F, Balzano S, Nardella M, Villani G Varicocele ovarico trattato con scleroembolizzazione percutanea. *Descrizione di un caso. Radiol Med* . 1993; 85: 295-7.
- Giacchetto C, Controneo GB, Marincolo F Ovarian varicocele. *Ultrasound and phlebographic evaluation. J Clin Ultrasound*. 1990; 18: 551-5.
- Gokdezin R, Ozbek E, Mizrak B, Ozen S Female varicocele. *Turgut Ozal Tip Dergisi*. 1990; 6: 183-186.
- Gültaplı K, Kurt A, Ypek A, Gümüş M, Yazıcıoğlu KR, Dilmen G, Tap ı The relation between pelvic varicose veins, chronic pelvic pain and lower extremity venous insufficiency in women. *Diagn*

- Interv Radiol. 2006; 12 (1): 34-38.
- Karaosmanoglu D, Karccaltincaba M, Akata D, Ozmen M MDCT of the ovarian vein: normal anatomy and pathology. AJR. 2009; 192: 295-299.
- Krinke G The laboratory rat. Academic Press. 2000; 253-257.
- Maženský D, Petrovová E, Luptáková L Variácie vybraných tepien podieľajúcich sa na krvnom zásobovaní tvárovej oblasti hlavy u kráľika. Martinský morfológický zborník. 2010; 57-59.
- Maženský D, Petrovová E, Luptáková L Variations of the origin of arteries supplying the brain in the rabbit and rat ischemia experiments. Folia Vet. 2011; 55, 4: 133-136.
- Navrátilová E, Malinovský L, D' Andrea 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.
- Nikitin HA, Nikitina AV, Baitinger AV Anatomical features of venous outflow from rat's reproductive organs. Bulletin medicine. 2012; 2: 84-92.
- Park SJ, Lim JV, Ko YT Diagnosis of pelvic congestion syndrome using transabdominal and transvaginal sonography. Am J Roentgenol. 2004; 182: 683-688.
- Popesko P, Rajtová V, Horák J Atlas anatomie malých laboratórných zvierat. Potkan, myš, škrečok. Príroda. Bratislava. 1990; 46-103.
- Vdoviaková K, Variácie odstopu *a . renalis dextra* u potkana obyčajného. Zborník referátov Biomechanické vlastnosti tkanív. UVL Košice, TU Košice. 2008; 150-151.
- Vdoviaková K, Maženský D, Petrovová E, Frankovičová M The cranial and caudal mesenteric arteries in the rat. Folia Vet. 2011; 55: 38-41.

# PROANGIOGÉNNY ÚČINOK ERYTROPOETÍNU A STIMULÁCIA JEHO TVORBY PÔSOENÍM 17 $\beta$ -ESTRADIOLU V OVARIÁLNYCH NÁDOROVÝCH BUNKÁCH

Ján Kriška, Peter Solár, Peter Fedoročko

*Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied*

## ABSTRAKT

V tejto práci sme si stanovili za cieľ určiť prítomnosť a funkčnosť erythropoetínového receptora (EpoR) u ovariálnych nádorových bunkových línií A2780 a OVCAR-3 a vplyv kondicionovaných médií z týchto buniek po ich inkubácii s erythropoetínom (Epo) na ľudské endotelové bunky ciev pupočníka (HUVEC) *in vitro*. Taktiež sme sledovali vplyv 17  $\beta$ -estradiolu (E2) na produkciu Epo a cievneho endotelového rastového faktora (VEGF) vo vybraných ovariálnych nádorových bunkových líniách. Metódou Western blotting sme po inkubovaní nádorových buniek s rôznymi koncentraciami Epo v hypoxických a normoxických podmienkach pozorovali u oboch bunkových línií prítomnosť EpoR a proteínov charakteristických pre Epo-signalizáciu. V skupinách buniek inkubovaných s vysokými koncentraciami Epo sme zaznamenali zvýšenie hladiny proteínu VEGF. Celularita HUVEC kultivovaných v kondicionovaných médiách z nádorových buniek bola priamo úmerná koncentrácii Epo, s ktorou boli tieto nádorové bunky pôvodne inkubované. Hladina Epo v nádorových bunkách inkubovaných s rôznymi koncentraciami E2, ktorá bola taktiež stanovovaná metódou Western blotting, sa významne nezmenila, no pozorovali sme významný nárast hladiny VEGF u oboch bunkových línií v skupinách vystavených vysokej hladine E2. Na základe týchto výsledkov sme v bunkách vybraných ovariálnych nádorových línií dokázali prítomnosť funkčného EpoR. Taktiež možno konštatovať, že pôsobenie Epo a E2 na vybrané nádorové bunkové línie má proangiogénny účinok.

## ÚVOD

Primárnou funkciou erythropoetínu (Epo) je regulácia maturácie, diferenciácie a prežívania erytroidných progenitorových buniek (Jelkmann a kol., 2008). Za fyziologických podmienok je tvorba Epo v organizme riadená mierou hypoxie v jednotlivých tkanivách. Čím je hypoxia intenzívnejšia a dlhšia, tým vyššia je produkcia Epo v obličkách, ktoré sú hlavným centrom tvorby Epo v ľudskom organizme. Na molekulárnej úrovni dochádza v bunke pri hypoxii k stabilizácii HIF-1 $\alpha$  podjednotky molekuly hypoxiou indukovaného faktora (HIF), ktorý je transkripčným faktorom mnohých génov, medzi nimi aj Epo (Schofield a Ratcliffe, 2004). V poslednom období vzrástol počet štúdií (Jelkmann a kol., 2008; Solár a kol., 2008; Ribatti a kol., 2003), ktoré preukázali prítomnosť erythropoetínového receptora (EpoR) aj v bunkách tkanív mimo hematopoetického systému, vrátane nádorov. Ak by sa podobný účinok ako má Epo na erytroidné prekursorov potvrdil na nádorových bunkách, malo by to zásadný význam pre onkologických pacientov, ktorí podstúpili chemoterapiu či rádioterapiu, a na zmiernenie anémie, ktorá je vedľajším efektom týchto terapií, im bol podávaný Epo.

Tkanivo solídnych nádorov sa s hypoxiou vyrovnáva navodením angiogenézy. Prítomnosť Epo a EpoR mRNA aj samotných proteínov je výraznejšia v hypoxických oblastiach nádorov (Acs a kol., 2003), kde môže viesť ku zvýšeniu angiogenézy buď priamo prostredníctvom mitogénneho vplyvu Epo na endotelové bunky, alebo reguláciou ďalších angiogénnych faktorov. V organizme dospelého človeka dochádza k fyziologickej angiogenéze iba v tkanivách pohlavných orgánov žien, vrátane vaječníkov. Tento proces však na rozdiel od nádorovej angiogenézy, ktorá bola dosiaľ popísaná, nie je výlučne pod vplyvom hypoxie, ale v závislosti na konkrétnom tkanive je v rôznej miere regulovaný aj estrogénovým hormónom 17  $\beta$ -estradiolom. E2 je z hľadiska množstva fyziologických dejov, v ktorých je zapojený,

považovaný za najvýznamnejší estrogén. Medzi jeho funkcie v organizme patrí aj stimulácia angiogenézy endometria a corpus luteum v konkrétnych fázach menštruačného cyklu. V našej štúdií sme si na modeli ovariálnych nádorových bunkových línii, vybraných na základe prítomnosti/nepřítomnosti funkčných estrogénových receptorov (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ), dali za cieľ určiť mieru vplyvu hypoxie, E2 a oboch týchto faktorov súčasne na produkciu VEGF, ktorý je hlavný stimulát angiogenézy v ľudskom organizme a Epo.

## MATERIÁL A METODIKA

### Biologický materiál:

V experimentoch boli použité ľudské bunky endotelu ciev pupočníka (HUVEC) a bunkové línie ľudského ovariálneho adenokarcinómu A2780 a OVCAR-3. HUVEC boli izolované z pupočníkových vén ich preplachovaním roztokom kolagenázy II a následne boli kultivované v štandardných podmienkach (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% vlhkosť) v médiu M199 s pridanými antibiotikami, 10% ľudského séra a 10% tepelne inaktivovaného séra z novonarodených teliat. Bunkové kultúry A2780 a OVCAR-3 boli kultivované taktiež za štandardných podmienok v médiu RPMI-1640 s prídavkom antibiotík. Kompletné kultivačné médium bolo v prípade A2780 obohatené o 10% FBS a v prípade OVCAR-3 o 20% FBS a 0,01mg/ml bovinného inzulínu.

### Hypoxia:

Podmienky hypoxie boli vytvorené pomocou prístroja PROOX 110 s kyslíkovým senzorm. Využitím tohto zariadenia a pomoc technického plynu s 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> a 94% N sme nastavili hypoxické prostredie, v ktorom boli bunky za stálej teploty 37°C inkubované.

### Stanovenie hladiny proteínov (Western blot):

Bunkové lyzáty boli pripravené s použitím lyzačného roztoku (100mM Tris, 1% SDS, 10% glycerol) s prídavkom zmesi inhibítorov proteáz a fosfatáz. Na základe kvantifikácie proteínov v jednotlivých lyzátoch boli vytvorené vzorky s jednotnou koncentráciou celkových proteínov a tieto boli elektroforeticky separované pomocou polyakrylamidovej elektroforézy (SDS-PAGE) a transportované na nitrocelulózoové membrány. Po inkubácii membrán s primárnymi protilátkami špecifickými pre hľadané proteíny, sérii preplachovaní, inkubácii membrán s odpovedajúcimi sekundárnymi protilátkami a opätovnej sérii preplachovaní bola hladina jednotlivých analyzovaných proteínov stanovená pomocou chemiluminiscenčného kitu ECLplus v tmavej komore na RTG film.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Metódou Western blotting sme po inkubovaní buniek s rôznymi koncentraciami Epo zaznamenali u oboch nádorových bunkových línii prítomnosť fosforylovaných foriem EpoR ako aj molekúl charakteristických pre niektoré signálne dráhy, ku ktorých spusteniu dochádza po naviazaní Epo na EpoR. Tým sme dokázali prítomnosť a funkčnosť EpoR u tohto typu buniek. Okrem toho došlo aj k významnému zvýšeniu hladiny VEGF v bunkách A2780 inkubovaných s Epo v normoxických podmienkach. Na základe týchto výsledkov boli HUVEC kultivované v kondiciovanom médiu, ktoré sme získali z A2780 buniek inkubovaných s rôznymi koncentraciami Epo v hypoxických a normoxických podmienkach. Stanovením celularity takto ovplyvnených HUVEC sme zistili, že v hypoxických podmienkach je zvýšenie počtu týchto buniek priamo úmerné koncentraciám Epo, ktorým boli vystavené bunky A2780.

Na základe týchto výsledkov a predpokladu, že v bunkách niektorých fyziologicky normálnych tkanív rozmnožovacích orgánov žien dochádza ku angiogenéze regulovanej aspoň do istej miery vplyvom E2, rozhodli sme sa stanoviť či tento mechanizmus funguje aj na ovariálnych nádorových bunkách *in vitro*, a taktiež určiť či je v tomto procese zapojený Epo. Po exogénnom podaní E2 k A2780 a OVCAR-3 bunkám (A2780 majú funkčný ER $\beta$



a nemajú prítomný ER $\alpha$ , OVCAR-3 majú funkčný ER $\alpha$  aj ER $\beta$ ) sme zaznamenali fosforylované formy ER $\alpha$  a ER $\beta$  v prípade OVCAR-3 buniek a fosforylované formy len ER $\beta$  u A2780 buniek, čím sme potvrdili funkčnosť príslušných estrogénových receptorov a teda schopnosť E2 pôsobiť na tieto bunky. Kultivovaním ovariálnych nádorových buniek s rôznymi koncentraciami E2 v hypoxických a normoxických podmienkach sme pomocou metódy Western blotting pozorovali nárast množstva proteínu VEGF po 48 hod. v normoxických aj hypoxických podmienkach u oboch analyzovaných bunkových línií, ktorý bol priamo úmerný koncentraciám E2, s ktorými boli bunkové línie inkubované. Signifikantná zmena hladiny Epo nebola pozorovaná. Potvrdenie tohto výsledku by mohlo znamenať, že v normoxických podmienkach je úloha HIF v stimulácii tvorby proangiogénnych faktorov nahradená pôsobením E2, alebo že E2 zabraňuje proteozomálnej degradácii molekuly HIF a tým jej umožňuje pôsobiť ako transkripčný faktor proangiogénnych faktorov aj normoxických podmienkach. Z tejto štúdie vyplýva, že Epo aj E2 stimulujú vo vybraných ovariálnych bunkových líniách tvorbu VEGF, no E2 nemá vplyv na produkciu Epo v týchto bunkách.

#### POĎAKOVANIE

Práca vznikla v rámci plnenia grantových projektov za finančnej podpory nasledujúcich agentúr: VEGA 1/0240/08, VEGA 1/0296/09, LPP 0062/09, APVV 0040/10, VVCE0001/07, SEPO II (ITMS 26220120039).

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Jelkmann W, Bohlius J, Hallek M, Sytkowski A J. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. *Oncol/Hematol* 2008; 67: 39-61.
- Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 343-354.
- Solár P, Feldman L, Jeong J-Y, Busingye J, Sytkowski AJ. Erythropoietin treatment of human ovarian cancer cells results in enhanced signaling and a paclitaxel-resistant phenotype. *Int J Cancer* 2008; 122: 281-288.
- Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E, Presta M. Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 891-896.
- Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J et al. Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol* 2003; 162: 1789-1806.

## POROVNANIE METÓD TESTOVANIA FAGOCYTÁRNEJ AKTIVITY VO VETERINÁRSKEJ IMUNOLÓGII

Kšonžeková P., Mudroňová D., Forbes E., Tkáčiková L.

Ústav imunológie, Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

### ABSTRAKT

Cieľom práce bolo porovnať súčasné *in vitro* metódy testovania fagocytárnej aktivity (FA). V našom experimente bola vyšetrená venózna krv rôznych druhov zvierat (hovädzí dobytok, ovce, ošípané, psy), pričom ako substrát boli použité kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*), mikrosférické hydrofilné častice (MSHP), ako aj fluorescenčne značené *Escherichia coli*. FA po aplikácii kvasiniek a MSHP častíc bola vyhodnotená mikroskopicky. Schopnosť ingescie opsonizovaných FITC-om značených *E.coli* bola analyzovaná cytometricky použitím komerčného fagotestu. Zistili sme signifikantné rozdiely v hodnotách FA meranej pomocou MSHP častíc v porovnaní s kvasinkami a komerčným fagotestom.

### ÚVOD

Fagocytóza je bunkovým mechanizmom vrodenej imunity živočíchov. Samotnému procesu fagocytózy predchádza aktivácia buniek vplyvom exogénnych, ako aj endogénnych stimulov a ich následná migrácia na miesto iritácie. Prvotné prichytenie („tethering“) a kotúľanie („rolling“) leukocytov po cievnom endotéliu umožňuje heterológna interakcia medzi selektínmi (CD62E, CD62P) a glykoproteínom sialyl Lewis-X (CD15) (Kansas, 1996). Kdežto pri adhézii leukocytov sa uplatňujú integríny (LFA-1, Mac-1, VLA-4) exprimované na ich povrchu. Diapedéze predchádza proces označovaný ako „crawling“, pri ktorom zohráva kľúčovú úlohu väzba medzi integrínom Mac-1 a medzibunkovou adhezívnou molekulou 1 (ICAM-1) (Phillipson a kol., 2006). Extravazácia leukocytov je sprostredkovaná homológna interakciou molekúl PECAM-1, avšak významnú úlohu tú zohrávajú aj ďalšie proteíny (CD99, kadheríny a iné). Paracelulárny, resp. transcelulárny prestup leukocytov cez endotel (Engelhardt a Wolburg, 2004) a následne cez bazálnu membránu vedie k prechodu buniek do spojivového tkaniva, kde dochádza k ich chemokínmi riadenej transmigrácii. Interakciu medzi antigénom a fagocytom sprostredkovávajú vzory rozpoznávajúce receptory (PRRs) a receptory tzv. imúnnej fagocytózy (receptory pre Fc-koniec Ig, komplementové receptory). Griffin a kol. (1975) navrhli dva možné mechanizmy pohltienia antigénov profesionálnymi fagocytmi. „Zips“ hypotéza hovorí, že dochádza k postupnému obklopeniu cieľovej častice pseudopódiami, pričom je potrebné nahromadenie veľkého množstva receptorov v membráne fagocytu. „Trigger“ hypotéza predpokladá, že prvotné prichytenie na povrch fagocytu sprostredkované len niekoľkými receptormi je postačujúce na pohltienie celej partikule. Výsledkom štádia ingescie je formovanie membránou ohraničenej vezikulárnej štruktúry - fagozómu. Následne dochádza k uvoľneniu granúl a lyzozómov za vzniku tzv. fagolyzozómu a deštrukcii infekčného agens.

Fagocytárna aktivita je významným ukazovateľom stavu vrodenej imunity živočíchov. Princíp *in vitro* vyšetrenia schopnosti fagocytov pohltiť cudzorodé častice je jednoduchý. Heparinizovaná krv, resp. suspenzia izolovaných buniek sa za presne definovaných podmienok inkubuje so suspenziou antigénu. Pri vyhodnotení testu sa využíva svetelná, resp. fluorescenčná mikroskopia, ako aj cytometrická analýza. Naším cieľom bolo porovnať súčasné *in vitro* metódy testovania schopnosti ingescie cudzorodých častíc krvnými fagocytmi.

## MATERIÁL A METODIKA

**Výetrovaný materiál:** Venózna krv bola sterilne odobraná do skúmavky s heparínom (10 UI/ml krvi) a následne vyšetrená, a to do dvoch hodín po odbere.

**Príprava substrátov:** Mikrosférické hydrofilné častice (fagoMSHP, Artim s.r.o.) a FITC-om značené *E. coli* (Phagotest kit) boli pred testom pripravené podľa pokynov dodávateľa. *S. cerevisiae* boli rozpustené vo fyziologickom roztoku a teplom usmrtené.

**Mikroskopické vyšetrenie fagocytárnej aktivity:** Heparinizovaná krv bola inkubovaná so suspenziou antigénu (kvasinky *S.cerevisiae*, resp. MSHP častice) 1 h pri 37.0°C vo vodnom kúpeli za stáleho miešania. Bol zachovaný adekvátny pomer antigénnych častíc a fagocytov, a to 10 *S. cerevisiae*:1 fagocyt, 50 MSHP:1 fagocyt. Po inkubácii bola reakcia zastavená uložením vzoriek na ľad a následne boli zhotovené krvné nátery, ktoré boli po vysušení ofarbené podľa Pappenheima. Mikroskopicky bolo vyhodnotených 100 buniek (neutrofilné granulocyty a monocyty), pričom ako aktívne fagocytujúce bunky boli definované fagocyty, ktoré pohltili aspoň 1 kvasinku, resp. minimálne 3 MSHP častice.

**Phagotest® (ORPEGEN Pharma, Nemecko):** Phagotest® bol prevedený podľa pokynov výrobcu (Phagotest®, ORPEGEN Pharma), pričom bolo analyzovaných 10 000 fagocytózy schopných buniek. Vzorky boli merané do hodiny na prietokovom cytometri BD FACS Canto a vyhodnotené pomocou BD FACS Diva softvéru.

**Štatistická analýza:** Výsledky boli vyhodnotené párovým t-testom v štatistickom programe GraphPad Prism verzia 3.00.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

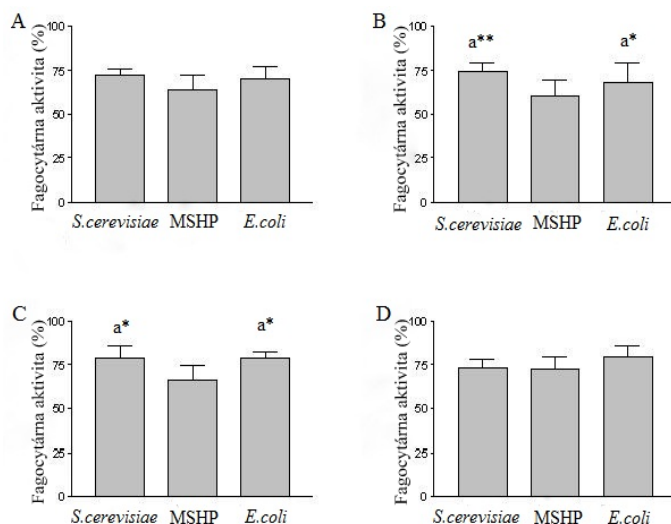
Cieľom práce bolo porovnať rôzne prístupy vyšetrenia ingescie antigénov fagocytmi. Zo zistených hodnôt sme vypočítali fagocytárnu aktivitu (FA) a fagocytárny index (FI). FA vyjadruje percentuálne zastúpenie aktívne fagocytujúcich neutrofilných granulocytov a monocytov. FI vyjadruje priemerný počet pohltitých kvasiniek, baktérií, resp. častíc na jeden fagocyt.

Výsledky vyšetrení FA u jednotlivých zvierat sú uvedené v grafoch (Obr.1) ako priemerné hodnoty a smerodajné odchýlky. U oviec a psov sme zaznamenali štatisticky významný rozdiel FA v závislosti od použitých častíc. FA krvných leukocytov fagocytujúcich MSHP bola signifikantne nižšia v porovnaní s testom, kedy boli ako antigén použité kvasinky a baktérie. Avšak je potrebné poznamenať, že aj u ošípaných a hovädzieho dobytku sme pozorovali nižšie hodnoty FA v prípade fagocytózy umelých častíc (bez signifikancie). Na rozdiel od umelých častíc boli baktérie *E.coli* opsonizované humánnymi protilátkami a komplementom. Podobne ako pri komerčnom fagoteste, vysoké hodnoty FA sme zaznamenali aj pri fagocytóze *S.cerevisiae*, čo sú ubikvitárne eukaryotické organizmy. Navyše kvasinky majú na rozdiel od MSHP častíc imunologicky stimulačný povrch. Výhodou MSHP častíc je však nízky sklon k ich vzájomnej agregácii, ako aj nešpecifickej adherencii na bunkové povrchy. Pre ich použitie v klinickej veterinárskej imunológii bude potrebné definovať referenčné fyziologické hodnoty FA, prípadne otestovať použitie druhovo špecificky opsonizovaných umelých častíc.

Hodnoty FI sú uvedené v tabuľke (Tab.1) ako priemerné hodnoty a smerodajné odchýlky. Štatistické porovnanie hodnôt FI (podobne ako pri FA) by v tomto prípade nebolo vhodné, keďže nami testované metodiky sa líšia typom a množstvom podávaných antigénnych častíc.

**Tab.1: Fagocytárny index (FI) krvných fagocytov u rôznych druhov zvierat po aplikácii *S.cerevisiae*, mikrosférických hydrofilných častíc (MSHP), resp. *E.coli*. Výsledky sú uvedené ako priemerné hodnoty ± smerodajné odchýlky (n = 6).**

	Ošípané	Ovce	Psy	Hovädzí dobytok
<i>S.cerevisiae</i>	3,33 ± 0,426	2,76 ± 0,665	3,68 ± 0,293	2,07 ± 0,242
MSHP	14,25 ± 4,460	16,06 ± 3,544	15,49 ± 4,085	13,08 ± 4,018
<i>E.coli</i>	5,63 ± 2,671	5,67 ± 1,266	4,52 ± 1,200	4,28 ± 1,411



**Obr.1: Fagocytárna aktivita (FA) krvných fagocytov rôznych druhov zvierat po aplikácii *S.cerevisiae*, mikrosférických hydrofilných častíc (MSHP), resp. *E.coli***

(A-ošípané, B-ovce, C-psy, D-hovädzí dobytok). Výsledky sú graficky zobrazené ako priemerné hodnoty ± smerodajné odchýlky (n = 6).

a – signifikantný rozdiel oproti MSHP

\* p ≤ 0.05, \*\* p ≤ 0.01

V porovnaní s mikroskopiou je nemalou výhodou prietokovej cytometrie analýza mnohonásobne vyššieho počtu buniek, čo rádo redukuje chyby pri hodnotení. Výhodou je taktiež možnosť vyšetriť FA samotných neutrofilov, resp. monocytov, čo by pri mikroskopickom hodnotení bolo časovo veľmi náročné. Avšak nevýhodou cytometrickej analýzy je finančná náročnosť, a to čo sa týka prístrojového vybavenia a údržby, ako aj komerčne dostupných testov. Použitie komerčných testov vo veterinárskej imunológii môže byť komplikované, keďže nemusia byť vhodné pre všetky druhy zvierat. Bežne sa využíva množstvo alternatív cytometrickej analýzy. Metodika zahŕňa, podobne ako pri komerčnom fagoteste, viacero krokov: zastavenie reakcie, zhasenie fluorescence, lýzu erytrocytov a fixáciu. Najjednoduchším spôsobom zastavenia reakcie je samotné uloženie vzorky na ľad. Vo väčšine sa však používa v kombinácii s pridaním ľadového fosfátového fyziologického roztoku (Busque a kol., 1998), ľadového roztoku kyseliny etyléndiaminotetraoctovej (Massoco a Palermo-Neto, 2003) alebo N-etylmaleimidu (Keogh a kol., 2011). Na zhasenie fluorescence naadherovaných baktérií, resp. častíc je vhodné použitie trypanovej modrej v koncentrácii 0,25 mg.ml<sup>-1</sup> alebo vyššej (Hed a kol., 1987). V prípade vyšetrenia fagocytov z celej krvi je potrebná lýza erytrocytov, na čo sa väčšinou využívajú lyzačné roztoky na báze chloridu amónneho (Santos a kol., 1995; Tippett a kol., 2007; Keogh a kol., 2011). Čo sa týka fixácie, prevláda použitie 1% paraformaldehydu (Tippett a kol., 2007; Keogh a kol., 2011).

Na záver by sme radi poukázali na výhody prietokovej cytometrie, ako je časová nenáročnosť, presnosť a reprodukovateľnosť výsledkov. Pravdepodobnosť chýb pri mikroskopickom hodnotení narastá v dôsledku nízkeho počtu analyzovaných buniek, ako aj subjektívnej chyby vyšetrojúceho. Na základe našich výsledkov možno poukázať na potrebu použitia imunologicky stimulačných antigénov, ako sú baktérie a kvasinky. Naviac, pri vyšetrení aktivity profesionálnych fagocytov zvierat, je pravdepodobne dôležitá aj aplikácia antigénov, ktoré sú druhovo špecificky opsonizované.

## POĎAKOVANIE

Táto publikácia bola vytvorená 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 rozvoja.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Busque P., Higgins R., Sénéchal S., Marchand R., Quessy S. Simultaneous flow cytometric measurement of *Streptococcus suis* phagocytosis by polymorphonuclear and mononuclear blood leukocytes. *Vet Microb.* 1998; 63: 229-38
- Engelhardt B., Wolburg H. Mini-review: transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol.* 2004; 34: 2955-63
- Griffin F.M., Griffin J.A., Leider J.E., Silverstein S.C. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J Exp Med.* 1975; 142: 1263-82
- Hed J., Hallden G., Johansson S.G.O., Larsson P. The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J Immunol Meth.* 1987; 101 (1): 119-25
- Kansas G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 1996; 88: 3259-87
- Keogh M.J., Spoon T., Ridgway S.H., Jensen E., Van-Bonn W., Romano T.A. Simultaneous measurement of phagocytosis and respiratory burst of leukocytes in whole blood from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) utilizing flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011; 144(3-4): 468-75
- Massoco C., Palermo-Neto J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 95: 11-19
- Phillipson M., Heit B., Colarusso P., Liu L., Ballantyne C.M., Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med.* 2006; 203: 2569-75
- Santos J.L., Montes M.J., Gutiérrez F., Ruiz C. Evaluation of phagocytic capacity with a modified flow cytometry technique. *Immunology Letters.* 1995; 45: 1-4
- Tippett E., Fernandes L.A., Rogerson S.J., Jaworowski A. A novel flow cytometric phagocytosis assay of malaria-infected erythrocytes. *J Immunol Meth.* 2007; 325: 42-50

## VPLYV OBEZITY NA PREIMPLANTAČNÝ VÝVIN EMBRYA

Kubandová J.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice*

### ABSTRAKT

Obezita je choroba, ktorá je charakterizovaná zmmnožením tukového tkaniva v tele človeka alebo zvierat'a nad určitú optimálnu hladinu. Medzi zásadné funkcie tukového tkaniva patrí schopnosť produkcie hormónov (leptín, adiponektín, rezistín, visfatín). Leptín, ako jeden z hlavných hormónov tukového tkaniva, zohráva dôležitú úlohu v reprodukcii. Základné faktory, ktoré môžu ovplyvniť genetickú informáciu embrya a plodu sú výživa a nutričný stav matky počas gravidity. Pre úspech reprodukčného procesu je dôležitý správny priebeh preimplantačného vývinu. Na základe doterajších štúdií je známe, že preimplantačné embryo je citlivé k zmenám materského prostredia a vplyv rôznych porúch homeostázy materského organizmu bol zaznamenateľný už na tejto úrovni. Toto minireview prináša zhrnutie doposiaľ známych faktov o vplyve niektorých aspektov obezity na preimplantačný vývin embrya rôznych živočíšnych druhov ako aj prehľad funkcií bieleho tukového tkaniva.

### ÚVOD

Obezita, sprevádzaná zvyšujúcou sa telesnou hmotnosťou zapríčinenou nadmernou akumuláciou telesného tuku, zaťažuje organizmus mechanicky a zhoršuje aj jeho fyziologické funkcie. Tukové tkanivo je vysoko špecializovaný aktívny endokrinný a parakrinný orgán. Pri štúdiu obezity v súvislosti s reprodukciou je potrebné pracovať s vhodnými zvieracími modelmi indukcie obezity. Tieto sú založené prevažne na dietetických (Mozeš a kol., 2004a,b; Šefčíková a kol., 2008; 2010) alebo genetických manipuláciách (Michaud a kol., 1994). Bolo dokázané, že obezita matky počas vyšších štádií tehotenstva má negatívny vplyv na potomstvo. Negatívny vplyv niektorých aspektov obezity bol zaznamenaný už aj počas preimplantačného vývinu embrya.

### TUKOVÉ TKANIVO A JEHO FUNKCIE

Obezita je definovaná aj ako nízkestupňový systematický zápal tukového (adipózneho) tkaniva (Calle a Kaaks, 2004). V organizme sa tukové tkanivo vyskytuje v dvoch formách ako hnedé a biele tukové tkanivo. U človeka je základným typom adipózneho tkaniva biele tukové tkanivo (Ginter a Simko, 2008), ktorého kvantitatívne najdôležitejšou zložkou sú vlastné tukové bunky – adipocyty (Weisberg a kol., 2003). Okrem funkcie tepelného izolátora, funkcie mechanickej ochrany a funkcie zásobného energetického zdroja sa biele tukové tkanivo zúčastňuje aj na energetickej homeostáze, ale aj na ďalších fyziologických a patofyziologických funkciách (napr. regulácie fertility atď.) (Schaffler a kol., 2007). Tukové tkanivo je tiež aj zdrojom estrogénov u postmenopauzálnych žien a ich koncentrácia je pri obezite podstatne zvýšená. Ďalšou dôležitou funkciou tukového tkaniva je produkcia hormónov. Proteíny tvorené výlučne v adipocytoch sa nazývajú adipokíny (Antuna-Puente a kol., 2008) a u väčšiny z nich je ich krvná koncentrácia pri obezite preukázateľne vyššia (Čikoš a kol., 2010; 2011). Patria medzi ne leptín (Lam a Lu, 2007), adiponektín (Čikoš a kol., 2010), rezistín (Pang a Le, 2006), visfatín (Moschen a kol., 2007) a iné.

### OBEZITA A REPRODUKCIA

V súčasnosti je obezita považovaná za faktor, ktorý má negatívny vplyv na reprodukciu (Aviram a kol., 2011). Týmto ochorením trpí približne 30% tehotných žien. Je dokázané, že obezita v období gravidity má nepriaznivý vplyv na vývin potomkov, čo sa môže prejaviť aj v neskorších fázach ich života (napr. vývojom obezity a metabolického syndrómu) (Nodine

a Hastings-Tolsme, 2012). U novorodencov obéznych matiek je vyššie riziko úmrtia v novorodeneckom období. Pri vysokých hodnotách BMI (index telesnej hmotnosti) matky narastá riziko výskytu rôznych vrodených vývojových chýb plodu (chrbtice, srdca, brušnej steny a pod.). Riziko vnútromaternicového odumretia plodu u obéznych matiek je až trojnásobne vyššie ako u žien s normálnou hmotnosťou. Často sa vyskytuje aj makrozómia plodu (nadmerná veľkosť – nad 4 kg). Obézne ženy majú častejšie problémy s fertilitou pretože majú zvýšené hladiny ženských aj mužských pohlavných hormónov (hyperandrogenizmus) a inzulínu (hyperinzulinizmus). To má za následok zvýšenú frekvenciu porúch pohlavného cyklu, zvýšenú potrebu gonádotropínov počas stimulácie ovulácie, znížený počet izolovaných oocytov, znížený počet úspešných tehotenstiev po IVF, zníženú funkciu žltého telieska a predovšetkým zvýšený risk nedonosenia (Zander-Fox a kol., 2012). Okrem toho, že obezita má priamy vplyv na fertilitu matky a vývin plodu, pravdepodobne ovplyvňuje reprodukciu už na úrovni oocytu a preimplantačného embrya (Shah a kol., 2011). Na výskum vplyvu obezity počas preimplantačného vývinu sú potrebné rozličné *in vivo* alebo *in vitro* experimenty na laboratórnych a hospodárskych zvieratách (Leroy a kol., 2011). U samíc myši alebo potkanov v *in vivo* experimentoch, ktoré boli po dosiahnutí dospelosti (35 dní) niekoľko týždňov kŕmené vysoko-tukovou diétou, bol po hormonálnej stimulácii zaznamenaný zvýšený počet ovulácií a následne zvýšená produkcia oocytov (Trujillo a Broughton, 1995). V obdobnom experimente však bola zaznamenaná i mierne znížená kvalita takto získaných oocytov. Embryá, ktoré sa z oocytov vyvíjali ďalej v *in vitro* podmienkach, vykazovali zníženú schopnosť dosiahnuť štádium blastocysty (Minge a kol., 2008). Kvalita takto získaných blastocýst však zatiaľ testovaná nebola. U geneticky upravených myši (lethal yellow mutation) bola taktiež preukázaná znížená schopnosť rastu embryí do vyšších vývinových štádií (Brannian a kol., 2005). Ani ich kvalita však testovaná nebola. Cieľom *in vitro* modelov je testovať priamy vplyv vybraných faktorov obezity na embryo a odhaľovať možné mechanizmy ich vplyvu (Wakefield a kol., 2008). Kravské embryá kultivované v médiu s prídavkom hyperlipidemického séra získaného od kráv, ktoré boli kŕmené vysoko-tukovou alebo karbohydrátovou diétou, jednoznačne vykazovali znížené rastové schopnosti, znížené počty buniek v blastocystách, znížený mitotický index a zníženú odolnosť voči zmrazovaniu (Leroy a kol., 2011). V niektorých *in vitro* experimentoch vykazovali myšacie embryá zlepšený vývin zo zygoty do blastocysty a zvýšený počet „hatchujúcich“ blastocýst (blastocysta zbavená *zona pellucida*) po pridaní nenasýtených mastných kyselín do kultivačného média (Wakefield a kol., 2008).

## POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0049/11.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Antuna-Puente B, Fève B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diab Metab.* 2008; 34: 2-11.
- Aviram A, Hod M, Yogev Y. Maternal obesity: Implications for pregnancy outcome and long-term risk- a link to maternal nutrition. *Int J Gynecol Obstet.* 2001; 115:S6-S10.
- 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; 45:143-150.
- Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence proposal mechanisms. *Nat Rev.* 2004; 4:579- 591
- Čikoš Š, Burkuš J, Bukovská A, Fabian D, Reháč P, Koppel J. Expression of adiponectin receptors and effect of adiponectin isoforms in mouse preimplantation embryo. *Hum Reprod.* 2010; 25: 2247-2255.

- Čikoš Š, Fabian D, Makarevich AV, Chrenek P, Koppel J. Biogenic monoamines in preimplantation development. *Hum Reprod* 2011; 26: 2296-2305.
- Ginter E, Simko V. Adult obesity at the beginning of the 21<sup>st</sup> century: epidemiology, pathophysiology and health risk. *Bratislavské Lekárske Listy*. 2008; 109: 224-230.
- Lam QL, Lu LW. Role of leptin in immunity. *Cel Mol Immunol*. 2007; 4:1-13.
- Leroy JLMR, Govaerts IGF, Rizos D, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A, Jorssen EPA, – Bols PEJ. Single *in vitro* bovine embryo production: coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. *Therion*. 2011; 76:1293-1303.
- Michaud EJ, Bultman SJ, Klebig ML, Van Vugt MJ, Stubbs LJ, Russel LB, Woychik RPA. Molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (Ay) mutation. *Genetics*, 1994; 91: 2562-2566.
- Minge CE, Bennet BD, Norman RJ, Robker RL. Peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$  agonist rosiglitazone reverses the adverse effects of diet-induced obesity on oocyte quality. *Endocrinol*; 2008, 149:2646-2656.
- Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger N, Tilg H. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol*. 2007; 178:1748-1758.
- 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.
- Nodine PM, Hastings-Tolsma M. Maternal obesity: improving pregnancy outcomes. *MCN Am J Mat Child Nurs*. 2012; 37:110-115.
- Pang SS, Le YY. Role of resitin in inflammation and inflammation-related diseases. *Cel Mol Immunol*. 2006; 3:29-34
- Shah DK, Missmer SA, Berry KF, Racowsky C, Ginsburg ES. Effect of obesity on oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization. *Obstet Gyn*. 2011; 118:63-70.
- Schaffler A, Scholmerich J, Salzberg B. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, V1q/TNFs and CTRPs. *Immunol*. 2007; 28:393-399.
- 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.
- Šefčíková Z, Kmet' V, Bujňáková D, Raček L, Možeš Š. Development of gut microflora in obese and lean rats. *Folia Microbiologica*. 2010; 55:373-375.
- Trujillo EP, Broughton KS. Ingestion of n-3 polyunsaturated fatty acid and ovulation in rats. *J Reprod Fertil*. 1995; 105:197-203.
- Van Hoeck V, Sturmev RG, Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Leese H J, Bols PEJ, Leroy JLMR. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. *PLoS One*. 2011; 6:23183.
- Wakefield SL, Lane M, Schulz SJ, Hebart ML, Thompson JG, Mitchell M. Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocytes and early embryo development in the mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 294:E425-E434.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RI, Ferrante, JrAW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003; 112:1796-1808.
- Zander-Fox DL, Henshaw R, Hamilton H, Lane M. Does obesity really matter? The impact of BMI on embryo quality and pregnancy outcomes after IVF in women aged  $\leq 38$  years. In *The Australian & New Zealand J Obstet Gynaecol*, 2012; 52:270-276.



## FENOTYP PROLIFERUJÚCICH BUNIEK VO VÝSTELKE CENTRÁLNEHO KANÁLA MIECHY POTKANA V SKOROM POSTNATÁLNO M OBDOBÍ

Kútna V., Ševc J., Matiašová A., Daxnerová Z.

*Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach*

### ABSTRAKT

Vývin nervového systému je centrom záujmu mnohých štúdií, no napriek tomu je informácií o postnatálnej gliogenéze veľmi málo. Cieľom tejto práce bolo preskúmanie skorých postnatálnych štádií vývinu miechy potkana s dôrazom na procesy, ktoré sa odohrávajú vo výstelke centrálného kanála a v jeho bezprostrednej blízkosti. Pomocou endogénneho markera proliferácie Ki-67 sme zistili, že k proliferácii vo výstelke centrálného kanála miechy potkana dochádza počas celého sledovaného obdobia, pričom vrchol dosahuje na druhý postnatálny týždeň. Bunky tvoriace výstelku centrálného kanála v tomto nami sledovanom období len veľmi výnimočne podliehajú apoptóze a preukazujú fenotyp radiálnej glie, neskôr endymových buniek, astrocytov a v malej miere aj oligodendrocytov.

### ÚVOD

Vývin centrálného nervového systému je zložitý proces, ktorý zahŕňa formovanie nervovej platničky a neurálnej rúry. Obe tieto štruktúry sú tvorené neuroepitelovými bunkami, ktoré aktívne proliferujú. Po uzatvorení neurálnej rúry sa neuroepitelové bunky, ktoré tvoria zárodočnú vrstvu, transformujú na bunky radiálnej glie (Barry a McDermott, 2005). Bipolárne bunky radiálnej glie predstavujú prechodný bunkový typ, prítomný vo výstelke centrálného kanála počas obmedzeného obdobia. Radiálna glia sa postupne vytráca, čo pravdepodobne súvisí s jej transformáciou na astrocyty (Shibata a kol., 1997), endymové bunky (Spassky a kol., 2005) a oligodendrocyty (Woodruff a kol., 2001). Bunky radiálnej glie môže byť taktiež zdrojom neurónov, preto sa pre ňu aj používa pomenovanie embryonálna neurálna kmeňová bunka (Kriegstein a Alvarez-Buylla, 2009). Keďže radiálna glia je zdrojom niekoľkých typov buniek môžeme dnes len ťažko súhlasiť so staršími prácami, ktoré výstelku centrálného kanála považovali za homogénnu skupinu endymových buniek. V súčasnosti sa už všeobecne prijíma názor, že endymová vrstva je vysoko heterogénna a nachádza sa v nej niekoľko typov buniek (Hugnot a Franzen, 2011). Výstelka centrálného kanála je proliferatívne aktívna počas embryonálneho aj postnatálneho obdobia a endymové bunky tvoria len časť z deliacich sa buniek centrálného kanála (Ševc a kol., 2011). Aj keď existuje veľké množstvo údajov o neurogenéze vo vyvíjajúcej sa mieche, informácie o procesoch postnatálnej gliogenézy vo výstelke centrálného kanála miechy stále chýbajú. A práve preto bolo cieľom tejto práce preskúmanie skorých postnatálnych štádií vývinu miechy potkana s dôrazom na procesy, ktoré sa odohrávajú vo výstelke centrálného kanála a v jeho bezprostrednej blízkosti.

### MATERIÁL A METODIKA

Ako experimentálne zvieratá sme použili potkany kmeňa Wistar oboch pohlaví vo veku 1, 7, 14, 21, 28, 35 a 42 dní (P1-P42). Zvieratá boli chované v štandardných laboratórnych podmienkach, s neobmedzeným prístupom k pitnej vode a peletovanému krmivu. Všetky experimenty boli uskutočnené v súlade so zásadami Etickej komisie Prírodovedeckej fakulty UPJŠ a na základe povolenia Štátnej veterinárnej a potravinovej Správy. Mláďatá boli usmrtené v dietyléterovej anestéze a bola im vykonaná transkardiálna perfúzia fyziologickým roztokom a 4% paraformaldehydom. Vybraté miechy boli fixované v 4% paraformaldehyde a následne inkubované v kryoprotektíve (30% sacharóze). Jednotlivé segmenty miechy boli narezané na kryostate na 40 μm hrubé rezy, imunohistochemicky a imunofluorescenčne ofarbené a analyzované. Na identifikáciu proliferatívne aktívnych buniek sme použili marker

Ki-67 (Abcam 1:500). Analýza množstva proliferačne aktívnych buniek vo výstelke centrálného kanála u potkanov v období P1-P42 bola uskutočnená na 3 zvieratách v každom časovom intervale. Z každého zvierat'a sme analyzovali 14 rezov. Množstvo proliferujúcich buniek bolo vyhodnotené ako počet Ki-67 pozitívnych buniek na objem tkaniva (1mm<sup>3</sup>). Na dôkaz prítomnosti apoptických buniek bola použitá metóda TUNEL. Markery použité na identifikáciu fenotypu jednotlivých gliových buniek sú uvedené v tabuľke č.1.

Bunkový typ	Marker	Výrobca a riedenie
<b>Radiálna glia</b>	Nestín	Santa Cruz (1:200)
	Vimentín	Abcam (1:200)
	GLAST	Millipore (1:1000)
<b>Astrocyty</b>	GFAP	Sigma-aldrich (1:1000)
<b>Oligodendrocyty</b>	Olig2	Millipore (1:500)
	PDGFR $\alpha$	Santa Cruz (1:50)
	Sox10	Santa Cruz (1:100)
<b>Ependýmne bunky</b>	S100 $\beta$	Abcam (1:100)
	CD24	Santa Cruz (1:50)
<b>Neuróny</b>	Doublecortin	Millipore (1:3000)

**Tab.1.** Markery použité na identifikáciu jednotlivých typov buniek vo výstelke centrálného kanála miechy potkana.

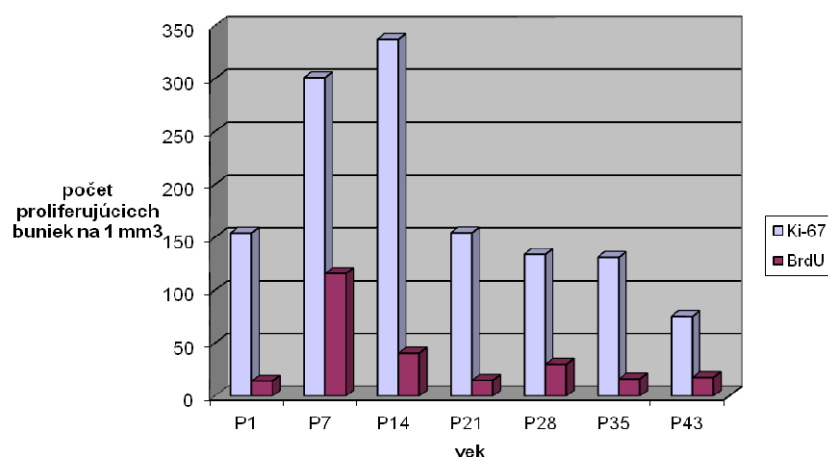
Histologické rezy boli vyhodnotené na svetelnom mikroskope Olympus BX41 pomocou softvéru QuickPHOTO Micro 2.2 a Ellipse 2 a na konfokálnom mikroskope Leica TCS SP5X pomocou softveru LAS AF.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V našej práci sme sa pokúsili preskúmať procesy odohrávajúce sa v výstelke centrálného kanála miechy potkana a v jeho bezprostrednej blízkosti počas skorého postnatálneho obdobia. Na základe našich predchádzajúcich výsledkov získaných pomocou podávania exogénneho markera proliferácie BrdU (5-bromo-2-deoxyuridínu) vieme, že vo výstelke centrálného kanála dochádza k dvom vlnám proliferácie a to okolo 18. dňa embryogenézy a medzi 8. a 15. postnatálnym dňom (Ševc a kol., 2011). Keďže BrdU značí len bunky nachádzajúce sa v S-fáze bunkového cyklu, rozhodli sme sa pre presnejšie stanovenie mitotickej aktivity v bunkách centrálného kanála miechy pomocou endogénneho markera proliferácie Ki-67, ktorý značí bunky vo všetkých fázach bunkového cyklu (okrem G0 fázy). Zistili sme, že proliferácia sa vo ventrikulárnej zóne vyskytuje počas celého sledovaného obdobia (P1-P42), pričom k maximálnej proliferačnej aktivite dochádza počas druhého postnatálneho týždňa (graf č.1). Naše výsledky potvrdzujú, že priebeh proliferácie buniek značných markerom Ki-67 a markerom S-fázy BrdU si zachováva podobný trend.

Vzhľadom k tomu, že výstelka centrálného kanála je proliferačne aktívna počas všetkých sledovaných období, zaujímalo nás, čo sa ďalej deje s týmito bunkami. Bunky môžu zostávať vo výstelke centrálného kanála, kde sú dôležité pre rast centrálného kanála počas vývinu miechy alebo migrovať smerom k periférii, kde sú zdrojom neurónov a gliových buniek. Ďalšou z možností nadprodukcie buniek je, že časť z novovzniknutých buniek v centrálnom kanáli podlieha apoptóze. Na overenie tejto hypotézy sme použili metódu *in situ* hybridizácie, tzv. TUNEL. Vyhodnotili sme rezy miechy z 3 zvierat z každého sledovaného obdobia (P1-P42). Zistili sme, že apoptické bunky sa vo výstelke centrálného kanála a v jeho tesnej blízkosti vyskytujú len veľmi vzácné. Z našich výsledkov teda vyplýva, že apoptóza len

v zanedbateľnej miere vplýva na ďalší osud buniek vznikajúcich vo ventrikulárnej zóne centrálného kanála miechy. V ďalšom kroku sme na identifikáciu fenotypov postnatálne vzniknutých buniek ventrikulárnej zóny centrálného kanála použili imunohistochemické reakcie s markermi radiálnej glie, ependýmových buniek, astrocytov, oligodendrocytov v rôznych štádiách diferenciácie a neurónov. Radiálna glia je v centrálnom kanáli prítomná ešte počas prvého postnatálneho týždňa a vykazuje imunoreaktivitu na vimentín, nestín a GLAST. Po druhom postnatálnom týždni radiálna glia pomaly vymizne. Ešte aj do šiesteho postnatálneho týždňa však môžeme v okolí centrálného kanála pozorovať jemné vimentín pozitívne vlákna. Podobnú tendenciu v expresii markerov gliových buniek popísali aj Barry a McDermott (2005). Najväčšiu proliferačnú aktivitu sme zaznamenali v prvom a druhom postnatálnom týždni. V tomto období bunky výstelky centrálného kanála a bunky nachádzajúce sa v jeho blízkom okolí vykazovali aktivitu najmä ako ependýmové bunky ( $S100\beta^+$ ), neuróny kontaktujúce centrálny kanál ( $Dcx^+$ ) a astrocyty ( $GFAP^+$ ), ktoré sme pozorovali v blízkosti centrálného kanála od druhého postnatálneho týždňa. Zistili sme, že v tesnom kontakte s výstelkou centrálného kanála sa nachádzajú aj  $Olig2^+$  a  $Sox10^+$  bunky, čo sú markery prekursorov resp. nezrelých oligodendrocytov. Priamo vo výstelke sa nám podarilo lokalizovať  $Olig2^+$  pozitívne bunky, čo by nasvedčovalo tomu, že by v tejto oblasti mohlo dochádzať k postnatálnej oligogliogenéze, ktorá už bola popísaná vo ventrikulárnej zóne mozgových komôr hlodavcov (Kessaris a kol., 2005, Richardson a kol., 2006), ale nie vo výstelke centrálného kanála miechy.



**Graf 1.** Porovnanie počtu proliferujúcich buniek na  $1\text{mm}^3$  tkaniva, označených markermi Ki-67 a BrdU.

## POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená grantovými projektmi VEGA 1/0967/12 a VVGS-PF-2012-49

## POUŽITÁ LITERATÚRA.

- Barry D.S., McDermott K.W. Differentiation of radial glia from radial precursor cells and transformation into astrocytes in the developing rat spinal cord. In *Glia*. 2005; 50, 187-197.
- Hugnot J.P., Franzen R. The spinal cord ependymal region: a stem cell niche in the caudal central nervous system. In *Front Biosci*. 2011;16:1044-1059.
- Kessaris N., Fogarty M., Iannarelli P., Grist M., Wegner M., Richardson W.D. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. In *Nat Neurosci*. 2006; 9:173-179.
- Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. In *Annu Rev Neurosci*. 2009; 32, 149-184.
- Richardson W.D., Kessaris N., Pringle N. Oligodendrocyte wars.. In *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7:11-18.

- Shibata T., Yamada K., Watanabe M., Ikenaka K., Wada K., Tanaka K., Inoue Y. Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia–astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. In *J Neurosci.* 1997; 17, 9212-9219.
- Spassky N., Merkle F.T., Flames N., Tramontin A.D., García-Verdugo J.M., Alvarez- Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. In *J Neurosci.* 2005; 25: 10-18.
- Ševc J., Daxnerová Z., Haňová V., Koval' J. Novel observations on the origin of ependymal cells in the ventricular zone of the rat spinal cord. In *Acta Histochem.* 2011; 113: 156-162.
- Woodruff R.H., Tekki-Kessaris N., Stiles C.D., Rowitch D.H., Richardson W.D. Oligodendrocyte development in the spinal cord and telencephalon: common themes and new perspectives. In *Int J Dev Neurosci.* 2001; 19: 379-385.

## TESTOVANIE ÚČINNOSTI VČELÍCH PROBIOTICKÝCH LAKTOBACILOV V IN VIVO PODMIENKACH

Kuzyšinová K.<sup>1</sup>, Mudroňová D.<sup>2</sup>, Molnár L.<sup>1</sup>, Toporčák J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika vtákov a exotických zvierat, UVLF, Košice

<sup>2</sup>Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

### ABSTRAKT

Mor včelieho plodu je nebezpečná celosvetovo rozšírená nákaza včiel, ktorej pôvodcom je tyčinkovitá baktéria *Paenibacillus larvae*. Spôsoby liečby sú málo efektívne a znehodnocujú včelie produkty. V krajinách Európskej únie, aj v mnohých ďalších, je jedinou povolenou intervenciou pri výskyte tohto ochorenia, spálenie infikovaných včelstiev a všetkého spáliteľného materiálu. Preto je veľmi aktuálna otázka nájdania účinnej prevencie, prípadne terapie tejto nákazy, pričom sa v súčasnosti kladie dôraz na využívanie prírodných metód, napríklad probiotík. V tomto výskume boli použité laktobacily vyizolované z tráviacich traktov zdravých dospelých včiel a selektované na základe ich dobrých probiotických vlastností a schopnosti inhibovať rast *P. larvae*. Tieto izoláty boli identifikované ako *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus plantarum*. Pre vytvorenie probiotického roztoku boli použité 24 hodinové kultúry týchto kmeňov, ktoré boli inkubované v MRS bujóne pri 37 °C, následne boli 3 krát centrifugované a premývané fyziologickým roztokom. Získaný sediment bol rozsuspendovaný v autoklávovanej kohútikovej vode tak, aby bola koncentrácia laktobacilov  $10^7 - 10^8$  cfu/ml. Ako probiotické médium bol zvolený peľ. Pre každý úl bolo pripravené 0,5 l probiotického roztoku, ktorý pozostával z 50g peľu a autoklávovanej kohútikovej vody s pripravenými laktobacilmi. Tento roztok včely prijímali per orálne, celkovo 3 krát s jednotýždňovým odstupom medzi aplikáciami. Pred podaním probiotík a počas podávania boli každý týždeň z úľov odoberané včely, ktoré boli usmrtené éterom. Následne im boli odoberané tráviace trakty, ktoré boli rozsuspendované vo fyziologickom roztoku a riedené desiatkovým riedením. Jednotlivé riedenia boli vysievané na MRS agar, MYPGP agar, Endo agar a MacConkey agar. Laktobacily boli kultivované 48 h. pri 37 °C za aneróbných podmienok, *P. larvae* bol kultivovaný 48 h. pri 37 °C a enterobaktérie a koliformné zárodky boli kultivované 24 h. pri 37 °C. Po podávaní probiotík sme zaznamenali zvýšenie počtov laktobacilov v tráviacom trakte včiel z približne  $10^6$  cfu/ml na  $10^7$  cfu/ml. Pred podávaním probiotík bol v tráviacom trakte včiel prítomný *P. larvae* v počtoch približne  $10^7$  cfu/ml, po skončení podávania úplne z tráviaceho traktu vymizol. Počty enterobaktérií v tráviacom trakte včiel sa znížili z približne  $10^7$  cfu/ml na  $10^5 - 10^6$  cfu/ml a počty koliformných zárodokov sa znížili z približne  $10^6$  cfu/ml na  $10^5$  cfu/ml. Z uvedeného usudzujeme, že probiotické laktobacily priaznivo ovplyvňujú mikrobiálne osídlenie tráviaceho traktu včiel a predstavujú možnosť zvýšenia odolnosti včiel voči *P. larvae*.

### ÚVOD

Mor včelieho plodu je nebezpečné a celosvetovo rozšírené ochorenie včiel, ktorého pôvodcom je tyčinkovitá baktéria *Paenibacillus larvae* (Alippi a Aguilar, 1998). Spôsoby liečby sú málo efektívne a znehodnocujú včelie produkty. V krajinách Európskej únie, aj v mnohých ďalších, sú postihnuté včelstvá likvidované so značnými ekonomickými stratami. Preto je nutné nájsť účinnú prevenciu, prípadne terapiu tohto ochorenia, s využitím najmä prírodných látok, napríklad probiotík. Táto práca sa zaoberá testovaním podávania probiotických včelích laktobacilov do včelstiev s cieľom sledovať ich vplyv na zloženie črevnej mikroflóry včiel.

## MATERIÁL A METODIKA

### Príprava laktobacilových kultúr:

Pre výskum boli použité kmene *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus plantarum*, ktoré boli vyzolované z tráviacich traktov včiel a následne identifikované. Tieto kmene v predchádzajúcich štúdiách vykazovali dobré probiotické vlastnosti a schopnosť inhibovať rast *P. larvae* (Mudroňová a kol., 2012). V práci boli použité 24 hodinové kultúry laktobacilov, ktoré boli inkubované v MRS bujóne pri 37 °C. Tieto kultúry boli trikrát centrifugované po dobu 30 min. pri 600g a premývané fyziologickým roztokom. Získaný sediment bol rozsuspendovaný v autoklávovej kohútikovej vode tak, aby bola koncentrácia laktobacilov  $10^7 - 10^8$  cfu. ml<sup>-1</sup>.

### Príprava probiotického roztoku:

Na základe predchádzajúceho testovania prežívateľnosti *L. brevis* a *L. plantarum* v rôznych médiách (Kuzyšinová a kol., 2012) bol ako probiotické médium zvolený peľ. Pre každý úl bolo pripravené 0,5 l probiotického roztoku, ktorý pozostával z 50g peľu a autoklávovej kohútikovej vody s pripravenými laktobacilmi. Tento roztok včely prijímali per orálne. Celkovo boli podané 3 dávky probiotických roztokov s odstupom medzi aplikáciami 1 týždeň.

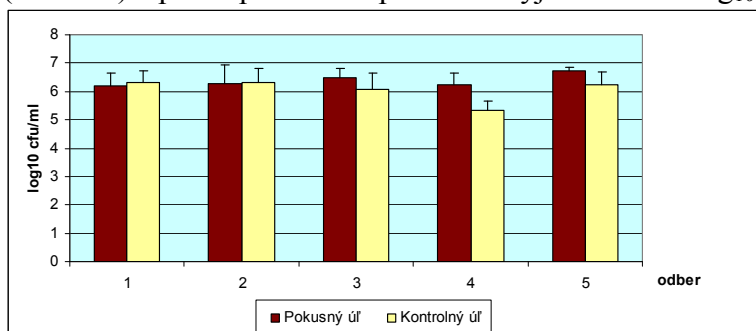
### Rozbor črevnej mikroflóry včiel:

Pred podaním probiotík a počas podávania boli každý týždeň z úl'ov odoberané včely, ktoré boli usmrtené inhalačne éterom. Následne im boli odoberané tráviace trakty, ktoré boli rozsuspendované vo fyziologickom roztoku a riedené desiatkovým riedením. Jednotlivé riedenia boli vysievané na MRS agar (pre stanovenie počtov laktobacilov), MYPGP agar (pre stanovenie počtov *P. larvae*), Endo agar (pre stanovenie počtov enterobaktérií) a MacConkey agar (pre stanovenie počtov koliformných zárodkov). Laktobacily boli kultivované 48 h. pri 37 °C za aneróbnych podmienok, *P. larvae* bol kultivovaný 48 h. pri 37 °C a enterobaktérie a koliformné baktérie boli kultivované 24 h. pri 37 °C.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

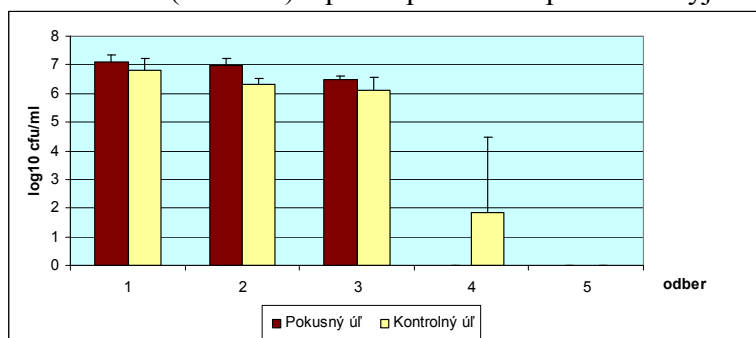
Po podávaní probiotík sa počty laktobacilov v čreve včiel zvýšili, čo poukazuje na schopnosť podávaných kmeňov kolonizovať tráviaci trakt. V kontrolnej skupine mali počty laktobacilov v tráviacom trakte včiel taktiež stúpajúcu tendenciu, čo je spôsobené tým, že samotný peľ obsahuje probiotické laktobacily (Graf 1.).

Graf 1. Počty laktobacilov v tráviacom trakte včiel pred podaním probiotických laktobacilov (1. odber) a počas podávania probiotík vyjadrené ako log<sub>10</sub> cfu/ml (n=9)



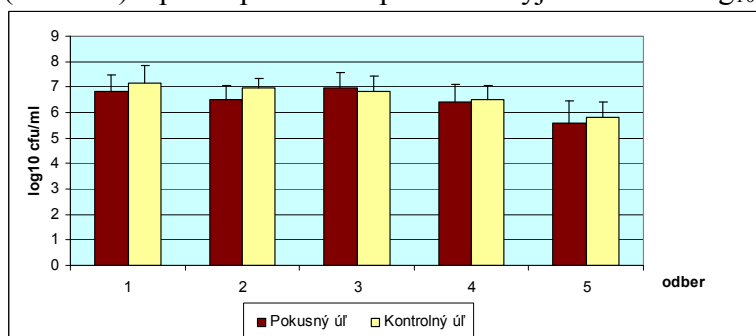
Pred podávaním probiotík bol v tráviacom trakte včiel prítomný *P. larvae* v počtoch približne  $10^7$  cfu/ml, po skončení podávania úplne z tráviaceho traktu vymizol, čo poukazuje na schopnosť *L. brevis* a *L. plantarum* inhibovať rast *P. larvae*. Kontrolná skupina poukazuje na to, že samotné laktobacily prítomné v peľi dokážu taktiež stabilizovať črevnú mikroflóru včiel a sú schopné z nej vytesniť *P. larvae* (Graf 2.).

Graf 2. Počty *Paenibacillus larvae* v tráviacom trakte včiel pred podaním probiotických laktobacilov (1. odber) a počas podávania probiotík vyjadrené ako log<sub>10</sub> cfu/ml (n=9)



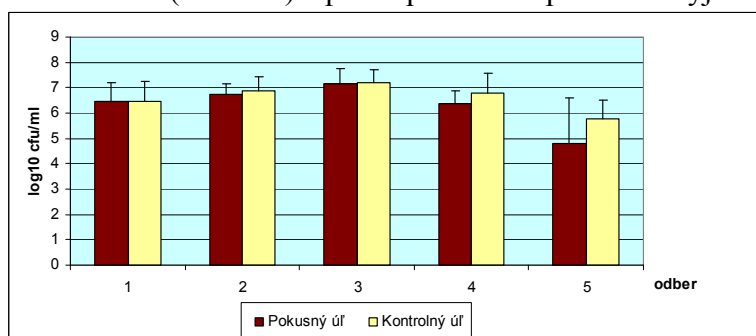
Po podávaní probiotík sa počty enterobaktérií v tráviacom trakte včiel znížili z približne 10<sup>7</sup> cfu/ml na 10<sup>5</sup> – 10<sup>6</sup> cfu/ml, pokles počtov enterobaktérií bol v pokusnej skupine výraznejší ako v kontrolnej skupine (Graf 3.).

Graf 3. Počty enterobaktérií v tráviacom trakte včiel pred podaním probiotických laktobacilov (1. odber) a počas podávania probiotík vyjadrené ako log<sub>10</sub> cfu/ml (n=9)



Počas pokusu sa počty koliformných zárodokov v tráviacom trakte včiel znížili z približne 10<sup>6</sup> cfu/ml na 10<sup>5</sup> cfu/ml, pokles počtov bol v pokusnej skupine výraznejší ako v kontrolnej skupine (Graf 4.).

Graf 4. Počty koliformných zárodokov v tráviacom trakte včiel pred podaním probiotických laktobacilov (1. odber) a počas podávania probiotík vyjadrené ako log<sub>10</sub> cfu/ml (n=9)



Probiotické baktérie osídľujú črevné prostredie a vytlačujú z neho patogénne mikroorganizmy. Podobne ako u vyšších stavovcov, aj u včiel zohrávajú dôležitú úlohu pri stabilizácii črevnej mikroflóry a podpory imunitného systému. Podľa našich výskumov, sú probiotické laktobacily schopné inhibovať rast *P. larvae* a stabilizovať mikrobiálne prostredie tráviaceho traktu včiel. K podobným záverom došli aj Canganella a Balsamo (2008), ktorí

dokázali inhibičné pôsobenie laktobacilov voči *P. larvae* a *P. alvei* (pôvodca hniloby včelieho plodu). Forsgren a kol. (2010) zaznamenali u laktobacilov a bifidobaktérií vyzolovaných zo žalúdka včiel schopnosť inhibovať rast *P. larvae*. Taktiež podávali laktobacily priamo včelím larvám v materskej kašičke, pričom zaznamenali signifikantne nižší počet nakazených lariiev. Samotná materská kašička obsahuje živé mliečne baktérie, ktoré sa do nej dostávajú zo žalúdka dospelých včiel a hrajú kľúčovú úlohu pri produkcii materskej kašičky z peľu. Sú pridávané k peľu spolu s nektárom vyvrhnutým zo žalúdka (Forsgren a kol., 2010). Inokulácia lariiev prospešnou črevnou mikroflórou môže zabrániť germinácii a proliferácii spór *P. larvae* v strednom úseku ich čreva a tak zabrániť infekcii.

#### POĎAKOVANIE

Práca bola riešená v rámci projektu 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.
- 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.
- Kuzyšinová K, Mudroňová D, Toporčák J, Molnár L. Vývoj aplikačnej formy probiotického prípravku pre včely. Zborník abstraktov, Študentská vedecká a odborná činnosť, 55. ročník, 25. apríl 2012, Košice, s. 40 – 41. ISBN 978-80-8077-277-2.
- Mudroňová D, Kuzyšinová K, Toporčák J, Nemcová R, Gancarčíková S, Hajdučková V. Selection of probiotic lactobacilli designed for the prevention of American Foulbrood. *Folia Veterinaria*. 2012; 55(4): 127 – 132. ISSN 0015-5748.



## VPLYV DEPRENYLU NA SELEKTÍVNE VULNERABILNÉ OBLASTI MOZGU

Lalkovičová M.<sup>1</sup>, Mihálik J.<sup>2</sup>, Danielisová V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Neurobiologický ústav, SAV, Košice*

<sup>2</sup> *Ústav anatómie, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice*

### ABSTRAKT

V našej práci sme sledovali účinok inhibítora monoamínoxidáz – deprenylu na selektívne vulnerabilné neuróny vo vybraných oblastiach mozgu potkana. Deprenyl bol podávaný po dobu 30-tich dní v dvoch rôznych koncentráciách a po ukončení experimentu boli sledované zmeny v hipokampe a striate. Zvieratá boli rozdelené do troch skupín: kontrolná skupina, skupina s dávkou deprenylu 0,0025 mg/kg a s 0,25 mg/kg dávkou deprenylu. Histologickými analýzami tkaniva sa zistili zmeny v štruktúre a celistvosti buniek ako aj zníženie ich počtu v oboch hemisférach mozgu. V skupine zvierat s nízkou koncentráciou v porovnaní s kontrolnou skupinou sme pozorovali signifikantné zmeny v počte neurónov v CA1 oblasti hipokampu a v oblasti dentate gyrus, menej výrazné zmeny sme sledovali v oblasti corpus striatum – v jeho dorzolaterálnej časti. Nezaznamenali sme výrazné rozdiely vo výsledkoch pri podaní nízkej a vysokej dávky deprenylu v žiadnej zo sledovaných oblastí. Napriek jeho známym neuroprotektívnym účinkom naše doterajšie výsledky naznačujú, že v selektívne vulnerabilných oblastiach mozgu po jeho aplikácii dochádza k pozorovateľným a merateľným neurodegeneratívnym zmenám.

### ÚVOD

Neuróny mozgu dospelého cicavca sú veľmi ťažko schopné regenerácie po poškodení. Preto akékoľvek poškodenie môže mať trvalé následky a vyústiť až do neurologickej dysfunkcie. Medzi dôležité patofyziologické mechanizmy poškodenia mozgu patrí ischemia, ktorá nastáva pri výraznej redukcii alebo úplnom zastavení krvného zásobovania tkaniva. Neuróny sa líšia v senzitivite voči ischemickému zásahu a vo svojej schopnosti zotaviť sa z takéhoto zásahu. Ak je čas trvania globálnej ischemie relatívne krátky, určité regióny mozgu sa ukázali byť náchylnejšie k neuronálnemu poškodeniu ako ostatné. Tento fenomén je známy pod pojmom selektívna vulnerabilita a bunky v týchto oblastiach sa nazývajú selektívne vulnerabilné (Brierley J. B. a Graham D. I., 1984). Pri poškodení nervovej bunky nastáva okrem iných procesov zastavenie a predĺžená inhibícia proteosyntézy. Vo veľmi citlivých oblastiach mozgu sa proteosyntéza nikdy neobnoví a bunky odumierajú.

Deprenyl (selegilín) je ireverzibilný inhibítor monoamínoxidáz podtypu B (MAO-B). Monoamínoxidázy sú enzýmy uložené na vonkajších membránach mitochondrií a ich inhibítory sa používajú pri liečbe psychiatrických a neurologických ochorení. Deprenyl je odvodený od propargylamínu (Knoll a Magyar, 1972), ktorý v nízkych dávkach selektívne inhibuje oxidačnú deamináciu dopamínu, benzylamínu a fenyletylamínu. Vo vysokých dávkach stráca selektivitu a začína inhibovať aj MAO-A, čím dochádza k vzostupu hladín serotonínu a noradrenalínu v organizme. Úspešne bol použitý v klinických štúdiách pri liečbe Parkinsonovej choroby (Birkmayer a kol., 1975). Mechanizmus účinku deprenylu je komplexný, okrem inhibičnej schopnosti chráni nervové bunky proti celej škále neurotoxínov, ktoré poškodzujú dopaminergické, cholinergické a serotonergické neuróny (Ebadi a kol., 2002). Zlepšuje psychomotorickú rýchlosť, bdelosť a dlhodobú pamäť. Nízke dávky deprenylu ale nespôsobujú žiadny alebo iba nevýznamný pokles aktivity MAO-B (Tatton a kol., 1996). Podávanie deprenylu vo vyšších dávkach síce úplne inhibuje aktivitu MAO-B ale vyvoláva apoptózu v kultivovaných nervových bunkách (Le a kol., 1997), čo by mohlo vysvetľovať následný nižší neuroprotektívny účinok (Shite a kol., 2000).

Naším cieľom je štúdium a objasnenie vplyvu deprenylu na citlivé oblasti mozgového tkaniva, rozsah jeho neuroprotektívnych vlastností ako aj možného apoptotického efektu na selektívne vulnérabilné neuróny.

## MATERIÁL A METODIKA

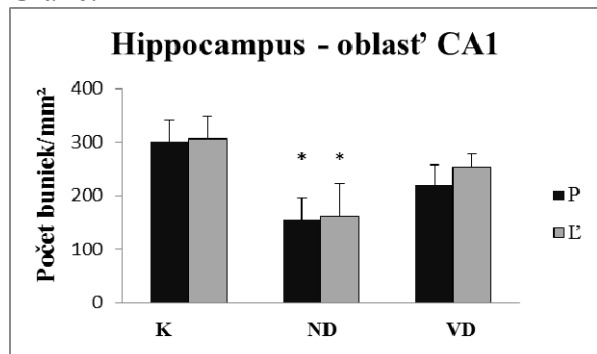
Do pokusu bolo zaradených 15 samcov potkana kmeňa Wistar. Zvieratá boli tri mesiace staré o priemernej hmotnosti 390 g a boli náhodne rozdelené do troch skupín po 5 zvierat. Pokus trval 30 dní. Kontrolnej skupine bol intra peritoneálne (i.p.) aplikovaný roztok aqua pro injectione. Druhej skupine bola aplikovaná nízka dávka deprenylu 0,0025 mg/kg i.p. (Sigma, M003) rozpusteného v aqua pro injectione (t.j. 10<sup>-5</sup>M). Tretej skupine bola vysoká dávka deprenylu 0,25 mg/kg podávaná i.p., ktorý bol rozpustený v aqua pro injectione (t.j. 10<sup>-3</sup>M). Po ukončení aplikácie boli zvieratá usmrtené letálnou dávkou tiopentalu (40 mg/kg) a boli transkardiálne prepláchnuté 150 ml PBS. Mozog bol izolovaný, vložený na 3 hodiny do 4% paraformaldehydu a po postfixácii preložený do kryoprotektíva 30% sacharózy. Následne bol krájaný na kryostate na 30 µm rezy. Rezy boli ďalej histologicky spracované a farbené hematoxíliom/eozínom. Na mikroskope Olympus BX 51 s digitálnou kamerou DP50 sme počítali bunky v strednej lineárnej časti CA1 oblasti, dentate gyrus a v dorzolaterálnej oblasti striata použitím Image tool software (UTHSCSA, San Antonio, USA). Štatistická analýza dát bola vykonaná pomocou jednosmernej analýzy rozptylu (ANOVA) s použitím následného Duncanovho post-hoc testu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

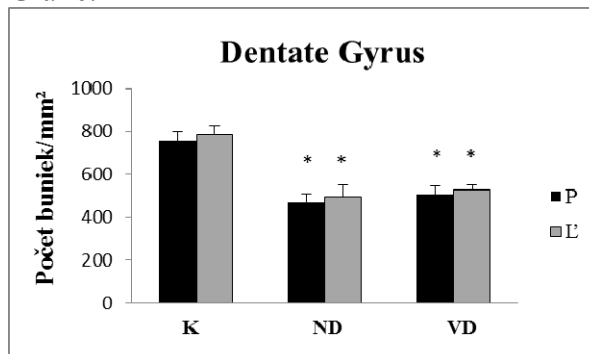
V grafickom vyhodnotení sú uvedené všetky pokusné skupiny a počet buniek v pravej a ľavej hemisfére sledovaných oblastí mozgu. Pri mikroskopickom pozorovaní boli viditeľné štrukturálne zmeny buniek, nastupujúce apoptotické zmeny ako aj postupný úbytok buniek najmä v CA1 oblasti hipokampu, čo sa potvrdilo aj štatistickou analýzou. Štatisticky významný rozdiel bol zaznamenaný po aplikácii nízkej dávky deprenylu v oboch hemisférach mozgu (Graf č.1). V gyrus dentatus sme zaznamenali štatistickú významnosť po aplikácii nízkej aj vysokej dávky deprenylu ako v pravej, tak aj v ľavej hemisfére (Graf č.2). Počet buniek v dorzolaterálnej oblasti striata bol nižší po podávaní oboch dávok deprenylu v porovnaní s kontrolou (Graf č.3).

Dlhodobé podávanie deprenylu zrejme spôsobuje neurodegeneratívne zmeny v selektívne vulnérabilných oblastiach mozgu. Na presné stanovenie tohto procesu je ale potrebné použiť aj ďalšie metódy.

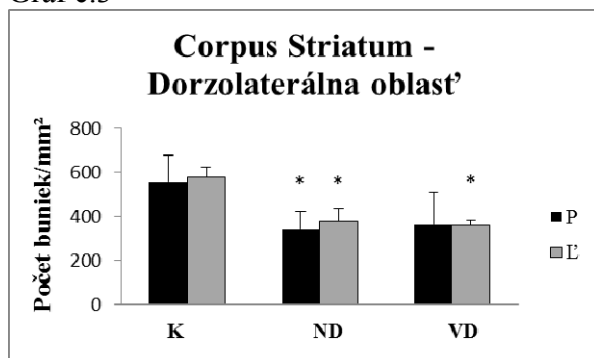
Graf č.1



Graf č.2



Graf č.3



Klinické štúdie preukázali využitie deprenylu ako antidepresíva, avšak v 3-6 krát vyšších dávkach ako sa použili pri liečbe Parkinsonovej choroby (Mann a kol., 1989). V týchto dávkach už deprenyl stráca svoju selektivitu pre MAO-B. Tiež sa zistilo, že transdermálna aplikácia 6-8 krát účinnejšie inhibovala MAO-A v nervovom tkanive mozgu a MAO-B bolo týmto spôsobom inhibované viac ako z 95% (Mawhinney a kol., 2003), čo by mohlo znížiť neurodegeneráciu a napomôcť tak potenciálnemu terapeutickému účinku.

#### POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantmi VEGA 2/0066/12, 1/0928/11 a schválená štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR pod číslom pokusu: Č. k. Ro-1757/10-221b

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Birkmeyer W, Riederer P, Youdim MBH, Linauer W. The potentiation of the antikinetic effect after L-dopa treatment by an inhibitor of MAO-B, L-deprenyl. *J Neural Trans.* 1975; 36: 303-326
- Brierley JB, Graham DI. (1984) Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system. *Greenfield's Neuropathology*, 4th edn. 1984; 125207.
- Ebadi M, Sharma S, Shavali S, el Refaey H. Neuroprotective actions of selegiline. *Journal of Neuroscience Research.* 2002; 67: 258-259
- Knoll J, Magyar K. Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. *Adv Biochem Psychopharmacopol.* 1972; 5: 393-408
- Le W, Jankowic J, Xie W, Kong R, Appel S. (-)-Deprenyl protection of 1-methyl-4-phenylpyridium ion (MPP+)-induced apoptosis independent of MAO-B inhibition. *Neurosci Lett.* 1997; 224:197-200
- Mann JJ, Aarons SF, Wilner PJ, Keilp JG, Sweeny JA, Pearlstein T, Frances AJ, Kocsis JH, Brown RP. A controlled study of the antidepressant efficacy and side effects of (-) deprenyl. *Arch Gen Psychiatry.* 1998; 46:45-50
- Mawhinney M, Cole D, Azzaro AJ. Daily transdermal administration of selegiline to Guinea pigs preferentially inhibits monoamine oxidase activity in brain when compared with intestinal and hepatic tissues. *Pharmacy and Pharmacology.* 2003; 55:27-34
- Shite J, Dong E, Kawai H, Stevens SY, Liang C-S. Selegiline improves cardiac sympathetic terminal function and  $\beta$ -adrenergic responsiveness in heart failure. *Am J Physiol, Heart Circ Physiol.* 2000; 279:H1283-H1290
- Tatton WG, Wadia JS, Ju WJ, Chalmers-Redman RM, Tatton NA, (-)-Deprenyl reduces neuronal apoptosis and facilitates neuronal outgrowth by altering protein synthesis without inhibiting monoamine oxidase. *Neural Transm Suppl.* 1996; 48:45-59

# VPLYV VETERNEJ KALAMITY NA SPOLOČENSTVÁ PÔDNYCH ČLÁNKONOŽCOV NA KALAMITNÝCH PLOCHÁCH SMREKOVÉHO LESA V TANAP-E

Lóšková J.<sup>1</sup>, Čuchta P.<sup>1</sup>, Miklisová D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice

<sup>2</sup> Parazitologický ústav, SAV, Košice

## ABSTRAKT

V novembri 2004 zasiahla Vysoké Tatry veterná kalamita, ktorá zničila približne 12 000 ha smrekového lesa. Prevažná väčšina vetrom poškodeného územia bola odťažená, len malá časť bola ponechaná na samovývoj. Výskum pôdnych článkonožcov sa uskutočnil v priebehu rokov 2005-2007 na 3 rozlične manažovaných plochách: vetrom nepoškodená, kontrolná plocha (REF); vetrom poškodená plocha s odťaženým drevom (EXT); vetrom poškodená plocha ponechaná na prírodnú sukcesiu (NEX). Pôdne vzorky boli odoberané na každej ploche raz ročne (jeseň). Cieľom nášho výskumu bolo posúdiť vplyv rôzneho typu lesného manažmentu na spoločenstvá pôdnych článkonožcov v priebehu prvých troch rokov po veternej disturbancii. Počas sledovaného obdobia bolo identifikovaných 15 skupín pôdnych článkonožcov predstavujúcich 29913 jedincov. Najpočetnejšími skupinami počas sledovaného obdobia boli Oribatida a Collembolla. Signifikantný pokles abundancie pôdnych článkonožcov sme zaznamenali na EXT ploche ( $p < 0,0005$ ), ako aj na NEX ploche ( $p < 0,05$ ) v porovnaní s REF. Značný rozdiel v abundancii článkonožcov ( $p < 0,05$ ) sa potvrdil aj medzi NEX a EXT plochou. Vychádzajúc z abundancií článkonožcov sa ukazuje ponechanie kalamitného dreva na mieste vhodnejším typom manažmentu, ako jeho odťaženie.

## ÚVOD

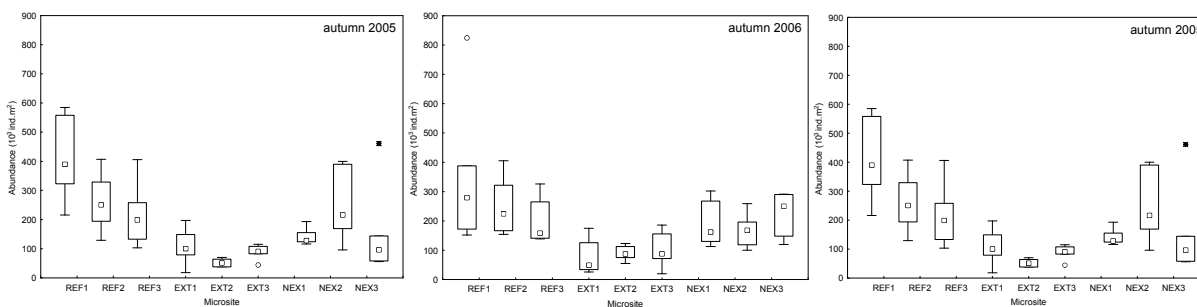
V novembri 2004 silný severozápadný vietor zrovnal so zemou lesy na úpätí juhovýchodných svahov Tatranského národného parku. Priemerná rýchlosť vetra dosahovala 90 - 115 km/h, na vrchole hôr cez 170 km/h. (Švajda a kol., 2005). Táto víchrica od Podbanského po Tatranskú kotlinu v páse širokom približne 2 - 5 km a dlhom 40 - 50 km vyvrátila alebo polámala lesné porasty na ploche okolo 12 tis. ha (Vološčuk, 2005). Drevná hmota bola z väčšej časti pokalamitnej plochy vyťažená, kvôli obavám z premnoženia podkôrnika a vzniku požiarov, menšia časť (1,55%) bola ponechaná na samovývoj (Falt'an, 2007). Podľa Ilissona a kol. (2007), vyťažením drevnej hmoty za pomoci ťažkých mechanizmov sa zvyšuje sila disturbancií a stupeň poškodenia daného územia. Dochádza k redukcii až eliminácii biologického dedičstva, modifikujú sa vzácne habitaty vznikajúce po disturbanciách, ovplyvňuje sa zloženie komunit, oslabuje prirodzená obnova vegetácie. Lesné hospodárenie a využívanie lesov má vplyv na pôdnu faunu a tým aj na procesy, na ktorých pôdna fauna participuje (Shaw a kol., 1991). Jednou z najčastejšie používaných hospodárskych aktivít v lesoch silne poškodených víchricou je úplné vyťaženie kmeňov. Následne dochádza k odtieneniu pôdneho povrchu, rozkolísaniu pôdnej mikroklímy a vystaveniu povrchu pôdy intenzívnejšiemu vysychaniu (Ulanova, 2000; Ilisson a kol., 2007). Po disturbanciách spôsobených požiarimi, vetrom, premnožením hmyzu nastupuje sekundárna sukcesia a smeruje k vytvoreniu pestrej mozaiky stanovišť (Schultze a kol., 2005). Detailným štúdiom štruktúry spoločenstiev pôdnej fauny habitatov alpskeho stupňa Vysokých Tatier sa zaoberali viacerí autori (napr. Rusek, 1993; Tajovský, 1997; Stašiov a Bitušík, 2001). Stručnú charakteristiku bezstavovcov, prevažne chrobákov viazaných svojim výskytom na charakteristické ekosystémy Vysokých Tatier, načrtol Majzlan (1994). Cieľom našej štúdie bolo zhodnotiť vplyv veternej kalamity a odlišných spôsobov hospodárenia (odťaženie kalamitného dreva, ponechanie porastu na samovývoj) na modelové spoločenstvá pôdnej fauny počas prvých troch rokov po veternej kalamite.

## MATERIÁL A METÓDY

V spolupráci s Výskumnou stanicou Štátnych lesov TANAP-u boli na pokalamitnom území Vysokých Tatier vybraté tri experimentálne plochy: (1) REF - vetrom nepoškodená plocha (kontrolná) - lokalita Smrekovec v blízkosti Vyšných Hágov; (2) EXT - vetrom poškodená plocha s následne odťaženým kalamitným drevom – lokalita Danielov Dom v blízkosti Novej Polianky; (3) NEX - vetrom poškodená plocha s ponechaným kalamitným drevom - lokalita Jamy v blízkosti Tatranskej Lomnice. Všetky plochy majú J–JV expozíciu svahu, nadmorskú výšku okolo 1000-1250 m n.m. Dominantným pôdnym typom je kambizem ležiaca na glaciálnej moréne (Gömöryová, 2011). Vzorky boli odoberané v rokoch 2005, 2006 a 2007 raz ročne (september/október). Na každej ploche boli vymedzené 3 výskumné stanovišťa (opakovania). Z každého stanovišťa bolo odobratých 6 pôdných vzoriek pôdnou sondou s priemerom 3,6 cm (10 cm<sup>2</sup>) do hĺbky 8-10 cm. Vzorky boli prepravené do laboratória a následne extrahované 7 dní vo vysoko gradientnom aparáte (Crossley a Blair, 1991). Získaná fauna bola skladovaná v 75 % benzín alkohole a uchovávaná v sklenených skúmavkách. Pomocou stereoskopickej lupy boli článkonožce sčítané a roztriedené do skupín. Analyzované boli základné ekologické parametre spoločenstiev - abundancia, indexy diverzity (Shannon, Pielou). Abundancie článkonožcov pre jednotlivé plochy boli testované box-plot analýzou a použitím dvojfaktorového neparametrického ANOVA testu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počas troch rokov bolo indentifikovaných 15 skupín pôdných článkonožcov predstavujúcich 29 913 jedincov (Tab. 1). Výrazný pokles abundancie pôdných článkonožcov ( $p < 0,0005$ ) sme zaznamenali na ploche s odťaženým kalamitným drevom (EXT) v porovnaní s kontrolnou, vetrom nepoškodenou plochou (REF) (Obr. 1). Na kalamitnej ploche ponechanej na samovývoj (NEX) sme zistili dvojnásobne vyššie abundancie článkonožcov ako na odťaženej ploche (EXT), ( $p < 0,05$ ). Signifikantný pokles ( $p < 0,05$ ) abundancie článkonožcov bol zistený aj na NEX ploche v porovnaní s REF (Obr. 1). Hodnoty abundancií jednotlivých skupín na neodťaženej ploche (NEX) sa viac približujú ku kontrolnej (REF), ako k odťaženej ploche (EXT).



**Obr. 1** Abundancia [ind.m<sup>-2</sup>] článkonožcov na študovaných plochách v rokoch 2005-2007.

Legenda: Medián; Box: Percentily – 25 %, 75 %; zvislé čiary- neodťahlé- min. a max.; ○ odťahlé hodnoty, \* extrémne hodnoty

Oribatida a Collembola spolu predstavovali viac ako 80 % zistených článkonožcov na všetkých lokalitách počas sledovaného obdobia. Pokles abundancie jednotlivých skupín pôdných článkonožcov po odťažení drevnej hmoty bol pravdepodobne vyvolaný zmenou vlastností prostredia. Odťaženie kalamitného dreva spôsobuje väčší dopad slnečných lúčov na povrch pôdy, zväčšujú sa výkyvy teplôt, menia sa vlhkosťné podmienky pôdy (Wallwork, 1976), dochádza k prerušeniu mykorrhíznych interakcií (Siira-Pietikäinen a kol., 2001), čo boli zrejme hlavné príčiny niekoľkonásobného poklesu abundancie Oribatida na EXT ploche

v porovnaní s NEX a REF plochou. Pokles početnosti na EXT ploche sme zaznamenali aj u Protura a Pauropoda, rovnaký stav zistil aj Rusek (2006) na odťaženej ploche v CHKO Šumava. Rovnako ako Addison a Barber (1997), ani my sme nezaznamenali výrazné zmeny v abundancii Collembola medzi EXT a REF plochou, čo je v protiklade so zistením Huhtu a kol. (1969), ktorý zaznamenal prudký nárast početnosti Collembola 1-2 roky po odťažení kalamitného dreva. Podľa Wallworka (1976), prídavok organického materiálu môže podporiť rast húb a baktérií, čo môže dočasne (kým sa nevyčerpajú zásoby organického materiálu) spôsobiť prudký nárast populácie Collembola, Oribatida, Coleoptera na EXT ploche, čo sa v našom prípade potvrdilo len pre Oribatida, pričom u Coleoptera sme naopak zaznamenali pokles abundancie.

Najvyššie indexy diverzity aj ekvitability boli zistené na EXT ploche, čo pravdepodobne súvisí s väčšou vyrovnanosťou abundancií jednotlivých skupín na danej ploche. Naopak, niekoľkonásobne prevyšujúce abundancie niektorých skupín (Oribatida, Collembola, Gamasina) v porovnaní s menej početnými skupinami, mali za následok pokles hodnôt oboch indexov na REF ploche (Tab. 1).

**Tab. 1** Priemerná abundancia [ind.m<sup>-2</sup>] skupín pôdných článkonožcov na kalamitných plochách TANAP-u počas rokov 2005-2007

Groups	REF			EXT			NEX		
	2005	2006	2007	2005	2006	2007	2005	2006	2007
Oribatida	244889	221500	274722	45944	53556	39222	148722	148000	94889
Collembola	22667	24722	26889	15889	23056	26889	18667	29667	37167
Gamasina	7778	5944	7278	8889	5000	5278	3056	3722	4667
Uropodina	7000	5833	7000	5611	2611	3278	4500	4667	4944
Actinedida	2278	2444	4222	2389	1778	1944	2000	3611	3611
Acaridida	2778	778	1833	889	1778	1222	444	3444	1167
Coleoptera	1389	1333	1444	722	556	1222	1944	389	833
Protura	833	1556	1222	667	222	111	278	111	111
Symphyla	500	667	444	444	500	167	167	333	1167
Diptera adults	111	222	111	611	111	111	56	167	333
Araneida	111	111	0	111	222	0	167	56	0
Pseudoscorpionida	222	56	56	56	0	56	0	0	56
Chilopoda	111	167	0	56	0	0	0	0	56
Campodeina	56	56	56	0	0	0	0	0	0
other groups	4833	111	389	389	0	111	167	111	0
<b>Σ abundancie</b>	<b>295556</b>	<b>265500</b>	<b>325667</b>	<b>82667</b>	<b>89389</b>	<b>79611</b>	<b>180167</b>	<b>194278</b>	<b>149000</b>
Sannon's diversity (H)	0,754	0,694	0,670	1,406	1,175	1,291	0,700	0,845	1,075
Pielou's evenness (J)	0,279	0,256	0,261	0,533	0,490	0,520	0,282	0,340	0,433

## POĎAKOVANIE

Výskum pôdnej fauny na kalamitných plochách vo Vysokých Tatrách bol podporený grantom VEGA č. 1/0282/11.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

Addison J. A., Barber K. N. Response of soil invertebrates to clear-cutting and partial cutting in a boreal mixedwood forest in Northern Ontario. Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Great Lakes Forestry Centre, Sault Ste. Marie, Ont. Info. Rep. GLC-X-1. 1997.

- Crossley D. A., Blair J.M. A high efficiency, "lowtechnology" Tullgren-type extractor for soil microarthropods. *Agric. Ecosyst. Environ.* 1991; 34:187-192.
- Falt'an V. Výskum a mapovanie zmien krajinej pokrývky v oblasti Štrbské Pleso – Tatranská Lesná po veternej kalamite v roku 2004, Pokalamitný výskum v TANAP-e 2007, Tatranská Lomnica, 25.-26. októbra 2007. Geofyzikálny ústav SAV, 1–14.
- Gömöryová E., Střelcová K., Fleischer P., Gömöry D. Soil microbial characteristics at the monitoring plots on windthrow areas of the Tatra National Park (Slovakia): their assessment as environmental indicators. *Environ. Monit. Assess.* 2011; 174:31-45.
- Huhta V., Nurminen M., Valpas A. Further notes on the effect of silvicultural practices upon the fauna of coniferous forest soil. *Ann. Zool. Fennici.* 1969; 6:327-334.
- Ilisson T., Köster K., Vodde F., Jögiste K. Regeneration development 4–5 years after a storm in Norway spruce dominated forests, Estonia. *Forest Ecol. Manag.* 2007; 250: 17–24.
- Majzlan O. Bezstavovce. In: Vološčuk, I. a kol. (eds.): *Tatranský národný park*. Gradus, Martin, 1994; 162-179.
- Rusek J. Air-pollution-mediated changes in alpine ecosystems and ecotones. *Ecol. Appl.* 1993; 3:409-416.
- Rusek, J. Závěrečná zpráva o řešení projektu VaV za roky 2004 – 2005. Projekt VaV ev. č. SM/6/1/04 „Výzkum a monitoring biodiverzity půdní fauny a humusu ve smrčínách postižených kůrovcem v CHKO Šumava“. BC AV ČR, Ústav půdní biologie, České Budějovice, 2006; 48s.
- Schulze E.D., Wirth C., Mollicone D., Ziegler W. Succession after stand replacing disturbances by fire, wind throw, and insects in the dark Taiga of Central Siberia. *Oecologia*, 2005; 146:77–88.
- Shaw C. H., Lundkvist H., Moldenke A., Boyle J. R. The relationships of soil fauna to long term forest productivity in temperate and boreal ecosystems: processes and research strategies. In: Dyck W.J., Mees C.A. (eds.) *Long-term field trials to assess environmental impact of harvesting*. IEA/BE T6/A6 Report No. 5, Forest Research Institute, Rotorua, New Zealand, FRI Bulletin No., 1991; 161:39-77.
- Siira-Pietikäinen, A., Haimi, J., Kanninen, A., Pietikäinen, J., Fritze, H. Response of decomposer community to root-isolation and addition of slash. *Soil Biol. Biochem.* 2001; 33:1993-2004.
- Stašiov S., Bitušík, P. Rozšírenie troch skupín epigeickej makrofauny pozdĺž výškového gradientu v doline Nefcerka (Vysoké Tatry): kosce (Opilionida), mnohonôžky (Diplopoda), stonôžky (Chilopoda). *Acta facultatis ecologiae*, Zvolen, 2001; 8:115- 121.
- Švajda J., Vančura T., Vološčuk I. Desať mesiacov po víchrici v Tatrách. *Fakty a dokumenty*. Vydavateľstvo Technickej univerzity vo Zvolene, 2005; 1-294.
- Ulanova, N.G. The effects of windthrow on forests at different spatial scales: a review. *Forest Ecol. Manag.* 2000; 135:155-167.
- Tajovský K. Distribution of the millipedes along an altitudinal gradient in three mountain regions in the Czech and Slovak Republics (Diplopoda). In: Enghoff H. (ed.): *Many-legged animals - A collection of papers on Myriapoda and Onychophora*. Proc. 10th Int Congr. Myriapodology, Copenhagen, 29 Jul.-2 Aug. 1996, *Entomol. scand., Suppl.* 51, 1997; p. 225-233.
- Vološčuk I. Teoretické a praktické aspekty vetrovej disturbancie lesných ekosystémov v TANAP-e. *Ochrana prírody*, Banská Bystrica, 2005; 24:5-20.
- Wallwork, J.A. *The Distribution and Diversity of Soil Fauna*. Academic Press, London, 1976; 356s.

## MOLEKULOVÝ SKRÍNING MITOCHONDRIÁLNYCH COX1 HAPLOTYPOV CHORVÁTSKÝCH POPULÁCIÍ *FASCIOLOIDES MAGNA* METÓDOU HRM

Malčická M.<sup>1</sup>, Bazsalovicsová E.<sup>1</sup>, Radvánszky J.<sup>2</sup>, Králová-Hromadová I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, Košice

<sup>2</sup>Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Vlárská 5, Bratislava

### ABSTRAKT

Pomocou metódy high-resolution melting bola analyzovaná štruktúra a frekvencia mitochondriálnych haplotypov proteín kódujúceho génu, podjednotky 1 cytochrómu oxidázy (*cox1*), u novo sa objavujúcej chorvátskej populácie pečeneňového parazita prežúvavcov, *Fascioloides magna*. Cieľom práce bolo porovnať genetickú skladbu analyzovanej populácie s ďalšími európskymi populáciami parazita a zistiť pôvod chorvátskej populácie. PCR amplifikáciou *cox1* génu a následnou HRM analýzou boli determinované dva štrukturálne odlišné haplotypy, ktorých štruktúra jednoznačne potvrdila podunajský pôvod tohto najnovšieho a stále expandujúceho európskeho ohniska *F. magna*.

### ÚVOD

*Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae) je závažný pečeneňový parazit širokého spektra voľne žijúcich a domácich prežúvavcov, ktorý je primárne lokalizovaný vo fibróznych pseudocystách parenchýmu pečene definitívnych hostiteľov. Pôvod *F. magna* je na severoamerickom kontinente, kde sa v súčasnosti vyskytuje v piatich enzootických oblastiach (1) oblasť Veľkých jazier, (2) Golfské pobrežie, dolné Mississippi a južné pobrežie Atlantiku, (3) severné pobrežie Tichého oceánu, (4) Skalisté hory, (5) a severný Quebec a Labrador (Pybus, 2001). V 19. storočí bol tento parazit spolu so svojimi hostiteľmi, jeleňmi wapiti introdukovaný do talianskeho prírodného parku La Mandria z amerického štátu Wyoming. (Apostolo, 1996). Ďalšími európskymi ohniskami výskytu parazita sa stali stredné a južné Čechy a oblasť Dunajských lužných lesov, avšak pôvod týchto dvoch ohnísk nebol doteraz známy. Pomocou molekulárnych analýz vybraných variabilných úsekov mitochondriálnej DNA bol nedávno objasnený pôvod všetkých európskych populácií parazita (Taliansko, Česká Republika, oblasť Dunajských lužných lesov) a bola dokázaná viacnásobná introdukcia *F. magna* do Európy z USA. Boli potvrdené dve nezávislé fylogenetické línie parazita, pričom prvú líniu tvorili populácie z Talianska a amerického severozápadu a druhú líniu reprezentovali české a podunajské populácie a jedince z juhovýchodného pobrežia USA. Porovnávací analýza vylúčila možnosť introdukcie parazita do ďalších dvoch európskych ohnísk z primárneho ohniska v Taliansku. Na druhej strane identické haplotypy v Čechách a v oblasti Dunajských lužných lesov (Slovensko, Maďarsko) poukázali na to, že do podunajskej oblasti sa *F. magna* dostala pravdepodobne importom nakazených jeleňov z Čiech (Králová-Hromadová a kol., 2011). Dunajské lužné lesy, ktoré predstavujú veľmi špecifický a unikátny biotop, poskytujú optimálne prostredie pre medzihostiteľov – vodných ulitníkov (*Galba truncatula*), ako aj voľné migračné cesty pre definitívnych hostiteľov. Vďaka týmto priaznivým ekologickým podmienkam sa neustále objavujú nové oblasti výskytu *F. magna*, naposledy v Chorvátsku a v Srbsku (Marinculić a kol., 2002; Marinković a Nesic, 2008).

Pre štúdium pôvodu populácií *F. magna* bolo nevyhnutné analyzovať široké spektrum vzoriek z rôznych geografických oblastí parazita, čo kládlo vysoké časové a finančné nároky na sekvenčné analýzy. Metóda high-resolution melting (HRM) je rýchla a spoľahlivá technika zameraná na detekciu nukleotidových variácií a skrining rôznych genotypov, čo umožňuje podrobiť sekvenčnej analýze iba vybraných reprezentantov špecifických genotypov. Z tohto dôvodu bola táto metóda nedávno optimalizovaná a úspešne využitá na typizáciu európskych populácií *F. magna* (Radvánsky a kol., 2011). Za účelom optimalizácie



metódy a pre lepšie rozlíšenie teplotných kriviek a reprodukovateľnosť získaných výsledkov boli navrhnuté tri vnútorné oligonukleotidové sondy, za pomoci ktorých boli detegované jedinečné genetické varianty u populácií *F. magna* (Radvánský a kol., 2011).

Cieľom tejto práce bolo pomocou špecificky modifikovanej metódy HRM stanoviť štruktúru a frekvenciu mitochondriálnych *cox1* haplotypov u novo sa objavujúcej chorvátskej populácie *F. magna*, získané výsledky porovnať s doterajšími poznatkami o európskych populáciách parazita a zistiť pôvod chorvátskych jedincov.

## MATERIÁL A METODIKA

Dospelé jedince *F. magna* boli získané pitvou fibrózných cýst pečeni jeleňa lesného (*Cervus elaphus elaphus*), premyté v PBS roztoku a fixované v 96 % etanole. Celkovo bolo analyzovaných 200 jedincov *F. magna*, ktoré pochádzali z 19 pečeni definitívnych hostiteľov z lokality Tikveš na severozápade Chorvátska.

### Izolácia DNA

Genomická DNA (gDNA) dospelých jedincov bola získaná z 20 mg tkaniva parazita klasickou fenol-chloroform-izoamylalkoholovou extrakciou (Králová-Hromadová a kol., 2008). Izolovaná gDNA bola rozpustená v 50  $\mu$ l deionizovanej vody a uchovávaná pri -20°C.

### PCR amplifikácia

Na PCR amplifikáciu variabilného úseku *cox1* (~440 bp) mitochondriálnej DNA boli použité primery navrhnuté v práci Králová-Hromadová a kol. (2008). Amplifikácia bola vykonaná v 96-jamkových platničkách v podmienkach asymetrickej PCR reakcie s pridaním DNA viažucej fluorescenčnej farbičky LCGreen Plus (Idaho Technology, USA) a troch vnútorných oligonukleotidových sond navrhnutých v práci Radvánský a kol. (2011). Reakčná zmes bola prekrytá 15  $\mu$ l vrstvou minerálneho oleja (Sigma, USA). Po amplifikácii boli PCR produkty zahriate na 94°C po dobu 30 sekúnd a následne ochladené na 25°C.

### High-resolution melting (HRM) analýza

Teplotné krivky vzoriek boli získané pomocou prístroja LightScanner (Idaho Technology, USA). Pomocou postupného zahrievania od 40°C do 95°C bolo navodené topenie DNA za súčasného zaznamenávania hladiny fluorescencie. Po ochladení vzoriek bol proces topenia zopakovaný za rovnakých podmienok. Disociačné správanie hlavného amplikónu a vnútorných sond bolo zaznamenané vo forme fluorescenčných kriviek, ktoré umožňujú porovnať teplotné profily jednotlivých vzoriek. Ako referenčné boli použité vzorky odpovedajúce piatim štruktúrne odlišným haplotypom, ktoré boli determinované na základe sekvenovania aj HRM analýzy (Ha1-Taliansko; Ha2 -Taliansko; Ha3-Česko/Slovensko/Maďarsko; Ha4-Česko/Slovensko; Ha5-Česko) (Radvánsky a kol., 2011). Analýza dát bola vykonaná pomocou softvéru LightScanner verzia 2.0.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledkom analýzy 439-bázovej oblasti *cox1* génu u 200 jedincov *F. magna* izolovaných z pečene jeleňa z Chorvátska bolo determinovanie dvoch rozdielnych haplotypov, ktoré boli 100% identické s dvomi (Ha3, Ha4) z celkovo známych piatich referenčných haplotypov (Radvánsky a kol., 2011). Haplotyp Ha3 bol detegovaný u 186 vzoriek (93%), zatiaľ čo druhý typ haplotypu Ha4 bol zistený u 14 vzoriek (7%). Neboli determinované žiadne nové, geneticky neznáme mitochondriálne haplotypy.

Získané výsledky tak jednoznačne poukazujú na podunajský pôvod analyzovanej chorvátskej populácie parazita. Dá sa predpokladať, že od prvých nálezov *F. magna* v oblasti Rakúska (Winkelmayer a Prosl, 2001), Slovenska (Rajský a kol., 2004) a Maďarska (Majoros a Sztojkov 2004) sa introdukovaná motolica úspešne adaptovala na európskeho špecifického hostiteľa (jeleňa európskeho) a vytvorila v oblasti dunajských lužných lesov stabilné a neustále sa rozširujúce ohnisko fascioloidózy, čoho dôkazom je geneticky identická

chorvátska populácia parazita. Z hľadiska časového a finančného aspektu danej molekulárnej analýzy, HRM analýza umožnila spoľahlivý molekulárny skrining geneticky neznámych variantov oproti vopred definovaným štandardám. Keďže neboli zistené žiadne nové genotypy, nebolo nutné podrobiť žiadnu vzorku dodatočnej sekvenačnej analýze.

#### POĎAKOVANIE

Autori ďakujú za poskytnutie parazitologického materiálu Dr. Reljovi Beckovi z Chorvátskeho veterinárneho inštitútu v Záhrebe, Chorvátsko. Práca bola financovaná zo zdrojov Agentúry pre podporu výskumu a vývoja APVV-51-062205 a realizáciou projektu „Centrum excelentnosti pre parazitológiu“ (kód ITMS: 26220120022) na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (podiel 0,3).

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Apostolo, C. The naturalistic aspects: flora, fauna and the environment. In Lupo, M., Paglieri, M., Apostolo, C., Vaccarino, E., Debernardi, M. eds., *La Mandria Storia e natura del Parco*. Torino: Edizioni Eda, 1996. p. 67-98.
- Králová-Hromadová I, Špakulová M, Horáčková E, Turčeková E, Novobilský A, Beck R, Koudela B, Marinculić A, Pybus M. Sequence analysis of ribosomal and mitochondrial genes of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae): intraspecific variation and differentiation from *Fasciola hepatica*. *J Parasitol*. 2008; 94:58-67.
- Králová-Hromadová I, Bazsalovicsová E, Štefka J, Špakulová M, Vávrová S, Szemes T, Tkach V, Trudget A, Pybus M. Multiple origins of European populations of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae), a liver parasite of ruminants. *Int J Parasitol*. 2011; 41:373-83.
- Majoros G, Sztojkov V. Appearance of the large American liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) (Trematoda: Fasciolata) in Hungary. *Parasitol Hung*. 1994; 27:27-38.
- Marinculić A, Džakula N, Janicky Z, Lučinger S, Živićniak T. Appearance of American liver fluke (*Fascioloides magna* Bassi, 1875) in Croatia-a case report. *Vet Archiv*. 2002; 72:319-325.
- Marinkovic D, Nesic V, Promene na jetri jelena lopatara (*Dama dama*) izazvane sa velikim američkim metiljem. *Savetovanje veterinara Srbije, Zlatibor (Serbia)*. 2008; 20 298-309.
- Radvánský J, Bazsalovicsová E, Kralová-Hromadová I, Minárik G, Kádaši E. Development of high-resolution melting (HRM) analysis for population studies of *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae), the giant liver fluke of ruminants. *Parasitol Res*. 2011; 108:201-9.
- Rajský D, Patuš A, Bukovjan K. Prvý nález *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) na Slovensku. *Slov Vet Cas*. 1994; 19:29-30.
- Pybus M.J. Liver flukes. In Samuel, W.M., Pybus, M.J., Kocan, A.A. eds., *Parasitic diseases in wild mammals*. Iowa City: Iowa State Press, 2001; 121-49.
- Winkelmayer R, Prosl H. Riesenleberegel-jetzt auch bei uns? *Österreichs Weidwerk*. 2001; 3:42-44.

## **POROVNANIE EFEKTIVITY ZNAČENIA PROLIFERUJÚCICH BUNIEK PO INTRAPERITONEÁLNOM A PERORÁLNOM PODANÍ BRDU U POTKANA.**

Matiašová A., Ševc J, Mikeš J., Jendželovský R., Kútna V., Daxnerová Z., Fedoročko P.

*Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach*

### **ABSTRAKT**

V experimente sme sa zamerali na sledovanie hladiny 5-bromo-2'-deoxyuridínu (BrdU) v krvnom sére potkanov po intraperitoneálnom (i.p.) podaní dávky 50mg/kg a 100mg/kg telesnej hmotnosti a po perorálnom (p.o.) podaní BrdU v koncentrácii 1mg/ml pitnej vody. Proliferujúce nádorové bunky línie HL-60 sme kultivovali s izolovaným sérami. Počas kultivácie dochádzalo ku vychytávaniu a inkorporácii BrdU do DNA buniek, ktoré prechádzali S-fázou bunkového cyklu. Množstvo BrdU inkorporovaného v DNA buniek a teda aj relatívne množstvo BrdU prítomné v sére sme analyzovali prietokovým cytometrom. Zistili sme, že už 5 minút po intraperitoneálnom podaní je hladina BrdU v krvi vysoká a po 60-90 minútach v oboch sledovaných koncentráciách klesá a je nedostatočná na označenie všetkých buniek vstupujúcich do S-fázy bunkového cyklu. Na sledovanie proliferácie buniek v priebehu dlhšieho časového obdobia je využívaný perorálny spôsob podávania. Predpokladáme však, že nepravidelný príjem vody potkanmi v priebehu svetlej a tmavej fázy dňa negatívne ovplyvňuje aj perorálny príjem BrdU. Z analýzy prietokovým cytometrom vyplýva, že percento BrdU+ buniek a teda aj relatívna hladina BrdU sú v sére experimentálnych zvierat po perorálnom podaní veľmi nízke a nedostatočné na označenie buniek vstupujúcich do S-fázy bunkového cyklu. Imunohistochemickým značením proliferujúcich buniek sme v miechach potkanov nezaznamenali signifikantný rozdiel v počte BrdU+ buniek po jeho intraperitoneálnom podaní v koncentrácii 50mg/kg a 100mg/kg. Počet BrdU+ buniek v subgranulárnej zóne *gyrus dentatus* hipokampu je po perorálnom podaní BrdU v koncentrácii 1mg/ml oveľa nižší v porovnaní s intraperitoneálne podaným BrdU v koncentrácii 50mg/kg, čo naznačuje, že perorálna aplikácia BrdU nie je vhodná na značenie proliferujúcich buniek.

### **ÚVOD**

V súčasnosti sú v experimentálnej a klinickej praxi využívané imunohistochemické a imunofluorescenčné metódy značenia buniek pomocou špecifických markerov. Na sledovanie proliferácie buniek v normálnom, ako aj v patologicky pozmenenom tkanive sú dostupné endogénne a exogénne markery. Medzi najviac využívané exogénne markery patrí 5-bromo-2'-deoxyuridín (BrdU), ktorý má na piatom uhlíku naviazaný atóm brómu (Taupin, 2007). Gratzner a kol. (1982) syntetizovali monoklonálnu protilátku, ktorá sa dokáže viazať na atóm brómu v BrdU a tak detekovať jeho prítomnosť v DNA proliferujúcich buniek. Tento fakt viedol k aktívnemu využívaniu BrdU pri štúdiu bunkovej proliferácie a doby ich vzniku (Burger a kol., 1988). Atóm brómu v molekule BrdU má však výrazné radiosenzibilizujúce, cytostatické, teratogénne účinky a predlžuje trvanie bunkového cyklu (Taupin, 2007). Pôvodne bolo BrdU využívané ako cytostatikum v radiačnej terapii u pacientov s nádorovým ochorením (Kuhn a Cooper-Kuhn, 2007). Aplikáciu BrdU pokusným zvieratám v experimente je preto nevyhnutné starostlivo naplánovať, aby sme predišli ovplyvneniu proliferácie buniek, aby boli získané výsledky jednoznačné a správne interpretované. Používanie BrdU ako markera proliferujúcich buniek vo vyvíjajúcom sa nervovom systéme zaviedli Nowakowski a kol. (1989) (Taupin, 2007), no táto látka vo vysokých dávkach negatívne ovplyvňuje normálny vývin mozgu a vedie k predčasnemu starnutiu (Kolb a kol., 1999). BrdU možno využiť pri determinácii doby vzniku buniek vo vyvíjajúcom sa nervovom systéme počas embryonálneho obdobia a viacnásobným značením

tak identifikovať ich fenotyp. Dôležitý je však spôsob podania a koncentrácia, ktorá musí byť zvolená tak, aby bola v priebehu celého *in vivo* experimentu dostatočná a konštantná na označenie proliferujúcich buniek a zároveň, aby boli negatívne vplyvy BrdU eliminované na minimum. Zvyčajne je BrdU potkanom podávané intraperitoneálnou a perorálnou cestou. Intravenózne podanie nie je pre malé laboratórne zvieratá vhodné a intracerebroventrikulárne podanie využívané pri štúdiu nervového systému vyžaduje chirurgický zákrok (Taupin, 2007). Rozhodli sme sa preto sledovať efektivitu značenia proliferujúcich buniek pomocou BrdU po intraperitoneálnom podaní v dvoch najčastejšie používaných koncentráciách (50mg/kg a 100mg/kg) a po perorálnom podaní v koncentrácii 1mg/ml pitnej vody. Cieľom tejto práce je zistiť, ako sa mení hladina BrdU v krvi po intraperitoneálnom podaní a či je nevyhnutné podávať BrdU intraperitoneálne vo vyššej koncentrácii. Zároveň predpokladáme, že nepravidelný príjem vody potkanmi v priebehu svetlej a tmavej fázy dňa negatívne ovplyvňuje aj perorálny príjem BrdU rozpusteného v pitnej vode, čo naznačuje nevhodnosť aplikácie BrdU do organizmu perorálnou cestou.

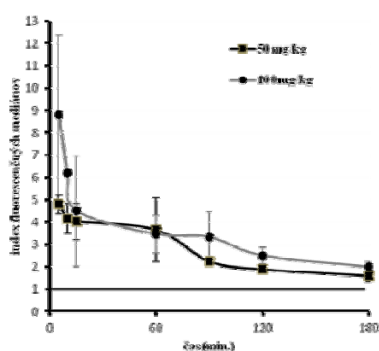
## MATERIÁL A METODIKA

V prvej časti experimentu sme sa zamerali na sledovanie farmakokinetiky BrdU v sére potkana po jeho intraperitoneálnom podaní v koncentráciách 50mg/kg a 100mg/kg telesnej hmotnosti v *in vitro* a *in vivo* podmienkach. Pre *in vitro* experiment sme použili 42 dospelých potkanov kmeňa Wistar oboch pohlaví vážiacich 300-350 gramov. Zvieratá boli chované v štandardných laboratórnych podmienkach s neobmedzeným prístupom k vode a potrave a rozdelené boli na skupinu s i.p. podaným BrdU v koncentrácii 50mg/kg a skupinu s i.p. podaným BrdU v koncentrácii 100mg/kg. V každej skupine bolo použitých 21 potkanov, ktorým sme i.p. podali 2 ml roztoku BrdU. Zvieratá boli dekapitované v časových intervaloch 5, 10, 15, 60, 90, 120 a 180 minút od podania BrdU, pričom každý časový interval reprezentovali tri zvieratá. Z krvi sme izolovali sérum, ktoré bolo zmrazené a uchované pri -20°C až do začiatku *in vitro* experimentu. Na sledovanie hladiny BrdU sme vyvinuli metódu kultivácie rýchlo proliferujúcich nádorových buniek (suspenná leukemická línia HL-60) v sérach experimentálnych zvierat. Vzorky boli 30 minút inkubované s anti-BrdU protilátkou a izotypovou kontrolou. Obsah BrdU inkorporovaného do DNA nádorových buniek sme analyzovali prietokovým cytometrom. Pre *in vivo* experiment sme použili 6 dospelých potkanov kmeňa Wistar vo veku 5 týždňov. Dve hodiny pred usmrtením bolo 3 zvieratám podané BrdU intraperitoneálne v koncentrácii 50 mg/kg a 3 zvieratám v koncentrácii 100 mg/kg. Zvieratá boli usmrtené transkardiálnou perfúziou a vzorky boli imunohistochemicky spracované pre svetelnú mikroskopiu. V druhej časti experimentu sme sa zamerali na sledovanie hladiny BrdU v krvnom sére potkanov, ktorým bolo perorálne podané BrdU v koncentrácii 1mg/ml pitnej vody. V *in vitro* experimente sme použili 24 dospelých potkanov kmeňa Wistar oboch pohlaví (♀ 300-370g; ♂ 400-500g). Všetky zvieratá mali prístup k vode s rozpusteným BrdU minimálne 12 hodín pred usmrtením. V priebehu svetlej (8:00 – 20:00 hod.) a tmavej fázy dňa (20:00 – 8:00 hod.) boli vo vybraných časových bodoch (2, 5, 7, 8, 9, 11, 14, 17, 19, 20, 21, 23 hod.) usmrtené tri zvieratá. Nádorové bunky línie HL-60 boli kultivované s izolovaným krvným sérom experimentálnych zvierat a spracované na analýzu prietokovým cytometrom rovnako, ako v predchádzajúcom *in vitro* experimente. Pre *in vivo* vyšetrovanie sme použili 12 dospelých potkanov kmeňa Wistar. Tri zvieratá mali prístup k vode s BrdU v koncentrácii 1mg/ml počas svetlej fázy dňa (12 hodín) a tri zvieratá počas tmavej fázy dňa (12 hodín). Ako kontrolu sme použili 3 zvieratá, ktorým bolo BrdU intraperitoneálne podané priebehu svetlej a 3 zvieratám v priebehu tmavej fázy dňa v koncentrácii 50mg/kg 6krát (každé 2 hodiny). Vzorky boli imunohistochemicky spracované pre svetelnú mikroskopiu. Počet BrdU pozitívnych buniek sme vyhodnotili v oblasti hilu a subgranulárnej zóny *gyrus dentatus* hipokampu.

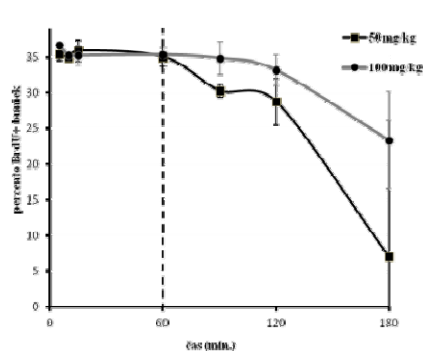
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Napriek tomu, že je BrdU najčastejšie používaným markerom proliferujúcich buniek, spôsoby jeho podávania sú u rôznych autorov nejednotné. Pri aplikácii BrdU intraperitoneálnou cestou je používaná koncentrácia v rozmedzí od 20 do 400mg/kg telesnej hmotnosti pokusného zvierat'a (Kuhn, H.G. a Cooper-Kuhn, C.M., 2007), najčastejšie však 50mg/kg (Horner a kol., 2000) alebo 100mg/kg (Fernández a kol., 2002). Nie len presná dávka, ale ani intervaly, ktoré autori využívajú od podania prvej dávky BrdU po usmrtenie zvierat'a, resp. po podanie nasledujúcej dávky pri skúmaní proliferácie z hľadiska dlhšieho časového úseku nie sú definované. Najčastejšie sa jedná o 1 hodinový (Horner a kol., 2000), 2 hodinový (Noll a Miller, 1993), 6 hodinový (Pringle a kol., 2003), 12 hodinový (Hartfuss a kol., 2001) alebo dokonca 24 hodinový interval (Noll a Miller, 1993). V našej práci sme sa preto rozhodli zistiť biologickú dostupnosť BrdU od jeho intraperitoneálneho podania v koncentrácii 50mg/kg a 100mg/kg telesnej hmotnosti a vyhodnotiť príjem BrdU podávaného perorálne v pitnej vode v závislosti na prirodzených biorytmoch laboratórnych potkanov. V prístupe, ktorý sme zvolili je dôležitý fakt, že analýzou zabudovania BrdU do DNA proliferujúcich buniek zo séra experimentálnych potkanov určíme prahovú hodnotu využiteľnosti BrdU pre bunky v S-fáze. Analýzou vzoriek na prietokovom cytometri sme zistili, že po 5 minútach od i.p. podania BrdU v dávke 50mg/kg ako aj 100mg/kg je jeho koncentrácia v krvnom sére vysoká (Graf 1). Intenzita fluorescencie fluorescein isothiokyanátu (FITC) konjugovaného s anti-BrdU protilátkou vyhodnotená ako medián fluorescencie dokazuje, že BrdU je v dostatočne vysokej koncentrácii prítomné v krvnom sére približne jednu hodinu a postupne klesá pri oboch sledovaných koncentráciách pričom už okolo 2. hodiny klesne na hodnotu, ktorá sa blíži k hranici detekcie BrdU touto metódou (index fluorescenčných mediánov=1). Okrem vyhodnotenia fluorescenčných mediánov sme vyhodnotili aj percento BrdU pozitívnych S-fázových buniek (Graf 2). Zistili sme, že po 60-90 minútach od podania BrdU je jeho koncentrácia v sére experimentálnych zvierat nedostatočná na označenie všetkých buniek v S-fáze bunkového cyklu. Napriek vyššej koncentrácii a dlhšej prítomnosti BrdU v sére po podaní dávky 100mg/kg je efektivita značenia S-fázových buniek podobná ako pri koncentrácii 50mg/kg. V miechach spracovaných pre svetlú mikroskopiu sme vyhodnotili počet BrdU+ buniek po intraperitoneálnom podaní BrdU v koncentrácii 50mg/kg a 100mg/kg, no nezistili sme signifikantný rozdiel v ich počte. S ohľadom na cytostatické účinky BrdU preto predpokladáme, že nie je nevyhnutné používať BrdU intraperitoneálne v koncentrácii 100mg/kg telesnej hmotnosti. Perorálna aplikácia BrdU v koncentrácii 1mg/ml pitnej vody sa využíva najmä na sledovanie proliferatívnej aktivity buniek v priebehu dlhšieho časového obdobia. Intraperitoneálne podávanie BrdU je v priebehu dlhšieho obdobia pre zviera stresujúce, preto je nevyhnutné perorálnu aplikáciu dokonale charakterizovať. Vzhľadom na prirodzené správanie sa potkanov počas svetlej a tmavej fázy dňa sme sledovali vhodnosť perorálneho podávania BrdU v danej koncentrácii. Potkany prijímajú potravu a vodu v malých dávkach v priebehu celého dňa, resp. aktívnej fázy dňa. U zvierat, ktoré žijú v zajatí sa však aktívna časť dňa výrazne skracuje. Zvieratá takmer celý deň spia a aktívne sú hlavne období od súmraku do úsvitu. Vzhľadom na to, že sú zvieratá cez deň málo aktívne, prijímajú menej vody a pravdepodobne aj menej BrdU, čo sme potvrdili meraním spotreby vody potkanmi v priebehu svetlej a tmavej fázy dňa (Graf 3). Po spracovaní vzoriek a meraní na prietokovom cytometri sme vyhodnotili aktuálnu hladinu BrdU v sledovaných časových bodoch počas svetlej a tmavej fázy dňa. Zistili sme, že percento BrdU+ buniek je veľmi nízke, čo odzrkadľuje malé množstvo BrdU, ktoré sa do organizmu po p.o. aplikácii v danej koncentrácii dostane (Graf 4). *Z in vivo* experimentu uskutočneného na tkanive hipokampu sme zistili, že počet BrdU+ buniek v 1mm<sup>3</sup> tkaniva je po perorálnom podaní v priebehu tmavej fázy dňa vyšší, ako počas svetlej fázy dňa. Počet BrdU+ buniek v tkanive po p.o. podaní v priebehu svetlej a tmavej fázy dňa sme porovnali s počtom BrdU+ buniek po

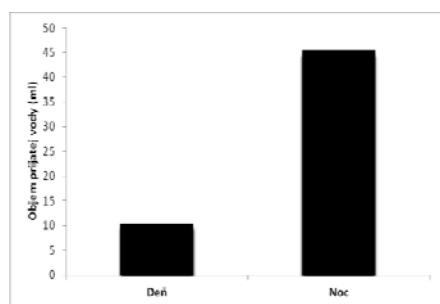
i.p. podaní (50mg/kg), ktoré bolo taktiež podávané v priebehu svetlej a tmavej fázy dňa. Zistili sme, že v počas tmavej fázy dňa, kedy sú zvieratá aktívne bolo po p.o. podaní označených približne 226 buniek/mm<sup>3</sup> tkaniva, zatiaľ čo po i.p. podaní bolo označených v priemere až 1104 buniek/mm<sup>3</sup> tkaniva. V priebehu svetlej fázy dňa, kedy sú potkany menej aktívne bolo po p.o. podaní označených v priemere 76 buniek/mm<sup>3</sup> tkaniva a po i.p. podaní približne 940 buniek/mm<sup>3</sup> tkaniva. Z daného experimentu vyplýva, že v *in vivo* podmienkach je po p.o. podaní označený len veľmi malý počet alebo takmer žiadne bunky, čo by u experimentátora mohlo vyvolať falošný pocit, že značenie buniek prebehlo správne. Na základe našich výsledkov z *in vitro* experimentu však nerovnomerný príjem vody a zároveň aj BrdU sponchybuje objektívnosť takto získaných údajov o proliferácii buniek. Alternatívou na značenie buniek v priebehu dlhšieho obdobia môže byť využívanie osmotických púmp alebo intraperitoneálne podávanie BrdU v priebehu dňa kombinované s perorálnym príjmom v priebehu noci v závislosti od dĺžky S-fázy a bunkového cyklu, ako to navrhovali Kuhn a Cooper-Kuhn (2008).



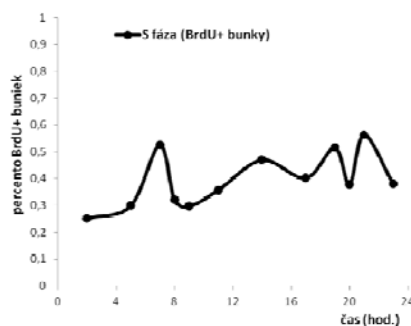
Graf 1



Graf 2



Graf 3



Graf 4

## POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená grantovými projektmi VVCE-0001-07 a VEGA grantmi č. 1/0322/11 a 1/0967/12.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Kuhn, G. H., Cooper-Kuhn, CH. M. Bromodeoxyuridine and the Detection of Neurogenesis. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2007, 8(3), 127-31
- Taupin, P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews*, 2007, 53(1), 198-214
- Burger, P.C., Shibata, T., Kleihues, P. Proliferation Markers for Neoplasms of the Nervous System, DeLelis R. A. *Advances in Immunohistochemistry*. New York: Raven Press, 1988, 301-316, ISBN 0-88167-394-3

- Kolb, B., Pedersen B., Ballermann M., Gibb R., Whishaw I.Q. Embryonic and Postnatal Injections of Bromodeoxyuridine Produce Age-Dependent Morphological and Behavioral Abnormalities. *The Journal of Neuroscience*, 1999, 19(6), 2337-46
- Horner, P.J., Power, A.E., Kempermann, G., Kuhn, H.G., Palmer, T.D., Winkler, J., Thal, L.J., Gage, F.H. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, 2000, 20(6), 2218-28
- Fernández, A., Radmilovich, M., Trujillo-Cenóz, O. Neurogenesis and Gliogenesis in the spinal cord of turtles. *The Journal of Comparative Neurology*, 453(2), 131-144
- Noll, E., Miller, R.H. Oligodendrocyte precursors originate at the ventral ventricular zone dorsal to the ventral midline region in the embryonic rat spinal cord. *Development*, 1993, 118(2), 563-573
- Pringle, N.P., Yu, W.P., Howell, M., Colvin, J.S., Ornitz, D.M., Richardson, W.D. Fgfr3 expression by astrocytes and their precursors: evidence that astrocytes and oligodendrocytes originate in distinct neuroepithelial domains. *Development*, 2003, 130(1), 93-102
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., Goetz, M. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Developmental Biology*, 2001, 229(1), 15-30

## **PODIEL NEKASPÁZOVEJ DRÁHY V MECHANIZME PROGRAMOVANEJ BUNKOVEJ SMRTI PO FOTODYNAMICKEJ TERAPII S HYPERICÍNOM.**

Mikešová L., Mikeš J., Valeková B., Vargová J., Fedoročko P.

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

### **ABSTRAKT**

Fotodynamická terapia vyvoláva tri morfológicky rozpoznateľné formy bunkovej smrti, a to apoptózu, nekrózu a autofágiu. Najčastejšie študovanou formou je apoptóza, pozorovaná v mnohých nádorových bunkových líniách po PDT s rôznymi fotosenzibilizátormi. Apoptóza, ktorá je precízne regulovaná a energeticky závislá je najčastejšie spájaná s aktiváciou kaspáz zodpovedných za jej priebeh. Avšak čoraz častejšie sa objavujú dôkazy o tom, že apoptóza môže prebiehať aj nezávisle od aktivácie kaspáz. Najznámejšími indukčnými faktormi bunkovej smrti nezávislej od kaspáz sú endonukleáza G (EndoG) a faktor indukujúci apoptózu (AIF). Mnohé štúdie sa však rozchádzajú v tvrdeniach o závislosti proapoptotickej funkcie AIF od kaspáz. Úloha AIF vo fotodynamickej terapii (PDT) je doposiaľ málo preskúmaná, rozporuplná a v prípade PDT s hypericínom dokonca úplne neznáma. Preto cieľom našej práce bolo zistiť podiel tejto alternatívnej formy bunkovej smrti na celkovej fotocytotoxicite po PDT s hypericínom. S využitím simultánneho sledovania zmien mitochondriálneho potenciálu a aktivity kaspázy 3, externalizácie fosfatidylserínu a viability alebo metabolickej aktivity s viabilitou pomocou prietokovej cytometrie, kombinovaným sledovaním viability, morfológických zmien a aktivity kaspázy 3 pomocou fluorescenčnej mikroskopie a stanovením intracelulárnej lokalizácie AIF pomocou konfokálnej mikroskopie sme potvrdili, že apoptóza sprevádzaná aktiváciou kaspázy 3 je primárnou formou bunkovej smrti po PDT s hypericínom, a to vo väčšine testovaných nádorových bunkových línií. K zapojeniu od kaspáz nezávislých foriem PCD dochádza pravdepodobne až v neskorších časových intervaloch po PDT.

### **ÚVOD**

Apoptóza predstavuje formu programovanej bunkovej smrti (PCD), ktorá je precízne regulovaná, energeticky závislá a nevyhnutná pre skorý embryonálny vývin a udržiavanie tkanivovej homeostázy. Väčšina proapoptotických signálnych dráh, či už závislých alebo nezávislých od aktivity kaspáz sa zbíha k mitochondriám, ktorých regulované poškodenie vedie k uvoľneniu mnohých apoptogénnych proteínov z intermembránového priestoru do cytosolu (Kroemer a kol., 2007), napr. cytochrómu c (Li a kol., 1997), Smac/DIABLO (Verhagen a kol., 2000), HtrA2/Omi (Li a kol., 2002), ale aj ďalších proteínov, ako napr. AIF alebo EndoG. AIF na jednej strane prostredníctvom svojej oxidoreduktázovej funkcie podporuje prežívanie buniek, ale na druhej strane sa po uvoľnení z mitochondrií stáva letálnym faktorom spôsobujúcim chromatinovú kondenzáciu a DNA fragmentáciu. Mnohé štúdie sa však rozchádzajú v tvrdeniach o závislosti proapoptotickej funkcie AIF od kaspáz.

### **MATERIÁL A METODIKA**

Bunkové línie odvodené od nádorov hrubého čreva HT-29, SW-480, SW-620 (RPMI-1610), HCT-116 (McCoy's 5A) boli kultivované v príslušných médiách obohatených o 10% FBS, antibiotiká a gentamycín pri teplote 37 °C, 95% vlhkosti a 5% podielom CO<sub>2</sub> v atmosfére.

Pre prípravu vzoriek pre fluorescenčnú mikroskopiu boli bunky kultivované 24 hodín na podložnom sklíčku osadenom s 12-jamkovou silikónovou mriežkou, a to v médiu prislúchajúcom danej bunkovej línii o hustote 2.10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>. Šestnásť hodín pred PDT bol k bunkám pridaný hypericín a po inkubácii bol hypericín aktivovaný ožarovacím zariadením. Hneď po osvetlení vzoriek bol pridaný špecifický substrát pre kaspázu 3 (Biotium, Hayward, CA, USA). V čase analýzy bolo k bunkám pridané farbivo Hoechst 33342 (2 µg.ml<sup>-1</sup>/30



min/37 °C) a propidium jodid (25 µg.ml<sup>-1</sup>/5 min/37 °C) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Vzorky sme scentrifugovali, médium odsali, nahradili čerstvým médiom a podrobili analýze pomocou fluorescenčného mikroskopu Leica DMI6000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Pre konfokálnu mikroskopiu boli bunky kultivované a podrobené PDT podobne ako pri príprave vzoriek na fluorescenčnú mikroskopiu. V čase analýzy boli bunky po odsatí média prepláchnuté studeným PBS, zafixované 4% paraformaldehydom (10 min/RT), dvakrát premyté studeným PBS, permeabilizované (0.5% Triton-X-100 v PBS), blokované (1% FBS v PBS) a inkubované s primárnou protilátkou cez noc. Po 4-násobnom premytí sklíčka studeným PBS boli bunky inkubované s biotinylovanou sekundárnou protilátkou 1,5 hodiny. Vzorka bola následne opäť 4x premytá s PBS a nasledovala inkubácia s fluorescenčne značeným streptavidínom (15 minút/4 °C). Po premytí s PBS bola DNA buniek farbená pomocou DRAQ5 (Biostat Limited, Leicestershire, UK) (20 min), bunky opäť 2x premyté s PBS a následne zaliate pod krycie sklíčko v zalievacom médiu a ponechané pri 4°C minimálne cez noc až do analýzy konfokálnym mikroskopom Leica TCS SP5X (Leica Microsystems).

Príprava vzoriek pre prietokový cytometer:

Mitochondriálny membránový potenciál a aktivácia kaspázy 3: po osvetlení vzoriek bol k bunkám pridaný špecifický substrát pre kaspázu 3 (Biotium). Adherentné a plávajúce bunky boli zozbierané v príslušných časových intervaloch po PDT s hypericínom, premyté v HBSS a farbené tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorátom (TMRE; 100 nmol.dm<sup>-3</sup>/15 min/37 °C) a analyzované prietokovým cytometrom. Analýza externalizácie fosfatidylserínu: po zozbieraní boli bunky ofarbené Annexin V-FITC (15 min/37 °C) (DAKO, Medesa s.r.o., Polička, ČR) a propidium jodidom (25 µg.ml<sup>-1</sup>/5 min/37 °C) (Sigma-Aldrich) a analyzované prietokovým cytometrom. Metabolická aktivita a viabilita: po zozbieraní boli bunky farbené pomocou fluoresceín diacetátu (100 ng.ml<sup>-1</sup>/20 min/ 37 °C), propidium jodidom (25 µg.ml<sup>-1</sup>/5 min/37 °C) (Sigma-Aldrich) a analyzované prietokovým cytometrom.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Keďže citlivosť jednotlivých nádorových bunkových línií na PDT s hypericínom je rozdielna, na základe výsledkov MTT testu metabolickej aktivity uskutočnenom na šiestich nádorových bunkových líniách hrubého čreva (HT-29, HCT116 wt, HCT116 p53<sup>+/+</sup>, HCT116 p53<sup>-/-</sup>, SW-480, SW-620) sme na 24 a 48 hod po PDT s hypericínom určili hodnoty IC<sub>50</sub>, ktoré sme použili v nasledujúcich experimentoch. Na vybraných bunkových modeloch sme chceli preukázať výskyt buniek s apoptotickou morfológiou, a to s aktiváciou a bez aktivácie kaspáz. Pomocou špecifických fluorescenčných farbív Hoechst 33342, špecifického substrátu pre kaspázu 3 a propidium jodidu sme tieto morfologické prejavy PCD pozorovali fluorescenčnou mikroskopiou na 3, 8, 24 a 48 hod po PDT. Na základe morfológie a biochemických zmien sme hodnotili 8 subpopulácií buniek. V bunkovej línii SW-480 bol výrazný účinok PDT pozorovateľný na 24 hod. Významnejší výskyt populácie buniek s apoptotickou morfológiou, ale bez aktivácie kaspáz sme pozorovali až 48 hod po PDT. Bunková línia HCT116 wt do 24 hod reagovala pomerne slabo na PDT, ale z 24 na 48 hod došlo k prudkej zmene a poklesu viability, pričom výrazný nárast populácie apoptotických buniek bez aktivácie kaspáz sa objavil taktiež na 48 hod. Naopak v bunkovej línii HT-29 sme pozorovali len minimálne zmeny a vysokú viabilitu vo všetkých časových intervaloch.

Kľúčové mechanizmy PCD, a to externalizáciu fosfatidylserínu (PS), depolarizáciu MMP, zmeny v metabolickej aktivite buniek, ako aj aktiváciu kaspázy 3 sme sledovali na spomínaných šiestich nádorových bunkových líniách v časových intervaloch 3, 8 a 24 hod po PDT pomocou prietokovej cytometrie. Pre určenie podielu nekaspázových mechanizmov PCD účinkom PDT sme zvolili simultánne sledovanie zmeny MMP spolu s aktiváciou

kaspázy 3. Výsledky dokázali, že už na 3 hod dochádza k aktivácii kaspázy 3 vo väčšine testovaných bunkových línií a ani 8 hod po PDT sme nepozorovali významnejší nárast subpopulácie buniek umierajúcej nezávisle od kaspáz. Predpokladáme teda, že spustenie kaspázovej dráhy je primárnym mechanizmom PCD v testovaných nádorových bunkách po PDT s hypericínom.

Pri sledovaní zmien metabolickej aktivity boli pozorovateľné zásadnejšie zmeny na 24 hod, kde podobne ako pri depolarizácii MMP dochádza k najväčším poklesom percenta metabolicky aktívnych buniek v bunkových líniách HCT116 wt a SW-480. Spomedzi buniek HCT116 sú najrezistentnejšie HCT116p53<sup>-/-</sup>, čo koreluje aj s výsledkami depolarizácie MMP. Aj keď už na tretiu hod je pozorovateľné signifikantné zvýšenie percenta Annexin V<sup>+</sup> buniek oproti kontrole vo všetkých bunkových líniách, vo všeobecnosti externalizácia PS nekoreluje s depolarizáciou MMP a aktiváciou kaspázy 3, prípadne s poklesom percenta metabolicky aktívnych buniek. Naznačuje to dereguláciu niektorých mechanizmov, keď k externalizácii PS buď nedochádza, alebo dochádza k jeho reinternalizácii.

Samotnú translokáciu AIF z mitochondrií sme pozorovali konfokálnou mikroskopiou v bunkových líniách HT-29, HCT116wt, SW-480 a SW-620 v adherencii na 1, 3 a 8 hod po PDT s hypericínom. Avšak translokáciu AIF sme nepozorovali v žiadnej zo spomínaných bunkových línií ani 8 hod po PDT a v dlhších časových intervaloch nebolo možné bunky analyzovať klasickým imunohistochemickým postupom, pretože sa počas prípravy odliekali od podložného sklíčka a strácali. Preto sme sa rozhodli analyzovať bunky metódou cytospinu. Tomu však predchádzala podobnejšia analýza bunkových subpopulácií-plávajúcich a adherentných buniek samostatne pomocou prietokovej cytometrie. Potvrdili sme, že práve populácia plávajúcich buniek obsahuje najväčší podiel umierajúcich buniek a že od kaspáz závislá PCD je majoritnou formou bunkovej smrti po PDT s hypericínom vo väčšine bunkových línií. Aj keď touto metodikou pozorujeme populácie buniek umierajúcich bez aktivácie kaspázy, táto metodika nám neposkytuje informácie o morfológii jadra a lokalizácii AIF. Táto populácia buniek umierajúcich bez aktivácie kaspázy môže obsahovať bunky umierajúce nekaspázovou formou PCD, ako aj bunky nekrotické. Preto bolo potrebné analyzovať tieto zmeny konfokálnou mikroskopiou. Cytospinom pripravené vzorky pomohli zachytiť aj subpopuláciu plávajúcich buniek. Vo všetkých bunkových líniách sme však ani na 24 hod ani na 48 hod po PDT nepozorovali translokáciu AIF do jadra. V prípade buniek HT-29 sme vzhľadom k nízkej toxicite, ktorú vyvolala IC50 hodnota (60 nM) použili vyššiu, až 125 nM koncentráciu hypericínu a už na 24 hod po PDT sme pozorovali translokáciu AIF z mitochondrií do jadra.

Vo väčšine testovaných bunkových línií je primárnou formou bunkovej smrti „kaspázami sprostredkovaná“ PCD. Nekaspázové formy PCD sa s vyššou pravdepodobnosťou objavujú až v neskorších časových intervaloch (24-viac hod). IC50 určené pomocou MTT testu vykazujú široké spektrum rôznych odpovedí. Zdá sa, že samotná PDT s hypericínom nespúšťa nekaspázové dráhy ako prioritné, ale k ich spusteniu dochádza pravdepodobne v dôsledku nástupu rezistencie nádorových bunkových línií voči terapii. Výsledky analýz poukázali nielen na rozdielnú citlivosť testovaných nádorových bunkových línií, ale aj na rozdiely v regulácii PCD z pohľadu aktivácie kaspáz. Podrobná analýza subpopulácií adherentných a odlepených buniek dokázala ich tendenciu uvoľňovať sa z adherencie už v úvodných fázach PCD.

## POĎAKOVANIE

Práca bola finančne podporená grantovými projektmi: APVV-0040-10, LPP-0062-09, VEGA 1/0475/10 a SEPO II (ITMS 26220120039).

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007; 87:99-163.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91:479-489.
- Li W, Srinivasula SM, Chai J, Li P, Wu JW, Zhang Z, Alnemri ES, Shi Y. Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat Struct Biol* 2002; 9:436-441.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102:43-53.

## MEMBRÁNOVÉ ZNAČENIE MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK KOSTNEJ DRENE V PODMIENKACH *IN VITRO*

Nagyová M., Slovinská L., Gruľová I., Čížková D.

*Neurobiologický ústav SAV, Košice*

### ABSTRAKT

Mezenchýmové kmeňové bunky (MSCs) sú dospelé, nehematopoetické kmeňové bunky, ktoré sú pre bunkovú terapiu zaujímavé tým, že majú multipotentný charakter. To znamená, že sú schopné diferencovať sa na typy buniek určitých tkanív, napríklad na osteoblasty, adipocyty, chondrocyty, myoblasty a iné. MSCs majú schopnosť obnovy opotrebovaných buniek a preto sú vhodným kandidátom pre regeneračnú medicínu. Medzi vysoko fluorescenčné a fotostabilné značkovače bunkových membrán patrí značkovací systém PKH-67-GL (PKH67) a Vybrant™ DiI (DiI). Transplantácia takto označených MSCs nám umožní sledovať ich správanie, prežívanie, migráciu, diferenciáciu a fenotypizáciu v *in vivo* systéme. V našom experimente sme sledovali efektivitu metódy fluorescenčného značenia potkaních MSCs pomocou PKH67 a DiI v *in vitro* podmienkach. Zistili sme, že membránové značenie MSCs či už PKH67, alebo DiI má nízku toxicitu. Viabilita MSCs značených DiI bola 90% a PKH67 bola 85,7%. Značenie neovplyvnilo proliferáciu aktivitu MSCs a samotná autofluorescencia dosiahla vysokú hodnotu aj na šiesty deň po značení, pri PKH67 bolo 94% a pri DiI 86% pozitívne značených MSCs.

### ÚVOD

MSCs sú multipotentné kmeňové bunky, tkanivovo špecifické bunky diferencujúce sa do obmedzenej populácie buniek. MSCs sa nachádzajú predovšetkým v kostnej dreni, takzvané stromálne bunky kostnej drene, ale aj v pokožke, kostrovom svalstve, tukovom tkanive, v zubnej pulpe, v črevách, v pečeni, v semenníkoch a v epiteli vaječníkov (Kerkis a kol., 2006, Guana a kol. 2006, Zuk a kol. 2002). MSCs majú vysoký rastový potenciál, genetickú stabilitu a neobvyklú schopnosť migrovať do miesta poškodeného tkaniva (da Silva Meirelles a kol., 2006). MSCs v prípade vážnych tkanivových poškodení sú schopné okrem migrácie na miesta poranenia uvoľňovať cytokíny (IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, M-CSF, GM-CSF, SDF-1 $\alpha$ ) a trofické faktory (NGF, BDNF, VEGF, GDNF, CNTF, NT-3), ktoré napomáhajú samotnej oprave a regenerácii poškodeného tkaniva (Caplan a Dennis, 2006, da Silva Meirelles a kol., 2008). Pre ich ľahkú izoláciu, multipotentný a imunomodulačný charakter a schopnosť produkovať trofické faktory sa MSCs stali zaujímavé pre bunkovú terapiu. Sledovanie transplantovaných MSCs, ich prežívanie, migráciu, diferenciáciu a fenotypizáciu si vyžaduje najst' efektívnu metódu farbenia MSCs s nízkou cytotoxicitou, ktoré neovplyvňuje základné bunkové funkcie, životnosť a proliferáciu buniek.

V *in vitro* podmienkach sme testovali efektivitu membránového farbenia MSCs fluorescenčným značkovacím systémom PKH-67-GL, ktorý využíva patentovanú technológiu stabilnej inkorporácie zelenej fluorescenčnej farbičky PKH67 do lipidovej vrstvy bunkovej membrány (Čížková a kol., 2006) a fluorescenčným Vybrant™ DiI farbiacim roztokom (DiI), ktorý je vysoko fluorescenčný a fotostabilný po inkorporácii do bunkovej membrány.

### MATERIÁL A METODIKA

#### *Izolácia MSCs*

MSCs boli získané z kostnej drene dlhých kostí (femuru a tibiie) samíc potkanov, ktoré sme terminálne anestetizovali (Tiopental, 50mg/kg). Izolovanú kostnú dreň sme vo fyziologickom roztoku jemne zhomogenizovali a centrifugovali 7 minút (300xg). Supernatant sme odstránili a peletu buniek resuspendovali v kultivačnom médiu (Dulbecco's Modified Eagle's Minimal

Essential Medium (DMEM), s 15% Fetal Bovine Serum (FCS) a 1% Penicilín/Streptomycín) a kultivovali v T25 fľašiach ( $1 \times 10^8$  buniek/fľašu) v 5% CO<sub>2</sub> pri 37°C.

#### *Kultivácia a pasážovanie MSCs*

Izolované MSCs majú schopnosť adherovať na povrchu kultivačných fliaš. Voľne plávajúce bunky boli postupne odstránené pravidelnou 3-4 dňovou výmenou čerstvého kultivačného média. Bunky boli pasážované v závislosti na ich proliferačnej aktivite pomocou 0,1% TRIPSÍN-EDTA. Na sledovanie efektivity značenia sme použili MSCs z 2. pasáže.

#### *Značenie MSCs pomocou PKH67 a DiI*

MSCs sme pomocou 0,1% TRIPSÍN-EDTA uvoľnili z povrchu kultivačných fliaš, pridali rovnaké množstvo média  $\alpha$ -MEM (Minimal Essential Medium) s 10% FCS na zastavenie účinku trypsínu. Uvoľnené bunky sme preniesli do skúmavky a centrifugovali 7 minút (300xg). Pred samotným farbením sme určili počet a životnosť získaných MSCs pomocou Bürkerovej komôrky a rozdelili do dvoch skúmaviek, kde prebiehalo samotné farbenie buniek.

MSCs v jednej skúmavke sme označili zelenou fluorescenčnou farbičkou PKH67 podľa protokolu SIGMA (Product Number:PKH67-GL). K farbeniu  $2 \times 10^7$  buniek/ml je potrebná koncentrácia farbičky  $4 \times 10^{-6}$  M PKH67 v 2 ml celkového objemu. K pelete MSCs sme pridali 1 ml Roztoku C (Diluent), jemne sme ich resuspendovali, aby sme získali homogénnu suspenziu buniek. Tesne pred farbením sme si pripravili  $4 \times 10^{-6}$  M PKH67 farbičku (4  $\mu$  farbičky/ 1ml roztoku C), pridali sme ju do 1ml resuspendovaných MSCs a zmiešali sme ich jemným pipetovaním pre uniformné označenie MSCs. Farbenie prebiehalo 15 minút pri 25°C a následne sme reakciu zastavili pridaním rovnakého množstva  $\alpha$ -MEM s 1% FCS. Po jednej minúte sme ku MSCs pridali rovnaké množstvo  $\alpha$ -MEM bez FCS a centrifugovali ich 7 minút (300xg). Supernatant sme odstránili a peletu označených MSCs premyli 2x v  $\alpha$ -MEM. Takto premyté bunky sme spočítali v Bürkerovej komôrke, kde sme zistili množstvo a viabilitu označených MSCs.

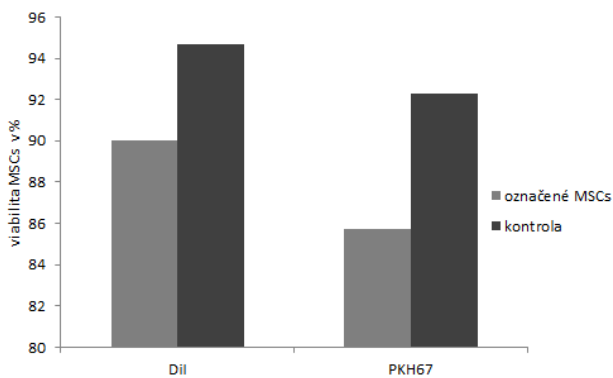
MSCs v druhej skúmavke sme označili červenou fluorescenčnou farbičkou DiI (Vybrant<sup>TM</sup> DiI farbiacim roztokom). Do 0,5 ml rozdisociovaných buniek sme pridali 5  $\mu$ l DiI a nechali pôsobiť 20 minút v termostate pri 37°C a ďalších 20 minút na trepačke pri izbovej teplote. Potom sme k označeným bunkám pridali 5 ml  $\alpha$ -MEM a centrifugovali ich 7 minút (300xg). Supernatant sme odstránili a peletu označených MSCs 2x premyli v  $\alpha$ -MEM. Bunky sme spočítali a preniesli na kultivačné platničky.

Viabilitu buniek sme vyhodnotili počítaním živých a mŕtvych buniek v Bürkerovej komôrke pridaním Trypan Blue ku vzorke MSCs v pomere 1:10. Životnosť buniek sme určili pomerom počtu živých (neofarbených) buniek k počtu všetkých buniek spočítaných v 25 stredných štvorcoch. Cytologická centrifúga StatSpin Cytofuge 2 (6 minút (27xg)) nám umožnila preniesť označené MSCs na podložné sklíčko v jednej vrstve do plochy s priemerom 7 mm. Histologický preparát sme fixovali 4 % paraformaldehydom a po premytí pridali DAPI, na detekciu jadier. Efektívnosť fluorescenčného značenia PKH67 a DiI v 0, 1., 3. a 6. deň kultivácie sme vyhodnotili pomocou fluorescenčného mikroskopu NICON ECLIPSE Ti. V preparátoch sme na 10 konštantných poliach (100  $\mu$ m x 100  $\mu$ m) stanovili percentuálne zastúpenie autofluoreskujúcich MSCs oproti neoznačených MSCs, ktoré sme vizualizovali pomocou DAPI. Pri vyhodnocovaní sme použili program ImageJ. Získané výsledky boli štatisticky vyhodnotené pomocou Studentovho t-testu.

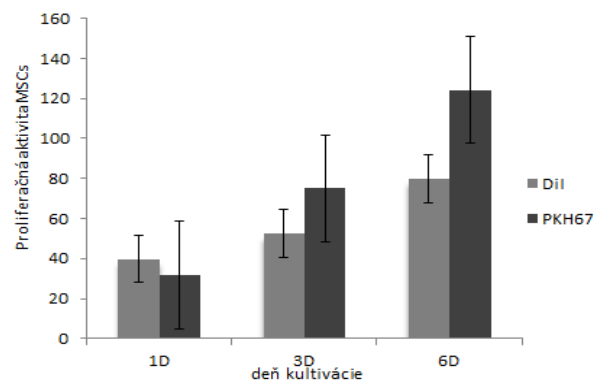
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Naše výsledky potvrdzujú, že značenie bunkových membrán MSCs pomocou fluorescenčnej farbičky DiI a PKH67 v podmienkach *in vitro* je vhodné, čo dokazuje 90% viabilita DiI a 85% viabilita PKH67 značených MSCs (Graf 1.). Dosiagnutá vysoká životnosť MSCs súvisí s nízkou cytotoxicitou fluorescenčnej farbičky DiI aj PKH67. Zistili sme, že počas

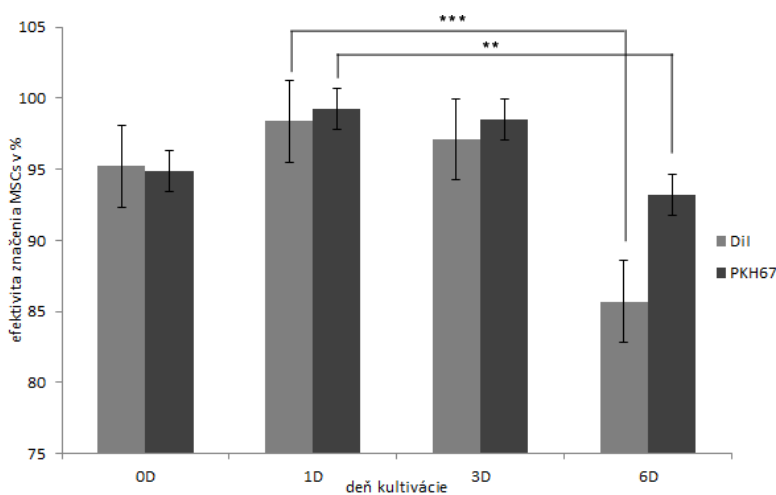
prvých troch dní je účinnosť membránového značenia DiI aj PKH67 vysoká, pri DiI sme dosiahli 97,1% a pri PKH67 98,5% efektivity značenia (Graf 3.). Na šiesty deň účinnosť značenia mierne klesla, pri DiI sme získali 85,7% a pri PKH67 93,2% označených MSCs. Štatisticky významný rozdiel bol zaznamenaný medzi MSCs označenými DiI a PKH67, ktoré boli kultivované 1D a 6D ( $p \leq 0,001$ ), čo pravdepodobne súvisí s proliferačnou aktivitou MSCs (Graf 2.). Veľké množstvo označených buniek poukazuje na optimálne zvolený čas farbenia a optimálne zvolenú koncentráciu farbivky na daný počet MSCs a na atraktívnosť značenia MSCs pomocou DiI aj PKH67 v *in vivo* štúdiách, kde bunky prejavujú relatívne nízky úbytok fluorescence a nízky transfer z bunky do bunky ( Albertine a kol., 1996).



**Graf1.** Životnosť MSCs



**Graf2.** Proliferačná aktivita MSCs



**Graf3.** Efektívnosť značenia MSCs pomocou DiI a PKH67

/ \*\*\*  $p=0.0003$  \*\*  $p=0.001$  /

## POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená týmito vedeckými grantmi: MVTS-COST BM 1002, VEGA 2/0114/11, SK-FR- 0019-11, Center of Excellence for Brain Research, APVV-0472-11

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Albertine K, Gee M. In vivo labeling of neutrophils using a fluorescent cell linker. *J. Leukoc. Biol.* 1996, 59:631-638.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* 2006; 98:1076-1084.
- Cizkova D, Rosocha J, Vanicky I, Jergova S, Cizek M. Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2006; 26:1167-1180.
- da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem. Cells.* 2008; 26:2287-2299.
- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell. Sci.* 2006; 119:2204-2213.
- Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee LH, Nolte J, Wolf F, Lee M, Engel W & Hasenfuss G. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature.* 2006; 440 (7088):1199-1203.
- Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI & Cerruti HF. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs.* 2006; 184, 3-4:105-116.
- Zuk P, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P & Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 2002; 13 (12):4279-4295.

# LOKALIZÁCIA A EXPRESIA RECEPTOROV ANGIOTENZÍNU II V SPINÁLNYCH GANGLIÁCH

Oroszová Z, Hricová L, Lukáčová N, Pavel J.

Neurobiologický ústav SAV, Košice

## ABSTRAKT

Angiotenzín II (Ang II) je neuropeptid, ktorý okrem veľmi dobre známej funkcie v regulácii krvného tlaku a objemu krvi je produkovaný lokálne v centrálnom nervovom systéme (CNS), kde môže fungovať ako neurotransmitter alebo neuromodulátor, a teda ovplyvňovať neurotransmisiu a excitabilitu neurónov. Na objasnenie jeho úlohy v regulácii periférnych senzorickej dráhy sedacieho nervu sme iniciovali štúdium expresie a lokalizácie receptorov Ang II v senzorickej dráhe sedacieho nervu u potkanov za fyziologických podmienok ako aj po unilaterálnej ligácii sedacieho nervu. Štúdiom rezov spinálnych ganglií potkana inkubovaných so značeným ligandom [<sup>125</sup>I]-Sarcosine<sup>1</sup>-Ang II a selektívnymi ligandmi pre oba receptory bolo určené predominantné AT<sub>1</sub> receptorové viazanie. Metóda *in situ* hybridizácie pomocou sense a antisense riboprób navyše ukázala prítomnosť mRNA oboch receptorových subtypov AT<sub>1A</sub> a AT<sub>1B</sub>. Na základe emulznej autorádiografie bola lokalizácia týchto mRNA zistená v neurónoch, čo bolo následne potvrdené aj imunoflorescenčnou lokalizáciou AT<sub>1</sub> receptorov, a to prevažne v malých gangliových bunkách. Po ligácii sedacieho nervu nastalo štatisticky výrazné zvýšenie AT<sub>1</sub>-imunoreaktívnych buniek. Kolokalizácia AT<sub>1</sub> receptora s CGRP naznačila, že Ang II pravdepodobne zohráva dôležitú úlohu v prenose bolestivých signálov najmä prostredníctvom peptidergických neurónov spinálnych ganglií, ktoré súvisia so zápalovou bolesťou.

## ÚVOD

Renín-angiotenzínový systém (RAS) je známy vyše sto rokov, ale obrovskej pozornosti sa mu dostalo až v poslednom období. Súvisí to so skutočnosťou, že tento systém spolu so svojim efektorovým hormónom angiotenzínom II je jedným z kľúčových regulátorov kardiovaskulárneho systému, objemu sodíka v organizme a významne sa podieľa na vazokonstrikcii. Taktiež stimuluje uvoľnenie aldosterónu z kôry nadobličiek a aktivuje sympatikový nervový systém. Ang II sprostredkováva svoje účinky cez dva typy receptorov, AT<sub>1</sub> a AT<sub>2</sub> (Chrysant, 2007). Väčšina fyziologických účinkov AngII je však sprostredkovaná cez stimuláciu AT<sub>1</sub> receptora.

Pôvodná predstava o RAS-e ako o periférnom hormonálnom systéme produkujúcom Ang II, ktorý sa prenáša k cieľovým tkanivám prostredníctvom krvi sa stala v posledných rokoch nedostatočnou. Ukázalo sa, že Ang II sa tvorí aj lokálne v rôznych tkanivách, ako je myokard, obličky, cievy a mozog. Periférny aj lokálny RAS vzájomne kooperujú. V centrálnom nervovom systéme existuje spolupráca lokálneho aj periférneho RAS-u len do určitej miery, a to v dôsledku izolovanosti CNS od periférie prostredníctvom hematoencefalitickej bariéry. V lokálnom mozgovom RAS-e, Ang II ovplyvňuje celý rad funkcií. Podieľa sa na centrálnej a periférnej regulácii senzorickej informácie a mnohých zmyslových modalít vrátane nocicepcie, chuti a zraku.

Spinálne gangliá obsahujúce primárne senzorickej neuróny vykazujú expresiu jednotlivých súčastí RAS, vrátane Ang II. Prítomnosť jeho prirodzených ligandov, t. j. angiotenzínových receptorov, doteraz však nebola detailne preskúmaná.

Cieľom našej práce bolo detegovať receptory Ang II na úrovni proteínovej a génovej expresie v spinálnych gangliách a lokalizovať expresiu AT<sub>1</sub> receptorov. Taktiež sme sledovali vplyv ligácie sedacieho nervu na expresiu AT<sub>1</sub> receptorov v malých neurónoch spinálnych ganglií a jej vplyv na zmeny počtu malých AT<sub>1</sub> receptor – imunoreaktívnych buniek kolokalizovaných s CGRP, IB4 a TH v spinálnych gangliách.



## MATERIÁL A METODIKA

Použité experimentálne zvieratá, dospelé samce potkana kmeňa Wistar (n=25) o hmotnosti 250 – 320g boli rozdelené do dvoch skupín: (1) intaktné kontrolné zvieratá (n=10), (2) zvieratá s unilaterálnou ligáciou sedacieho nervu (n=15). U zvierat z oboch experimentálnych skupín po transkardiálnom preplachu s fyziologickým roztokom (0,9% NaCl) a následne so 4% paraformaldehydrom za hlbkej narkózy (thiopental, 50µg/kg,i.p.) boli obojstranne odobrané spinálne gangliá (DRG) prislúchajúce dolným lumbálnym segmentom. Zvieratám s unilaterálnou ligáciou boli spinálne gangliá odobrané ipsilaterálne a kontralaterálne (tzv. sham-operated control) k ligovanému miestu až po 7 dňoch prežívania. Odobraté tkanivá boli post-fixované 3 hodiny v 4% paraformaldehyde pri 4°C. Kryoprotekcia odobratých tkanív bola uskutočnená v 15% a 30 % roztoku sacharózy pri 4°C až do nasýtenia. Pred krájaním boli tkanivá pokryté kryoprotekčným médiom, okamžite zmrazené v kryostate (-20°C) a následne nakrájané na rezy s hrúbkou 25µm, ktoré sme namontovali na mikroskopické sklíčka.

Prítomnosť receptorov angiotenzínu II v spinálnych gangliách bola stanovená prostredníctvom autorádiografickej metódy založenej na vytesnení izotopom značeného ligandu [<sup>125</sup>I]-Sarcosine<sup>1</sup>-AngII z väzby na daný receptor prostredníctvom nadbytku selektívneho ligandu špecifického pre daný typ angiotenzínového receptora (Losartan – selektívny antagonist AT<sub>1</sub> receptora resp. PD123319 - selektívny antagonist AT<sub>2</sub> receptora) (Tsutsumi a Saavedra, 1991) ). Po uskutočnení autorádiografickej metódy boli rezy exponované svetlocitlivému filmu Kodak Biomax MR, následne vyvolané a získané autorádiogramy zosnímané kamerou Nikon.

Jednotlivé izoformy AT<sub>1</sub> receptora boli stanovené prostredníctvom *in situ* hybridizácie za použitia [<sup>35</sup>S] značených selektívnych riboprób a na bunkovej úrovni rozlíšené pomocou emulznej techniky. Vizualizácia a zosnímanie autorádiogramov bolo uskutočnené ako pri autorádiografickej metóde stanovenia receptorov.

Charakterizácia malých neurónov spinálnych ganglií bola urobená dvojitým farbením rezov tkaniva prostredníctvom inkubácie anti-AT<sub>1</sub> receptor polyklonálnou protilátkou (1:100) a zároveň s: (A) anti-CGRP (calcitonínu génovo príbuzný peptid) monoklonálnou protilátkou (1:8.000); (B) Griffonia simplicifolia izolektínom B4 konjugovaným s FITC (10µg/ml); (C) anti-TH (tyrozinhydroxyláza) monoklonálnou protilátkou (1:300).

Výsledky sú vyjadrené ako priemer ± SEM zo skupiny piatich zvierat, ktoré boli merané individuálne. Na zistenie štatisticky významných rozdielov bol v štatistickej analýze použitý nepárový študentov t-test na hladine významnosti p < 0,05.

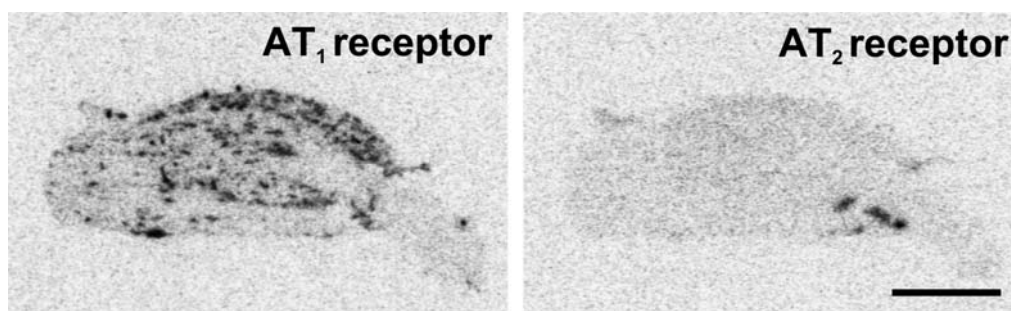
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Už predchádzajúce experimentálne štúdie všeobecne poukázali na prítomnosť receptorov Ang II v spinálnych gangliách, ale bez ich bližšej špecifikácie a bunkovej lokalizácie (Oldfield, et al, 1994). Pre štúdium expresie a bunkovej lokalizácie dvoch fyziologicky najdôležitejších receptorov Ang II sme použili kombináciu kvantitatívnej autorádiografie a *in situ* hybridizácie. Kvantitatívne stanovenie a výrazné vytesnenie izotopom značeného ligandu selektívnym AT<sub>1</sub> receptorovým ligandom losartanom odhalilo, že väčšina receptorov Ang II v dolných lumbálnych DRG je AT<sub>1</sub> typu (Obr. 1). Keďže žiadne konzistentné vytesnenie [<sup>125</sup>I]-Sarcosine<sup>1</sup>-AngII s PD123319 (selektívny AT<sub>2</sub> receptorový ligand) nebolo zistené, znamená to, že AT<sub>2</sub> receptor sa v DRG nenachádza alebo je prítomný v takom malom množstve, že nie je možné ho detegovať touto metódou. Prítomnosť takého malého množstva je však z fyziologického hľadiska nevýznamná. Je dôležité si uvedomiť, že hlodavce na rozdiel od človeka exprimujú dva subtypy AT<sub>1</sub> receptora – AT<sub>1A</sub> a AT<sub>1B</sub>, pričom v nervovom systéme je predominantný subtyp AT<sub>1A</sub> (Jöhren, et al., 1995). Kvôli veľkej homológii v kódujúcich oblastiach a podobným afinitám k ligandom nemôže byť viazanie na AT<sub>1A</sub> a

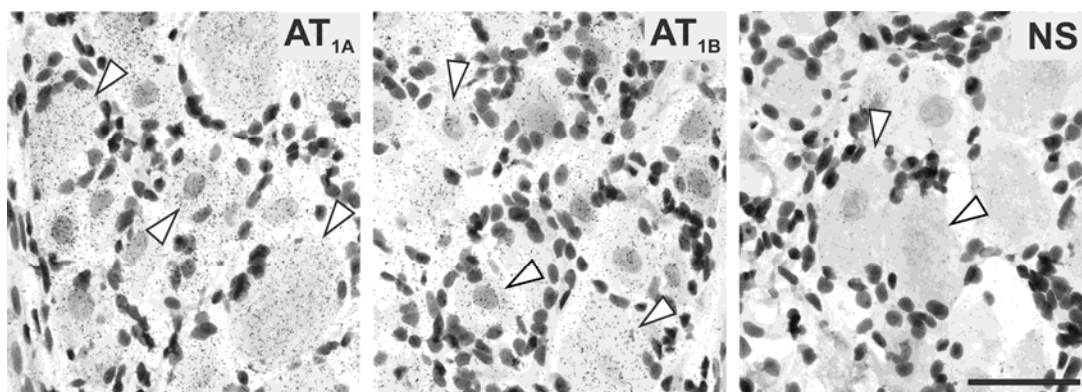
AT<sub>1B</sub> receptor rozlíšené autorádiografiou (Inagami T, et al., 1993). *In situ* hybridizácia pomocou riboprób korešpondujúcich s nekodujúcimi oblasťami receptorových subtypov nám odhalila v spinálnych gangliách prítomnosť obidvoch AT<sub>1A</sub> a AT<sub>1B</sub> receptorových subtypov, s dominanciou AT<sub>1A</sub> subtypu. Okrem toho, *in situ* hybridizácia prostredníctvom emulznej techniky nám poskytla informáciu o bunkovej lokalizácii mRNA jednotlivých receptorových subtypov. Hybridizačný signál znázornený prítomnosťou väčšieho alebo menšieho počtu strieborných zrníek bol zaznamenaný nad skoro všetkými neurónovými bunkami, ktorých jadrá boli jemne zafarbené krezyl violeťou (Obr. 2).

Na základe imunofluorescenčného viazania protilátky, AT<sub>1</sub> receptor za fyziologických podmienok bol lokalizovaný v prevažnej časti neurónových buniek spinálnych ganglií, no prevažne v malých neurónoch (viac ako 40% z celkového počtu). Štatistické vyhodnotenie kvantifikácie malých AT<sub>1</sub> receptor – pozitívnych buniek po chronickej stimulácii nervových vlákien sedacieho nervu spôsobená jeho ligáciou poukázalo na výrazný nárast počtu imunoreaktívnych buniek v dolných lumbálnych DRG (Obr. 3), čo naznačuje dôležitú úlohu Ang II a jeho AT<sub>1</sub> receptorov v prenose bolestivých signálov.

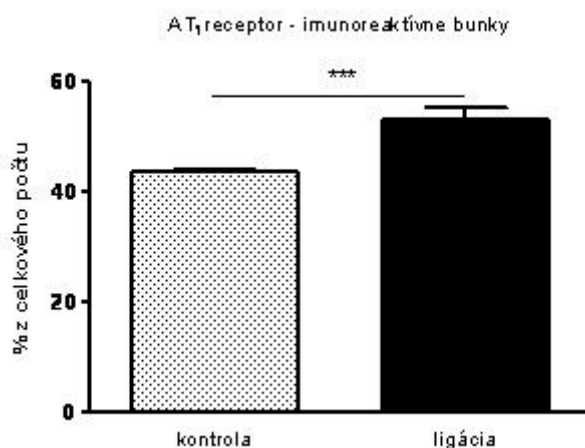
Malé neuróny spinálnych ganglií môžeme rozdeliť do 3 skupín: (1) neuróny závislé na NGF (nerve growth factor), ktoré obsahujú neuropeptidy ako Substancia P a CGRP; (2) neuróny závislé na GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), ktoré neobsahujú neuropeptidy, ale viažu izolektín IB4; (3) neuróny, ktoré obsahujú tyrozín hydroxylázu (TH) – rýchlosť určujúci enzým v syntéze katecholamínov. Dvojité fluorescenčné farbenie ukázalo, že približne po 20% z celkového počtu AT<sub>1</sub> receptor-imunoreaktívnych buniek je zároveň CGRP-, IB4- a TH-pozitívnych (Obr. 4). Unilaterálna ligácia sedacieho nervu spôsobila štatisticky výrazný nárast AT<sub>1</sub>+CGRP- a AT<sub>1</sub>+IB4-pozitívnych buniek (o približne 15% respekt. 5%) (Obr. 4). Aj keď pôvodne bolo publikované, že izolektín IB4 sa selektívne viaže na neuropeptid-neobsahujúce neuróny, následné štúdium poukázalo, že malá, ale štatisticky významná časť týchto neurónov je peptidergická (Vulchanova a spol. 2001; Bergman a spol. 1999). Tieto výsledky naznačili, že Ang II prostredníctvom AT<sub>1</sub> receptora by mohol byť regulačným faktorom v prenose senzorickej informácie v primárnych senzorickejch neurónoch, pravdepodobne najmä v kombinácii s ostatnými neuropeptidmi. Kolokalizácia AT<sub>1</sub> receptora s CGRP naznačila, že Ang II pravdepodobne zohráva dôležitú úlohu v prenose bolestivých signálov najmä prostredníctvom peptidergických neurónov spinálnych ganglií, ktoré súvisia so zápalovou bolesťou.



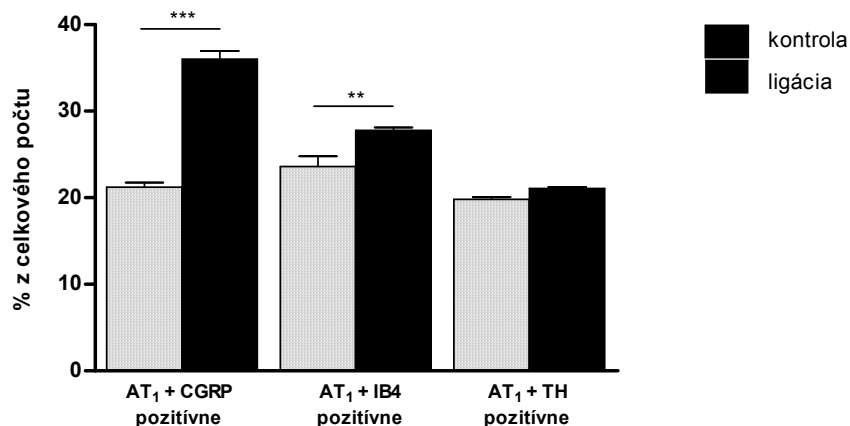
**Obrázok 1.** Stanovenie AT<sub>1</sub> a AT<sub>2</sub> receptorov prostredníctvom autorádiografickej metódy. Mierka = 1mm.



**Obrázok 2.**  $AT_{1A}$  a  $AT_{1B}$  mRNA v dolných spinálnych gangliách zaznamenaná emulznou technikou. Agregáty strieborných zrnok nad neurónmi predstavujú hybridizačný signál antisense  $AT_{1A}$  a  $AT_{1B}$  riboprób (šípky). NS – hybridizácia so sense ribopróbou predstavuje nešpecifické Mierka = 50  $\mu$ m.



**Obrázok 3.** Kvantitatívne stanovenie počtu malých  $AT_1$  receptor – imunoreaktívnych buniek v spinálnych gangliách za fyziologických podmienok (kontrola) a po ligácii sedacieho nervu. \*\*\*  $p < 0,001$



**Obrázok 4.** Kvantitatívne stanovenie počtu malých  $AT_1$  receptor – imunoreaktívnych buniek

kolokalizovaných s CGRP, IB4 a TH v spinálnych gangliách za fyziologických podmienok (kontrola) a po ligácii sedacieho nervu. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$

#### POĎAKOVANIE

Moje poďakovanie za výbornú technickú asistenciu patrí Ingrid Vrábelovej. Výskumná práca bola podporená VEGA grantom č. 2/0203/10.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

Bergman E. a spol. Brain Res. 1999, 832, 63-83.

Chrysant S.G. J Clin Hypertens. 2007,9, 454-459.

Inagami T. a spol. Arzneimittelforschung, 1993, 43, 226-228.

Jöhren O, Ingami T, Saavedra J.M. NeuroReport. 1995, 6, 2549-2552.

Oldfield B.J. a spol. Brain Res. 1994, 650, 40-48.

Tsutsumi K, Saavedra J. M. Neurochem. 1991, 56, 384-351.

Vulchanova L. a spol. Neuroscience, 2001, 108, 143-155.

## HYPERICÍN, CISPLATINA A ICH KOMBINOVANÝ ÚČINOK V BUNKÁCH OVARIÁLNEHO ADENOKARCINÓMU

Papčová Z., Jendželovský R., Koval' J., Mikeš J., Hiřovská L., Fedoročko P.

*Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach*

### ABSTRAKT

Rezistencia nádorových buniek voči cytostatikám, ktorá môže vyústiť až k zlyhaniu liečby, predstavuje závažný problém v protinádorovej terapii. Dnes je už známe, že bunky disponujú viacerými mechanizmami, prostredníctvom ktorých sa dokážu vysporiadať s xenobiotikami a so zásahmi z vonkajšieho prostredia a že tieto mechanizmy sú ovplyvniteľné rôznymi príležitostne, aj bežne užívanými látkami, medzi inými aj látkami obsiahnutými v liečivých rastlinách. V tejto štúdii sme preto sledovali vplyv hypericínu, jedného z biologicky aktívnych metabolitov ľubovníka bodkovaného (*Hypericum perforatum* L.), na účinky cisplatinu v bunkách ľudského ovariálneho adenokarcinómu (A2780, A2780cis). Výsledky viacerých analýz (MTT test, analýza externalizácie fosfatidylserínu a viability, analýza zmien mitochondriálneho membránového potenciálu) poukazujú na schopnosť hypericínu znížiť cytotoxicitu cisplatinu a to nielen v bunkách senzitívnych (A2780) na účinok cisplatinu, ale aj v rezistentnej bunkovej línii A2780cis. Výrazné antagonistické pôsobenie hypericínu voči účinkom cisplatinu bolo sprevádzané nárastom hladiny ABC transportného proteínu MRP1, ktorý sme detekovali metódou Western blot. Táto skutočnosť poukazuje na schopnosť hypericínu indukovať niektoré mechanizmy rezistencie. Dosiahnuté výsledky by mohli upozorniť na riziko súbežného užívania extraktov z ľubovníka bodkovaného s cytostatickými liečivami a prispieť k odhaleniu negatívnych liekových interakcií zodpovedných za prípadné komplikácie pri liečbe iných typov ochorení.

### ÚVOD

Napriek značným pokrokom v poznaní biológie ľudských nádorov a neustálemu zdokonaľovaniu diagnostických a liečebných postupov patria nádorové ochorenia vo svete dodnes medzi hlavné príčiny úmrtí. Mnohopočetná lieková rezistencia (MDR) predstavuje jeden z najzávažnejších problémov, ktorý výrazne prispieva ku komplikáciám v liečbe nádorových ochorení a častokrát aj k zlyhaniu terapeutického prístupu. Nádorové bunky „sa všemožne snažia prežiť“ a pomocou početných mechanizmov dokážu odolávať väčšine pokusov o ich elimináciu. Sú tak schopné nadobudnúť rezistenciu voči širokému spektru štruktúrne, chemicky a funkčne odlišných liečiv.

Je známe, že množstvo prírodných látok moduluje niektoré mechanizmy MDR a dnes už množstvo experimentálnych a klinických štúdií upozorňuje na nežiaduce liekové interakcie spôsobené liečivými rastlinami. Tieto interakcie môžu mať dopad na efektivitu viacerých liečebných postupov, no napriek tomu stále viac ľudí užíva produkty z liečivých rastlín v rámci prevencie a na terapeutické účely. Extrakty z ľubovníka bodkovaného (*Hypericum perforatum* L.) sa vo vysokej miere využívajú na liečbu psychických problémov ako sú depresie, úzkosti, nervozita a nespavosť. Biologicky aktívne látky obsiahnuté v ľubovníku, predovšetkým hyperforín a hypericín, sú však schopné ovplyvniť viaceré mechanizmy MDR (Cantoni a kol., 2003; Chen a kol., 2004; Komoroski a kol., 2004). Výsledky z našich laboratórií poukazujú na indukčný potenciál hypericínu voči expresii a aktivite ABC transportných proteínov MRP1 a BCRP v bunkách adenokarcinómu hrubého čreva (Jendželovský a kol., 2009). Toto zistenie by mohlo prispieť k odhaleniu liekových interakcií, ktoré by mohli byť zodpovedné za prípadné komplikácie pri liečbe nádorových ochorení. Vychádzajúc tak z predpokladu, že hypericín je schopný navodiť rezistenciu prostredníctvom

aktivácie ABC transportných proteínov, bolo našim cieľom analyzovať vplyv predinkubácie buniek ovariálneho adenokarcinómu s hypericínom na účinok cisplatiny.

## MATERIÁL A METODIKA

*Bunkové línie.* Ako experimentálny model boli použité bunkové línie ľudského ovariálneho adenokarcinómu A2780 (parentálna, senzitívna voči cisplatine) a A2780cis (odvodená, rezistentná voči cisplatine). Bunky boli nasádzané do kultivačných platní alebo Petriho misiek a kultivované v médiu RPMI 1640 obohatenom o 10 % FBS po dobu 24 hod za definovaných podmienok (37°C, 95% vlhkosť, 5% CO<sub>2</sub>). Následne boli bunky vystavené vplyvu xenobiotík a podrobené procedúram podľa experimentálnej schémy.

*Analýza metabolickej aktivity buniek (MTT test).* Bunky boli predinkubované s vybranými koncentráciami hypericínu (0,1 a 0,5 µM) po dobu 24 hod a následne k nim bola pridaná cisplatina (IC 50). Po uplynutí doby pôsobenia cisplatiny (24 a 48 hod) bol k bunkám pridaný MTT (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid; 0,5 mg/ml), ktorý je živými bunkami metabolizovaný na nerozpustný fialový formazán. Po štvorhodinovej inkubácii bol na zastavenie metabolizácie MTT a rozpustenie kryštalického formazánu pridaný 10% roztok SDS (dodecylsulfát sodný). Nasledujúci deň bola pomocou spektrofluoroluminometra FluoStar Optima odmeraná absorbancia ( $\lambda = 585$  nm) rozpusteného formazánu.

*Analýza počtu buniek.* Po 24 hod predinkubácii buniek s hypericínom a následnom pôsobení cisplatiny bol počet adherentných (prisadnutých) a plávajúcich buniek v jednotlivých experimentálnych skupinách stanovený prístrojom Coulter Counter. Plávajúce bunky boli analyzované priamo z média odobratého z experimentálnych skupín 24 a 48 hod po pridaní cisplatiny. Adherentné bunky boli vystavené pôsobeniu trypsínu, zozbierané a následne počítané.

*Analýza externalizácie fosfatidylserínu a viability.* Adherentné aj plávajúce bunky boli zozbierané 24 a 48 hod po pridaní cisplatiny, ktorému predchádzala 24 hodinová predinkubácia s hypericínom. Bunky boli farbené s Annexin V-FITC po dobu 20 min pri izbovej teplote, opláchnuté a farbené s propídiom jodidom minimálne 5 min. Vzorky boli analyzované pomocou prietokového cytometra BD FACSCalibur.

*Analýza zmien mitochondriálneho membránového potenciálu (MMP).* Adherentné aj plávajúce bunky boli zozbierané v súlade s experimentálnou schémou identickou s predošlými analýzami, opláchnuté v roztoku PBS, resuspendované v roztoku HBSS. Bunky boli farbené s 0,1 µM TMRE (tetremetylrodamin etyl ester) po dobu 30 min pri izbovej teplote. Vzorky boli analyzované pomocou prietokového cytometra BD FACSCalibur.

*Western blot.* Bunkové lyzáty pre analýzu hladiny proteínov boli pripravené s využitím komerčnej zmesi inhibítorov proteáz a fosfatáz 15 min, 1, 6 a 24 hod po pridaní hypericínu a 1, 6 a 24 hod po pridaní cisplatiny, ktorému predchádzala 24 hodinová predinkubácia s hypericínom. Proteíny boli kvantifikované s využitím komerčnej sady (BioRad Laboratories), nariadené na rovnakú koncentráciu (30 µg/ml), oddelené pomocou polyakrylamidovej elektroforézy (SDS-PAGE) a prenesené na PVDF membrány. Po 1 hod inkubácii v tlmivom roztoku obsahujúcom 5% sušené mlieko boli membrány inkubované cez noc pri 4°C s primárnou protilátkou (anti-MRP1, anti-MRP2, anti-BCRP, anti- $\beta$ -aktín). Po premytí v preplachovacom roztoku boli membrány 1 hod inkubované pri laboratórnej teplote s príslušnou sekundárnou protilátkou. Imunodetekcia hladiny jednotlivých analyzovaných proteínov bola stanovená pomocou chemiluminiscenčného kitu ECLplus na RTG film.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Interakcie liečiv a biologicky aktívnych metabolitov obsiahnutých v liečivých rastlinách predstavujú dôležitý faktor, ktorý môže zapríčiniť zlyhanie aplikovanej liečby a ktorý je preto nutné pri konkrétnom terapeutickom prístupe zohľadniť. Jednou z liečivých bylín, s ktorou sa

pomerne často spája vznik negatívnych liekových interakcií, je aj ľubovník bodkovaný (*Hypericum perforatum* L.), ktorý je v čoraz väčšej miere využívaný ako antidepresívum. Viacero štúdií upozorňuje na indukčný potenciál hyperforínu, jedného zo sekundárnych metabolitov ľubovníka, voči niektorým cytochróm P450 monooxygenázam a ABC transportnému proteínu P-gp (Cantoni a kol., 2003; Chen a kol., 2004; Komoroski a kol., 2004). Výsledky dosiahnuté v našich laboratóriách však poukazujú na hypericín ako na ďalší biologicky aktívny metabolit, ktorý je schopný modulovať aktivitu niektorých ABC transportných proteínov (Jendželovský a kol., 2009). Na základe toho je možné predpokladať, že hypericín by mohol byť schopný navodiť rezistenciu nádorových buniek prostredníctvom aktivácie transportných proteínov a tým znížiť účinnosť následne aplikovaných chemoterapeutík, ktoré predstavujú substráty pre dané proteíny. Keďže cisplatina je stále v praxi využívaným chemoterapeutikom a zároveň aj potenciálnym substrátom niektorých ABC proteínov, cieľom tejto štúdie bola analýza vplyvu predinkubácie buniek ovariálneho adenokarcinómu s hypericínom na účinok cisplatinu a overenie predpokladu navodenia rezistencie voči tomuto cytostatiku.

Zistili sme, že hypericín je schopný znížiť cytotoxicitu cisplatinu v bunkách senzitívnych (A2780) aj rezistentných (A2780cis) voči cisplatinu. Aj keď zmeny v celkovej počte a počte plávajúcich buniek neboli výrazné, ďalšie sledované parametre odhalili negatívny vplyv hypericínu voči účinkom cisplatinu. Zaznamenali sme štatisticky významný nárast metabolickej aktivity, pokles percenta buniek so zníženým MMP, ako aj redukcii percenta apoptotických a mŕtvych buniek. Na základe hodnôt kombinačného indexu (CalcuSyn; Chou a Talalay, 1984) sme zistili, že hypericín sa vyznačuje antagonistickým vplyvom voči účinku cisplatinu, čo by mohlo súvisieť s jeho schopnosťou aktivovať niektoré mechanizmy MDR. Vychádzajúc z našich predošlých výsledkov (Jendželovský a kol., 2009), zamerali sme sa na zmeny expresie ABC transportných proteínov MRP1, MRP2 a BCRP. v skupinách ovplyvnených samotným hypericínom a kombináciou hypericínu s cisplatinou sme v oboch bunkových líniiach odhalili zvýšenie hladiny transportného proteínu MRP1. Tento nárast bol evidentný na šiestu hodinu od pridania hypericínu, pričom pretrval aj na 24 a 48 hod. Doterajšie výsledky tak poukazujú na indukčný potenciál hypericínu voči niektorým mechanizmom MDR. Je však nutné uplatniť ďalšie analýzy pre vyvrátenie alebo potvrdenie možnosti účasti proteínu MRP1 na modulovanom účinku cisplatinu ako aj pre odhalenie ďalších mechanizmov, ktoré by mohli byť zodpovedné za výsledný efekt. Je možné predpokladať, že by vplyvom hypericínu mohlo dôjsť k ovplyvneniu aj ďalších systémov zodpovedných za rezistenciu nádorových buniek voči cisplatinu, keďže tá je značne multifaktoriálna a v závislosti od typu buniek sa na nej uplatňuje viacero mechanizmov a signálnych dráh.

Dosiahnuté výsledky by mohli prispieť k odhaleniu negatívnych liekových interakcií zodpovedných za prípadné komplikácie pri liečbe iných typov ochorení. Je dôležité upozorniť na ľubovník bodkovaný a jeho extrakty, keďže ich dlhodobé užívanie by nielen kvôli obsahu hyperforínu, ale aj kvôli obsahu hypericínu, mohlo mať za následok vznik rezistencie a zníženie účinnosti príslušného liečiva.

## POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. VVCE-0001-07 a APVV-0040-10, Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV č. VEGA 1/0626/11 a Vnútnym vedeckým grantovým systémom PF UPJŠ č. VVGS PF 6/2011/B.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Cantoni L, Rozio M, Mangolini A, Hauri L, Caccia S. Hyperforin contributes to the hepatic CYP3A-inducing effect of *Hypericum perforatum* extract in the mouse. *Toxicol Sci.* 2003; 75(1):25-30.
- Chen Y, Ferguson SS, Negishi M, Goldstein JA. Induction of human CYP2C9 by rifampicin, hyperforin, and phenobarbital is mediated by the pregnane X receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 308(2):495-501.
- Komoroski BJ, Zhang S, Cai H, Hutzler JM, Frye R et al. Induction and inhibition of cytochromes P450 by the St. John's wort constituent hyperforin in human hepatocyte cultures. *Drug Metab Dispos.* 2004; 32(5):512-8.
- Jendželovský R, Mikeš J, Koval' J, Souček K, Procházková J et al. Drug efflux transporters, MRP1 and BCRP, affect the outcome of hypericin-mediated photodynamic therapy in HT-29 adenocarcinoma cells. *Photochem Photobiol Sci.* 2009; 8(12):1716-23.
- Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984; 22:27-55.



## BIZARNÉ FORMY ŽIVOTA

Renčko A., Špalková M., Toropila M., Ondrašovičová S., Daňová D.

Katedra biológie a genetiky, Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie

### ABSTRAKT

V našich akváriách sa stretávame s kedysi u nás nedosiahnuteľnými druhmi najrôznejších exotických druhov rýb a ponuka rastlín sa taktiež datuje v stovkách druhov. V poslednom čase sú čoraz častejšími obyvateľmi našich akvárií i rôzne sprievodné druhy ako slimáky, rôzne kôrovce (napr. kraby, raky, krevety) a mnohé iné. Tým sa však venuje dostatok pozornosti. My sa zameriame na stvorenia menej nápadné, no veľmi zaujímavé z mnohých hľadísk. O prítomnosti týchto obyvateľov akvárií mnohokrát nevedia ani samotní akvaristi. Niektoré z nich sú užitočné, iné menej, daktoré dokonca pri premnožení škodia, no všetky sú konkurencieschopné a pri zmenených podmienkach sa ich populácie pozvoľna či náhle strácajú, alebo sa naopak rozrastú. Cieľom bola biotopová štúdia. Pozorovali sme zmeny osídlenia jednotlivých druhov živočíšnej ríše v akváriu po odčervovaní terčovcov (*Symphyshodon discus*) neguvonom. (Neguvon úč. I. trichlorfon). Najčastejšie trpia parazitárnymi chorobami. Po ukončení liečby boli do značnej miery zredukované druhy, ktoré škodili rybám alebo rastlinám. Ďalej sme sledovali výskyt ďalších živočíšnych druhov v iných prostrediach a typoch vôd. Občas sa však v bežnom živote i veterinárnej praxi môžeme stretnúť s netradičnými vodnými živočíchmi v prírode ako pracovníci v rybospracujúcom priemysle, ale i pri potravinárskych produktoch ako bežní konzumenti.

### ÚVOD

Ryby trpia mnohými bakteriálnymi, vírusovými, plesňovými, geneticky podmienenými i výživou a chovnými podmienkami získanými chorobami. Diskusy patria medzi chovateľsky atraktívne ryby s veľkým spektrom farebných línií. Najčastejšie trpia parazitárnymi chorobami (Šmiga, 2012). Chovatelia zaznamenávajú vysokú prevalenciu žiabrohlíst, čiže *Dactylogyrus spp.* a *Gyrodactylus spp.* Tieto drobné helminty veľkosti do 1,5 mm sú kozmopolitne rozšírené druhy (Jurášek a kol., 1993). Parazity poškodzujú tkanivo žiabier, žiabre sú hnedé silne zahlienené (Jurášek a kol., 1993). Mávajú pomerne úzku hostiteľskú špecificitu a môžu byť významnými patogénmi, predovšetkým na plôdiku (*D. vastator*). Sú oviparné, takže k nákaze ďalšieho hostiteľa dochádza až potom, keď sa vo vode zo zrelého vajíčka vyliadne onkomiracidium, ktoré aktívne vyhľadá novú rybu (Volf a kol., 2007).

**Cieľ :** Biotopová štúdia. Pozorovali sme zmeny osídlenia jednotlivých druhov živočíšnej ríše v akváriu po odčervovaní terčovcov (*Symphyshodon discus*) neguvonom. (Neguvon úč. I. trichlorfon). Ďalej sme sledovali výskyt ďalších živočíšnych druhov v iných prostrediach a typoch vôd.

### MARERIÁL A METÓDY

Odčervovaná bola spoločenská nádrž s diskusmi, neónkami a inými tetrami (Amazonská biotopová) husto porastená lymnofilami a echinodorusmi o objeme 340 l; pri teplote vody 28°C; pH 7,4; vodivosti 442 mS.cm<sup>-1</sup>; pri nasýtení kyslíkom 85,7%, čiže 6,18 mg.l<sup>-1</sup> akváriovej vody. Dehelmintizácia bola robená prípravkom Neguvon s účinnou látkou trichlorfon o špecificky druhovom dávkovaní (zvolenom pre druh *Symphyshodon discus*) 0,25 g na 100 l akváriovej vody. Liečebná kúra trvala 3 dni. Teplota vody bola počas liečby zvýšená na 30°C. Filtrácia bola spustená na plný výkon (1200 l.hod<sup>-1</sup>), avšak bez aktívneho uhlia. Samotnému odčervovaniu predchádzala patologicko-anatomická pitva, ktorá dokázala a potvrdila podozrenie z nákazy týmito monogeami.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Žiabre terčovcov boli početne napadnuté, na lamelách sme pod mikroskopom pozorovali petechie, ale aj nekrotické ložiská. Následne prebehla i izolácia tohto parazita. Prípravok Neguvon však pôsobí zhubne nielen na *Dactylogyrus spp.*, ale i na iné nižšie živočíchy. I v našom akváriu sme zaznamenali úhyn kreviet druhu *Neocardina denticulata* do 24 hodín po začatí kúry. Prvé nervové príznaky sa u nich objavili už po 9 hodinách, mortalita u tohto druhu bola 100%-ná. U ďalšieho živočicha (slimáka) *Anisus vorticulus* sme zaznamenali vytiahnutie nohy z ulity po 1 dni, úhyn do 3. dňa bol približne 50%-ný. U slimáka *Melanoides tuberculata*, ako i u slimáka *Clea helena* nebol zaznamenaný úhyn. Po odčervovaní terčovcov (*Symphiodon discus*) po 1. dni od začiatku liečebnej kúry sa vo zvýšenej miere zviditeľnil pohyb lastúrnatic (trieda *Ostracoda*), ktoré sú nezmenené na Zemi už od Kambria. Veľký pohyb sme zaznamenali tiež u planárií. (Úhyn do 3. dňa bol 100%-ný.) Po ukončení liečby boli do značnej miery zredukované druhy, ktoré škodili rybám alebo rastlinám. Pri týchto stabilizovaných podmienkach sa pomnožili iní predátori. Živočích nezmar hnedý (lat. *Hydra oligactis*) je druh nezmaru bežne sa vyskytujúci v stojatých a pomaly tečúcich vodách mierneho pásma na severnej pologuli (wikipedia). Okrem neho sa sporadicky vyskytuje i nezmar zelený (*Chlorohydra viridissima*/*Hydra viridissima*, obr. č. 1 a 2). Výskyt tohto druhu sme zaznamenali i my po odčervení v našom akváriu. Objavil sa náhle na niekoľkých skalách a jeho populácia sa do niekoľkých dní rozrástla mnohonásobne až na populáciu okolo 150 kusov, ktorá neskôr pozvoľna klesala. Niektoré jedince boli aj 2 cm veľké. Tento živočíšny druh je veľmi citlivý na obsah medi a meďnatých preparátov v akváriovej vode, možno ho teda považovať za indikátor obsahu medi. Mávajú od štyroch do šiestich ramien. Živia sa dafniami (*Daphnia pulex*), žiabronôžkami (*Artemia franciscana*), ale i ostatným planktónom. Po odčervení a znížení populačného tlaku neguvonom dostali i tieto zaujímavé druhy možnosť zvýšiť denzitu svojich populácií. Bola sledovaná úmrtnosť a životaschopnosť jednotlivých druhov a všetky opisované a izolované živočíšne druhy boli fotograficky zaznamenané.

Po zmene podmienok v ekosystéme akvária, a zničení niektorých nežiadúcich druhov sa v krátkom čase objavujú druhy iné, ktoré sú v našom prípade menej invazívne a menej škodlivé pre rybky a celý ekosystém akvária. V zmenených konkurenčných a predátorských podmienkach sa okrem iných živočíšnych druhov v našom akváriovom biotope zhruba po 3 mesiacoch objavila kolónia nezmaru zeleného. Na tejto štúdii môžeme vidieť, ako rýchlo dokážu uvoľnené miesto v nike obsadiť iné druhy.

Obr. Č. 1. Nezmar zelený *Chlorohydra viridissima* (vľavo dole)

Obr. Č. 2. Nezmar zelený *Chlorohydra viridissima* (vpravo dole)



S ďalším zaujímavým živočíšnym druhom sme sa stretli pri odbere vzoriek hornín (na stanovenia rádionuklidov niektorých prvkov) z podpovrchových tokov riek slovenských jaskynných systémov. Tak tomu bolo i v našom najväčšom demänovskom jaskynnom systéme. Ide o vzácných a zaujímavých chvostoskokov (trieda *Collembola*). Tieto druhy začali prenikať do podzemia s nástupom nepriaznivého podnebia počas ľadových dôb v starších štvrtohorách. Pokročilý stupeň adaptácií na jaskynné prostredie naznačuje, že ich evolúcia prebiehala dlhší čas. Niektoré troglobionty možno označiť za glaciálne relikty, t.j. pozostatky chladnomilnej fauny z ľadových dôb. U jaskynných chvostoskokov je rozmnožovací potenciál nižší ako u povrchových druhov. Troglobionty majú spomalené biologické procesy, zníženú schopnosť regulovať straty telesnej vody a tendenciu k zvýšeniu obsahu tuku v tkanivách. Rozmnožovanie nemá periodicitu striedania dňa a noci alebo ročných období a závisí od prítomnosti potravy v tomto prostredí. Niektoré jaskynné chvostoskoky majú tendenciu ku geofáгии, t.j. ku konzumácii jaskynných sedimentov a dokážu tak dlhšie hladovať. Stygobiontné druhy sa dožívajú 15-krát viac ako povrchové druhy a všetky vývinové štádiá sú predĺžené (Thibaud a Deharveng, 1994). Zaujímavé živočíchy žijú i vo vodách našich lesov. V studničke v katastri obce Svrčinovec na horných Kysuciach (obr. č. 3) každoročne zaznamenávame výskyt mloka karpatského (*Triturus montandoni*, obr. č. 4.), ktorý sa živí i krivákmi (*Gammarus pulex*).

Obr. Č. 3. Prirodzené prostredie mloka karpatského (*Triturus montandoni*) (vľavo dole)

Obr. Č. 4. Mlok karpatský (*Triturus montandoni*) (vpravo dole)



Kantíková a kol. (2006) našli v konzerve s rybami od spotrebiteľov článkonožca *Saduria entomon*. Výrobcom konzervy bol výrobca z Lotyšska. Vedci sa domnievajú, že *Saduria spp.* zablúdila do baltickej oblasti z Barentsovho mora asi pred viac ako 7000 rokmi na konci poslednej doby ľadovej. Nakoľko sa našla na mnohých miestach Arktídy, populácia v Baltickej oblasti sa považuje za relikvitu doby ľadovej. Pozdĺž pobrežia *Saduria spp.* zapríčiňuje problémy rybárom, lebo napáda ulovené slede (Kantíková a kol., 2006). Títo autori ďalej popisujú že *Saduria spp.* môže mať až 8,6 cm a je indikátorom čistoty slaných vôd. Žije od hladiny až po hĺbku 290 m.

Pri tomto bezpodmienečne nutnom chovateľskom úkone (odčervovaní diskusov) sme mali možnosť pozorovať v akváriu priamo na pracovisku, ako sa v zmenených podmienkach potravinovej niky vedia presadiť jednotlivé živočíšne druhy. Voda poskytuje útočisko od fylogeneticky najjednoduchších (žiabronôžky, gamarusy, nezmary, hmyz a i.) živočíšnych druhov až po vodné cicavce. Vodné prostredie poskytuje mimoriadne rôznorodé a bohaté podmienky pre život a zahŕňa i tieto zaujímavé (až bizarné) formy života. Ako nám ukazuje prax, čoraz častejšie sa môžeme i u nás stretnúť s nepôvodnými tropickými, ale i arktickými druhmi. Preto je pre nás ako veterinárnych lekárov potrebné tieto živočíšne druhy poznať a neustále sa v tejto zoologickej oblasti vzdelávať.

#### POĎAKOVANIE

Prezentovaná práca vznikla za podpory Štátneho veterinárneho a potravinového ústavu v Dolnom Kubíne a jaskyniarov speleoklubu Demänovská dolina.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

[http://sk.wikipedia.org/wiki/Nezmar\\_hned%C3%BD](http://sk.wikipedia.org/wiki/Nezmar_hned%C3%BD)

Jurášek V., Dubinský a kol.: Veterinárna parazitológia, Príroda, Bratislava, 1993, ISBN 80-07-00603-6, 382 s.

Kantiková, M., Škuntová, O., Vankúšová, M., Březinová, N.: Aké prekvapenie nás môže čakať pri otvorení rybacej konzervy? Slovenský veterinársky časopis, č 4, 2006 str. 220, ISSN 1335-0099

Šmiga Ľubomír: Prevalencia chorôb v okrasných chovov rýb, ŠVOČ-2012, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice, ISBN 978-80-8077-277-2,

Thibaud J.-M., Deharveng L., 1994: Collembola. In: Juberthie C., Decu V. (eds.), Encyclopaedia Biospeologica, Tome I., Société de Biospéologie, Moulis - Bucarest, 267-276

Volf, P., Horák, P a kol.: 2007 Paraziti a jejich biologie, Triton, Praha, ISBN 978 -80 – 7387 – 008 - 9, 318 s.

## ANTIOXIDAČNÝ ÚČINOK ŠALVIOVEJ SILICE U KURČIAT

Ryzner M.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice*

### ABSTRAKT

Rastlinné silice môžu pozitívne ovplyvňovať príjem krmiva a tým zvyšovať hmotnostné prírastky u zvierat, čo sa javí ako vhodná alternatíva niektorých rastových stimulantov napríklad antibiotík, na rozdiel od ktorých by zabezpečili rovnakú ekonomickú efektívnosť chovu, ale ich prirodzený pôvod by zaručoval bezpečnosť. Novú generáciu rastových stimulantov predstavujú napríklad aditíva na báze rastlín, takzvané fytoaditíva (rastlinné extrakty, éterické oleje), ktoré sa okrem iných prospešných vlastností vyznačujú predovšetkým silnými antibakteriálnymi a antioxidačnými vlastnosťami. Extrakty *Salvia officinalis* majú široké uplatnenie predovšetkým pre svoje významné antioxidačné, antibakteriálne, virostatické, fungicídne, antiflogistické, adstringenčné, analgetické a insekticídne vlastnosti. Fenolová rozmarínová kyselina je zlúčenina, ktorá najviac prispieva k antioxidačnej aktivite šalvie. Vo všeobecnosti je možné rastlinné silice využiť vo výžive kurčiat na optimalizáciu ich tráviacich procesov, k zlepšeniu produkčných parametrov, ako aj k stimulácii imunitných reakcií, k prevencii a čiastočne aj k terapii ochorení, čo vedie k udržiavaniu dobrého zdravotného stavu kurčiat.

### ÚVOD

*Salvia officinalis* L. patrí do čeľade *Lamiaceae*. Jej domácou oblasťou sú stredomorské krajiny, no dnes sa pestuje po celom svete. Táto liečivá aromatická rastlina je dobre známa svojou povestou „všeliaku“, najmä kvôli silným antioxidačným účinkom, ktoré sú prisudzované fenolovým komponentom, ktoré obsahuje (Baricevic a Bartol, 2000). Vysoká antioxidačná aktivita šalvie a jej použitie v tradičnom liečiteľstve viedlo vedcov ďalej skúmať túto bylinu, aby lepšie zistili mechanizmy jej účinku. Šalvia je známa svojou vysokou produkciou sekundárnych metabolitov, ktoré jej dávajú liečivé a aromatické vlastnosti a robia ju bohatou na zdroj bioaktívnych látok.

Voľné radikály sú tvorené ako dôsledok normálneho intracelulárneho metabolizmu v mitochondriách a peroxizómoch ako aj rozličných cytozolových enzýmových systémoch. Navyše množstvo vonkajších činiteľov môže spúšťať tvorbu voľných radikálov a ich reaktívnych metabolitov. Dokonalý enzýmový a ne-enzýmový obranný systém zahrňujúci katalázu (CAT), superoxid dismutázu (SOD) a glutatión peroxidázu (GPx) reguluje hladinu a pôsobí proti celkovým voľným radikálom, aby bola udržiavaná homeostáza. Znižovanie hladiny voľných radikálov pod určitú hodnotu môže narušiť fyziologickú úlohu oxidantov v celulárnej proliferácii a celkovú ochranu organizmu. Naopak zvýšená tvorba voľných radikálov môže byť škodlivá a viesť k bunkovej smrti alebo k rýchlejšiemu starnutiu a chorobnosti. Zvyčajne je škodlivosť spôsobená zvýšením hladiny voľných radikálov myslená ako výsledok náhodného poškodenia proteínov, lipidov a DNA (Finkel a Holbrook, 2000).

### OXIDAČNÝ STRES

Voľné radikály sú molekuly, ktoré obsahujú jeden alebo viacero nespárovaných elektrónov následkom čoho sa molekuly stávajú chemicky extrémne reaktívnymi. Za normálnych fyziologických podmienok je produkcia voľných radikálov a ďalších reaktívnych látok približne v rovnováhe s antioxidačným obranným systémom (Halliwell a Gutteridge, 1999). Rovnováha však nie je dokonalá, pretože k oxidačnému poškodeniu dochádza v DNA, na proteínoch, lipidoch a malých molekulách v živých systémoch i za normálnych podmienok (Halliwell a Gutteridge, 1999; Willcox a kol., 2004). Poškodené molekuly sú opravené alebo vymenené. Avšak za určitých okolností môže dôjsť k nerovnováhe medzi voľnými radikálmi

a antioxidačným obranným systémom, čo následne spôsobí oxidačný stres, ktorý môže vyústiť v rozsiahle škody akumuláciou oxidovaných molekúl (Halliwell, 1996). To môže byť napríklad v dôsledku vystavenia sa oxidatívny podmienkam životného prostredia, ako je ultrafialové žiarenie, hyperoxia, lieky a toxíny (napríklad v súčasnosti znečistený vzduch a cigaretový dym) a tiež zmeny bunkových systémov za patologických podmienok (napr. u chronických zápalových ochorení a ischémii) (Willcox a kol., 2004). Vyššou úrovňou oxidatívneho stresu sú ťažké poškodenia molekúl v bunke, ako sú proteíny, DNA a lipidy, čo môže mať za následok rozsiahlu bunkovú smrť. Napriek tomu bunky často tolerujú mierny oxidatívny stres prostredníctvom zmien v expresii génov, čo má za následok syntézu antioxidačných enzýmov. V skutočnosti je oxidačný stres spájaný s etiológiou niekoľkých príbuzných chronických chorôb ako sú rakovina, cukrovka, neurodegeneratívne a kardiovaskulárne ochorenia (Halliwell, 1996; Halliwell a Gutteridge, 1999; Willcox a kol., 2004). Oxidačnému stresu boli pripísané aj s vekom súvisiace starnutie a strata fyziologických schopností. Pri niektorých ochoreniach je oxidačný stres len sekundárny jav a nie je primárnou príčinou choroby, čo však neznamená, že oxidačný stres je v tomto prípade nepodstatný (Halliwell, 1996).

## ANTIOXIDAČNÁ OCHRANA

Medzi ochranné systémy patria:

1.) mechanizmy - zabráňujú tvorbe voľných radikálov: napr. elimináciou voľných iónov, inhibíciou enzýmov, ktoré katalyzujú tvorbu voľných radikálov alebo reaktívnych metabolitov, odstránením peroxidov enzýmami katalázou alebo peroxidázou. Tieto sú antioxidy v širšom slova zmysle.

2.) systémy – ktoré vycytávajú, alebo lapajú už vytvorené voľné radikály, tieto látky sa označujú ako antioxidy v užšom slova zmysle. Sú to vitamíny A, E, C, karotenoidy, glutatión, kyselina močová a iné, ktorých funkciou je prerušenie a obmedzenie rozširovania reťazových reakcií tvorby reaktívnych kyslíkových radikálov (ROS). Podľa mechanizmu eliminácie voľných radikálov sa delia na: vycytávače (scavengers), lapače (trappers), zhášače (quencher).

3.) reparačné systémy – odstraňujú poškodené molekuly z organizmu, ktoré vznikli pôsobením radikálov a toxických produktov ich metabolizmu. Sú to: lipofilné enzýmy, proteolytické enzýmy a regeneračné systémy (Ďuráčková, 1997).

Éterické oleje sú prchavé, prírodné, komplexné zlúčeniny intenzívne voňajúce, olejovité látky obsiahnuté v rôznych častiach rastlín. Pôsobia hlavne protizápalovo (Juhás a kol., 2008), antimikrobiálne (Fabian a kol., 2006) a antioxidačne (Faix a kol., 2007). Éterický olej šalvie je zmesou prchavých zlúčenín, v ktorých je prevaha terpénov s nižšou molekulovou hmotnosťou, predovšetkým monoterpénov a seskviterpenov, ktoré tvoria prchavú súčasť a arómu rastliny (Cuppert a Hall, 1998). Biologické vlastnosti éterického oleja *Salvia officinalis* sú pripisované najmä alfa a beta tujónu, gáfru a 1,8 cineolu (Senatore a kol., 2006). Antioxidačná aktivita sa prisudzuje predovšetkým fenolovým zložkám ako sú karnozol, kyselina karnozová, rozmarol a kyselina rozmarínová, ale aj flavonoidom a fenolovým glykozidom (Lu a Foo, 2001).

Vo väčšine štúdií boli použité rastlinné výtázky, zatiaľ čo priame použitie účinných zložiek je menej časté. Použitie extraktu vedie k vyššej antioxidačnej aktivite vzhľadom na vyššiu koncentráciu antioxidačných látok. Avšak prchavé aromatické zložky obmedzujú používanie extraktu vo vyšších koncentráciách. Bolo dokázané, že účinnosť hlavných zložiek je modulovaná inými drobnými molekulami. Niektoré štúdie v závere poukázali, že celý éterický olej má väčšiu biologickú aktivitu ako samotné hlavné zložky éterického oleja (Mourey a Canillac, 2002), čo naznačuje, že aj menšinové zložky sú dôležité pre jeho účinok

a môžu mať synergický efekt alebo zosilňujúci vplyv. Toto bolo zistené aj v prípade šalvie (Marino a kol., 2001).

Rozsah účinkov týchto hlavných zložiek je priamo závislý na ich koncentrácii v čase, keď sú testované, či už samostatne alebo zahrnuté v éterickom oleji. Synergické účinky rôznych molekúl obsiahnutých v éterických olejoch, v porovnaní s účinkom jednej alebo dvoch hlavných zložiek oleja, ostávajú otázne (Bakkali a kol., 2008). Je však možné, že aktivita hlavných zložiek oleja je modulovaná ostatnými malými molekulami.

Antioxidačná aktivita fenolových látok v rastlinách je hlavne vďaka ich redoxným vlastnostiam a chemickej štruktúre. Farag a kol. (1989) diskutovali o vzťahu medzi antioxidačnými vlastnosťami a chemickým zložením éterických olejov. 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 oxidácii tukov, a tým spomaľujú hydroxy-peroxidovú formáciu. Teissedre a Waterhouse (2000) potvrdzujú vysokú koreláciu medzi celkovým obsahom fenolu v éterických olejoch a nízkou v lipoproteínovou oxidáciou u ľudí *in vitro*. Napríklad u nosníc sa oxidácia lipidov žltka v chlade znížila pridaním thymolu do potravy, čím sa následne môže predĺžiť obdobie skladovania a eliminovať tak potrebu ďalšej oxidačnej stabilizácie (Botsoglou a kol., 2002).

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 chránia bunky pred oxidatívnym poškodením (Kyriakopoulos a Behne, 2002). Jednou z dôležitých reakcií typických pre oxidačný stres organizmu je oxidácia polynenasýtených 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). To, že éterické oleje majú silné antioxidačné vlastnosti vo svojich prácach potvrdili aj Faix a kol. 2009, keď po podávaní éterického oleja *Cinnamomum zeylanicum* zistili signifikantný vplyv na antioxidačný status, ako aj zvýšenie fagocytárnej aktivity u výkrmových kurčiat. Taktiež Plachá a Faix, 2008 popisali možný pozitívny vplyv škorice, rozmarínu a borneolu na imunitné funkcie v organizme, keďže tieto éterické oleje stimulovali fagocytárnu aktivitu leukocytov. V posledných rokoch sa zvýšil význam prírodných antioxidantov z dôvodu potencionálnych nebezpečných vlastností syntetických antioxidantov. Navyše bolo preukázané, že prírodné antioxidanty majú priaznivé účinky na organizmus.

## POĎAKOVANIE

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

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Waomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46:446-475.
- Baricevic D, Bartol T. The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus. Kintzios, S.E. (Ed.), SAGE – The Genus *Salvia*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2000:143-184.
- Botsoglou N.A, Florou-Paneri P, Christaki E, Fletouris D. J, Spais A.B. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *Br. Poult. Sci.* 2002; 43(2):223-230.
- Cuppert S.L, Hall C.A. Antioxidant activity of the labiatae. *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press, London, 1998:245–271.

- Ďuračková Z. Antioxidanty v dobrom aj zlom. *Klin. Bioch. Metab.* 1997; 5:194-199.
- 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, Juhás Š, Faixova Z. The effect of essential oil intake on changes of plasma antioxidant status in mice. *Acta Vet. Brno.* 2007; 76:357-361.
- Faix Š, Faixová Z, Plachá I, Koppel J. Effect of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil on antioxidative status in brojler chickens. *Acta Vet. Brno.* 2009; 78: 411-417.
- Farag R.S, Badei A.Z.M, Hewedi F.M., El-Baroty G.S.A. Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1989; 66:792-799.
- Finkel T, Holbrook N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000; 408:239-247.
- Halliwell B, Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford University Press, New York, 1999:1-936.
- Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* 1996; 16:33-50.
- Juhás Š, Bujňáková D, Reháček 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. *Rev. Physiol. Bioch.* 2002; 145:3-46.
- Lin W.Y, Chen C.S, Wu S.B, Lin Y.P, Levin R.M, Wei Y.H. Oxidative stress biomarkers in urine and plasma of rabbits with partial bladder outlet obstruction. *Bju International.* 2011; 107:1839-1843.
- Lu Y, Foo L.Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.* 2001; 75:197-202.
- Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.* 2001; 67:187-795.
- Mourey A, Canillac N. Anti-listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers. *Food Control.* 2002; 13:289-292.
- Plachá I, Faix Š. Účinek škorice, rozmarínu a borneolu na fagocytárnu aktivitu leukocytov u nosníc. XXII. Dni živočíšnej fyziológie 2008; 37.
- Senatore F, Apostolides A.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.
- Teissedre P.L, Waterhouse A.L. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *J. Agr. Food Chem.* 2000; 48:3801-3805.
- Willcox J.K, Ash S.L, Catignani G.L. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2004; 44(4):275-295.



## RELATÍVNA ABUNDANCIA DRUHOV Z *OBSOLETUS* KOMPLEXU STANOVENÁ MULTIPLEX PCR ITS-1 A ITS-2 SEGMENTU A DETEKCIA BTV A EHDV

Sarvašová A.<sup>1</sup>, Goffredo M.<sup>2</sup>, Kočišová A.<sup>1</sup>, Sopoliga I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ústav parazitológie UVLF Košice

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell Abruzzo e del Molise „G. Caporale“ Teramo, Italy

<sup>3</sup> UZ UVLF Rozhanovce

### ABSTRAKT

Práca je zameraná na druhovú determináciu pakomárikov multiplex PCR metódou na zistenie relatívnej abundancie morfológicky nerozlišiteľných druhov z *Obsoletus* Komplexu a vyšetrenie potenciálnych vektorov na prítomnosť *Bluetongue* vírusu (BTV) a vírusu Epizootickej hemoragickej choroby (EHDV).

Analyzovali sme 6 odchytoch pakomárikov z 3 lokalít, 4 z obory z danielou a muflónou zverou (okr. Košice-okolie), 1 z chovu v hovädzieho dobytku v okrese Trebišov a 1 z chovu v okrese Prešov. Celkovo sme druhovo determinovali 7773 ks pakomárikov, s 54 % zastúpením druhov z *Obsoletus* Komplexu a 23 % z *Pulicaris* Komplexu. Na základe multiplex PCR ITS-1 a ITS-2 segmentu sme zistili relatívnu abundanciu druhov z *Obsoletus* Komplexu. V chovoch HD bola abundancia *C. obsoletus* 86 a 81 % a v obore bola vyššia pri odchytoch v polovici mája a koncom júna (57 a 76 %) a nižšia v odchytoch koncom mája a začiatkom júna (5 a 18 %). Výskyt *C. montanus* sme vo vzorkách nepotvrdili.

V 79 pooloch obsahujúcich 3154 *parous* a gravidných samičiek (n=3154) z *Obsoletus* a *Pulicaris* Komplexu sme prítomnosť BTV a EHDV nepotvrdili.

### ÚVOD

Pakomáriky z rodu *Culicoides* sú vektormi arbovirusov ako napríklad *Bluetongue* vírusu (BTV), *Schmallenberg* vírusu (SBV), vírusu epizootickej hemoragickej horúčky (EHDV) a ďalších. Na prenose BTV sa v Európe podieľajú druhy z *Obsoletus* Komplexu (Mellor a Pitzolis, 1979), *C. dewulfi* (Meiswinkel a kol., 2007), *C. chiopterus* (Dijkstra, 2008) a *C. pulicaris* (Caracappa a kol., 2003). *C. obsoletus* a *C. dewulfi* sú tiež vektormi SBV (DEFRA, 2012). EHDV v Európe doteraz nebol potvrdený.

Do *Obsoletus* Komplexu patria druhy *C. obsoletus* s.s., *C. scoticus* a *C. montanus*, ktorých samičky sú pomocou morfológických znakov nerozlišiteľné. Samčekovia sa diagnostikujú na základe rozdielneho tvaru kopulačných orgánov. Na druhovú determináciu samičiek je nevyhnutné použitie PCR metód. Na molekulárnu diagnostiku pakomárikov sa využívajú ITS-1, ITS-2 segmenty rDNA alebo mt COI (Cetre-Sossah, 2004; Mathieu a kol., 2007; Gomulski a kol., 2005; Nolan a kol., 2007).

### MATERIÁL A METODIKA

Pakomáriky, odchytené svetelným lapačom v 3 oblastiach východného Slovenska (chov hovädzieho dobytku v okr. Trebišov a Prešov a obora s danielou a muflónou zverou okr. Košice-okolie) sme druhovo determinovali na základe morfológických znakov (Delécolle, 1985; Goffredo a Meiswinkel, 2004). Zároveň sme samičky rozdeľovali do kategórií podľa fyziologického stavu (tzv. *age-grading*) na nenacicané (*nulliparous*), nacicané (*parous*), čerstvo nacicané (*engorged*) a gravidné (Dyce, 1969). Na druhovú determináciu samičiek z *Obsoletus* Komplexu sme vykonali multiplex PCR analýzu s druhovo špecifickými primermi pre ITS-2 oblasť (Gomulski a kol., 2005). Touto metódou sme schopní identifikovať druhy *C. obsoletus*, *C. scoticus* a *C. montanus*. Náhodným výberom sme vybrali 125 nenacicaných (*nulliparous*) samičiek z *Obsoletus* Komplexu a 4 samičky, ktoré sme druhovo determinovali ako *C. chiopterus*. Pri 16 kusoch samičiek z *Obsoletus* Komplexu a 4 suspektných *C. chiopterus* sme urobili aj multiplex PCR s primermi pre ITS-1 segment (Mathieu a kol.,

2007), ktoré sa používajú na diagnostiku *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. montanus*, *C. chiopterus* a *C. dewulfi*.

Z *parous* a gravidných samičiek z *Obsoletus* a *Pulicaris* Komplexu sme pripravili pooly na real-time RT-PCR detekciu BTV a RT-PCR detekciu EHDV.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analyzovali sme 6 odchytoch pakomárikov z 3 lokalít, 4 z obory, 1 z chovu hovädzieho dobytká v okrese Trebišov a 1 z chovu v okrese Prešov. Celkovo sme druhovo determinovali 7773 ks pakomárikov, s 54 % zastúpením druhov z *Obsoletus* Komplexu a 23 % z *Pulicaris* Komplexu.

Pomocou multiplex PCR ITS-2 segmentu sme jednoznačne druhovo určili 109 jedincov zo 125. DNA zo 16 samičiek bolo potrebné analyzovať opäť z dôvodu nejednoznačných výsledkov. Na amplifikáciu sme použili primery pre ITS-1 segment. *C. chiopterus* sme tiež analyzovali touto metódou, pretože na primery používané na ITS-2 segment reaguje ako *C. scoticus*. Pri 8 jedincoch z *Obsoletus* Komplexu a 4 *C. chiopterus* sme vykonali aj sekvenáciu.

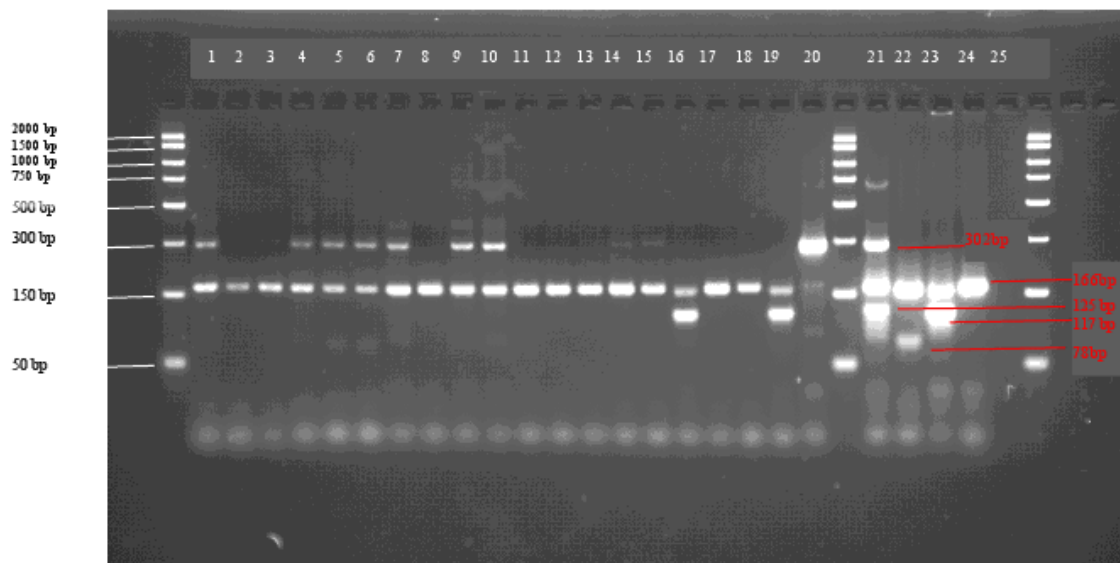
Vyhodnotením výsledkov všetkých troch vyšetrovacích metód sme dospeli k výsledku relatívnej abundancie druhov z *Obsoletus* Komplexu, ktorá bola pre *C. obsoletus* v chovoch HD 86 a 81 %. V obore bola vyššia abundancia *C. obsoletus* pri odchytoch v polovici mája a koncom júna, ale v 2 odchytoch koncom mája a začiatkom júna sme zaznamenali vyššiu relatívnu abundanciu *C. scoticus* (Tab.1). *C. montanus* sme vo vzorkách nepotvrdili.

Zo 4 jedincov determinovaných na základe morfológických znakov ako *C. chiopterus* sme na základe ITS-1 segmentu a sekvenáciou potvrdili len 2, zvyšné 2 boli *C. scoticus*.

V 79 pooloch obsahujúcich 3154 *parous* a gravidných samičiek (n=3154) z *Obsoletus* a *Pulicaris* Komplexu sme prítomnosť BTV a EHDV nepotvrdili.

Tab. 1. Relatívna abundancia druhov z *Obsoletus* Komplexu a *C. chiopterus* analyzovaných multiplex PCR ITS-1 a ITS-2 segmentu.

Č.vz.	Miesto odchyty	Dátum odchyty	Druh	Počet analyz. ♀	<i>C. obsoletus</i>	<i>C. scoticus</i>	% <i>C. obsoletus</i>
1.	Obora	13.5.2011	<i>Obsoletus</i> Kompl.	21	12	8	57,14
2.	Obora	26.5.2011	<i>Obsoletus</i> Kompl.	19	1	18	5,26
3.	Obora	2.6.2011	<i>Obsoletus</i> Kompl.	22	4	18	18,18
4.	Obora	23.6.2011	<i>Obsoletus</i> Kompl.	21	16	5	76,19
5.	Chov HD – okr. TV	25.5.2011	<i>Obsoletus</i> Kompl.	21	18	3	85,71
6.	Chov HD – okr. PO	25.5.2011	<i>Obsoletus</i> Kompl.	21	17	4	80,95
7.	Chov HD – okr. PO	25.5.2011	<i>C. chiopterus</i>	4		2	



Obr. 1. Gélová elektroforéza amplifikačných produktov multiplex PCR ITS-1 segmentu (1,4-7,9,10,14,15,20 - *C. obsoletus*; 2,3,8,11-13,24 - *C. scoticus*; 21 - *C. montanus*; 16,19,23 - *C. chiopterus*; 22 - *C. dewulfi*)

## ZÁVER

Na Slovensku nebol doteraz potvrdený žiaden autochtónny prípad Bluetongue ani Epizootickej hemoragickej choroby u domácich a voľne žijúcich prežuvavcov. Naším doterajším výskumom sa nepodarilo potvrdiť prítomnosť týchto vírusov v pakomárikoch. Prítomnosť potenciálnych vektorov a nekontrolovateľná migrácia voľne žijúcich zvierat ako rezervoára patogénov nevyklučuje možnosť zavlečenia pôvodcov závažných ochorení aj do našich chovov.

## POĎAKOVANIE

Práca je podporovaná grantovou úlohou VEGA č. 1/0236/12 a základným výskumom NRL UVLF pre pesticídy v Košiciach.

## POUŽITÁ LITERATÚRA:

- Caracappa S, Torina A, Guercio A, Vitale F, Calabro A, Purpari G, Ferrantelli V, Vitale M, Mellor P S. Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Vet. Rec.* 2003; 153: 71-74.
- Cetre-Sossah C, Baldet T, Delécolle J-C, Mathieu B, Perrin A, Grillet C, Albina E Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the main vector of bluetongue and African horse sickness in Africa and Europe, by ITS1 rDNA PCR amplification. *Vet. Res.* 2004; 35: 325-337.
- <http://www.defra.gov.uk/animal-diseases/files/poa-schmallenberg-update-120311.pdf>
- Delécolle J-C. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. PhD Dissertation, 1985, Université Louis Pasteur de Strasbourg, U. F. R. des sciences de la vie et de la terre, Strasbourg.
- Dijkstra E, van der Ven I J, Meiswinkel R, Hölzel D R, Van Rijn P A. *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Vet Rec.* 2008 Mar 29; 162 (13): 422.
- Dyce A L. The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *J. Aust. Ent. Soc.* 1969; 8: 11-15.
- Goffredo M, Meiswinkel R. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Vet. Ital.* 2004; 40: 260-265.

- Gomulski L M, Meiswinkel R, Delécolle J C, Goffredo M, Gasperi G. Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera, Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Syst. Entomol.* 2005; 30: 619-631.
- Mathieu B, Perrin A, Baldet T, Delécolle J C, Albina E, Cetre-Sossah C. Molecular identification of western European Species of *Obsoletus* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an internal transcribed spacer-1 rDNA Multiplex polymerase chain reaction Assay. *J. Med. Ent.* 2007; 44 (6): 1019-1025.
- Meiswinkel R, Van Rijn P, Leijts P, Goffredo M. Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet. Rec.* 2007; 161: 564-565.
- Mellor P S, Pitzolis G. Observations on breeding sites and lighttrap collections of *Culicoides* during an outbreak of bluetongue in Cyprus. *Bull. Entomol. Res.* 1979; 69: 229-234.
- Nolan D V, Carpenter S, Barber J, Mellor P, Dallas J, Mordue (Luntz) A J, Pierrney S B. Rapid diagnostic PCR assay for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Vet. Microbiol.* 2007; 124: 82-94.

## BAKTERIÁLNE SPOLOČENSTVO DRENÁŽNEJ VODY SKLÁDKY HNEDEHO KALU V ŽIARI NAD HRONOM

Stramová, Z.<sup>1,2</sup>, Júdová, J.<sup>3</sup>, Remenár, M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

<sup>2</sup> Katedra biochémie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice

<sup>3</sup> Katedra biológie a ekológie, Univerzita Mateja Bela, Banská Bystrica

### ABSTRAKT

Drenážna voda zo skládky hnedého kalu v Žiari nad Hronom vytvára jedno z najnehostinnejších miest pre život. pH tejto vody je vyššie než 13 a nachádza sa v nej veľa ťažkých kovov (najmä chrómu – 50 mg/L). Napriek všetkému sa v tejto vode vyskytuje relatívne početná bakteriálna populácia. Cieľom tejto práce bolo charakterizovať kultivovateľné baktérie z tohto prostredia. Kultivačnými metódami sme z drenážnej vody izolovali a pomocou MALDI-TOF analýzy identifikovali najmenej 6 skupín baktérií. Všetky izolované kmene sú halo- a alkalotolerantné. V populácii významne dominujú gram-pozitívne baktérie. Podarilo sa nám identifikovať dve skupiny reprezentované druhmi *Bacillus megatherium* a *Micrococcus luteus*. Viaceré získané izoláty vykazujú biotechnologicky zaujímavé enzýmové aktivity.

### ÚVOD

V závodoch Slovenského národného povstania (ZSNP) v Žiari nad Hronom sa oxid hlinitý vyrábala od roku 1957 do 1967 (Šťastný, 2005). Po vyťažení oxidu hlinitého sa zostatok bauxitu prepravoval hydraulicky potrubím a ukladal na kalové pole. Postupne tak vzniklo rozsiahle odkalisko, ktoré má rozlohu vyše 40 hektárov a nad okolitým terénom čnie do výšky 42 až 45 metrov. Okrem toho sa tu nachádza približne jeden milión metrov kubických voľných a viazaných alkalických vôd. Táto alkalická voda, ktorej pH je 13, môže predstavovať nebezpečnú záťaž na životné prostredie. Viaceré mikroorganizmy však dokážu prežívať aj v takýchto extrémnych podmienkach a v posledných rokoch sa záujem sústreďuje na využitie takýchto extrémofilných mikroorganizmov v biotechnologických a bioremediačných procesoch. Alkalofily sú mikroorganizmy, ktoré sú schopné prežiť v prostredí s pH 9 až 11 (Zavarzina, 2006). Alkalotolerantné mikroorganizmy sa skladajú z dvoch hlavných fyziologických skupín mikroorganizmov. Do prvej skupiny patria alkalofily a do druhej haloalkalofily. Alkalofily vyžadujú pH 9 alebo aj viac pre svoj rast a ich pH optimum je 10, zatiaľ čo haloalkalofily vyžadujú pre svoj rast hodnoty pH vyššie ako 9 a vysokú salinitu (nad 33% wt/vol NaCl). Alkalofily a haloalkalofily majú špeciálne adaptačné mechanizmy na prežitie v prostredí s vysokou salinitou a pri zásaditom pH. Tieto vlastnosti robia haloalkalofily veľmi zaujímavými mikroorganizmami z hľadiska základného výskumu ale aj z hľadiska biotechnologického (Tindall, 1984). Cieľom tejto práce bolo štúdium bakteriálnej populácie v drenážnej vode skládky hnedého kalu v Žiari nad Hronom.

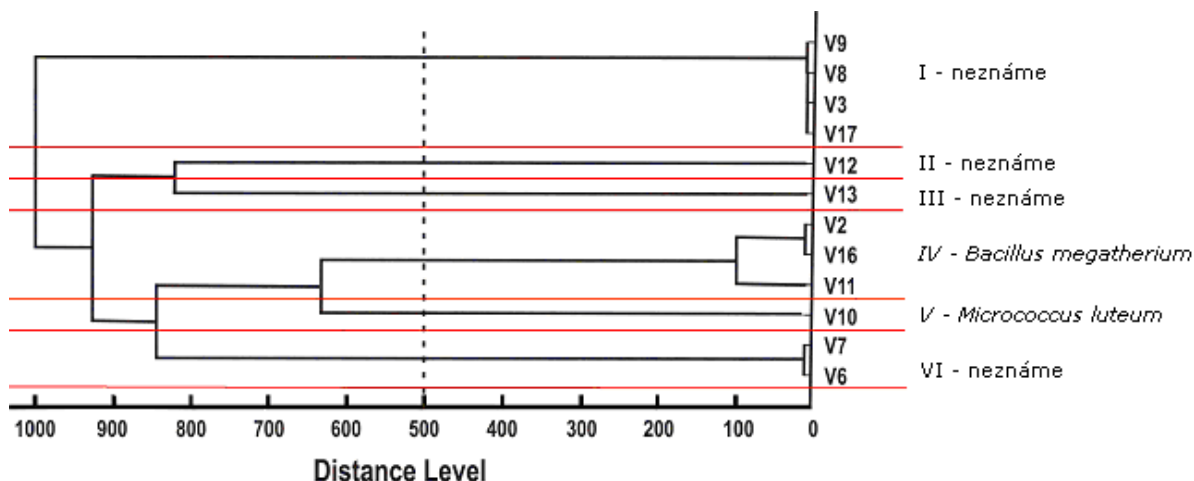
### MATERIÁL A METODIKA

*Pôvod a spracovanie vzoriek:* Odber vzoriek sme vykonali dňa 17.5.2010. Vzorky drenážnej vody sme vysievali na Živný agar č. 2 s rôznymi hodnotami pH (7, 9, 11 a 13) po 100 µl. Kultivácia prebehla 24 hod. pri izbovej teplote a teplote 37°C.

*Charakterizácia izolátov:* Jednotlivé izoláty sme charakterizovali pomocou analýzy proteínových profilov prístrojom MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Germany). Ďalšie vlastnosti bakteriálnej populácie v drenážnej vode hnedého kalu, ako prítomnosť katalázy, amylázy, proteázy sme stanovili klasickými biochemickými a mikrobiálnymi postupmi.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Napriek extrémnym podmienkam ako je vysoké pH (až 13), obsah toxických kovov a množstvo rozpustených látok sme vo vzorkách kalovej vody detegovali početnú populáciu mikroorganizmov. Kolónie všetkých izolovaných kmeňov rástli na Živnom agare č. 2 s pH 7 aj s pH 11 teda majú alkalotolerantný charakter. Pomocou MALDI – TOF analýzy sme jednotlivé izoláty klasifikovali do šiestich skupín (obr. 1).



Obr. 1: Dendrogram izolátov z drenážnej vody skládky hnedého kalu v žiari nad Hronom vytvorený porovnaním MALDI-TOF profilov

Najpočetnejšími boli izoláty zaradené do prvej skupiny (V9, V8, V3, V17), ktoré sa však pomocou MALDI – TOF nepodarilo identifikovať. Ide o psychrofilné gram-pozitívne koky až kokobacily tvoriace žltozelené kolónie.

Tabuľka 1: Mikrobiologická charakteristika vybraných izolátov

Charakteristika	Izolát					
	V3	V12	V13	V11	V10	V6
<b>Maldi skupina</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>
<b>Rast pri</b>						
20 °C	+	+	+	+	+	+
30 °C	+	+	+	+	+	+
37 °C	-	+	+	+	+	-
45 °C	-	-	-	+	+/-	-
5 % NaCl	+	+	+	+	+	+
7,5 % NaCl	+	+	+	+	+	-
10 % NaCl	+	+	+	+	+	-
<b>Anaeróbne</b>	-	-	-	-	-	-
pH = 7,0	+	+	+	+	+	+
pH = 10,0	+	+	+	+	+	+
<b>Oxidáza</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Kataláza</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Produkcia indolu</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Produkcia H<sub>2</sub>S</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Proteáza</b>	-	-	-	-	+	-
<b>Produkcia amylázy</b>	-	+	+	-	-	-
<b>Gramovo farbenie</b>	G+	G+	G+	G+	G+	G-
<b>Morfológia buniek</b>	kokobacily	diplokoky	diplokoky	bacily	koky	tyčinky
<b>Farba kolónií</b>	žltozelená	krémová	krémová	béžová	žltá	krémová

Ďalšie najčastejšie sa vyskytujúce izoláty sú zaradené do skupiny IV (izoláty V2, V16, V11). Na základe MALDI – TOF sme stanovili, že ide o izoláty baktérie rodu *Bacillus megatherium*. Tieto izoláty taktiež vykazovali vlastnosti typické pre tento druh. Dvoma izolátmi (V7 a V6) bola tvorená skupina VI, ktorú sa nepodarilo identifikovať.

Táto skupina ako jediná je tvorená gram-negatívnymi krátkymi tyčinkami, tvoriacimi kolónie krémovej farby. Ostatné skupiny boli tvorené len jedným izolátom, vo všetkých prípadoch patriacim ku gram-pozitívnym baktériám. Z nich sa podarilo pomocou MALDI-TOF analýzy identifikovať len izolát V10 ako *Micrococcus luteus*. Podrobná mikrobiologická charakteristika vybraných izolátov je uvedená v Tabuľke 1.

Existuje len minimum prác o bakteriálnych populáciách vyskytujúcich sa v bauxitových odpadových vodách. Ako jediní túto bakteriálnu populáciu študovali Hamdy a Williams (2001), ktorí popisujú až 150 bakteriálnych kultúr, zaradených do rodov *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Leuconostoc* a *Enterobacter*. V porovnaní s ich výsledkami sme pozorovali nižšiu frekvenciu gram-negatívnych baktérií.

V oboch štúdiách sa však detegovali zástupcovia rodov *Bacillus* a *Micrococcus* ktorí sa v súčasnosti aktívne využívajú pri bioremediácii (Dercová a kol., 2005). Je teda predpoklad, že po overení ďalších vlastností by boli aj naše izoláty využiteľné v bioremediačných procesoch. Alkalofilné a alkalotolerantné baktérie sú významnými producentmi viacerých priemyselne dôležitých enzýmov. Z našich izolátov sa pozorovala produkcia alkalickéj proteázy iba v prípade izolátu *M. luteus* V10. Schopnosť produkovať amylázu vykazujú izoláty V12 a V13.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA:

- Šťastný, P., (2005). Projekt revitalizácie dedičstva starej výroby hliníka. In Enviromagazín 1/2005, 2005, s. 8, 9
- Zavarzina, D.G. Kolganova, T. V., Bulygina, E. S. (2006). *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov., sp. nov., the first alkaliphilic representative of the family Geobacteraceae, isolated from a soda lake. In Mikrobiologija 75 (6): 775–85
- Tindall, B.J., et. al (1984) *Natronobacterium* gen. nov., and *Natronococcus* gen. nov., to new genera of haloalkalophilic archaeobacteria. In Syst appl Microbial. 5: 41-57
- Dercová, K., Makovníková, J., Barančíková, G., Žuffa, J., Bioremediácia toxických kovov kontaminujúcich vody a pôdy. 2005. In Chem Listy 99, 2005, s.682, 688, 690
- Hamdy, M. K., Williams, F. S. (2001). Bacterial amelioration of bauxite residue waste of industrial alumina plants. In J In Microbio Biotechnol. 27, 2001, s.228

## VÝSKYT OCHORENÍ U OKRASNÝCH DRUHŮ RÝB IMPORTOVANÝCH Z ÁZIE

Šmiga L.<sup>1</sup>, Košuthová L.<sup>1</sup>, Košuth P.<sup>1</sup>, Letková V.<sup>2</sup>, Mihok T.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice

<sup>2</sup> Ústav parazitológie, UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice

### ABSTRAKT

Nedostatočná veterinárna kontrola zdravotného stavu okrasných druhov rýb pochádzajúcich z importu z Ázijských krajín, na území Slovenskej republiky, spôsobuje výskyt nových druhov parazitov (nami zistené druhy monogeneí: *Gousservia* spp.) a s tým spojená zlá životaschopnosť a enormný úhyn rýb v akvapredajniach, alebo v profesionálnych chovoch. Cieľom našej práce bolo diagnostikovať výskyt ochorení okrasných druhov rýb pochádzajúcich z importov z Ázijských krajín (AOFU). Vyšetrené ryby boli podrobené kompletnej pitve, so zameraním na parazitárne ochorenia a mykobakteriázy. Skrining bol vykonávaný od roku 2008- 2012 a celkovo bolo vyšetrených 50 akvárií. Väčšina rýb pochádzala od profesionálnych chovateľov (až 84 %). Najčastejšie sa vyskytujúcim protozoárnym parazitom bola *Hexamita* sp. v 50 % prevalencii a z helmintov *Dactylogyrus* sp. v 43,7 % prevalencii. Vyššia prevalencia ochorení u juvenilných jedincov (70%) súvisela nielen s nedostatočne vyvinutým imunitným systémom mladých rýb, ale hlavne s vyšším počtom mladých jedincov importovaných do akvapredajní a chovných zariadení. Bakteriálne ochorenia sa vyskytovali len u 4 % vyšetovaných akvárií a z mykotických ochorení sme diagnostikovali ichthyofonózu s prevalenciou 28 %.

### ÚVOD

Od roku 1985 sa každým rokom zvyšuje v priemere o 14 % produkcia akvaristického priemyslu. Ročne je exportovaných do viac ako 100 krajín sveta približne milión okrasných rýb a vodných bezstavovcov, z toho 90 % tvoria sladkovodné a 10 % morské druhy (98 % pochádza z odchyty). Ročný zárobok svetového akvaristického priemyslu je približne 15 miliónov amerických dolárov (Oliver, 2001, 2003; Wabnitz et al., 2003; Bartley, 2005; UNEP-WCMC, 2007; Whittington and Chong, 2007 in Roberts, 2010). V roku 2001 vytvoril Oliver poradie najväčších svetových importérov a exportérov okrasných druhov rýb : Import-Japonsko, Nemecko, Francúzsko, Belgicko, Singapur, Holandsko, Čína Hong Kong a Kanada, naopak najväčším exportérom je Singapur, USA, Malajzia, Česká republika, Srí Lanka, Japonsko, Filipíny a Izrael. Singapur je hlavným importérom okrasných druhov rýb z ázijských farmových chovov a odchyty z voľnej prírody, ktoré exportuje ďalej do USA, západnej Európy a Japonska (Oliver, 2001; Wabnitz et al., 2003 in Roberts, 2010). Import a export rýb predstavuje veľké riziko prenosu ochorení, najmä parazitárnych do oblastí s neprirodzeným výskytom týchto patogénov. Za účelom vykonávania kontroly zdravotného stavu a zamedzenia šíreniu ochorení, vznikli v krajinách s významným importom rýb, akým je v posledných rokoch Austrália (Andrews, 1990; Oliver, 2003; Gerstner et al., 2006; UNEP-WCMC, 2007 in Roberts, 2010) viaceré inštitúcie a projekty, AQIS- Australian Quarantine and Inspection Service, Biosecurity Australia a pod (Stephens, Jones, Hillier, 2005). Rovnako v krajinách s významným exportom rýb, akými sú štáty AOFU sa spoločnosť AVA- Agri-Food & Veterinary Authority, zaoberá diagnostikou ochorení okrasných druhov rýb určených na export (Yeo, Wee et al. 2010).

Cieľom našej práce bolo diagnostikovať ochorenia okrasných druhov rýb pochádzajúcich z importov z ázijských krajín a eliminovať výskyt ochorení v chovoch, ktoré môžu predstavovať vysoké riziko infekcie aj pre naše hospodárske druhy rýb.



## MATERIÁL A METODIKA

Od roku 2008 - 2012 sme vykonali skrining ochorení okrasných druhov rýb pochádzajúcich z importov z Ázijských štátov. Vyšetrenia boli zamerané na parazitárne ochorenia.

Vyšetrené druhy rýb a počet: *Hyphesobrycon heterorhabdus*: 1; *Tanichthys albonubes*: 1; *Rasbora heteromorpha*: 1; *Carassius auratus* var.: 4; *Betta splendens*: 2; *Helostoma temmincki*: 2; *Megalampodus megalopterus*: 1; *Symphysodon discus*: 17; *Colisa lalia*: 3; *Hyphesobrycon herbertaxelrodi*: 1; *Pangasius* sp.: 1; *Nannostomus beckfordi*: 1; *Barbus tetrazona*: 2; *Xiphophorus maculatus*: 5; *Xiphophorus variatus*: 7.

Všetky pitvané ryby s klinickými prejavmi pochádzali z importov z Ázijských štátov (AOFU) a boli vyšetrené krátko po importe, bez možnosti nakazenia sa v karanténe. Vyšetrené boli kompletnou parazitologickou pitvou. Anamnestické a diagnostické údaje boli podrobne zaznamenané v pitevných protokoloch. Na determináciu parazitov sme využívali determináčny kľúč- Khalil, L., F., Jones, A., Bray, R., A.: Keys to the cestode parasites of vertebrates a na protozoá- Ergens, R., Lom, J.: Původci parazitárních nemoci ryb. (1970)

Mikroskopovacie zariadenia používané pri vyšetovaní: Olympus Bx 41 (mikroskop), Motic Zeiss Primo Star (mikroskop); SMZ- 168 (lupa) a k nej zosilovacie zariadenie Motic MLC-150 C.

Okrem fixácie parazitov v podobe trvalých preparátov, bola vykonávaná fotodokumentácia mikro a makropreparátov parazitov fotoaparátom Olympus digital 35 mm, 1: 3,5 a fotokamerou Camfot Axio Cam ERc5s. Pomocou, ktorých sme vykonávali taktiež merania jednotlivých častí parazitov (najmä pri meraní stredných a periférnych háčikov monogeneí *Goussevia* sp.), použili sme k tomu program Software (36) Release 4.8.2 ( Carl Zeiss) .

Pri vyšetovaní jedincov podozrivých na mykobakteriázy sme používali na ofarbenie preparátov farbenie Ziehl- Neelson. Následne sme prezerali preparát s imerzným olejom pri 1000 násobnom zväčšení.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vyšetrených bolo 50 obsádok akvárii z importu. Prírodné formy rýb boli v importoch zastúpené len v 2 prípadoch (4 %), mutačné formy tvorili 48 obsádok (96 %) . Akvária s dospelými jedincami tvorili 30 %, s juvenilnými 70 %. Parazitárne ochorenia boli v prevalencii 96 %; mykotické (ichtyofonóza) 28 % a bakteriálne 4 %.

Protozoárne parazity, ktoré boli diagnostikované u rýb z importu: Ciliophora (rod *Trichodina* 18, 7%) a Mastigophora (rod *Hexamita* 50 % , rod *Ichtyobodo* 2 %) . Z Metazoi boli zastúpené dva kmene: Kmeň Plathelminthes (trieda Monogenea, rod *Dactylogyrus*, ktorých prevalencia bola zo všetkých parazitárných ochorení najvyššia, 43,7 % a rod *Gyrodactylus* , 2 % . Trieda Cestoda v 2 % a kmeň Nematoda (rod *Capillaria* ) v 6,2% prevalencii.

Až 84 % prípadov pochádzalo od profesionálnych akvaristov a len 16, 6 % z akvapredajní.

Výskyt zmiešaných parazitárných infekcií bol najčastejšie v kombinácii hexamitóza, daktylogyróza, gyrodaktylóza a trichodinóza.

Vďaka nízkej cene a širokému sortimentu akváriových druhov rýb, sú Ázijské krajiny častým exportérom rýb pre profesionálnych chovateľov a akvapredajne na Slovensku. Z importov pochádzajú prevažne juvenilné jedince (70 %). Dospelé jedince slúžia pre profesionálnych chovateľov, ako chovný materiál. Sú to prevažne zriedkavé farebné, alebo tvarové formy terčovcov (*Symphysodon discus*) a plát pestrých (*Xiphophorus variatus*), ktoré sú využívané v profesionálnych európskych chovoch pri šľachtení mutácií. Z komerčného dôvodu sa mutačné formy vyskytovali častejšie (96 %), ako prírodné (4 %). Prírodné formy pochádzali z odchytov a išlo o druhy vyskytujúce sa v Ázii. Vysoká frekvencia výskytu *Hexamita* sp. u cichlíd popisovaná v literatúre (Roberts, 2010) sa nám potvrdila a to v 50 % prevalencií. Hexamitóza sa vyskytovala, ako sekundárny fakultatívny parazit, po pomnožení sa vplyvom stresu počas prepravy. *Capillaria* sp. s prevalenciou 6,2 % bola diagnostikovaná u terčovcov,

ktoré Košuth (1989) radí medzi najčastejšie infikované druhy týmto parazitom. Najčastejšie sa vyskytujúcim parazitárnym ochorením bola Dactylogyróza, ktorá sa vyskytovala v 43,7 %. Z triedy Cestoda sme diagnostikovali iba jedného zástupcu a to *Bothriocephalus sp.*. Nízke percento zastúpenia protozoárných parazitov a niektorých skupín helmintov je spôsobené radikálnymi, často neodbornými liečebnými procedúrami v karanténnych staniciach, alebo v chovných zariadeniach priamo v Ázijských štátoch.

#### POĎAKOVANIE

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore projektu APVV 0154-07

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- KOŠUTH, P.. Choroby akváriových rýb 6. In *Akvárium terárium*. ISSN 0002-3930, 1989, roč. 32, č. 6, s. 11-12.
- KOŠUTH, P.. Monogenea, parazitické červy akváriových rýb. In *Akvárium terárium*. 1988, roč. 31, č. 3, s. 15-17.
- ROBERTS, H., E.. *Fundamentals of ornamental fish health*. USA: Wiley-Blackwell, 2010. 229 s. ISBN-13:978-0-8138-1401-8/2010.
- STEPHENS, J., B.; Jones, J., B.; HILLIER, P. *Ornamental fish testing project, final report*. 2005, s. 5.
- YEO, A.; WEE, Ch., L.. Evaluation of the animal health controls in place for aquaculture animals destined for export to the European Union by the European Commission Food and Veterinary Office. In *Ornamental fish newsletter*. 2010, roč. 1, č. 1.

# ÚČINOK *THYMUS VULGARIS* NA ZDRAVOTNÝ STAV TRÁVIACEHO TRAKTU U HYDINY

Jana Takáčová

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

## ABSTRAKT

Možné reziduá antibiotík a odolnosť voči chorobám sú dôvody, prečo antibiotiká boli zakázané ako doplnkové látky. Tento predpoklad viedol k vyšetrovaniu alternatívnych doplnkových látok v živočíšnej výrobe, a medzi nimi sú aj éterické oleje. Jedná sa o komplexné zmesi zlúčenín, ktorých chemické zloženie a koncentrácia sú premenlivé. Ich liečivé účinky môžu byť veľmi silné a je tu mnoho použití pre nich. Táto štúdia sa zameriava na éterický olej z *Thymus vulgaris*.

*Thymus vulgaris* obsahuje látky, fenolové antioxidanty. Thymol je jednou z hlavných látok, ktoré môžu hrať úlohu pri ochrane duodenálnej sliznice pred vplyvmi reaktívnych foriem kyslíka, a tým zaistiť antioxidačnú ochranu s cieľom zabezpečiť zmenšenie medzibunkových priestoroch a zamedzenie prieniku patogénnych baktérií a toxínov z intra do extraintestinálneho priestoru.

## ÚVOD

Rastlinné extrakty majú široký rozsah použitia. Môžu stimulovať príjem krmiva. Majú kokcidiostatický, či protiškvrkavkový efekt. Extrakty získané z aromatických a liečivých rastlín majú výrazný antiseptický a stimulačný účinok s priaznivým pôsobením na trávenie. Mnohí autori uvádzajú antimikrobiálny (Fabian a kol., 2006) a antioxidačný (Faix a kol., 2007) účinok éterických olejov, ich schopnosť pôsobiť protizápalovo (Juhás a kol., 2008). Funkčná charakteristika spočíva v organoleptickom pôsobení, stimulácii organizmu k vlastnej produkcii sekrétov. V ostatných rokoch sa prejavil zvýšený záujem o využitie rastlinných silíc. Biologicky aktívne komponenty rastlín sú prevažne sekundárnymi produktmi ich metabolizmu, ako sú napr. terpenoidy, fenoly, glykozidy a alkaloidy. Vzhľadom na možný synergický vzťah medzi jednotlivými zložkami nie je úplne jasné, ktorý komponent éterického oleja účinkuje ako stimulátor endogénnych tráviacich enzýmov, antioxidant, protizápalová a antimikrobiálna substancia alebo imunomodulátor. Thymol a jeho izomér carvacrol, účinné látky získané z rastlín tymiánu a oregána sú klasifikované ako monoterpény fenolov, v *in vitro* podmienkach preukázali svoj antimikrobiálny účinok (Ouweland a kol., 2010). Éterické oleje v tele zvierat podporujú predovšetkým sekréciu tráviacich štiav. Výsledkom je vyššia stráviteľnosť a vstrebávanie živín. Na základe výsledkov prác viacerých autorov môžu éterické oleje u hydiny ovplyvňovať hmotnosť vajec, produkciu vajec, živú hmotnosť, či príjem krmiva (Ayasan a kol., 2005). Rastlinné extrakty majú výrazné antioxidačné vlastnosti, ktoré vo svojej práci potvrdili aj Faix a kol. 2009, keď po podávaní éterického oleja *Cinnamomum zeylanicum* zistili signifikantný vplyv na antioxidačný status ako aj zvýšenie fagocytárnej aktivity u výkrmových kurčiat. Plachá a Faix, 2008 zistili vo svojej práci možný pozitívny vplyv škorice, rozmarínu a borneolu na imunitné funkcie v organizme, keď zistili, že tieto éterické oleje stimulovali fagocytárnu aktivitu leukocytov.

## PRODUKCIA HYDINY

Obchodná produkcia hydiny v priebehu posledných 50 rokov ťažila z farmaceutických a biologických produktov, ktoré umožnili zvýšiť genetický potenciál, zlepšiť výživu a celkovo zvýšiť produkciu. Potraviny živočíšneho pôvodu napr. zdravé hydinové mäso, poskytujú proteín dôležitý v ľudskej strave. Na Slovensku má produkcia a predaj jatočnej hydiny vzrastajúci trend, pričom v spotrebe sa zaraďuje hneď za bravčové mäso.

Problematika zdravej výživy zahŕňa mnoho aspektov, pri hydinových produktoch najmä tvorbu mäsa s nižším obsahom cholesterolu, vhodným zložením mastných kyselín a zvýšeným obsahom účinných látok (Benková a kol. 2005). Mäso hydiny má výhodné biologické a nutritívne vlastnosti. Bielkoviny kuracieho a morčacieho mäsa obsahujú v porovnaní s bravčovým a hovädzím mäsom viac esenciálnych aminokyselín, najmä arginínu, leucínu, izoleucínu, metionínu a valínu. Ich priaznivý pomer vytvára vhodné podmienky pre zdravý vývoj človeka a jeho výkonnosť. Nedostatok týchto látok spomaľuje rast, poškodzuje činnosť centrálného nervového systému, endokrinného systému a pod. (Benková a kol., 2005).

## INTEGRITA ČREVA

Črevný epitel predstavuje ochrannú bariéru proti kontinuálnemu pôsobeniu potravinových patogénov a patogénnych mikroorganizmov prítomných v lúmene čreva a rôznym fyzikálno-chemickým účinkom, ktoré spôsobujú tráviace a mikrobiálne produkty, ale napriek tomu musí byť priepustná, priechodná pre prospešné živiny a tekutiny. Ochrana proti škodlivým agensom je zabezpečená faktormi ako sú: žalúdočná kyselina, peristaltika, prítomnosť hlienu, črevná proteolýza a flóra čreva (Nava a kol., 2005). Črevná bakteriálna mikroflóra môže byť modifikovaná zložením diéty, ktorá môže ovplyvňovať produkciu a kvalitu mucínu (Faixová a kol., 2008).

Tesne regulovaná kontrola črevnej bariérovej funkcie a integrity je rozhodujúca v patogenéze črevných chorôb, ako sú: zápalové ochorenie čriev, ulcerózne kolitídy a autoimunitné choroby spojené s poruchou črevnej bariéry a zvýšením črevnej priepustnosti (Laukoetter a kol., 2008).

Črevná integrita je ohrozená, keď vrstva hlienu je degradovaná, epitelové bunky sú zničené, cievné zásobenie je prerušené, alebo je ohrozený imunitný systém. Výsledkom je enteritída alebo zápal čriev. Objavujú sa príznaky ako je hnačka, dehydrácia, slabosť, úbytok telesnej hmotnosti alebo pomalý rast. Pri poškodení tráviaceho traktu vznikajú nekrotické enteritídy.

Vhodným modelom pre určenie funkčného stavu čreva je použitie *in vitro* Ussing chamber metódy, ktorou sa môžu popísať viaceré ukazovatele funkcií čreva. Pomocou tejto metódy sa popísala úloha epitelialnej bariéry (Boudry, 2005), transport elektrolytov cez črevný epitel (Stack a kol., 1995) a transport kyslíkových radikálov ktorý študoval Zawieja a kol., 1992. Znižovanie črevnej permeability spôsobenej patogénnym kmeňom *Escherichia coli* u potkanov kŕmených laktobacilmi s využitím modelu Ussing chamber pre stanovenie vlastností črevnej steny popísali Mangell a kol., 2002. Podobne bol tento model použitý aj na meranie protizápalového účinku laktobacilov meraného kvantifikovaním produkcie cytokínov (Madsen a kol., 1999). Vplyv éterického oleja *Thymus vulgaris* na integritu črevnej steny vo svojej práci sledovali aj Plachá a kol. 2010 a,b. Zistili, že jeho pozitívny účinok závisí od koncentrácie, keďže 0,4 % koncentrácia negatívne ovplyvnila intestinálnu integritu na rozdiel od nižšej 0,05% koncentrácie.

Docic a Biklei (2003) uvádzajú, že rastlinné extrakty podobne ako antibiotiká, pozitívne ovplyvňujú príjem krmiva, prírastky živej hmotnosti, utilizáciu živín a zlepšujú mikrobiálnu fermentáciu v čreve. Bikler (2006) poukazuje aj na skutočnosť, že použitie fyto génných aditív stimuluje rast tráviacej sústavy a zlepšuje jej odolnosť voči kolonizácií patogénnou mikroflórou multifunkčné vlastnosti, ktoré sú dané špecifickým obsahom bioaktívnych zložiek.

Reaktívne kyslíkové medziprodukty predstavujú dôležité mediátory pri aktivácii zápalových reakcií. Napríklad chronický zápal čreva je charakterizovaný zvýšenou produkciou reaktívnych kyslíkových metabolitov.

Acetylcholín je rozhodujúci pri kontrole transportu iónov a aktivity vody cez epitel čreva. Hirota a McKay (2006) preskúmali mechanizmus cholinergickej kontroly transportu iónov

cez intestinum cicavcov v Ussing chamber. Cholinergický nervový systém ovplyvňuje bazálny tok iónov a môže spôsobiť aj zvýšenie transportu iónov.

Zápal čreva často charakterizujú poruchy v cholinergickom systéme a zníženie transportu iónov cez črevný epitel. Preto Hirota a McKay (2006) navrhovali, aby farmakologické analýzy boli doplnené technikami molekulárnej biológie, ktorými by sa zameriavalo na konkrétne acetylcholinové receptory a signalizačné molekuly. Rozdiely transportu iónov cez zdravé a poškodené tkanivo tak odhalia kontrolné mechanizmy, ktoré môžu byť nepovšimnuté keď sa zameriava len na zdravé tkanivo.

Tymol a cinamaldehyd získané z tymiánu a škorice, majú vplyv na bunky cicavcov. Boudry a Perrier, (2008) zisťovali vplyv týchto látok na vylučovanie a vstrebávanie elektrolytov cez epitel jejuna ošípaných v Ussing chamber. Došli k záveru, že tymol indukuje sekréciu  $\text{Cl}^-$  a  $\text{HCO}_3^-$  prostredníctvom aktivácie nervových receptorov, zatiaľ čo cinamaldehyd indukuje sekréciu  $\text{HCO}_3^-$  pravdepodobne prostredníctvom priamej aktivácie nikotínových receptorov na epitelialne bunky. Kamel a McKay (2003) charakterizujú fyto génné substancie ako prírodné latky rastlinného pôvodu, ktoré nezanechávajú reziduá v živočíšnych produktoch a nie je nutné dodržiavať ochrannú dobu pred jatočnou porážkou zvierat. Získané poznatky nasvedčujú tomu, že éterické oleje pridávané do krmnej dávky majú pozitívny vplyv na celkový zdravotný stav hydiny, hlavne na zdravie čreva a zlepšujú hmotnostné prírastky.

## POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantom VEGA No. 2/0010/10.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ayasan T, Yurtseven S, Baylan M, Canogullari S. The effects of dietary *Yucca Schidigera* on egg yield parameters and egg shell quality of latiny japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). In: International Journal of Poultry Science. 2005; 4 (3): 159-162.
- Benková J, Baumgartner J, Hetényi L. Hydinové mäso – významná zložka racionálne výživy obyvateľstva. In.: Realizácia komplexného programu ozdravenia výživy obyvateľstva SR – využitie nutričných poznatkov v primárnej a sekundárnej prevencii neinfekčných chorôb. Zborník č. 49, SAPV, Nitra, 2005; 31-32. ISBN 80-89162-18-5.
- Bikler P. Performing nature – aplikovaná príroda. In Slovenský chov 2006; 11 (6): 45.
- Boudry G, Perrier C. Thyme and cinnamon extracts induce anion secretion in piglet small intestine via cholinergic pathway. Journal of Physiology and Pharmacology, 2008; 59 (3): 543-552.
- Docic M, Bilkei G. Differences in antibiotic in *Escherichia coli*, insolated from East-Europen swine hers with or without prophylactic use of antibiotics. In J. Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2003; 50: 27-30.
- 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, Faixová Z. The effect of essential oil intake on changes of plasma antioxidant status in mice. Acta Vet. Brno. 2007; 76: 357-361.
- Faixová Z, Faix Š. Metabolické účinky éterických olejov u kurčiat. Slov. Vet. Čas. 2008; 4: 383-385.
- Faix Š, Faixová Z, Plachá I, Koppel J. Effect of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil on antioxidative status in brojler chickens. Acta Vet. Brno. 2009; 78: 411-417.
- Juhás Š, Bujňáková D, Rehák P, Čikoš Š, Czikková S, Veselá J, Il'ková G, Koppel J. Antiinflammatory effects of thyme essential oil in mice. Acta Vet Brno. 2008; 77: 327-334.
- Kamel C, McKay R. Plant extracts enhance performance in broilers under *Clostridium perfringens* challenge. In Journal of animal science, 2003; 81 (1): 103.
- Laukoetter MG, Nava P, Nusrat A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2008; 14: 401-407
- Madsen L, Garras A, Asins G, Serra D, Hegardt FG, Berge RK. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and carnitine palmitoyltransferase II as potential control sites for ketogenesis during mitochondrion and peroxisome proliferation. Biochemical Pharmacology 1999; 57 (9): 1011-9.

- Mangell P, Nejdfors P, Wang M, Ahrné S, Weström B, Thorlacius H, Jeppson B. *Digestive Diseases and Sciences* 2002; 47 (3): 511-516.
- Nava G, Bielke LR, Callaway TR, Castaneda MP. Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: the poultry experience. *Anim Health Res Rev.* 2005; 6 (1): 105-118.
- Ouwehand AC, Tiihonen K, Kettunen H, Peuranen S, Schulze H, Rautonen N. In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. *Veterinarni Medicina* 2010; 55: 71-78.
- Plachá I, Simonová Pogány M, Čobanová K, Lauková A, Faix Š. Effect of *Enterococcus faecium* AL41 and *Thymus vulgaris* essential oil on small intestine integrity and antioxidative status of laying hens. *Research in Veterinary Science* 2010; 89: 257-261.
- Plachá I, Simonová Pogány M, Čobanová K, Lauková A, Faix Š. Testovanie vplyvu tymiánovej silice a kmeňa *Enterococcus faecium* AL41 na epiteliálnu integritu duodenálnej steny, fagocytárnu aktivitu a antioxidačný status kurčiat. XXIV. Dny živočíšne fyziologie, Liblice, 2010; ISSN 1804-5766: 19.
- Plachá I, Faix Š. Účinok škorice, rozmarínu a borneolu na fagocytárnu aktivitu leukocytov u nosníc. XXII. Dni živočíšnej fyziologie 2008; 37.
- Stack WA, Keely SJ, O'Donoghue DP, Baird AW. Immune regulation of human colonic electrolyte transport in vitro. *Gut* 1995; 36 (3): 395-400.
- Zawieja DC, Garcia C, Granger HJ. Oxygen radicals, enzymes and fluid transport through pericardial interstitium. *The American Journal of Physiology* 1992; 262: 136-43.

## GDF-15 AKO FAKTOR POTENCIÁLNE OVPLYVŇUJÚCI ÚČINNOSŤ FOTODYNAMICKEJ TERAPIE S HYPERICÍNOM

Valeková, B., Mikeš, J., Vargová, J., Mikešová, L., Fedoročko, P.

Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta Univerzity P. J. Šafárika v Košiciach

### ABSTRAKT

Expresia a sekrécia pleiotropne pôsobiaceho cytokínu GDF-15 sa zvyšuje pri viacerých patologických stavoch vrátane onkologických ochorení. V posledných rokoch bolo venované značné úsilie objasneniu úlohy GDF-15 počas skorých a neskorých fáz nádorového ochorenia. Doposiaľ získané výsledky sú značne protichodné, časť z nich naznačuje proapoptotický efekt GDF-15 v nádorových bunkách, ďalšie poukazujú naopak na antiapoptotický a prometastatický účinok. Poznanie účinku tohto faktora môže byť dôležité pri voľbe terapeutického prístupu. Cieľom našich experimentov je overiť, či sekrečná forma GDF-15 má úlohu v odpovedi nádorových buniek na zásah prostredníctvom fotodynamickej terapie s využitím hypericínu ako fotosenzibilizátora (HY-PDT). Ako experimentálny model pre štúdium sme zvolili bunkovú líniu HCT116 p53<sup>+/+</sup> (s normálnou reguláciou expresie *gdf-15*) a HCT116 p53<sup>-/-</sup> (s deregulovanou, potlačenou expresiou *gdf-15* neprodukujúcu) a bunkovú líniu A549. Na štúdium vplyvu GDF-15 na odpoveď buniek na PDT sme uskutočnili experimenty s kondicionovanými médiami od buniek HCT-116 p53<sup>+/+</sup>. Ďalšie experimenty mali za cieľ overiť, aký je podiel GDF-15 na celkovom účinku kondicionovaného média. Overovali sme koncentračnú závislosť metabolickej aktivity buniek od GDF-15, vplyv tohto cytokínu na zmeny metabolickej aktivity po PDT MTT testom a zmeny proliferatívnej a migračnej aktivity buniek prostredníctvom „wound-healing assay“. Aj keď experimenty s kondicionovanými médiami naznačujú prítomnosť stimulov podporujúcich programovanú bunkovú smrť, následné experimenty nepodporujú hypotézu, že za tento efekt zodpovedá sekretovaný GDF-15.

### ÚVOD

Fotodynamická terapia (PDT) je efektívnou alternatívou protinádorovej terapie. Realizácia pozostáva z podania chemickej látky (tzv. fotosenzibilizátora), ktorá po aktivácii svetlom určitej vlnovej dĺžky vyvoláva vznik reaktívnych foriem kyslíka. Tie vedú k poškodeniu cieľovej bunky či tkaniva a spusteniu kaskád programovanej bunkovej smrti. Hypericín, naftodiantrón prírodného pôvodu, je produkovaný ako sekundárny metabolit rastlín z rodu *Hypericum*. Vyznačuje sa viacerými vlastnosťami, ktoré z neho robia fotosenzibilizátor vhodný na využitie v PDT nádorových ochorení. Okrem zvýšenej afinity k nádorovému tkanivu a minimálnej toxicity v tme sa vyznačuje aj vysokou efektívnosťou pri indukcii oxidatívneho stresu priamo poškodzujúceho cieľovú nádorovú bunku. K jeho celkovému účinku sa pridáva schopnosť poškodiť cievne zásobenie nádoru. Niektoré protinádorové účinky hypericínu nevyžadujú aktiváciu svetlom. Hypericín má schopnosť inhibovať angiogénu, migráciu a invazivitu nádorových buniek *in vitro* (Vantieghem a kol., 2002).

GDF-15, pleiotropne pôsobiaci cytokín patriaci do rodiny TGF- $\beta$ , je za fyziologických podmienok exprimovaný v malej miere, no pravdepodobne sa zúčastňuje viacerých dôležitých procesov, ako embryonálny vývin, hematopoéza a regulácia imunitných pochodov (Mimeault a Batra, 2010). GDF-15 je sekretovaný do extracelulárneho prostredia po štiepení proproteínovou konvertázou a dimerizácii v endoplazmatickom retikule. Expresia a následná sekrécia sa zvyšuje pri patologických stavoch vrátane onkologických ochorení. Hoci výsledky niektorých experimentov naznačujú protinádorové a proapoptotické účinky GDF-15 (Wilson a kol., 2003; Baek a kol., 2005), údaje z klinických štúdií ukazujú výrazný nárast hladiny v sére onkologických pacientov s nádormi gastrointestinálneho traktu, pankreasu, prostaty

a melanómami (Baek a kol., 2009; Mimeault a Batra, 2010). Narastajúca koncentrácia GDF-15 v sére je v korelácii s progresom nádorového ochorenia, stupňom malignity, prítomnosťou infiltrácie lymfatických uzlín a zakladaním metastáz. Je asociovaný s horšou prognózou a skráteným časom prežívania pacientov. Je spájaný aj so vznikom a zvyšovaním rezistencie na protinádorovú terapiu (Selander a kol., 2007; Proutski a kol., 2009).

V oblasti fotodynamickej terapie je o funkcii a význame GDF-15 známe ešte menej. Ukázalo sa síce, že PDT s kyselinou 5-aminolevolínovou vedie k zvýšeniu expresie *gdf-15* v niekoľkých nádorových bunkových líniah (Wild a kol., 2005), nebolo však doposiaľ študované, či dochádza aj k syntéze finálneho sekrečného produktu, a nebol ani sledovaný prípadný účinok sekretovaného GDF-15 po PDT na zasiahnuté bunky. Predošlé experimenty ukázali, že kým neaktívny hypericín vedie k zvýšenej sekrécii GDF-15 nádorovými bunkami, po PDT s hypericínom dochádza k zvýšenej akumulácii GDF-15 v bunkách a k poklesu sekrécie. Naším cieľom je preto overiť, aký je vplyv tohto pleiotropne pôsobiaceho cytokínu, na účinnosť PDT s hypericínom, ktorý produkciu GDF-15 ovplyvňuje.

## MATERIÁL A METODIKA

Ako experimentálny model sme zvolili bunkové línie kolorektálneho adenokarcinómu HCT116 p53<sup>+/+</sup> a HCT116 p53<sup>-/-</sup> a pľúcneho adenokarcinómu A549. Bunkové línie boli kultivované v médiu McCoy's 5A (HCT116), resp. F12K (A549) obohatenom o 10% FBS za definovaných podmienok (37°C, 95% vlhkosť, 5% CO<sub>2</sub>) po dobu 24 hod a následne podrobené experimentálnym procedúram podľa pripravenej schémy. Pre analýzu markerov bunkovej smrti bolo bunkám HCT116 p53<sup>-/-</sup> menené médium v časových intervaloch 0, 8 a 24 hod po PDT za kondicionované médium, odobrané HCT116 p53<sup>+/+</sup> bunkám, ktoré sekretujú GDF-15. Plávajúce aj adherentné HCT116 p53<sup>-/-</sup> bunky boli zozbierané podľa protokolu a prostredníctvom prietokovej cytometrie boli analyzované markery bunkovej smrti: externalizácia fosfatidylserínu (farbenie Annexin V-FITC 20 min, tesne pred meraním pridaný propídium jodid); depolarizácia mitochondriálneho membránového potenciálu (farbenie tetrametylénrodamin etyl esterom 20 min); aktivácia kaspázy 3 (inkubácia s fluorescenčne značeným substrátom pre kaspázu 3, 20 min); metabolická aktivita buniek (farbenie fluoresceíndiacetátom 20 min, tesne pred meraním na stanovenie viability pridaný propídium jodid). Všetky merania boli uskutočnené prietokovým cytometrom BD FACSCalibur.

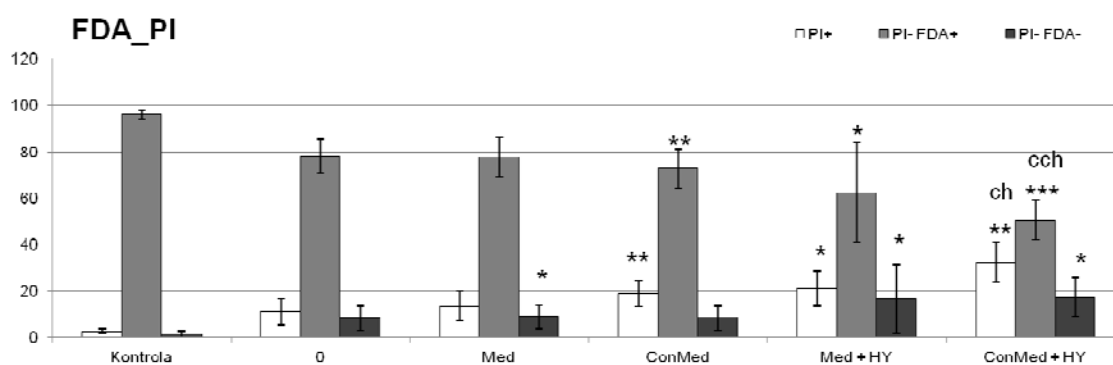
Analýzu metabolickej aktivity buniek sme uskutočnili MTT testom, pričom sme sledovali koncentračnú závislosť metabolickej aktivity od koncentrácie pridaného GDF-15 (250; 500; 750 a 1000 ng/ml) a to po 48 a 72 hod inkubácii. Taktiež sme analyzovali vplyv GDF-15 (24 hod predinkubácia) na metabolickú aktivitu buniek vystavených účinku HY-PDT (50nM a 75nM hypericín) a to 24 a 48 hod po HY-PDT. Po uplynutí určených časových intervalov bol k bunkám vo všetkých experimentálnych skupinách pridaný MTT (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid, žltej farby, 0,5 mg/ml), ktorý je živými metabolizujúcimi bunkami premieňaný na nerozpustný fialový formazán. Po uplynutí 4 hod bola metabolizácia MTT zastavená pridaním 10% roztoku dodecylsulfát sodného. Absorbancia rozpusteného formazánu bola stanovená spektrofotometricky (FluoStar Optima).

Analýza proliferačnej a migračnej schopnosti bola uskutočnená pomocou stanovenia rýchlosti prerastania štrbiny v konfluentnej vrstve buniek, tzv. „wound-healing assay“. Bunky zvolených línii boli nasadené do Petriho misiek s adaptérmi s definovanou šírkou štrbiny medzi dvoma skupinami buniek. Po dosiahnutí konfluencie bol adaptér odstránený a bunky boli vystavené procedúram podľa experimentálnej schémy. Porovnávali sme šírku zaceľovanej štrbiny vo zvolených časových intervaloch po HY-PDT medzi experimentálnymi skupinami. Šírka štrbiny bola zaznamenávaná fotograficky (Leica DMI6000) a vyhodnocovaná pomocou softvéru (LAS AF Lite 2.6.0).



## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na overenie hypotézy, či GDF-15 ovplyvňuje účinnosť HY-PDT, sme sa rozhodli sledovať viaceré parametre stanovované na nádorových bunkových líniiach po zásahu HY-PDT. Ako prvé sme uskutočnili experimenty s využitím kondiciovaného média HCT116 p53<sup>+/+</sup> buniek sekretujúcich GDF-15. Prostredníctvom prietokovej cytometrie sme analyzovali zmeny v parametroch charakterizujúcich bunkovú smrť v prípade buniek HCT116 p53<sup>-/-</sup> s deregulovanou expresiou GDF-15, po vystavení HY-PDT a následne ďalej inkubovaných v kondiciovanom médiu. Najvyšší podiel buniek so stanovovanými markermi bunkovej smrti sme 48 hod po HY-PDT detegovali v populácii HCT116 p53<sup>-/-</sup> s pridaným kondiciovaným médiom od p53<sup>+/+</sup> buniek inkubovaných s neaktivovaným hypericínom, ktorý v týchto bunkách zvyšuje sekreciu GDF-15. V tejto skupine sme zároveň zaznamenali štatisticky významný pokles v percentuálnom zastúpení metabolicky aktívnych buniek v porovnaní s kontrolou, ale aj s experimentálnymi skupinami, kde bol pridaný neaktivovaný hypericín resp. plne kondiciované médium (Obr.1). Tieto efekty sú pravdepodobne spôsobené parciálne faktormi kondiciovaného média, parciálne samotným hypericínom. Uvedené faktory viedli aj k zvýšeniu počtu buniek umierajúcich bunkovou smrťou nezávislou od kaspáz 48 hod po HY-PDT.



**Obr. 1** Percentuálne zastúpenie metabolicky aktívnych buniek v jednotlivých experimentálnych skupinách (Med-čisté médium, ConMed-kondiciované médium, HY-neaktivovaný hypericín; 0-bez výmeny média; c-štatistická významnosť oproti skupine s kondiciovaným médiom; h-štatistická významnosť oproti skupine s neaktivovaným hypericínom)

Na overenie, či za zmeny metabolickej aktivity buniek zistených v predošlom experimente podieľa sekrečná forma GDF-15, sme využili MTT test. Pôsobenie samotného GDF-15 vedie k signifikantnému zníženiu metabolickej aktivity buniek vzťahnutej ku kontrole v HCT116 p53<sup>+/+</sup> a v p53<sup>-/-</sup> bunkách, no nezaznamenali sme významnejší vplyv tohto cytokínu na metabolickú aktivitu buniek vystavených účinku HY-PDT.

Naopak nepozorovali sme vplyv GDF-15 na metabolickú aktivitu buniek A549, no bunky vystavené pôsobeniu HY-PDT inkubované s GDF-15 sa vyznačovali zvýšenou rezistenciou na PDT v čase 24 hod po zásahu. Zároveň však v tejto skupine došlo k spomaleniu regenerácie metabolickej aktivity populácie voči kontrole oproti bunkám nevystaveným vplyvu GDF-15.

Proliferačnú a migračnú aktivitu buniek sme sledovali pomocou „wound-healing assay“. V prípade HCT116 p53<sup>+/+</sup> a A549 buniek sme pozorovali mierne zníženie rýchlosti prerastania štrbiny po pridaní samotného GDF-15. Tento rozdiel bol najvýraznejší pri A549 bunkách po 24-hodinovej inkubácii. Na testovanie vplyvu GDF-15 na rýchlosť uzatvárania štrbiny bunkami po zásahu HY-PDT sme použili PDT s 50 nM hypericínom na bunkové línie HCT116 a so 100 a 150 nM hypericínom na bunky A549. Za daných podmienok 24-hodinová

predinkubácia buniek s GDF-15 ani pridanie GDF-15 po HY-PDT nevedli k štatisticky významným zmenám v rýchlosti uzatvárania štrbiny.

Hoci prvotné experimenty s kondicionovanými médiami naznačujú prítomnosť faktorov podporujúcich programovanú bunkovú smrť, ďalšie série experimentov nepodporujú hypotézu, že by za tieto efekty zodpovedal práve GDF-15. Tento cytokín inhibuje metabolickú aktivitu HCT116 buniek a v spolupôsobení s HY-PDT ovplyvňuje metabolickú aktivitu A549. Ďalší test nepotvrdil vplyv GDF-15 na proliferáciu a migračnú aktivitu buniek po HY-PDT pôsobení. V doterajších experimentoch sa nám nepodarilo potvrdiť vplyv GDF-15 na účinnosť HY-PDT priamym pôsobením na nádorové bunky, celkové pôsobenie GDF-15 v nádorových ochoreniach však môže byť dané nie len vplyvom na nádorové bunky, ktoré ho produkujú ale aj na bunky imunitného systému podieľajúce sa na protinádorovej imunite.

## POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola uskutočnená v rámci plnenia grantových projektov za finančnej podpory grantových agentúr: VEGA 1/0626/11 a APVV-0040-10.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Baek KE, Yoon SR, Kim JT, Kim KS, Kang SH, Yang Y, Lim JS, Choi I, Nam MS, Yoon M, Lee HG. Upregulation and secretion of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in gastric cancers. *Clin Chim Acta* 2009, 401(1-2):128-33.
- Baek SJ, Kim JS, Moore SM, Lee SH, Martinez J, Eling TE. Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an antitumorigenic protein. *Mol Pharmacol* 2005, 67: 356-64.
- Mimeault M, Batra SK. Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer. *J Cell Physiol* 2010, 224: 626-35.
- Proutski I, Stevenson L, Allen WL, McCulla A, Boyer J et al. Prostate-derived factor--a novel inhibitor of drug-induced cell death in colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2009, 8:2566-74.
- Selander KS, Brown DA, Sequeiros GB, Hunter M, Desmond R et al Serum macrophage inhibitory cytokine-1 concentrations correlate with the presence of prostate cancer bone metastases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, 16: 532-537.
- Vantieghem A, Xu Y, Assefa Z, Piette J, Vandenheede JR, Merlevede W, De Witte PA, Agostinis P. Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis. *J Biol Chem* 2002, 277: 37718-31.
- Wild PJ, Krieg RC, Seidl J, Stoehr R, Reher K, Hofmann C, Louhelainen J, Rostenthal A, Hartmann A, Pilarsky C, Bosserhoff AK, Knuechel R. RNA expression profiling of normal and tumor cells following photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in vitro. *Mol Cancer Ther* 2005, 4: 516-528.
- Wilson LC, Baek SJ, Call A, Eling TE. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) is induced by genistein through the expression of p53 in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2003, 105: 747-753.

## EKTOMIKROFLÓRA KLIŠTIKA VČELIEHO (*Varroa destructor*)

Vaníková S.<sup>1,2</sup>, Nosková A.<sup>3</sup>, Júdová J.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

<sup>2</sup> Katedra genetiky, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice

<sup>3</sup> Katedra biológie a ekológie, Univerzita Mateja Bela, Banská Bystrica

### ABSTRAKT

Napadnutie včelstiev klieštikom včelím je vážnym a častým problémom pri chove včiel a boj proti tomuto parazitovi sa stal v odbornej i laickej verejnosti často diskutovanou témou. V našej práci sme sa zamerali na charakterizáciu ektomikroflóry klieštika ako možného zdroja významných ochorení včelích spoločenstiev u nás. Pomocou MALDI-TOF analýzy sme identifikovali viaceré bakteriálne kmene izolované z klieštika. Z celkovo 9 izolovaných kmeňov patria 4 do rodu *Microbacterium*. V študovanej populácii sme ďalej identifikovali predstaviteľov druhov *Bacillus cereus*, *Brevundimonas vesicularis*, *Rhizobium radiobacter* a *Microbacterium liquefaciens*. Jeden kmeň sa nám nepodarilo identifikovať. Väčšina izolovaných druhov doteraz nebola spájaná s včelami alebo klieštikom včelím.

### ÚVOD

Včela medonosná (*Apis mellifera*) má pre človeka zásadný význam, predovšetkým ako opel'ovač. V súčasnosti sa stretávame s celosvetovo rozšíreným úbytkom včelstiev. Všeobecne platí, že za úbytok je zodpovedných viacero faktorov. Súčasné štúdie podporujú názor, že ide o interakciu rôznych patogénov, medzi nimi aj klieštika včelieho (*Varroa destructor*), s ďalšími stresovými faktormi (Nazzi et al., 2012).

Klieštik včelí je prirodzeným parazitom včely východnej (*Apis cerana*) žijúcej v Ázii, odkiaľ bol zavlečený do Európy. Včela medonosná je pre neho ľahko dostupný a málo odolný hosťiteľ (Conte et al., 2010). Dospelý parazit sa živí hemolymfou dospelých včiel, zatiaľ čo ich vývojové štádiá parazitujú na včelom plode. V súčasnosti je klieštik včelí rozšírený po celom svete a patrí medzi ekonomicky významné parazity. Je známy ako vektor viacerých vírusov spôsobujúcich ochorenia včiel, a často aj kolaps celej rodiny (Nazzi et al., 2012). Okrem vírusov môže klieštik prenášať aj baktérie (pôvodcu septikémie – *Serratia marcescens*, pôvodcu moru včelieho plodu – *Paenibacillus larvae*) a huby (pôvodcu zväpenatenia – *Ascosphaera apis*) (Staroň, 2009). V našej práci sme sa zamerali na charakterizáciu ektomikroflóry klieštika ako možného zdroja významných ochorení včelích spoločenstiev u nás. O mikroflóre spojenj s klieštikom je len málo informácií.

### MATERIÁL A METODIKA

Vzorky sme odobrali z úľa od včelára z Bacúcha, okres Brezno. Klieštiky sme z včiel odstránili pomocou kyseliny mravčej. Klieštiky sme opláchli 1 ml roztoku PBS a alikvóty tohto roztoku sme vysievali na platne so živným agarom č. 2. Takto naočkované vzorky na Petriho miskách sme kultivovali v termostate s teplotou 37°C. Týmto postupom sme získali viaceré kolónie, z ktorých sme na základe morfológie vybrali 9 kmeňov baktérií, ktoré sme ďalej charakterizovali. Na identifikáciu izolátov sme využili základné mikrobiologické metódy ako Gramovo farbenie, test na oxidázu, katalázu, indol a MALDI-TOF hmotnostnú spektrometriu. Na základe analýzy proteínových profilov prístrojom MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Germany) sme skonštruovali strom podobnosti jednotlivých izolátov.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z povrchových častí tela niekoľkých desiatok jedincov klieštika včelieho sa nám podarilo izolovať viaceré kmene baktérií s výraznou morfológickou variabilitou. MALDI-TOF analýzou sme potom potvrdili túto variabilitu (Tab. 1). Spoľahlivo sa nám podarilo

identifikovať tri kmene: KK3 ako *Bacillus cereus*, KK8 ako *Brevundimonas vesicularis* a KK7 ako *Microbacterium* sp. Ostatné výsledky majú podľa MALDI-TOF analýzy nižšie skóre spoľahlivosti: KK2 – *Microbacterium maritypicum*, KK5 – *Rhizobium radiobacter*, KK6 – *Brevundimonas vesicularis*, KK9 – *Microbacterium liquefaciens*. Izoláty KK1 a KK4 sa na základe porovnania proteínových spektier MALDI-TOF analýzou nepodarilo identifikovať. Gramovo farbenie ukázalo, že ide o grampozitívne koky.

Tab. 1: Identifikácia bakteriálnych izolátov z klieštika včelieho pomocou MALDI- TOF analýzy

Izolát	Druh (najlepšia zhoda)	Skóre	Druh (druhá najlepšia zhoda)	Skóre
KK1	neidentifikovateľné	1.664	neidentifikovateľné	1.634
KK2	<i>Microbacterium maritypicum</i>	1.839	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	1.701
KK3	<i>Bacillus cereus</i>	2.347	<i>Bacillus cereus</i>	2.265
KK4	neidentifikovateľné	1.486	neidentifikovateľné	1.441
KK5	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1.958	<i>Rhizobium radiobacter</i>	1.762
KK6	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1.794	neidentifikovateľné	1.38
KK7	<i>Microbacterium</i> sp	2.541	<i>Microbacterium oxydans</i>	1.781
KK8	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	2.035	neidentifikovateľné	1.576
KK9	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	1.807	<i>Microbacterium maritypicum</i>	1.8

Izolát KK3 bol stanovený ako *Bacillus cereus*. Predstavitelia tohto rodu sú grampozitívne sporulujúce bacily, v prírode rozšírené. Viaceré štúdie zaznamenali prítomnosť predstaviteľov rodu *Bacillus* v súvislosti so včelami a ich produktami, pričom jedným z najpočetnejších druhov bol *B. cereus* (Iurlina and Fritz, 2005; Tysset et al., 1970).

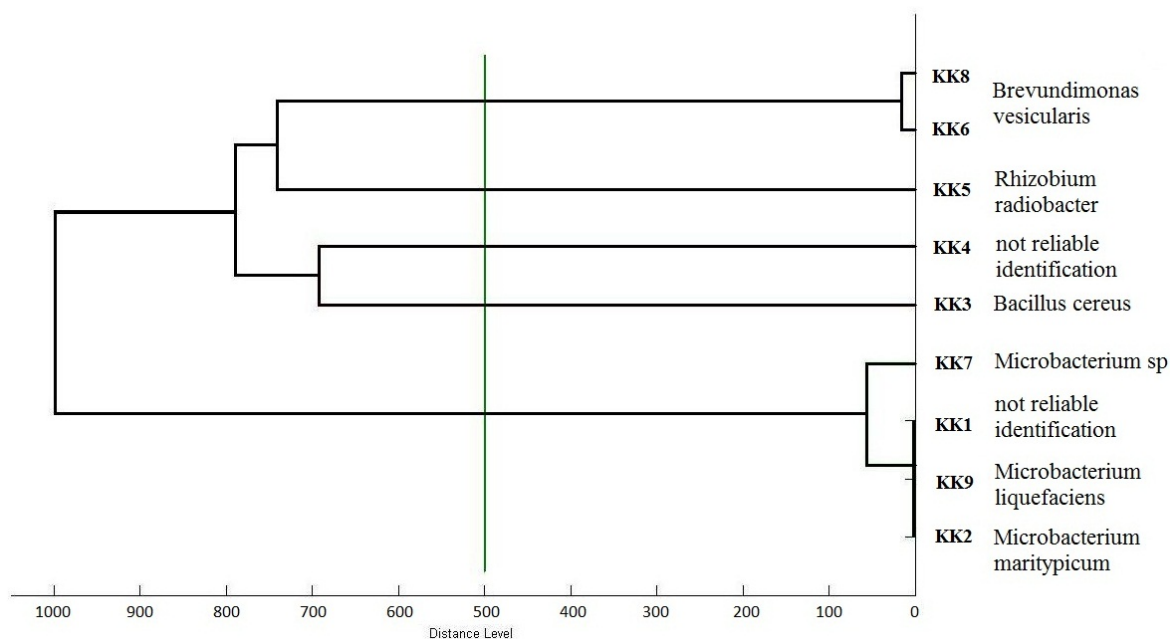
KK6 a KK8 boli MALDI- TOF analýzou identifikované ako *Brevundimonas vesicularis*. *B. vesicularis* (predtým známe ako *Pseudomonas vesicularis* a *Corynebacterium vesiculare*) sú aeróbne, nesporulujúce, gramnegatívne bacily. Boli izolované z externého prostredia - pôda, voda a sú aj súčasťou kožnej mikroflóry človeka, pričom môžu vyvolávať rôzne infekčné ochorenia (napr. meningitídu) (Yang et al., 2006). Prítomnosť predstaviteľov rodu *Pseudomonas* v mede zaznamenali vo svojej práci Tysset et al. (1970).

Posledným identifikovaným kmeňom v našej práci je *Rhizobium radiobacter*. Je to aeróbná, nesporulujúca, gramnegatívna baktéria. V prostredí sa vyskytuje predovšetkým v spojitosti s nádorovým ochorením rastlín, ale je známa aj ako patogén človeka (Egemen et al., 2011).

Na základe podobnosti proteínových profilov získaných MALDI-TOF analýzou sme skonštruovali dendrogram znázorňujúci príbuznosť jednotlivých kmeňov (Obr.1). Izolát KK1, ktorý sme MALDI- TOF analýzou neidentifikovali priamo, patrí spolu s izolátmi KK2, KK7 a KK9 do rodu *Microbacterium* a z dendrogramu vyplýva, že všetky 4 izoláty patria do toho istého druhu. Predstavitelia rodu *Microbacterium* sú grampozitívne, nesporulujúce baktérie, celosvetovo rozšírené. Jedince tohto rodu boli izolované z rôznych habitatov, napr. rastlín, pôdy, ale aj tráviaceho traktu a lariev hmyzu, či rôznych potravín (Dworkin et al., 2006). V literatúre nebol dosiaľ popísaný žiadny vzťah medzi predstaviteľmi rodu *Microbacterium* a klieštikom včelím, či včelstvom všeobecne.

Všetky spomínané izolované baktérie sú druhy bežne sa vyskytujúce v prírode. Vzhľadom na to, že klieštik včelí je ektoparazitom včely medonosnej, je pravdepodobné, že tieto baktérie sa na neho dostali práve prostredníctvom robotníč, na ktorých parazituje, počas opeľovania.

Použitím MALDI-TOF analýzy a z nej vychádzajúceho dendrogramu sa nám nepodarilo určiť jediný kmeň – KK4. Ide o gramnegatívny bacil, pozitívny na katalázu, oxidázu a indol. Na charakterizácii tohto kmeňa a na analýze biologickej funkcie ostatných izolátov sa ďalej pracuje.



Obr. 1: Dendrogram znázorňujúci príbuznosť bakteriálnych izolátov z klieštika včelieho

## POĎAKOVANIE

Práca vznikla s podporou grantu VEGA 2/0016/12.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Conte YL., Ellis M., Ritter W. *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*. 2010. 41(3): 353-363
- Dworkin M., Falkow S., Rosemberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria* (v. 1-7). 3rd edition. Springer. 2006. 7000pp. ISBN-10: 0387254994, ISBN-13: 978-0387254999
- Egemen O., Ozkaya O., Bingol D., Akan M. *Rhizobium radiobacter*: An unusual pathogen isolated on an active chronic ulcerous inflammation. *J Plast Reconstr Aes*. 2012. 65(8): 233-5
- Iurlina MO. and Fritz R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *Int J Food Microbiol*. 2005. 105: 297– 304
- Nazzi F., Brown SP., Annoscia D., Piccolo FD., Prisco GD., Varricchio P., Vedova GD., Cattonaro F., Caprio E., Pennacchio F. Synergistic Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies. 2012. *PLoS Pathog* 8(6): e1002735. doi:10.1371/journal.ppat.1002735
- Staroň M. Klieštikovosť včiel – I.časť. *Včelár*. 2009. 83:178-179. URL: [http://www.ponyfarma.pavcina-lehota.sk/vcelarstvo/dokumenty/varroosisI\\_web.pdf](http://www.ponyfarma.pavcina-lehota.sk/vcelarstvo/dokumenty/varroosisI_web.pdf)
- Tysset C., Durand C., Taliergio YP. Contribution to the study of the microbial contamination and the hygiene of commercial honey. *Rev Med Vet*. 1970. 146: 1471– 1492.
- Yang ML., Chen IH., Chen TC., Lin WR., Lin CY., and Lu PL. Case report: Infective endocarditis caused by *Brevundimonas vesicularis*. *BMC Infect Dis*. 2006. 6: 179

## VPLYV FAKTOROV PROSTREDIA NA VARIABILITU OČKÁŇOV RODU *EREBIA*

Varcholová K.

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied, Katedra zoológie

### ABSTRAKT

V príspevku boli sledované rozmery predných krídel (dĺžka a šírka) a samčích kopulačných orgánov (dĺžka a šírka valvy a dĺžka aedeagu) viacerých populácií druhov *Erebia aethiops* (ESPER 1777), *Erebia euryale* (ESPER 1805), 1775) a *Erebia medusa* (DENIS & SCHIFFERMULLER z rôznych lokalít Západných Karpát. Odchytené jedince pochádzali z hypsometricky rozdielnych lokalít Slovenska, z orografických celkov Slovenské Rudohorie, Muránska planina, Slanské vrchy, Čergov, Busov, Pieniny a Košická kotlina. Získaný materiál bol po preparácii premeraný a sledované veličiny boli vyhodnotené pomocou matematicko-štatistickej analýzy. Štatistický test (ANOVA) potvrdil variabilitu a rozdiely medzi jednotlivými výbermi. Boli potvrdené rozdiely v rozmeroch krídel, ako aj kopulačných orgánov skúmaných očkáňov. Štatisticky významne odlišné sú prevažne jedince pochádzajúce z lokalít s vyššou nadmorskou výškou oproti jedincom, ktoré žijú v nižších nadmorských výškach. Okrem štatistického spracovania sa preskúmala aj korelácia medzi dĺžkou a šírkou krídla a kopulačných orgánov. Bola zistená pozitívna korelácia pri krídlach, naopak pre kopulačné orgány táto miera závislosti nebola potvrdená. Pomocou PCA analýzy bol vyhodnocovaný vplyv faktorov prostredia na zistenú variabilitu, pričom z výsledkov vyplýva, že najväčší podiel na celkovej zistenej variabilite skúmaných motýľov má nadmorská výška.

### ÚVOD

Determinácia mnohých skupín hmyzu založená na porovnávaní ektodermálnych kopulačných orgánov je obvyklou a často využívanou metódou. Často nie je jednoduché odlišiť samčeka od samičky na základe vyskytujúceho sa pohlavného dimorfizmu a takisto v prípade nezreteľných medzidruhových rozdielov sa k diagnostike využíva štúdium vonkajších kopulačných orgánov skúmaných druhov (Wakeham-Dawson et al., 2004). Analýza evolúcie kopulačných orgánov nám môže objasniť dôležité fylogenetické vzťahy mnohých druhov hmyzu. (Naumann, 1988). Jednotliví zástupcovia rodu *Erebia* patria medzi časté objekty entomologických pozorovaní. Exempláre z tohto rodu, hlavne vysokohorské, sú skúmané ako modelové príklady vplyvu prostredia na správanie, či morfológiu. Tieto druhy majú veľké spektrum výskytu v rámci kontinentálnej Európy (Kudrna a kol., 2011). Cieľom práce bolo analyzovať viaceré populácie vybraných druhov rodu *Erebia* a zistiť ich morfológickú variabilitu a definovať jej príčiny.

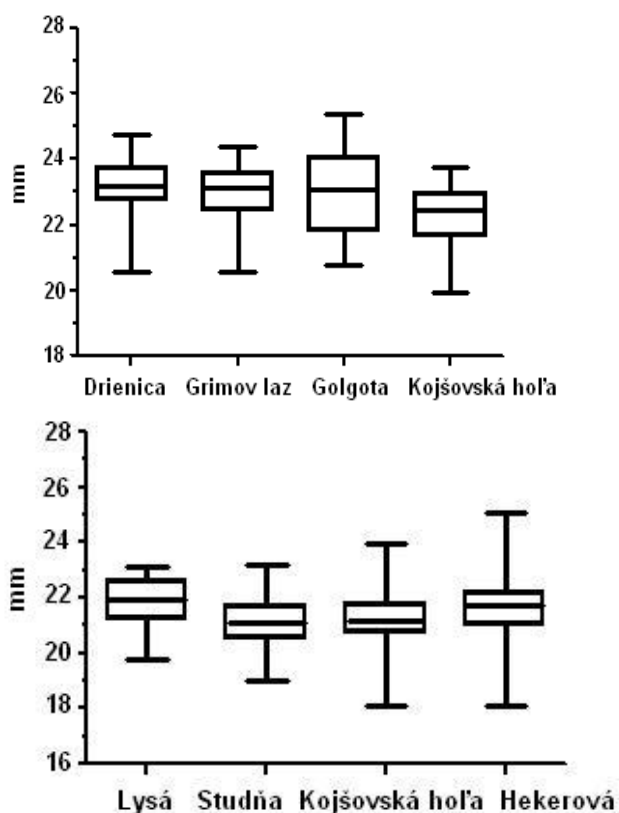
### MATERIÁL A METODIKA

Bolo prešetrených niekoľko populácií druhov *Erebia aethiops*, *Erebia euryale* a *Erebia medusa* z rozdielnych lokalít Slovenska. Krídla boli premerané pomocou elektronického číselného meradla v milimetroch. Dĺžka krídla predstavovala najdlhšiu vzdialenosť a šírka jeho najširšiu časť. Na preparáciu bola použitá metóda macerácie odlomenej koncovej časti bruška v hydroxide draselnom. KOH zabezpečil zachovanie kopulačného orgánu tvoreného z chitínu. Všetky mäkké časti, tkanivá, svaly rozpustil. Pod stereolupou sa odstránili zvyšky integumentu a vypreparovaný kopulačný orgán bol vložený do kvapky glycerínu, kde bol pomocou optiky premeraný. Po zmeraní všetkých hodnôt sa použitím štatistických metód podľa ANDĚLA (1985) zisťovalo, či existuje výrazný rozdiel medzi dĺžkou, šírkou krídla, valvy a dĺžkou aedeagu u skúmaných druhov. Štatistické analýzy sa vyhodnocovali v programoch GraphPad Prism 5, OriginPro 8 a XLSTAT 2009. Každá lokalita s prislúchajúcim počtom exemplárov predstavuje štatistický súbor. Venovala sa pozornosť

hlavne sledovaniu rozdielov faktorov (dĺžka, šírka krídel, dĺžka, šírka valvy a dĺžka aedoeagu) v závislosti od nadmorskej výšky a ďalších podmienok prostredia. V prvej etape bola zvolená pre vyhodnocovanie rozdielov jednofaktorová analýza rozptylu. V druhej etape bola použitá Scheffého, príp. Tukeyova metóda mnohonásobného porovnávania. Okrem štatistického spracovania sa v experimente preskúmala aj vzájomný vzťah (korelácia) medzi dĺžkou a šírkou krídla a medzi dĺžkou a šírkou valvy. V závere PCA analýza objasňuje, ktorý faktor prostredia má najväčší vplyv na zistenú variabilitu. Na základe tohto spracovania rozdielov (resp. podobností) v rozmeroch krídel a stavbe kopulačných orgánov sú vyhodnotené rozdiely medzi sledovanými populáciami a uvedené faktory, ktoré k daným skutočnostiam prispeli.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Skúmané očkáne majú širokú ekologickú valenciu k nadmorskej výške. Preto tu bol predpoklad, že variabilita rozličných kvantitatívnych znakov populácie má normálne rozdelenie v priaznivých podmienkach prostredia. Na základe štatistických testov bola potvrdená variabilita v rozmeroch krídel (obr. 1, 2, 3, 4, 5) a samčích ektodermálnych kopulačných orgánov. Štatisticky významne odlišné sú od seba jedince pochádzajúce z lokalít s nižšou nadmorskou výškou oproti jedincom pochádzajúcim z lokalít s vyššou nadmorskou výškou.

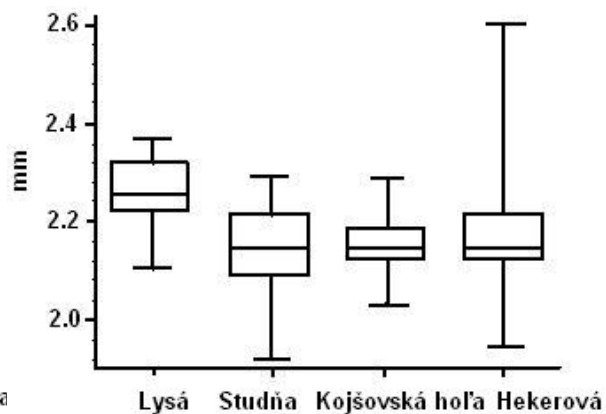


Obr. 1 Dĺžka krídel *Erebia aethiops*

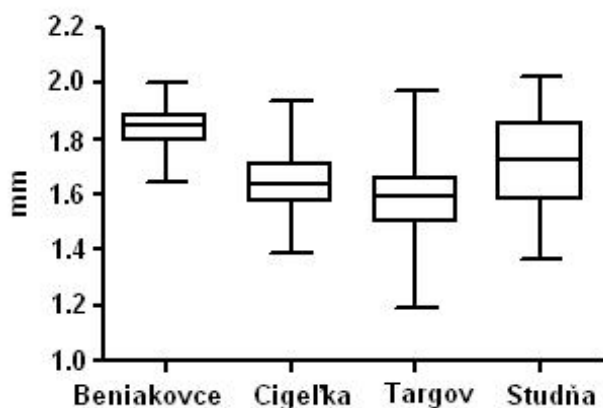
Obr. 2 Dĺžka krídel *Erebia euryale*



Obr. 3 Dĺžka valvy *Erebia aethiops*



Obr. 4 Dĺžka valvy *Erebia euryale*



Obr. 5 Dĺžka valvy *Erebia medusa*

Prešetrený bol aj vzájomný vzťah dĺžky a šírky krídla a kopulačných orgánov. Bola zistená pozitívna korelácia dĺžky a šírky krídla, čo pri kopulačných orgánoch potvrdené nebolo, hodnoty korelačných koeficientov sa však výrazne menili so stúpajúcou nadmorskou výškou. V závere boli vybrané ďalšie faktory prostredia (nadmorská výška, podložie, prítomnosť vody) a pomocou PCA analýzy bol vyhodnocovaný ich vplyv na celkovú zistenú variabilitu. Táto analýza potvrdila najvýraznejší vplyv nadmorskej výšky.

#### POĎAKOVANIE

Príspevok bol spracovaný s príspevom projektov VEGA 1/0477/10 a 1/1025/12.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Anděl, J., 1985. Matematická statistika. SNTL - Nakladatelství technické literatury, Praha, pp. 352.
- Kudrna, O., et al., 2011. Distribution Atlas of Butterflies in Europe. GfS, Halle, pp 576.
- Naumann L.M. 1988. The interne female genitalia of some Zygaenidae (Insecta: Lepidoptera): their morphology and remarks on their phylogenetic significance. Systematic Entomology 13: 85-99.
- Wakeham-Dawson A., Jakšić P., Holloway J.D., Dennis R.L.H. 2004. Multivariate analysis of male genitalia structures in the *Hipparchia semele-muelleri-delattini* complex (Nymphalidae, Satyrinae) from the Balkans: how many taxa? Nota Lep. 27 (2/3): 103-124.



## REGULÁCIA IMUNITNEJ ODPOVEDE PERITONEÁLNYCH MAKROFÁGOV POČAS INFEKCIE CESTÓDOM MESOCESTOIDES VOGAE U MYŠÍ

Vendeľová M., Hrkčková G.

Parazitologický ústav, SAV, Košice

### ABSTRAKT

Makrofágy predstavujú prvú obrannú líniu v obrane organizmu voči patogénom, pričom počas infekcie dochádza k ich rozdielnej aktivácii a zmenám fenotypu. Cieľom práce bolo sledovanie dynamiky počtu a zmeny fenotypu monocytov a makrofágov v peritoneálnej dutine myši s infekciou cestódou *Mesocestoides vogae*. V štúdiu sme sa zamerali aj na hlavné efektorové funkcie týchto buniek, medzi ktoré patrí respiračné vzplanutie a fagocytárna aktivita a vplyv infekcie na celkovú metabolickú aktivitu buniek. Zároveň sme sledovali zmenu expresie génov pre cytokíny Th1 a Th2 typu imunitnej odpovede peritoneálnych leukocytov, ktoré vybrané aspekty ovplyvňujú. V experimente sme použili myši kmeňa ICR, ktoré boli orálne infikované 60 larvami. Peritoneálne exudátové bunky (PEC) sme odoberali myšiam počas dvoch mesiacov infekcie v týždňových intervaloch. Fenotypové črty buniek sme sledovali svetelným mikroskopom po klasickom farbení Mäy-Grünwald/ Giemsa. Fagocytárna aktivita bola stanovená na základe ingescie latexových častíc a produkcia voľných radikálov prostredníctvom redukcie ferricytochrómu c na ferocytochróm c. Metabolická aktivita buniek bola stanovená na základe redukcie MTT (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)2,5-difenyl tetrazolium bromid). Génová expresia bola stanovená metódou RealTime PCR. Makrofágy predstavovali najpočetnejšiu skupinu buniek a zahŕňali niekoľko subpopulácií s rôznou afinitou k farbivám. V preparátoch sme zaznamenali niekoľko typov makrofágov t.j klasické bázické formy, acidofilnejšie formy s väčším jadrom a obrie viacjadrové bunky. Indukcia aktivácie makrofágov na alternatívne formy korelovala s expresiou IL-4, IL-10 a IL-13 cytokínov Th2 typu odpovede, ktoré sú spojené s chronickou ochorením. Prechodné formy makrofágov pod vplyvom týchto cytokínov preukázali protizápalové vlastnosti, ktoré súviseli so zníženým respiračným vzplanutím a potlačenou fagocytárnou aktivitou. Tieto efektorové funkcie sú vplyvom cytokínov INF- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  znakom hlavne klasických makrofágov Th1 typu imunitnej odpovede. Expresia génov pre tieto cytokíny bola počas postupujúcej infekcie potlačená. Útlm spomínaných efektorových funkcií u alternatívnych foriem makrofágov neprejavoval známky zníženej metabolickej aktivity, čo je predpokladom toho, že spomínané typy nepredstavujú stíšené makrofágy, ale makrofágy špecializované na inú funkciu.

### ÚVOD

Infekcie, ktoré sú spôsobené helmintmi, medzi ktoré patria aj cestódy, nie sú všeobecne fatálne, ale sú spojené s vysokým percentom morbidít s chronickou infekciou často vedúcou k anémii a podvýžive (WHO, 1999). Pri navrhovaní nových spôsobov terapie voči helmintom je nevyhnutné poznať aspekty imunitnej odpovede a úlohu jednotlivých komponentov imunitného systému. Infekcia spôsobená helmintmi a korešpondujúca imunitná odpoveď hostiteľa je výsledkom dlhodobej dynamickej koevolúcie medzi nimi. Larvy (tetratyridie) *Mesocestoides vogae* predstavujú unikátne organizmy, ktoré sa dokážu nepohlavne rozmnožovať v pečeni a peritoneálnej dutine hostiteľa, kde spôsobujú závažné patologické zmeny. Vďaka tejto schopnosti dochádza k enormnému nárastu počtu lariev u infikovaných zvierat, ktoré napriek pretrvávajúcej silnej chronickej infekcii dokážu prežiť veľmi dlho (Specht et al., 1965). Je zrejmé, že aj *Mesocestoides* si vyvinul mechanizmy ako obísť imunitný systém hostiteľa, aby si tak vytvoril vhodné prostredie pre rozmnožovanie a maturáciu bez toho, aby došlo k usmrteniu hostiteľa. Protektívna imunitná odpoveď a tolerancia helminta je tradične spätá s Th2 typom imunitnej odpovede so zvýšenou hladinou

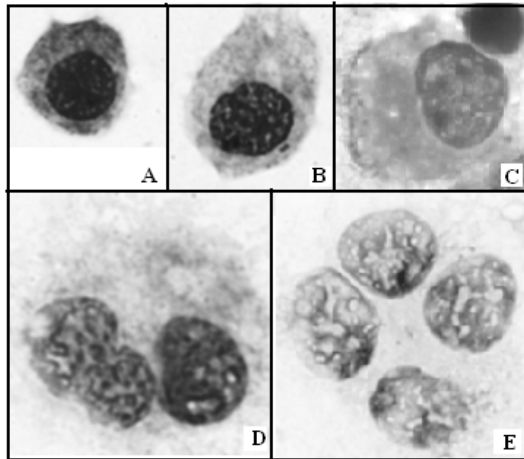
interleukínu-4 (IL-4), IL-10, IL-13 a ďalších, aktiváciou a expanziou plazmatických buniek produkujúcich protilátky IgE, eozinofilov, mastocytov atď. (Anthony et al., 2007). Pre iniciáciu imunitnej odpovede sú nevyhnutné bunky vrodenej zložky imunity, z ktorých dominantné postavenie majú práve makrofágy (Williams et al., 1983). Monocyto-makrofágova línia buniek je typická svojou heterogenitou a plasticitou. Klasicky aktivované makrofágy produkujú reaktívne kyslíkové radikály a zápalové cytokíny (TNF- $\alpha$ ) a sú konvenčne späté s Th1 typom imunitnej odpovede (Helming et al., 2007)). Donedávna sa považovali za relatívne pokojové počas Th2 typu odpovede, niekoľko štúdií poukazuje na ich alternatívnu aktiváciu a pohotové doplnenie do miesta infekcie helminta. Takéto makrofágy vykazujú minimálne tri principiálne funkcie: reguláciu imunitnej odpovede, hojenie rán a rezistenciu voči invázii parazita (Anthony et al., 2007). Mnohojadrové obrovské bunky (MGC - multinucleated giant cells), ktoré vznikajú fúziou makrofágov sú charakteristickou črtou granulomatózných zápalov. Jeden z krokov ich formácie pravdepodobne predstavuje alternatívna aktivácia prostredníctvom IL-4 (Mantovani, 2007). Funkcia MGC počas chronického zápalu však zatiaľ nebola objasnená (Helming et al., 2007). Pri hľadaní nových prístupov terapie je dôležité objasniť dôležité mechanizmy modulácie imunitných reakcií hostiteľa parazitmi. V predloženej práci bolo našim hlavným cieľom predstaviť dynamické zmeny v zložení populácii týchto buniek, ktoré majú majoritné postavenie pri imunosupresii spôsobenej parazitom a sledovať ich efektorové funkcie a vplyv infekcie na metabolickú aktivitu buniek počas sledovaného obdobia infekcie.

## MATERIÁL A METODIKA

Experimenty sme uskutočnili na samcoch kmeňa ICR, ktoré boli orálne infikované 55 – 60 tetratyrídiami *M.vogae*. V peritoneálnej dutine myší sme sledovali vplyv infekcie. Peritoneálne exudátové bunky sme z myší izolovali na 0., 7., 14., 21., 25., 28., 35., a 44. deň po infekcii (d.p.i). Bunkové nátery z peritoneálnej dutiny sme farbili metódou May-Grünwald/ Giemsa. Časť buniek sme použili na sledovanie respiračného vzplanutia, ktoré je sprevádzané produkciou reaktívnych kyslíkových radikálov na základe redukcie ferricytochrómu C na ferocytochróm C podľa metódy (Hrčková a kol., 1997) a fagocytárnej aktivity prostredníctvom ingescie latexových častíc podľa modifikovanej metódy (Jones et al, 2007). Z buniek sme izolovali RNA, pripravili cDNA a metódou Real-Time PCR sme sledovali expresiu génov pre vybrané cytokíny INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 a IL-13 Th1 a Th2 typu odpovede, ktorú sme vyhodnotili  $\Delta\Delta C_t$  metódou podľa opublikovaného postupu (Hrčková a kol., 2010). Metabolická aktivita buniek bola stanovená štandardnou metódou redukcie MTT soli, ktorú sme modifikovali na peritoneálne bunky podľa Mosmanna (Mosmann, 1983).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Makrofágy predstavovali najpočetnejšiu skupinu peritoneálnych buniek a zahŕňali niekoľko subpopulácií klasických foriem, prechodných alternatívnych foriem a obrích buniek (giant cells). Prechodné makrofágy mali oproti klasickým bazickým makrofágom zvýšenú citlivosť voči kyslým zložkám farbív (Obr. 1,A – C). V porovnaní s klasickým bazickými makrofágmi počet modifikovaných alternatívnych foriem postupne narastal (Graf. 1). S nárastom počtu prechodných alternatívnych foriem makrofágov a obrích buniek korelovala expresia génov pre IL-4 a IL-13 cytokíny. Makrofágy podstupujú alternatívnu aktiváciu prostredníctvom týchto cytokínov, ktoré spúšťajú fenotypové zmeny dôležité pre imunitnú odpoveď pri parazitárnych ochoreniach (Martinez et al., 2008). Je pravdepodobné, že nami sledované bunky predstavujú spomínané alternatívne aktivované makrofágy, čo je v najbližšej budúcnosti potrebné overiť. Obrie bunky (giant cells), ktoré sú charakteristické pre

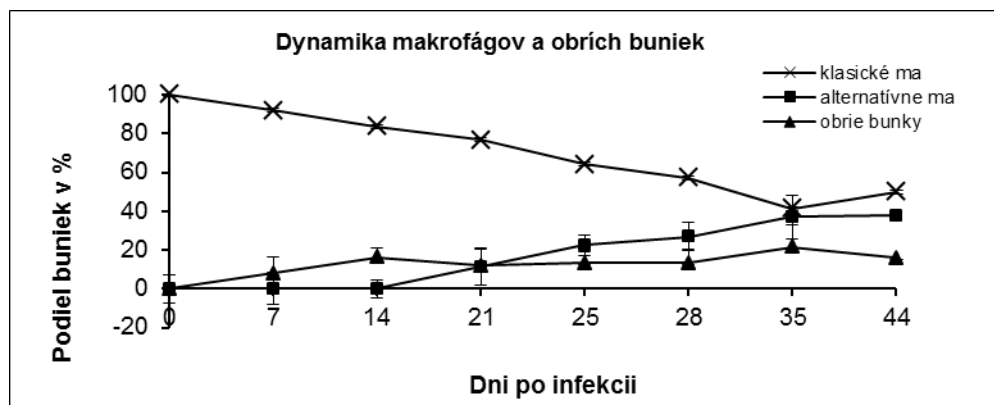


**Obr.1:** Jednotlivé typy makrofágov. Farbenie Mäy-Grünwald/Giemsa Romanovský, zv. 1000x  
 A. klasický bázičný makrofág,  
 B. prechodná forma makrofágu,  
 C. alternatívny makrofág,  
 D. trojjadrová MGC, E. štvorjadrová MGC

granulomatózne infekcie sa v populácii peritoneálnych buniek vyskytovali s 2 - 6 jadrami od 7. dňa p. i. (Obr. 1, D, E). Tieto obrie bunky vznikajú fúziou makrofágov, pričom tejto fúzii predchádza práve ich alternatívna aktivácia taktiež pod vplyvom spomínaných cytokínov (Mantovani et al., 2007). V našej práci sme sledovali vybrané efektorové funkcie, ktoré sú typicky späté s aktívnym statusom makrofágov, t.j. fagocytárna aktivita buniek a respiračné vzplanutie. Fagocytárna aktivita bola po počiatkovej stimulácii na 14. d.p.i postupne

inhibovaná a bola doménou hlavne klasických makrofágov. U alternatívne aktivovaných makrofágov a obrovských buniek nebola ingescia vo významnej miere zaznamenaná. Intenzita respiračného vzplanutia bola stanovená na základe merania koncentrácie superoxidových aniónov ( $O_2^-$ ). Maximálne zvýšená produkcia superoxidu bola zaznamenaná 14. d.p.i a po

tomto dni dochádzalo k jej graduálnemu poklesu. Alternatívne formy makrofágov majú zrejme túto nešpecifickú efektorovú funkciu potlačenú alebo pozmenenú, pretože napriek ich zvyšujúcemu počtu nedochádza k zvýšeniu produkcie superoxidu. Zmena pokojových makrofágov na potentné bunky so zvýšenou schopnosťou prezentovať antigén, syntetizovať prozápalové cytokíny, toxické mediátory a stimulovať fagocytárnu aktivitu je spôsobovaná cytokínom  $IFN-\gamma$  (Martinez et al., 2009). Relatívna expresia génu pre  $IFN-\gamma$  mala v našich experimentoch klesajúcu tendenciu, čo v kooperácii s IL-4 cytokínom, ktorý je schopný inhibovať respiračné vzplanutie malo za následok celkovú inhibíciu prozápalových vlastností týchto buniek. Pri hodnotení efektorových funkcií by sme teda mohli zhrnúť, že počas infekcie došlo k ich potlačeniu. Pri overovaní metabolickej aktivity buniek sme nepotvrdili hypotézu, že bunky sú pravdepodobne prostredníctvom produktov lariev metabolicky inhibované, naopak ukázalo sa, že s postupujúcou infekciou je metabolická aktivita buniek výrazne stimulovaná oproti kontrole s maximom na 14. deň po infekcii. Alternatívne formy makrofágov a viacjadrové bunky nepredstavujú pokojové makrofágy, ale naopak metabolicky aktívne bunky, ktoré majú zatiaľ neobjasnenú funkciu pri helmintózach.



Graf. 1: Dynamika jednotlivých typov makrofágov dané dni po infekcii

Uvádza sa, že pri týchto infekciách je cieľom Th2 typu imunitnej odpovede eliminácia a kontrola infekcie, a to prostredníctvom pôsobenia IL-4 a IL-13 cytokínov. K eliminácii lariev

nedochádza, ba naopak vďaka pohlavnému rozmnožovaniu dochádza k ich enormnému nárastu ako v pečeni, tak aj v peritoneálnej dutine. Je zrejmé, že parazit si vyvinul mechanizmy ako obísť efektívnu imunitnú odpoveď pravdepodobne prostredníctvom svojich exkrecečno-sekrečných molekúl. Na objasnenie vplyvu týchto antigénov a komplexný popis tohto parazito-hostiteľského vzťahu aj v súvislosti s prípadnou terapiou sú potrebné ďalšie štúdiá a predložená časť predstavuje len prvý zlomok.

## ZÁVER

Infekcia larvami *M. vogae* spôsobuje výrazne zmeny v dynamike počtu zápalových buniek v peritoneálnej dutine myši s najvýraznejšími zmenami fenotypu v monocyto-makrofágovej línii. Napriek ich zvyšujúcemu počtu nedochádza k inhibícii proliferácie lariev. Prozápalové funkcie makrofágov, ktoré sú klasifikované ako klasicky aktivované sú s postupujúcou infekciou potláčané. Celková metabolická aktivita buniek je výrazne stimulovaná, a preto je zrejmé, že makrofágy sú v zmysle Th2 typu odpovede prispôbené na vykonávanie iných funkcií, ktoré sú pravdepodobne späté s elimináciou poškodenia tkanív, tlmenia zápalu a zabezpečenia parazito-hostiteľskej tolerancie. Pribudajúce dôkazy potvrdzujú fakt, že makrofágy hrajú hlavnú úlohu v patológii a vďaka ich sekrečným produktom a efektorovým funkciám predstavujú sľubný terapeutický cieľ.

## POĎAKOVANIE

Práca vznikla za podpory projektu VEGA č. 2/0188/10

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Anthony M.R., et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature reviews*. 2007; 7: 975 – 987.
- Helming L., Gordon, S. Macrophage fusion induced by IL-4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules. 2007. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 33 – 42
- Hrčková G., Velebný S. Effect of praziquantel and liposome-incorporated praziquantel on peritoneal macrophage activation in mice infected with *Mesocestoides corti* tetrathyridia (Cestoda). *Parasitology*. 1997; 114: 475 – 482.
- Hrčková G., Velebný S., Solár P. Dynamics of hepatic stellate cells, collagen types I and III synthesis and gene expression of selected cytokines during hepatic fibrogenesis following *Mesocestoides vogae* (Cestoda) infection in mice. *International journal for parasitology*. 2010; 40: 163 – 174.
- Jones P. et al. Intervertebral disc cells as competent phagocytes in vitro: implications for cell death in disc degeneration. *Arthritis research and therapy*. 2008; 10: 1 – 8.
- Mantovani A., Sica A., Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 14 – 16.
- Martinez et al. Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27:451–83.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983; 65: 55-63.
- Specht D., Voge M. Asexual multiplication of *Mesocestoides* tetrathyridia in laboratory animals. *Journal of parasitology*. 1965; 51: 268 – 272. WHO in World health report (World health organization, Geneva, Switzerland, 1999)
- Williams G., Williams J. Granulomatous inflammation-a review. *J Clin Pathol.* 1983; 36: 723 – 733.

## VPLYV RÔZNYCH ZDROJOV MANGÁNU V DIÉTE NOSNÍC NA PRODUKCIU A VYBRANÉ PARAMETRE VAJEC

Venglovská K.<sup>1</sup>, Mellen M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice

<sup>2</sup>Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Nitra

### ABSTRAKT

Mangán (Mn) je esenciálny stopový prvok, ktorý sa štandardne pridáva do kŕmnych zmesí nosníc, a to buď ako súčasť organických alebo anorganických zlúčenín. Absorpcia Mn je u hydiny pomerne nízka a prebieha rôznymi absorpčnými cestami v závislosti od prijatej formy. Absorbovaný Mn sa jednak ukladá v tkanivách vtákov, ale podieľa sa aj na tvorbe škrupiny vajec. Mn ovplyvňuje pevnosť škrupiny a jej kryštalografickú štruktúru. Obsah Mn v tkanivách/produktach a teda aj jeho depozícia vo vajciach môže závisieť od množstva a formy v akej je prijímaný. V súčasnosti sú však rozdielne názory o biovyužitelnosti anorganických a organických zdrojov Mn. Tento príspevok zhrňuje doposiaľ známe poznatky o vplyve rôznych foriem Mn na produkciu, kvalitu a depozíciu Mn vo vajciach.

### ÚVOD

Mangán je esenciálny stopový prvok pre všetky živé organizmy. Prostredníctvom enzýmov sa zapája do bielkovinového a energetického metabolizmu, je dôležitý pre správny vývoj kostného tkaniva a pre udržanie správnej mineralizácie kostí, má významnú úlohu v regulácii bunkového metabolizmu a v antioxidantnej ochrane. Mn je potrebný aj pre správnu funkciu nervového a reprodukčného systému (Zlotkin a kol., 1995; McDowell, 2003). U hydiny je Mn nevyhnutný pre normálny vývoj kostí, enzýmové funkcie a metabolizmus bielkovín (Scott a kol., 1976). Nedostatočný príjem Mn diétou spôsobuje v chove hydiny ochorenia perózu a nutričnú chondrodystrofiu, kedy dochádza poruchám vývoja kostí a ich malformáciám, opuchom kĺbov a pod. Taktiež dochádza k narušeniu vývoja otolítov vo vnútornom uchu u kurčiat a tieto defekty môžu viesť až k ataxii. Mangán je kofaktorom metaloenzýmov zodpovedných za syntézu uhličitanov a mukopolysacharidov a zohráva dôležitú funkciu pri tvorbe škrupiny (Swiatkiewicz a Koreleski, 2008), podieľa sa na vytváraní hustejšej minerálnej kostry škrupiny a tým jej poskytuje väčšiu odolnosť a pevnosť (Gheisari a kol., 2011). Preto u Mn-deficientných nosníc dochádza k poklesu znášky vajec, poruchám tvorby škrupiny a zvýšenému výskytu vajec s tenkou, resp. žiadnou škrupinou (McDowell, 2003).

V súčasnosti je v EÚ schválených 11 zlúčenín Mn ako kŕmnych aditív mangánu používaných vo výžive zvierat. Tri z nich sú cheláty a to, mangánový chelát proteínového hydrátu aminokyselín (pochádzajúci z hydrolyzovaných sójových proteínov), mangánový chelát glycínu (syntetický) a mangánový chelát hydroxylového analógu metionínu (Community Register of Feed Additives). Tieto aditíva a ich maximálne povolené limity a podmienky ich užívania upravuje smernica Európskej komisie (EC 1334/2003 a EC 479/2006). Maximálny povolený celkový obsah Mn v EÚ je 150 mg.kg<sup>-1</sup> kompletnej kŕmnej zmesi pre všetky zvieratá produkujúce potraviny, okrem rýb (100 mg.kg<sup>-1</sup>). Anorganické formy Mn sa využívajú vo veľkej miere na suplementáciu kŕmnych zmesí, ale absorpcia Mn v tejto forme je limitovaná, najmä z dôvodu antagonistického správania sa v diéte a následne v gastrointestinálnom trakte (Richards a kol., 2010). Podľa iných autorov, organické aditíva majú v porovnaní s anorganickými určité výhody a to, chránia pred neželanými chemickými reakciami v gastrointestinálnom trakte, ľahšie prechádzajú črevnou stenou a sú absorbované inými absorpčnými cestami (Mateos a kol., 2005). Organické formy stopových prvkov sa vo

všeobecnosti považujú za biovyužiteľnejšie (Yan a Waldroup, 2006; Li a kol., 2005) Z tohto dôvodu narastá záujem o využívanie organických aditív Mn vo výžive hydiny, čo súvisí s vyššou biodostupnosťou organických minerálov, ktorá je pravdepodobne spojená s odlišnými mechanizmami absorpcie a lepšou ochranou pred naviazaním sa na iné komponenty v diéte ako sú napr. fytáty, s ktorými vytvárajú nestráviteľné komplexy (Swiatkiewicz a kol., 2001). Výsledky štúdií ohľadne účinkov minerálnych komplexov na nosnice si však navzájom odporujú. V niektorých štúdiách sa udáva, že organické zdroje Mn priaznivo ovplyvňujú znášku, kvalitu škrupiny a to najmä hrúbku a váhu škrupiny (Bunesova, 1999; Klecker a kol., 2002). Iní autori nezistili žiadne signifikantné rozdiely v biovyužitelnosti medzi organickými a anorganickými aditívami Mn (Lim a Paik, 2003; Mabe a kol., 2003).

#### VPLYV MANGÁNU NA PRODUKCIU VAJEC

Potreba Mn pre nosnice bola stanovená americkou NRC (1994) alebo nemeckou GfE (1999) od 17-60 mg Mn.kg<sup>-1</sup> krmiva tak, aby boli zachované všetky jeho esenciálne funkcie. Podľa Nariadenia vlády SR (č. 440/2006 Z.z.) sú požiadavky na Mn v krmných zmesiach stanovené na min. 40 mg Mn.kg<sup>-1</sup> krmiva pre úžitkové nosnice. Niektorí autori sa domnievajú, že 25 mg Mn.kg<sup>-1</sup> krmiva je dostatočné množstvo pre zachovanie maximálnej produkcie vajec, hmotnosti vajec a konverzie krmiva a zvýšenie prídavku Mn nemá vplyv na produkciu vajec (Inal a kol., 2001; Sazzad a kol., 1994). Podľa Sun a kol. (2012) suplementácia rozličných zdrojov Mn nemá zásadný vplyv na produkciu vajec, na konverziu krmiva a ani na množstvo rozbitých vajec. Podľa Hossain a Berechini (1998) však bola produkcia vajec a ich hmotnosť signifikantne ovplyvnená množstvom Mn v diéte. Vyššia produkcia vajec bola zaznamenaná pri suplementácii 50 mg Mn.kg<sup>-1</sup> krmiva, pričom vyššia hmotnosť vajec bola pozorovaná pri suplementácii 75 mg Mn.kg<sup>-1</sup> diéty.

#### VPLYV MANGÁNU NA KVALITU VAJEC

Chovatelia nosníc sa samozrejme snažia zvyšovať produkciu vajec, zlepšovať ich kvalitu, ale aj udržiavať dobrý zdravotný stav zvierat v chovoch, taktiež sa venujú aj otázke bezpečnosti potravín živočíšneho pôvodu. Avšak až 8% všetkých strát v produkcii vajec súvisí priamo s nízkou kvalitou škrupín (Klecker a kol., 2002). Rozbité škrupiny súvisia priamo s kvalitou škrupín, ktorá je ovplyvňovaná najmä výživou, z menšej miery aj inými faktormi. Vysoká pevnosť škrupín a čo najmenšie množstvo deformácií v štruktúre škrupiny sú nevyhnutné pre ochranu vajec pred penetráciou patogénnych baktérií ako sú *Salmonella sp.* do vajec (Washburn, 1982; Roland, 1988). Mangán je jedným z mikroelementov, ktoré majú významný vplyv na kvalitu vaječnej škrupiny.

Mangán aktivuje glykozyl transferázu, ktorá sa zapája do tvorby mukopolycharidov, ktoré sú súčasťou proteoglykánov a tým sa nepriamo zapája do tvorby škrupiny (Leach, 1976). Mabe a kol. (2003) zistili, že stopové prvky majú vplyv na mechanické vlastnosti škrupiny pôsobením na kryštalizáciu vápenca a môžu modifikovať jej kryštalografickú štruktúru. Mangán pôsobí na vytváranie hustejšej minerálnej kostry škrupiny, poskytuje jej väčšiu odolnosť a pevnosť. Nosnice kŕmené Mn-deficientnou diétou majú škrupiny omnoho tenšie, krehkejšie s priesvitnými miestami a abnormalitami v ultraštruktúre škrupiny. (Gheisari a kol., 2011). Naopak zvýšený prídavok Mn do diéty mal pozitívny účinok na niektoré parametre škrupín (Abdallah a kol., 1994; Hossain a kol., 1994; Sazzad a kol., 1994). Inal a kol. (2001) zistil, že 25 mg Mn.kg<sup>-1</sup> krmiva je dostatočné množstvo pre produkciu a hmotnosť vajec, konverziu krmiva, ale pre optimálnu kvalitu škrupiny je požiadavka na Mn pre nosnice o čosi vyššia. V štúdiu od Fassani a kol. (2000) bol prídavok Mn v druhej fáze produkčného cyklu 40-200 mg Mn.kg<sup>-1</sup> do diéty nosníc a v nej bolo zaznamenané zlepšenie hrúbky škrupiny a zníženie strát vajec. Najhrubšie škrupiny boli zistené pri suplementácii 200

mg Mn.kg<sup>-1</sup> krmiva. Leach a Gross (1983) zaznamenali, že škrupiny nosníc, ktoré boli kŕmené Mn-deficientnou diétou mali škrupiny tenšie a vykazovali zmeny v ultraštruktúre mamilárnej vrstvy a tiež zníženie obsahu hexozamínov a hexurónovej kyseliny v organickej matrix.

#### DEPOZÍCIA MANGÁNU VO VAJCIACH

Rozpätie koncentrácie Mn vo vajciach, ktoré sa udáva v literatúre je pomerne dosť úzke. Danish Food Databank udáva koncentráciu Mn v surových vajciach okolo 0,46 mg.kg<sup>-1</sup> a koncentráciu Mn v žĺtku 0,97 mg.kg<sup>-1</sup> (Danish Food Composition Databank; <http://www.foodcomp.dk>). Elmadfa a Muskat (2003) stanovili strednú koncentráciu Mn vo vaječnom obsahu na 0,3 mg.kg<sup>-1</sup> čerstvej hmotnosti. Podľa Dobrzanskeho a kol. (2008) sa priemerná koncentrácia Mn vo vajci sa pohybuje v rozmedzí 0,39-0,48 mg.kg<sup>-1</sup> hmotnosti, pričom žiadne významné rozdiely medzi organickými a anorganickými formami Mn zaznamenané neboli. V škrupinách vajec (bez vnútorných membrán) je obsah Mn 0,4-1,1 mg.kg<sup>-1</sup> (Konieczna, 1993) alebo podľa Mabe a kol. (2003) je to 2,74 - 2,81 mg Mn.kg<sup>-1</sup> sušiny. Priemerný obsah Mn v škrupine vajec sa pohyboval v rozmedzí 1,3 - 1,8 mg.kg<sup>-1</sup> na sušinu. Akumulácia Mn z organických aditív nebola významne vyššia v porovnaní s MnO, aj napriek tomu, že tam bola tendencia k vyššej depozícii Mn vo vaječnom obsahu.

#### POĎAKOVANIE

Práca bola realizovaná v rámci projektu VEGA č.2/0045/12.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abdallah AG, Harms RH, Wilson HR, Ei-Husseiny OM. Effect of removing trace minerals from diet of hens laying eggs with heavy or light shell weight. *Poultry Science*, 1994; 73: 295-301.
- Bunesova A. Chelated trace minerals (Zn, Mn) in nutrition of hens. *Zeszyty Naukowe Przeglądu Hodowlanego*, 1999; 45: 309-317.
- Community Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC)No 1831/2003. [http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm\\_register\\_feed\\_additives\\_1831-03.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm_register_feed_additives_1831-03.pdf).
- Dobrzanski Z, Korczynski M, Chojnacka K, Górecki H, Opalinski S. Influence of organic forms of copper, manganese and iron on bioaccumulation of these metals and zinc in laying hens. *J.Elementol* 2008; 13(3): 309-319.
- Elmadfa I, Muskat E. *Wielkie tabele kalorii i wartosci odzywczych*. Wyd. MUZA S.A. 2003, Warszawa.
- Fassani JE, Bertechini AG, de Oliveira BL, Goncalves T, Fialho ET. Manganese in nutrition of the leghorn hens in the second cycle of production. *Revista Ciencia e Agrotecnologia*, 2000; 24: 468-478.
- GfE (Society of Nutrition Physiology). *Energie- und Nährstoffbedarf andwirtschaftlicher Nutztiere*, Nr 7: Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Legehennen und Masthüner (Broiler). DLG - Verlag, 1999; Frankfurt am Main, Germany.
- Gheisari AA, Sanei A, Samie A, Gheisari MM, Toghyani M. Effect of diets supplemented with different levels of manganese, zinc, and copper from their organic or inorganic sources on egg production and quality characteristics in laying hens. *Biol Trace Elem Res* 2011; 142(3):557-71.
- Hossain SM, Berechini AG, Nobre PTC. Egg production, tissue deposition and mineral metabolism in two strains of commercial layers with various level of manganese in diet. *Animal Feed Science and Technology*, 1994; 34: 271-275.
- Hossain SM, Berechini AG. Effect of varying manganese and available phosphorus levels in the diet on egg production and eggshell quality of layers. *Animal Feed Science Technology* 1998; 71: 303-308.
- Inal F, Coskun B, Gulsen N, Kurroglu V. The effects of withdraw of vitamin and trace mineral supplements from layers diets on egg yield and trace mineral composition. *British Poultry Science*, 2001; 42: 77-80.
- Klecker D, Zeman L, Jelinek P, Bunesova A. Effect of manganese and zinc chelates on the quality of eggs. *Acta Univ Agric Silvic Mendel Brun* 2002; 50: 59-68.

- Konieczna L. Skorupy jaj zrodtem zwiazkow mineralnych. *Biul Inf Drobiar*, 1993; 31(2): 21-24.
- Leach Jr RM. Metabolism and function of manganese. Trace elements in Human Health and Disease. Vol. II. PRASAD A.S. (ed.), Academic pr, New York, 1976; pp. 235-247.
- Leach Jr RM, Gross R. The effect of manganese deficiency upon the ultrastructure of the eggshell. *Poultry Science* 1983; 62: 499-504.
- Li SF, Luo XG, Lu L, Crenshaw TD, Bu YQ, Liu B, Kuang X, Shao GZ, Yu SX. Bioavailability of organic manganese sources in broilers fed high dietary calcium. *Animal Feed Science and Technology*, 2005; 124: 703-715.
- Lim HS, Paik IK. Effects of supplementary mineral methionine chelats (Zn, Cu, Mn) on the performance and eggshell quality of laying hens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2003; 16: 1804-1808.
- Mabe I, Rapp C, Bain MM, Nys Y. Supplementation of a corn-soybean meal diet with manganese, copper, and zinc from organic or inorganic sources improves eggshell quality in aged laying hens. *Poult Sci.* 2003; 82(12):1903-13.
- Mateos GG, Lazaro R, Astillero JR, Serrano MP. Trace minerals: what text books dont tell you. In: Re-defining Mineral Nutrition (Taylor-Pickard J and Toker L eds.), Nottingham University Press, Nottingham, 2005; pp. 41-43.
- McDowell LR. Manganese. Minerals in animals and human nutrition. 2nd ed. Elsevier Science, BV Amsterdam, Netherlands. 2003; pp. 335-356.
- National Research Council (NRC). Nutrient requirements of Poultry. 9th Revised ed. National Academy Press, Washington DC, 1994.
- Richards JD, Zhao J, Harrell RJ, Atwell CA, Dibner JJ. Trace mineral nutrition in poultry and swine. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2010; 23: 1527-1534.
- Roland Sr. DA. Research note: egg shell problems: estimates of incidence and economic impact. *Poultry Science*, 1988; 67: 1801-1803.
- Sazzad HM, Bertechini AG, Nobre PTC. Egg production, tissue deposition and mineral metabolism in two strains of commercial layers with various levels of manganese in diets. *Animal Feed Science and Technology*, 1994; 46: 271-275.
- Scott ML, Nesheim MC, Young RJ. Nutrition of the chicken, Scott ML (Ed.), Ithaca, NY, 1976; pp. 277-382.
- Sun Q, Guo Y, Li J, Zhang T, Wen J. Effects of methionine hydroxy analog chelated Cu/Mn/Zn on laying performance, egg quality, enzyme activity and mineral retention of laying hens. *J Poult Sci*, 2012; 49: 20-25.
- Swiatkiewicz S, Koreleski J, Dai QZ. The bioavailability of zinc from inorganic and organic sources in broiler chicken as affected by addition of phytase. *Journal of Animal and Feed Science*, 2001; 10: 317-328.
- Swiatkiewicz S, Koreleski J. The effect of zinc and manganese source in the diet for laying hens on eggshell and bones quality. *Veterinari medicina*, 2008; 53(10): 555-563.
- Washburn KW. Incidence, cause, and prevention of eggshell breakage in commercial production. *Poultry Science*, 1982; 61: 205-212.
- Yan F, Waldroup PW. Evaluation of Mintrex manganese as a source of manganese for young broilers. *International Journal of Poultry Science*, 2006; 5: 708-713.
- Zlotkin SH, Atkinson S, Lockitch G. Trace elements in nutrition for premature-infants. *Clin. Perinatol.* 1995; 22: 223-240.





**VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV**

**2012**

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

**VII. 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. 180 strán.

**ISBN 978-80-968618-9-7**

**EAN 9788096861897**



**ISBN 978-80-968618-9-7**